

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

Contribuição para o monitoramento do vírus da Síndrome da Mancha Branca na carcinicultura de Santa Catarina

JANICE DA SILVA MARQUES

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Aqüicultura do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Aqüicultura.

Florianópolis, Santa Catarina

2008

MARQUES, Janice da Silva

Contribuição para o monitoramento do vírus da Síndrome da Mancha Branca na carcinicultura de Santa Catarina / Janice da Silva Marques. Florianópolis, 2008.

51p.: il.

Dissertação de mestrado em Aquicultura. Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina. 2008.

Orientadora: Prof. (a) Dr. (a) Maria Risoleta Freire Marques

Palavras chaves: 1. WSSV, 2. *Litopenaeus vannamei*, 3. *Chasmagnathus granulata*, 4. PCR *nested*, 5. Vírus.

**Contribuição para o monitoramento do vírus da síndrome da
mancha branca na carcinicultura de Santa Catarina.**

Por

JANICE DA SILVA MARQUES

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

MESTRE EM AQUICULTURA

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

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

Banca Examinadora:

Dra. Maria Risoleta Freire Marques - *Orientadora*

Dra. Alitiene Moura Lemos Pereira

Dr. Walter Quadros Seiffert

Dedico este trabalho à minha ilustre mãe, Cecília Meireles da Silva Marques, luz da minha vida, orgulho e incentivo, para sempre.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar tenho que agradecer a Deus, por enviar-me força, coragem e luz, sempre, guiando-me pelos caminhos iluminados, mostrando-me a trilha do meu existir.

Aos meus pais e meu irmão, razão da minha existência, o amor é tudo!

À Prof.(a) Dra.(a) Maria Risoleta Freire Marques, minha orientadora, pela oportunidade concedida, atenção e compreensão dedicadas e pelos grandes ensinamentos.

Às minhas colegas: Juliana Moser, muito obrigada pelos vários ensinamentos, trocas de idéias e conselhos. Isabel Cristina Muller, obrigada pela amizade que criamos, por ouvir-me pacientemente, pelos ensinamentos e idéias trocadas.

A toda equipe LABICAI: Jacó, Marília, Guilherme, Juliano, Karin, Igor, Talita, e também ao professor Afonso C. D. Bairy. Muito obrigada pelo apoio e acolhida no laboratório, ensinamentos passados pelos corredores, trocas de idéias. Vocês foram fundamentais ao meu ingresso no mundo da Biologia Molecular.

A Felipe e Rogério do Nascimento Vieira, pela oportunidade concedida na fazenda de cultivo, abrindo as portas para coleta de amostras e pela ajuda concedida nas coletas.

A André Alfing, segundo maior catador de caranguejos (depois de mim) dos manguezais locais, por toda força, ajuda, carinho, companheirismo, incondicional. Sem dúvida minha versão masculina neste mundo. Vou te amar para sempre.

Às professoras Aimê R. M. Magalhães e Andréa Freire, pela ajuda com a chave de identificação dos Brachyura do litoral brasileiro.

A Dave Murray, Bruce Dickinson, Adrian Smith, Nicko MacBrain, Steve Harris e Janick Gers, magos das melodias à altura do grande Ludwig Van, seus acordes acelerados me deram força e ânimo para a realização deste trabalho. Trilha sonora desta dissertação, com direito a show ao vivo “em casa” e souvenir. Thank you!

A todas as pessoas, que direta ou indiretamente, colaboraram de alguma forma para a realização deste trabalho. Muito obrigada!

SUMÁRIO

Resumo

Abstract

1.Introdução.....	9
2. Manuscrito 1.....	16
Resumo.....	16
1.Introdução.....	16
2. Material e Métodos.....	18
2.1 Coleta das amostras.....	18
2.2 Extração de DNA genômico.....	20
2.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	20
2.4 Eletroforese em gel de agarose.....	21
2.5 Clonagem do fragmento.....	21
2.6 Confirmação da presença do fragmento (inserto).....	22
2.7 Sequenciamento e análise da seqüência obtida.....	22
3. Resultados.....	23
3.1 Produtos de PCR.....	23
3.2 Sequenciamento.....	24
4. Discussão.....	25
5. Referências.....	26
3. Manuscrito 2.....	28
Resumo.....	28
1.Introdução.....	29
2. Material e Métodos.....	30
2.1 Coleta das amostras.....	30
2.2 Extração de DNA genômico.....	32
2.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	32
2.4 Eletroforese em gel de agarose.....	33
3. Resultados.....	34
4. Discussão.....	37
5. Referências.....	39
4. Conclusões Finais e Perspectivas.....	41
5. Referências Bibliográficas.....	45
6. Anexo.....	49

RESUMO

A carcinicultura é o segmento da aqüicultura que mais cresce no mundo. Porém, o maior problema enfrentado pela indústria é a ocorrência de enfermidades que assolam os cultivos. Em Santa Catarina, a produção de camarões cultivados era crescente até os últimos anos, quando o Estado passou a ser afetado por perdas drásticas na produção causadas pelo vírus da Síndrome da Mancha Branca (*White Spot Syndrome Virus – WSSV*). Assim sendo, foi estabelecido um conjunto de medidas de controle da enfermidade envolvendo pesquisas em diferentes áreas. O presente estudo foi desenvolvido dentro desta perspectiva, visando estimar a prevalência do vírus em exemplares da espécie endêmica de caranguejo (*Chasmagnathus granulata*) do ambiente natural e do viveiro de cultivo de uma fazenda, onde foram investigados também camarões cultivados (*Litopenaeus vannamei*). Paralelamente foi realizada a padronização do diagnóstico do WSSV através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) de dois passos (*nested*) utilizando-se os iniciadores recomendados pela OIE e anteriormente descritos na literatura. Foi estimada uma prevalência no mínimo de 5% e no máximo de 23% para os caranguejos coletados no ambiente. Na fazenda, no Tempo1 de coleta, os caranguejos apresentaram prevalência em torno de 97% e os camarões em torno de 90%. No Tempo2 não foi detectada a presença do WSSV nos caranguejos e nos camarões foi detectada uma prevalência do vírus em torno de 27%. Neste estudo, a utilização da PCR como ferramenta de diagnóstico e detecção de estágios virais latentes mostrou-se uma arma eficiente no monitoramento desta enfermidade presente nos cultivos.

ABSTRACT

The carciniculture is the branch of aquaculture that have been growing more in the world. However, the main problem the industry has faced is the occurrence of diseases which have been devastating the cultivations. In Santa Catarina state, the production of cultivated shrimps was crescent until the last years, when the state started to be affected by great losses in productivity due the white spot syndrome virus (WSSV). Since then, it was established a set of measures for the disease control, including studies in different areas. This work was developed according to this perspective, trying to estimate the prevalence of the virus in samples of the endemic species of a crab (*Chasmagnathus granulata*) from the natural environment and the cultivation ponds of a farm, where the cultivated shrimp (*Litopenaeus vannamei*) was, too, investigated. At the same time, it was carried out the standardization of the WSSV diagnostic through the Polimerase Chain Reaction (PCR) of two steps (nested), using the primers recommended by OIE and previously described in the literature. It was estimated a prevalence of 23% to the crabs collected in the environment. In the farm, during the first collection, the crabs showed a prevalence of 97%, and the shrimps 90%. In the second collection, it was not detected the WSSV presence in crabs, but in the shrimps it showed a prevalence around 27%. The use of PCR as a tool to the diagnostic and detection of latent viral stages has demonstrated to be an efficient weapon for monitoring the viral diseases in the cultivations.

INTRODUÇÃO

O cultivo de camarão marinho, ou carcinicultura, é o segmento da aquicultura mundial que mais cresceu nas últimas três décadas nos países sub-tropicais e tropicais em desenvolvimento. Em 2002, a produção mundial do setor foi de 1.319.128 ton. em 2.049.426 hectares de viveiros (ABCC, 2003). Em 2004, segundo dados da *Food and Agriculture Organization* (FAO), a produção mundial de camarões foi de 5.668.862 toneladas (FAO, 2006). Na produção mundial, destacam-se os países asiáticos, como China, Tailândia, Vietnã, Índia, Indonésia, Bangladesh, Taiwan, Filipinas, Malásia e Sri-Lanka. A espécie mais cultivada no continente asiático é a espécie exótica *Litopenaeus vannamei* introduzida no continente com grande sucesso, devido ao fato de ser esta uma espécie mais detritívora (com menor exigência de conteúdo protéico na formulação de rações, tornando o cultivo mais econômico), seguida pelas espécies locais, *Penaeus monodon* e *Penaeus japonicus*.

Na carcinicultura do Hemisfério Ocidental, destacam-se o Equador, o Brasil e o México em termos de produtividade (FAO, 2006). O Equador liderou a produção até 1998, quando chegou a produzir 130.000 toneladas. No entanto, a partir de 1999 a atividade naquele país foi arrasada pela disseminação do vírus da Síndrome da Mancha Branca que dizimou os camarões, tendo a produção atingido apenas 37.000 toneladas no ano 2000.

Antes do Equador, os países asiáticos também foram atingidos por essa enfermidade, mas o grande investimento em pesquisas e a utilização de práticas de manejo e biossegurança adequadas, permitiram a recuperação da produção no continente mais rapidamente e com prejuízos menores (Flegel, 2007).

Embora a exploração comercial da carcinicultura marinha no Brasil tenha começado no início da década de 80 com a introdução de *P. japonicus* no Nordeste, somente a partir da segunda metade dos anos 90 houve domínio da tecnologia que passou a permitir o aproveitamento de parte do imenso potencial que o país apresenta. Devida a excelente adaptação ao cativeiro, o cultivo da espécie *Litopenaeus vannamei* foi implantado, alcançando excelentes índices zootécnicos. Essa espécie é oriunda da costa leste do Pacífico desde o extremo norte do Golfo da Califórnia até Tumbes, Perú. É bentônico sobre a plataforma continental a profundidades que variam entre 5 a 72 metros (Pérez Farfante & Kensley, 1997).

A partir do ano 2003, o crescimento da atividade no Brasil foi tão grande, que chamou a atenção da concorrência mundial, e muitos especialistas apontaram este país como provável detentor da futura hegemonia no setor. Em Santa Catarina, a produção comercial teve início a partir de 1998 e até 2004 aumentou com uma taxa média anual de crescimento superior a 50%. Das 76.000 toneladas de *L.vannamei* produzidas em 2004 no Brasil, um total de 4.189 toneladas foram produzidas em Santa Catarina (Diário Catarinense, abril de 2005). Em 2004, o Estado contava com mais de 1500 hectares de viveiros distribuídos em 108 fazendas (Gelinski, 2005).

Atualmente, uma grande ameaça ao desenvolvimento da carcinicultura está representada pelas doenças, responsáveis pelos maiores prejuízos registrados no setor. As enfermidades virais provocam as maiores perdas (Paez-Osuna, 2001) e, atualmente, duas são destaque no Brasil: a

Necrose Muscular Infecciosa que vem assolando os cultivos do Nordeste, e a Síndrome da Mancha Branca, presente na carcinicultura catarinense.

A Síndrome da Mancha Branca foi pela primeira vez registrada em cultivos de *Penaeus japonicus* no Japão em 1993 (Nakano et al, 1994). O agente etiológico desta enfermidade é um vírus (*White Spot Syndrome Virus*, WSSV), o qual é o agente patogênico que mais trouxe efeitos negativos aos cultivos de camarão ao redor do mundo, tendo afetado mais de 20 países. Os registros de seus primeiros estragos datam de 1993 em cultivos na China e no Japão. Em 1995, o WSSV foi detectado em uma fazenda do Texas, EUA, onde segundo Lightner (1998) foi introduzido no país através da importação de camarões congelados da Ásia. A partir de 1999, sua presença foi relatada na Nicarágua, Guatemala, Honduras, Panamá, Equador, Colômbia e Peru (Chamberlain, 1999).

Após os surtos ocorridos na Ásia e nos EUA na década de 90, o WSSV vem sendo intensamente estudado por diferentes grupos de diversos países. É um vírus encontrado tanto em fazendas de camarão, como no ambiente natural. Afeta diferentes espécies de camarões peneídeos cultivados e caracteriza-se por altas e rápidas mortalidades nas populações infectadas. Na espécie *L.vannamei* a taxa de mortalidade alcança níveis de 90 a 100% dentro de 3 a 7 dias após a infecção (ZHAN et al. 1998). É extremamente virulento e pode atacar uma ampla variedade de tecidos de origem ecodérmica e mesodérmica (Lo et al, 1997). Os sinais clínicos mais comuns são pontos brancos circulares na carapaça, muitas vezes acompanhados de uma coloração avermelhada no corpo do animal. A progressão da doença é caracterizada pela falta de alimentação dos animais que param de comer (o que caracteriza o intestino vazio) seguida pela aparição de animais moribundos nadando na superfície das beiradas dos viveiros. Entretanto, os pontos brancos na cutícula, cuja presença caracteriza a denominação da enfermidade não constituem um sinal clínico exclusivo dessa síndrome, podendo ser causados por uma outra enfermidade de origem bacteriana ou até mesmo por condições ambientais, como alta alcalinidade da água (Wang, 2002).

O WSSV foi inicialmente classificado como um baculovirus, pertencente à família Baculoviridae, porém, após estudos mais detalhados foi reclassificado taxonomicamente em uma nova família, especialmente criada para tal, a família Nimaviridae, com um novo gênero Whispovirus (Mayo, 2002; ICTVdB, 2006). O WSSV apresenta um envelope trilaminar de morfologia oliveo-baciliforme com dimensões entre 250-380 nm de comprimento e 80-120 nm de largura. Uma outra característica morfológica é a presença de uma extensão em forma de filamento na extremidade viral (Durand et al, 2007). O genoma do WSSV consiste em uma molécula de DNA dupla fita, cuja seqüência completa foi obtida a partir de diferentes cepas isoladas em distintas regiões geográficas. O tamanho do genoma completo foi reportado para uma cepa isolada da China como sendo constituído de 305107 pares de base (pb) (GenBank nº de acesso AF332093); para uma cepa isolada da Tailândia de 292967 pb (GenBank nº de acesso AF369029) e para uma cepa isolada de outra localidade da China de 307287 pb (GenBank nº de acesso AF440570). Segundo Chen et al (2002), as seqüências destas três cepas isoladas são quase idênticas. As diferenças no tamanho são devido a várias pequenas inserções e uma grande deleção (aproximadamente 12 kb). Marks (2005) caracterizou uma cepa isolada da Tailândia em 1996 com o maior genoma identificado até então (aproximadamente 312 kb) e sugeriu que esta poderia ser uma cepa ancestral às outras isoladas

posteriormente, as quais diminuíram o tamanho do genoma como uma vantagem para sua replicação. Chang et al (2001) sugeriram que vírus similares ao WSSV foram reportados infectando células mesodérmicas como hemócitos, células conectivas e hematopoiéticas de espécies de brachyuras da Europa e América do Norte e especularam a possibilidade destes vírus estarem conectados com a origem e disseminação do WSSV. Esses vírus foram reportados muito antes do aparecimento do WSSV e têm morfologia similar à dele.

Análises de sequenciamento mostraram que todas as cepas de WSSV contêm um genoma circular de dupla fita de DNA em torno de 300 kb onde foram identificadas 531 possíveis janelas de leitura de transcrição gênica (*Open Reading Frames* – ORFs), das quais 181 ORFs provavelmente codificam proteínas funcionais. Dentre estas, 48 ORFs foram identificadas como apresentando 20 a 60% de homologia com proteínas conhecidas de outros vírus ou organismos. O restante das ORFs codificam proteínas sem homologia com outras já conhecidas. A estratégia de infecção do WSSV é ainda totalmente desconhecida e diferente de outros vírus, necessitando ser investigada *ab initio*.

Huang (2002) realizou a análise proteômica de 24 proteínas virais (*Viral Protein-VP*) e Tsai et al (2004) realizaram análise genômica e proteômica de 39 proteínas estruturais do WSSV. Atualmente, muitos estudos têm sido direcionados à caracterização e análise funcional de proteínas do envelope viral, que estariam diretamente relacionadas às estratégias de infecção (Mariëlle, 2001; Li, 2006). Segundo van Hulten et al (2000), as cinco proteínas virais maiores foram nomeadas VP28, VP26, VP24, VP19 e VP15. As proteínas VP28 e VP19 foram identificadas como proteínas estruturais pertencentes ao envelope viral. Yoganandhan et al (2006) relataram a inibição da transcrição do gene da VP28 na resistência do camarão de água doce *Macrobrachium rosenbergii* ao WSSV. Li et al (2005) sugeriram que a VP31 exerce uma importante função na biologia do vírus, atuando na fusão vírus-célula e célula-célula por possuir na sequência do gene que a codifica um motivo RGD (*Arginine-Glycine-Aspartate*) associando a este tripeptídeo de reconhecimento um papel na interação entre a VP31 e as células do hospedeiro. A VP31 já havia sido reportada anteriormente no estudo de Tsai et al (2004), mas sem estudos sobre sua localização ou função. A presença de um motivo RGD tem sido amplamente associada a um papel de mediador na interação vírus-hospedeiro. Essa proteína do envelope viral também possui uma treonina na quarta posição do motivo RGD, o que é considerado crítico na interação com as integrinas. A VP31 pode ser uma proteína de fusão que contém um domínio envolvido na ligação com outra proteína do envelope para o ancoramento na membrana. Estes autores sugerem ainda que a VP31 talvez seja uma proteína chave na invasão celular pelo vírus e pode ser uma boa candidata para pesquisas e estudos com receptores na superfície da célula do camarão. Anticorpos contra proteínas do envelope viral têm sido usados em testes de neutralização com sucesso (Mariëlle, 2001; Li, 2005).

Uma dificuldade que os pesquisadores têm encontrado consiste no pouco conhecimento a cerca dos mecanismos de resposta dos camarões e outros artrópodes às infecções virais (Flegel, 2007). Os crustáceos, assim como outros invertebrados, possuem apenas um sistema imune inato ou natural, diferentemente dos vertebrados, que possuem além deste, um sistema adaptativo ou adquirido, filogeneticamente mais novo e altamente complexo e eficiente, caracterizado pela presença de inúmeros receptores, anticorpos específicos e células de memória. Esse sistema adaptativo ocorre

exclusivamente nos vertebrados e sua ausência nos invertebrados inviabiliza qualquer tentativa de desenvolvimento de vacinas, diminuindo substancialmente a possibilidade de prevenção e controle de doenças nestes animais (Bachere, 2000; Marques & Barracco, 2000). Por essa razão, acreditava-se até pouco tempo, que os crustáceos não teriam nenhum tipo de resposta imune às infecções virais. Flegel (2007), porém, relatou que experimentos laboratoriais e observações de campo na última década indicam que os camarões podem expressar uma resposta específica e adaptativa aos patógenos virais, a qual não pode ser explicada pelo atual conhecimento sobre suas respostas de defesa humoral e celular. Robalino (2005) reportou a indução de proteção antiviral em *Litopenaeus vannamei* tratados com RNA dupla fita que aumentou a resistência em animais desafiados com WSSV e sugeriu, conseqüentemente, o envolvimento do RNA de interferência nos mecanismos de resposta antiviral em camarões. Xu (2007) conseguiu neutralizar experimentalmente a infecção pelo WSSV em *Penaeus japonicus*, através do silenciamento do gene da VP28 por uma curta seqüência específica do RNA de interferência. Nos últimos anos, muitas pesquisas têm sido realizadas na busca por moléculas envolvidas na defesa dos camarões às infecções virais. Recentemente alguns genes envolvidos na resposta imune de camarões peneídeos têm sido clonados e caracterizados (Luo et al, 2003; He et al, 2005).

Como conseqüência de um enorme esforço técnico-científico e econômico do setor produtivo, os impactos do WSSV vêm sendo minimizados gradativamente ao redor do mundo. No Equador, de 1999 até hoje, o índice de infecção vem sendo reduzido consideravelmente, mostrando recuperações cada vez maiores em termos de produtividade. O setor camaroneiro equatoriano concentrou seus esforços no apoio voltado para pesquisas, entre elas aquelas sobre o melhoramento genético para a obtenção de reprodutores que permitam gerar larvas resistentes. Estes trabalhos foram realizados de duas maneiras: a primeira, mediante a seleção de reprodutores livres do WSSV, mantidos em áreas limpas, e a segunda, mediante a recuperação de animais sobreviventes, para serem levados até a idade de reprodução com o mesmo objetivo. Aparentemente, a segunda alternativa tem sido a que melhores resultados têm produzido. Vários grupos de produtores debruçaram-se sobre programas complexos de melhoramento genético com seleção fenotípica, mediante o isolamento de duas características: sobrevivência e crescimento. Em várias fazendas foram selecionados camarões machos e fêmeas com características similares, e realizados esforços para manter o isolamento dos reprodutores (por grupos fenotípicos), marcados apropriadamente e alocados em diferentes estações de reprodução. Os produtos (larvas) foram enviados a várias fazendas, com características ambientais distintas, para observar seu desenvolvimento para que a partir desses resultados fossem sendo definidas novas linhas de reprodutores.

O primeiro foco do WSSV no Brasil foi registrado na região do Complexo Lagunar de Santa Catarina, composto principalmente pelas Lagoas: do Mirim, de Imaruí, de Santo Antônio, de Santa Marta, do Camacho, entre as maiores. No início do primeiro cultivo da safra 2004/2005, iniciaram-se mortalidades massivas de camarões nos viveiros de 19 fazendas de camarão da região da Pescaria Brava (Laguna) e também Imaruí. Os sintomas da doença começaram a surgir em novembro de 2004 e a enfermidade foi diagnosticada em 11 de janeiro de 2005, quando foram recebidos os resultados das análises das amostras enviadas para diagnóstico na Universidade do Arizona, onde se encontra

um dos laboratórios de referência da Organização Internacional de Epizootias (OIE) na área de patologia de crustáceos. A presença do vírus foi confirmada também por análises realizadas na Universidade Federal de Santa Catarina, no Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica, que confirmou o diagnóstico positivo em 19 de janeiro de 2005. As fazendas contaminadas foram interditadas e cloradas imediatamente e o repovoamento suspenso até setembro de 2005, promovendo assim o vazio sanitário. A região do foco, abrangendo vinte empreendimentos, foi isolada e a enfermidade foi notificada à OIE.

A OIE é uma organização intergovernamental criada pelo Convênio Internacional de 25 de janeiro de 1924, firmado por 28 países. Em 2002, a OIE contava com 164 países membros. Essa entidade possui uma base mundial de dados sobre sanidade animal e cabe aos países membros notificarem a ocorrência de enfermidades e aos laboratórios de referência e centros colaboradores enviarem informações de pesquisa e campo. Com base nestes dados, a OIE efetua mensagens de emergência e informações sanitárias semanais, analisa e difunde informação científica, e estabelece diretrizes para a sanidade animal mundial com o objetivo de prevenção e controle da propagação de enfermidades, fomentando a segurança do comércio mundial de animais. As normas e recomendações da OIE incluem medidas de biossegurança, vigilância, monitoramento e metodologias de diagnóstico das enfermidades listadas pela Organização. Estas enfermidades são aquelas consideradas importantes do ponto de vista sócio-econômico e de saúde pública e que tem repercussão no comércio internacional de animais aquáticos. Dentre as oito enfermidades de crustáceos listadas pela OIE, a Síndrome da Mancha Branca é a que recebe maior atenção pela comunidade científica mundial, devido ao seu impacto avassalador na produção aquícola.

Assim como o primeiro foco, também a segunda manifestação da doença em Santa Catarina ocorreu em fazendas às margens da Lagoa de Imaruí. Segundo Seiffert et al (2005) problemas de qualidade da água e do solo foram determinantes para o aparecimento da enfermidade. A renovação de água e a despesca de emergência dos empreendimentos infectados provavelmente geraram um efeito em cadeia no ecossistema da lagoa, que é a principal fonte de abastecimento e captação de água das fazendas da região, promovendo a disseminação do agente patogênico.

Como o vírus permanece ativo, livre na natureza, pelo espaço de quatro a cinco dias, ele pode ter se disseminado através de correntes marinhas, podendo ainda estar presente no ambiente há vários anos. A manifestação da doença pode ter ocorrido pelo intenso desequilíbrio que as fazendas do primeiro foco apresentavam, como altas densidades de cultivo, má preparação de solo e água, falta de renovação de água, excesso de matéria orgânica no solo, oxigênio baixo, transparência baixa, presença de pesticidas e temperaturas entre 25 e 28°C (ótima para a replicação viral).

Em 2004, antes da doença, o Estado chegou a produzir 4,2 mil toneladas de camarão. Na atual safra a produção foi reduzida para 300 toneladas. Em 2005, o WSSV se espalhou pelo Estado e atingiu as três áreas produtoras: o núcleo Sul (Região de Laguna), o núcleo Centro (Região de Tijucas) e o núcleo Norte (Região de São Francisco). Como o vírus chegou ao Estado e como ele se disseminou são questões que permanecem ainda em aberto. O inquérito epidemiológico da CIDASC (Companhia Integrada de Desenvolvimento Agrícola do Estado de Santa Catarina) não chegou a conclusões sobre a origem da infecção viral porque nem todas as fazendas tinham controle e registro

rigorosos de entrada e saída de produtos e de pessoas. Como a origem do foco ocorreu em fazendas que apresentavam grande desequilíbrio nas condições e parâmetros de cultivo, poder-se-ia considerar a hipótese de que se as condições estivessem apropriadas nestas propriedades o vírus poderia não ter se manifestado.

A presença do WSSV no ambiente natural é comum na Ásia e nos Estados Unidos (Lo et al, 1996a; Chang et al, 2001; Karunasagar et al, 2001; Vaseeharan et al, 2003). Várias espécies endêmicas de crustáceos e outros artrópodos são hospedeiros e portadores assintomáticos deste vírus. Entre as inúmeras espécies hospedeiras já registradas estão os caranguejos *Charybdis annulata*, *Charybdis cruciata*, *Macrophthalmus sulcatus*, *Gelasimus marionis nitidus*, *Metopograpsus messor* (Karunasagar et al, 2001), *Calappa lophos*, *Portunus sanguinolentus*, *Charybdis feriata* (Kou, 1998), *Paratelphusa hydromous* e *Paratelphusa pulvinata* (Hameed, 2001); também as lagostas *Panulirus ornatus*, *Panulirus versicolor*, *Panulirus longipes* e *Panulirus penicillatus* (Kou, 1998); além de inúmeras espécies de camarões, entre eles o *Macrobrachium rosenbergii* (Hameed, 2000), relatado como sendo resistente ao vírus.

Segundo a OIE (2006), os crustáceos decápodes (marinhos e dulcícolas) são hospedeiros suscetíveis ao desenvolvimento da enfermidade, enquanto crustáceos não-decápodes, como copépodes (Lo et al, 1996a; Hameed, 2001) e artêmias (Chang et al 2002; Li, 2003), outros artrópodes não-crustáceos, como insetos e Isópodos (Lo et al, 1996a), e outros animais, como poliquetas (Vijayan, 2005) e rotíferos (Yan, 2004), podem acumular altas concentrações de partículas virais viáveis, apesar de não existirem ainda evidências da replicação do WSSV nestes organismos. No caso de alguns destes organismos foi associada a transmissão do WSSV a camarões em condições experimentais (Zhang, 2006; Yan, 2004).

A grande quantidade desses vetores nos viveiros de cultivo (fauna acompanhante) e no entorno das fazendas (fauna circundante) representa a impossibilidade de erradicação do patógeno. No entanto, a experiência asiática demonstra que é possível conviver com o vírus sem a manifestação da doença, se mantidas as condições ideais de cultivo (Tsai, 1999; Flegel, 2004; Umesha, 2006).

Para o convívio com o WSSV sem prejuízos para a atividade, os países asiáticos investiram substancialmente em pesquisas, visando conhecer o vírus, as relações patógeno-hospedeiro em distintos hospedeiros, e as relações patógeno-hospedeiro-ambiente. Após uma década de pesquisas, atualmente, a Ásia representa uma hegemonia na carcinicultura mundial, apesar da disseminação do WSSV por todo o continente.

Neste sentido, torna-se necessária a criação de uma zona de vigilância em Santa Catarina, onde os animais são objeto de uma série de investigações sistemáticas, e a realização de uma ampla gama de pesquisas para subsidiar a formulação de estratégias para o controle da enfermidade. O conhecimento sobre a cepa viral presente no Estado e sobre seu comportamento nos hospedeiros e nas condições ambientais locais é a base para o desenvolvimento de condições ideais de cultivo com a presença do WSSV sem a manifestação da doença.

Segundo Waikhom (2006), a passagem de uma cepa de WSSV por diferentes hospedeiros induz uma variação genômica e altera a patogenicidade do vírus. Este autor identificou diferenças na

virulência de uma mesma cepa após a passagem por duas espécies distintas de caranguejos. Wang et al (1999) detectaram diferenças na virulência de cepas isoladas de diferentes regiões geográficas.

A identificação de vetores e hospedeiros intermediários presentes nos cultivos catarinenses contribui para o monitoramento do vírus no ambiente e a identificação de sua rota biogeográfica, podendo fornecer ainda subsídios para estudos de patogenicidade. A única espécie catarinense reportada como hospedeira para o WSSV é o siri azul *Callinectes sapidus*, porém o vírus foi detectado em animais da costa norte-americana (Chang et al, 2001).

Na busca de um modelo de estudo para o WSSV em Santa Catarina, o caranguejo nativo *Chasmagnathus granulata* (o gatanhão) corresponde perfeitamente a este objetivo. Esta espécie de caranguejo, não apresenta interesse comercial (ao contrário do siri azul), ocorre amplamente por todo o Estado e é abundante nos viveiros de cultivo, fazendo parte da fauna acompanhante e circundante às fazendas. Muitos trabalhos têm sido realizados no Brasil, Argentina e Uruguai utilizando esta espécie como um bioindicador de condições ambientais adversas, devido sua fácil adaptação à mudanças ambientais significativas (Moreno, 2003; Gutiérrez, 2004; Medesani, 2004; Zanotto, 2004; Ferrer, 2006).

Com o intuito de investigar a presença do vírus no ambiente natural, avaliar essa espécie de caranguejo como hospedeira para o WSSV e estimar a prevalência do vírus em exemplares coletados no ambiente, o presente estudo utilizou animais da Lagoa de Imaruí (origem do foco) (Manuscrito 1). O presente trabalho também teve por objetivo monitorar o WSSV em exemplares de *Chasmagnathus granulata* presentes no viveiro de uma fazenda de cultivo de *Litopenaeus vannamei*, e em exemplares de camarões cultivados neste mesmo viveiro, confrontando os resultados obtidos nas duas espécies em dois tempos distintos de coleta (Manuscrito 2). Paralelamente, o presente estudo teve por objetivo padronizar as condições para o diagnóstico do WSSV através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) de dois passos (*nested*) utilizando-se os iniciadores recomendados pela OIE e anteriormente descritos por Lo et al (1996b). Os dois manuscritos serão submetidos para publicação no periódico Aquaculture. As normas para a publicação encontram-se em anexo.

Essa é uma etapa preliminar de um estudo mais abrangente, que visa estimar a prevalência do WSSV em exemplares destas espécies no ambiente natural e em viveiros de cultivo de outras fazendas do complexo Lagunar de Santa Catarina e de outras regiões produtoras de Santa Catarina: núcleo Centro (Região de Tijucas) e núcleo Norte (Região de São Francisco).

Detecção do vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV) no caranguejo *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851) em Santa Catarina, Brasil

Marques, J.S. ; Marques, M.R.F.

Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica, Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil

Resumo

O vírus da Síndrome da Mancha Branca (*White Spot Syndrome Virus* - WSSV) é o agente patogênico causador das maiores perdas econômicas registradas na carcinicultura mundial. Quando introduzido no ambiente, dissemina-se rapidamente, infectando diferentes espécies de organismos aquáticos, os quais podem tornar-se reservatórios alternativos para o patógeno. Em Santa Catarina, o WSSV foi registrado pela primeira vez em janeiro de 2005, em cultivos de *Litopenaeus vannamei*, causando sérios prejuízos para o setor. O caranguejo nativo *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851) faz parte da fauna acompanhante e circundante dos viveiros de cultivo. No presente estudo, a ocorrência do WSSV foi investigada em *C. granulata* coletados na Lagoa de Imaruí, sul do Estado de Santa Catarina. As análises foram realizadas através de PCR *nested* e os resultados obtidos foram confirmados pelo sequenciamento do fragmento de 941pb obtido. O monitoramento do WSSV nas espécies endêmicas e de sua distribuição geográfica contribuem para o conhecimento da disseminação viral no ambiente e para o entendimento das relações patógeno-hospedeiro em diferentes espécies.

Palavras chaves: WSSV; *Chasmagnathus granulata*; Lagoa de Imaruí; PCR *nested*

1. Introdução

O vírus da Síndrome da Mancha Branca (*White Spot Syndrome Virus* - WSSV) é o agente patogênico responsável pelas maiores perdas registradas na carcinicultura mundial. Altamente virulento, dissemina-se rapidamente pelo ambiente e infecta não somente camarões de cultivo, mas também diversas espécies de crustáceos.

Em todo o mundo, foram registradas várias espécies endêmicas de crustáceos como hospedeiros e portadores assintomáticos deste vírus. Muitos estudos têm sido realizados visando investigar a susceptibilidade de distintos hospedeiros e a prevalência do WSSV no ambiente natural. Lo et al (1996a) investigaram a prevalência do WSSV em camarões, caranguejos e outros artrópodes da costa de Taiwan e determinaram-na como sendo igual a 40%; Chang et al (2001) estimaram a prevalência deste vírus como sendo de aproximadamente 27% em populações do siri azul *Callinectes sapidus* da costa atlântica norte-americana; Hossain et al (2001) encontraram 49% de prevalência

para o WSSV em camarões selvagens da costa de Bangladesh e Vaseeharan et al (2003) relataram uma prevalência igual a 23% em crustáceos selvagens da Índia.

Segundo Waikhom et al (2006), a passagem de uma cepa de WSSV por diferentes hospedeiros induz uma variação genômica e altera a patogenicidade do vírus. Estes autores identificaram diferenças na virulência de uma mesma cepa, após sua passagem por duas espécies distintas de caranguejos. Wang et al (1999) mostraram diferenças sutis na virulência de cepas isoladas de diferentes regiões geográficas e sugeriram que a susceptibilidade ao agente patogênico pode variar de acordo com a espécie e o estágio de vida do hospedeiro.

O estudo e a identificação de hospedeiros potenciais para o WSSV nos cultivos catarinenses pode contribuir para o monitoramento do vírus no ambiente e identificação de sua rota biogeográfica, além de fornecer subsídios para estudos de patogenicidade.

O caranguejo gatanhão, *Chasmagnathus granulata*, é uma espécie nativa de Santa Catarina, que ocorre desde o Rio de Janeiro até o Golfo San Matias na Argentina, vivendo em estuários de sedimento areno-lodoso (Buckup & Buckup, 1999). Ocorre em toda a extensão do estuário do Complexo Lagunar do sul do Estado e nas fazendas de cultivo de camarão ali localizadas, onde é encontrado em abundância nos viveiros, abrindo tocas e galerias nos taludes.

Após o registro do primeiro foco da Síndrome da Mancha Branca em Santa Catarina em janeiro de 2005, a enfermidade alastrou-se por todo o estado, atingindo fazendas de diferentes regiões geográficas. A partir de então, a região do foco foi isolada e o repovoamento suspenso até setembro daquele ano, estabelecendo-se assim o vazio sanitário (Seiffert et al, 2005). Após o vazio sanitário, novos povoamentos foram realizados em fazendas distintas. No entanto, perdas subseqüentes para os produtores foram registradas.

Este trabalho detectou a ocorrência e estimou a prevalência do WSSV em uma população do caranguejo gatanhão (*C. granulata*) coletada na região do Complexo Lagunar do sul de Santa Catarina, visando identificar hospedeiros para o WSSV e contribuir para o monitoramento do comportamento desta cepa viral na biota local.

A criação de uma zona de vigilância, onde os animais possam ser objetos de uma série de investigações sistemáticas e onde a identificação da rota biogeográfica do WSSV possa ser determinada são de suma importância e podem contribuir para o delineamento de estratégias de combate ao vírus, minimizando seu impacto sobre a carcinicultura em Santa Catarina.

2. Material e Métodos

2.1. Coleta das amostras

Em Fevereiro de 2006 foram coletados aleatoriamente 150 exemplares de *Chasmagnathus granulata* de peso total médio de $13,53 \pm 5,12$ g, machos e fêmeas, na Lagoa de Imaruí, estuário do Complexo Lagunar, Santa Catarina (Fig.1).

O número de animais coletados foi estabelecido com base na recomendação da Organização Internacional de Epizootias (OIE, 2006), segundo a qual, com uma amostragem de 150 animais, pressupondo-se uma prevalência viral de 2%, é possível estimar a prevalência do vírus em um determinado local, com um grau de confiança de 95%.

Os caranguejos foram identificados segundo a chave publicada por Melo (1996) para os Brachyura do litoral brasileiro. Os animais foram anestesiados por hipotermia (em gelo) e de cada espécime foram retiradas as brânquias e as patas. Os tecidos de cada um dos espécimes foram fixados separadamente em etanol 95% (1:10 v/v).

2.2. Extração de DNA genômico

A extração de DNA genômico foi realizada a partir das amostras de brânquias e patas (n=5 por tecido), utilizando-se protocolo adaptado de Maciel (2002). Os tecidos foram digeridos em solução de lise contendo proteinase K (1 mg/ml) e SDS (1%) por 120 minutos a 65°C. Após a adição de NaCl (5M) e CTAB (10%), os tecidos foram incubados a 55°C por 60 minutos. Em seguida, as amostras foram tratadas com clorofórmio: álcool isoamílico (24:1 v/v) e centrifugadas a 14000 rpm por 8 minutos. Ao sobrenadante coletado foi adicionado álcool isopropílico. Após uma centrifugação a 2500 rpm por 3 minutos, o material precipitado foi então lavado com etanol 75%, seco a temperatura ambiente e ressuspensionado em tampão TE 1X (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0). A amostra foi tratada com RNase A (1 mg/ml) e clorofórmio: álcool isoamílico (24:1 v/v) e, em seguida, centrifugada a 14000 rpm por 8 minutos. O sobrenadante foi coletado e o DNA foi precipitado com a adição de acetato de sódio (3M) e etanol 95%. Após nova centrifugação a 2500 rpm por 2 minutos, o DNA foi lavado com etanol 75%, seco a temperatura ambiente e ressuspensionado em tampão TE 1X (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0).

Uma alíquota foi utilizada para determinação da concentração, através da análise espectrofotométrica e determinação da razão da absorbância a 260 e 280 nm. Após a extração, o DNA foi mantido a 4°C até o uso.

2.3. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A presença do vírus da mancha branca foi investigada através da amplificação de um fragmento do genoma viral, através da Reação em Cadeia da Polimerase em dois passos, *nested* PCR, utilizando-se os iniciadores recomendados pela OIE e descritos anteriormente por Lo et al (1996b):

WS146F1(5'ACTACTTTCAGCCTATCTAG3'), **WS146R1**(5'TAATGCGGGTGTAAATGTTCTTAGCA3')
WS146F2(5'GTAAGTGGCCCTTCCATCTCCA3'), **WS146R2**(5'TACGGCAGCTGCTGCACCTTGT3').

As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 25 µl, contendo 1 µl de DNA (100 ng/µl), Tris 10 mM, MgCl₂ 3,0 mM, 200 µM de cada dNTP, 140 nM de cada iniciador (WS146F1 e WS146R1) e 1U de *Taq* DNA Polimerase (Biosystems). A amplificação foi realizada no termociclador Biometra com desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, seguida de 39 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 1 minuto e 30 segundos e extensão a 72°C por 2 minutos. A extensão final foi realizada a 72°C por 5 minutos. Após a amplificação, 1 µl do produto foi adicionado ao segundo passo de amplificação (PCR *nested*) em uma mistura idêntica a descrita acima para a primeira reação exceto os iniciadores, sendo, neste caso, utilizados o par WS146F2 e WS146R2. Após uma desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, as condições da reação foram as seguintes: anelamento a 55°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto. A extensão final foi realizada a 72°C por 5 minutos. Como controle positivo foi utilizada uma

amostra de DNA extraída de pleópode de *L.vannamei*, cujo resultado foi positivo para a presença de uma seqüência genômica do WSSV, e como controle negativo foi utilizada uma outra amostra de DNA extraída de pleópode de *L.vannamei*, cujo resultado foi negativo para a presença de uma seqüência genômica do WSSV (Moser & Marques, dados não publicados). Como controle de contaminação foram realizadas reações sem adição de DNA.

Para confirmação dos resultados, foram realizadas ampliações utilizando-se o kit comercial IQ2000 WSSV (Farming Intelligene Tech. Corp.), seguindo-se as especificações do fabricante.

2.4. Eletroforese em gel de agarose

Para avaliação da integridade do DNA genômico extraído, uma alíquota da amostra foi submetida à eletroforese em gel de agarose a 1% em TBE 1X (Tris 89 mM, Ácido Bórico 89 mM, EDTA 2 mM). A eletroforese foi realizada a 120 V em tampão TBE 1X.

Após a PCR, uma alíquota da reação foi igualmente submetida à eletroforese em gel de agarose (2%) como descrito acima, utilizando-se os marcadores de peso molecular 1 kb DNA *ladder* e 100 pb ladder (Invitrogen).

Em ambos os casos, a visualização das bandas foi realizada por intercalação de brometo de etídio (0,5 µg/ml) em luz UV. Os géis foram fotografados com câmera digital e analisados utilizando-se o programa Gel-Quant™ (Multiplexed Biotechnologies).

2.5 Clonagem do fragmento

O fragmento de tamanho esperado (941 bp) foi recortado do gel e purificado através do kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare), de acordo com as especificações do fabricante. Os fragmentos purificados foram ligados ao vetor pGEM-T® Easy (Promega), nas condições descritas por Muller (2004).

Após a ligação dos fragmentos, células competentes de *E. coli* JM109 (Promega) foram transformadas através de choque térmico, sendo as bactérias, em seguida, mantidas a 37°C por 2 horas. Uma alíquota de 100 µl da solução contendo as bactérias foi plaqueada em agar (LB-Ágar, Sigma; 35g/l). Contendo ampicilina (100 mM), IPTG (0,5 mM) e X-Gal (50 mM). As placas foram acondicionadas a 37°C por 18 horas.

Após o crescimento em meio sólido, as colônias selecionadas visualmente para a presença do inserto foram transferidas para crescimento em meio líquido (LB Broth, Sigma; 20g/l), contendo 100 mM de ampicilina, sendo mantidas durante 18 horas a 37°C sob agitação constante (140 rpm).

2.6 *Confirmação da presença do fragmento (inserto)*

Para a confirmação da presença do inserto nas colônias consideradas visualmente como positivas (transformadas), os plasmídeos foram extraídos pelo método de lise alcalina, nas condições descritas por Ausubel et al. (1995). Em seguida, os plasmídeos foram digeridos com a EcoRI e a presença do inserto foi conferida através da avaliação do perfil do produto da digestão por eletroforese em gel de agarose 2% em TBE 1X (vide acima).

2.7 *Sequenciamento e análise da seqüência obtida*

A reação de amplificação dos fragmentos (insertos) contidos nos plasmídeos foi realizada utilizando-se o kit DYEnamic® ET Dye terminator (GE Healthcare). As amostras foram sequenciadas no sequenciador MegaBACE (GE Healthcare), utilizando-se os iniciadores PGem-F ou Excel-R a partir de aproximadamente 1.000 ng do DNA plasmidial. As seqüências obtidas foram avaliadas inicialmente quanto a qualidade pelo programa Phred ($Phred \geq 15$) do pacote Phred/Phrap/Consed (EWING;GREEN,1998). A seqüência consenso foi usada para comparação com o banco de dados de seqüências nucleotídicas do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), usando o programa BLASTn.

3. Resultados

3.1. Produtos de PCR

A análise dos produtos de PCR por eletroforese em gel de agarose revelou a presença de uma única banda de tamanho equivalente a 941 pares de base (pb), correspondente a amplificação de um fragmento específico do genoma do WSSV, utilizando-se os iniciadores descritos (Fig.2). A presença deste fragmento foi observada em sete das trinta amostras analisadas. As amostras nas quais a presença do fragmento de 941 pb não foi observada foram consideradas negativas.

As amostras positivas foram ainda confirmadas pela detecção de um fragmento de 296 pb, específico para o genoma do WSSV, correspondente ao tamanho esperado, utilizando-se o kit comercial IQ2000 WSSV (Fig.3).

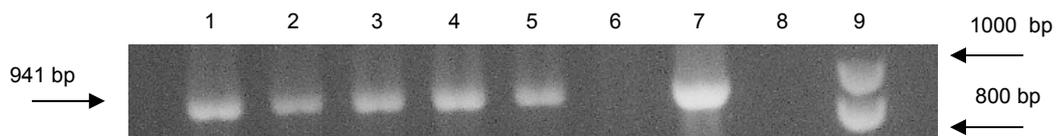


Figura 2. Eletroforese em gel de agarose (2%) representativo dos produtos amplificados por PCR, utilizando-se os iniciadores recomendados pela OIE. 1- 5: amostras extraídas de brânquias de *C.granulata* positivas para o WSSV (fragmento de 941 pb); 6: controle negativo (amostra obtida de pleópode de *L. vannamei*); 7: controle positivo (amostra obtida de pleópode de *L. vannamei*); 8: controle negativo (reação sem adição de DNA); 9: marcador de peso molecular (1 kb DNA ladder).

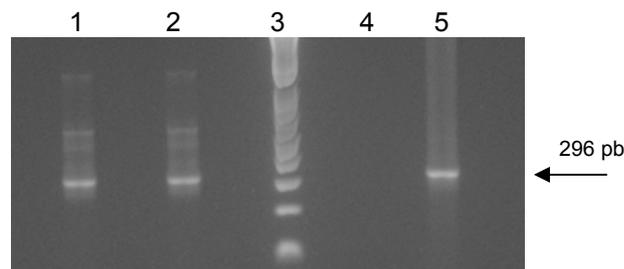


Figura 3. Eletroforese em gel de agarose (2%) representativo dos produtos amplificados por PCR, utilizando-se o kit comercial IQ2000. 1: controle positivo (plasmídeo; 1000 cópias/reação); 2: amostra positiva com infecção severa pelo WSSV (amostra obtida de pleópode de *L. vannamei*); 3: marcador de peso molecular (100 pb DNA ladder); 4: controle negativo (reação sem adição de DNA); 5: amostra extraída de brânquias de *C.granulata* (positivas para o WSSV, fragmento de 296 pb).

3.2. Sequenciamento

Dentre as amostras positivas, ou seja, cuja amplificação por PCR resultou em um fragmento de tamanho esperado (igual a 941 pb), utilizando-se os iniciadores recomendados pela OIE, duas delas tiveram os fragmentos clonados e seqüenciados, com o objetivo de confirmar se a seqüência nucleotídica dos mesmos apresentava identidade com uma seqüência correspondente do genoma do WSSV. A seqüência de nucleotídeos do fragmento de 950 pb está mostrada na Figura 4. A busca por uma seqüência homóloga realizada no GenBank, utilizando-se o Blastn, mostrou 98% de homologia entre esta seqüência e uma seqüência específica do genoma do vírus da mancha branca (número de acesso: AF369029).

```

Query 1      TACGGCAGCTGCTGCACCTTGTTTCGGCGTTCCTTTCTCGAATGTATCTCCCTTGACAG 60
Sbjct 225452 TACGGCAGCTGCTGCACCTTGTTTCGGCGTTCCTTTCTCGAATGTATCTCCCTTGACAG 225393
Query 61     AAGGAAATCAAAGGCGAGAGGGCCGCTGGCGCATGAGGCGAATGGTACATTTTCCGGGCG 120
Sbjct 225392 AAGGAAATCAAAGGCGAGAGGGCCGCTGGCGCATGAGGCGAATGGTACATTTTCCGGGCG 225333
Query 121    AGCTGCCTTGCCGGAAATTAGTGTGTGATAGACGGCATTCTTCATGGCTTCTGAGATGAG 180
Sbjct 225332 AGCTGCCTTGCCGGAAATTAGTGTGTGATAGACGGCATTCTTCATGGCTTCTGAGATGAG 225273
Query 181    GACGGGACCATTGTTGGATGTTGTTTCGCTATCTTCATAATCCATTGATTCTACTCCTCC 240
Sbjct 225272 GACGGGACCATTGTTGGATGTTGTTTCGCTATCTTCATAATCCATTGATTCTACTCCTCC 225213
Query 241    ATTATTATTAGATTTGAAGAGGTCGTCAGAGCCTAGTCTATCAATCATTTCCCTTGGTGT 300
Sbjct 225212 ATTATTATTAGATTTGAAGAGGTCGTCAGAGCCTAGTCTATCAATCATTTCCCTTGGTGT 225153
Query 301    TTCATATACGCTTCTGGTACAGATTACAGCGATGGTGGCCGACAGTTCGTTACAGATAAC 360
Sbjct 225152 TTCATATACGCTTCTGGTACAGATTACAGCGATGGTGGCCGACAGTTCGTTACAGATAAC 225093
Query 361    CTTTCCAAGATCGGCGATAAGTTGTTCCAAAACATTAGCAAACACGACAGTTTGAGCGTT 420
Sbjct 225092 CTTTCCAAGATCGGCGATAAGTTGTTCCAAAACATTAGCAAACACGACAGTTTGAGCGTT 225033
Query 421    CATGTGCTCTTTTGGATGTATCTGTTCCCTTGGCAGAGCATTCTGGATCAGTTCAGATTC 480
Sbjct 225032 CATGTGCTCTTTTGGATGTATCTGTTCCCTTGGCAGAGCATTCTGGATCAGTTCAGATTC 224973
Query 481    GTTTACCGTTTCCATTCCGGT-CTCTGGAAGTCGGCTGGCATGGCTTGAAGCGACAGTTC 539
Sbjct 224972 GTT-ACCGTTTCCAT-CGGTTGC-CTGGAAGACGGCTGGCATGGCT-GAAGCGACAGTTC 224917
Query 540    CCTTGGCGTCGGCGGTGCACACGTGCTGGCGATGACATTCCAATATTCCTAGTACACTTC 599
Sbjct 224916 CCTTGGCGTCGGCGGTGCACACGTGCTGGCGATGACATTCCAATATTCCTAGTACACTTC 224857
Query 600    TTGCATTATTTGGTTTGACATATTACGTGGAGGTTGACTCCTTCCGTTGTCATGCCAGAG 659
Sbjct 224856 TTGCATTATTTGGTTTGACA-ATAACGTCGAGGTTGACTCCTGCCGTTGTCATGCCAGAG 224798
Query 660    TTGGAGAGGGCGATTCTTGATGGTTCAAATGTTCCATTAAAGTTGGAGTTCATTCTCATT 719
Sbjct 224797 TTGGAGAGGGCGAGTCTTGATGGTTCAAATGTTCCATTAAAGTTGGAGTTCATTCTCATT 224738
Query 720    TCAGTCCATTTCGCTAACCTTCTTAAGGAGGGAAGATCCTGTTACTCTAGAATCGATCTTG 779
Sbjct 224737 TCAGTCCATTTCGCTAACCTTCTTAAGGAGGGAAGATCCTGTTACTCTAGAATCGATCTTG 224678
Query 780    GACATGTTTCATCACGTAATGTTTGTCACTAATAAGCTTGTGGCCTGATAGGGTGTGGCT 839
Sbjct 224677 GACATGTTTCATCACGTAATGTTTGTCACTAATAAGCTTGTGGCCTGATAGGGTGTGGCT 224618
Query 840    CTAATTTCTTCCATGGAGACTTCTGGGCGGGCGAATGCGAAAGAGGATACCAGATGCTCG 899
Sbjct 224617 CTAATTTCTTCCATGGAGACTTCTGGGCGGGCGAATGCGAAAGAGGATACCAGATGCTCG 224558
Query 900    TTATCTGAGGGAGTAAAA-TGTG-TGGAGA-GGAAGGG-CAGTCACA 942
Sbjct 224557 TTATCTGAGGGAGTAAAAAGTGTGGTGGAGATGGAAGGGCAGTTACA 224511

```

Figura 4. Alinhamento da seqüência de nucleotídeos obtida após o sequenciamento do fragmento de 941 pb (*query*) com parte de uma seqüência do genoma completo do WSSV (*subject*; número de acesso: AF369029).

4. Discussão

A detecção de um fragmento de 941 pb, amplificado a partir de amostras obtidas do caranguejo *Chasmagnathus granulata* e cuja seqüência de nucleotídeos apresentou um alto grau de homologia (98%) com uma seqüência presente no genoma do WSSV, confirma esta espécie de crustáceo como hospedeiro/reservatório para este patógeno.

Por sua abundância, tanto no entorno como nas fazendas de cultivo de camarão, esta espécie de caranguejo poderia ser um vetor potencial para a infecção dos animais cultivados pelo WSSV e para a permanência do vírus no ambiente. Por terem sido os animais coletados neste estudo provenientes da Lagoa de Imaruí, fica clara a presença do vírus no estuário do Complexo Lagunar, principal fonte de abastecimento de água para as fazendas da região. Outras coletas realizadas na mesma região, as quais fazem parte de um amplo projeto de monitoramento do WSSV e cujas análises estão em andamento em nosso laboratório, confirmaram a presença do WSSV em caranguejos, siris e camarões coletados em um ponto próximo ao amostrado neste trabalho, bem como em outros pontos do estuário (dados não publicados).

A presença do fragmento de 941 pb em sete do total de trinta amostras analisadas no presente estudo sugere uma prevalência estimada para o WSSV em torno de no mínimo 5% e no máximo de 23% neste local em fevereiro de 2006, um ano após o surto inicial da enfermidade e seis meses após o povoamento pós-vazio sanitário.

A detecção do WSSV com o kit comercial aqui utilizado (IQ2000) confirmou o resultado positivo obtido inicialmente, empregando-se os iniciadores recomendados pela Organização Internacional de Epizootias (OIE) e anteriormente descritos por Lo et al (1996b). Recentemente, Claydon (2004) relatou a ocorrência de resultados falso-positivos para o WSSV no lagostim *Cherax quadricarinatus*, em análises realizadas com os iniciadores de Lo et al (1996b). Em seu trabalho, o sequenciamento do fragmento de 941 pares de base obtido não revelou nenhuma filogenia com a seqüência descrita para o WSSV, questionando assim a especificidade deste conjunto de iniciadores e sugerindo modificações no protocolo atual da OIE. Em nosso presente estudo, utilizamos os iniciadores recomendados pela OIE, porém com modificações no protocolo da reação de amplificação (PCR) otimizando-o para nossas condições. Além da confirmação dos resultados positivos com o kit comercial, optamos por seqüenciar também o fragmento de 941 pb obtido, conforme recomenda atualmente a OIE, após o relato do estudo de Claydon descrito acima. A seqüência de nucleotídeos determinada apresentou 98% de homologia com uma região específica do genoma do WSSV.

O monitoramento periódico do WSSV no ambiente, principalmente após surtos da enfermidade, mudanças ambientais significativas, fenômenos naturais ou interferência humana (como a estratégia de vazio sanitário, novos povoamentos e despesas) é fundamental para o conhecimento da distribuição geográfica e disseminação do vírus. O estudo e a caracterização de hospedeiros ou vetores potenciais, como o caranguejo *C. granulata*, podem contribuir para o entendimento dos mecanismos de replicação viral, bem como das respostas de defesa e do grau de susceptibilidade das espécies endêmicas à esta cepa presente no ambiente, nas regiões produtoras locais. Estes estudos, aliados a investigação epidemiológica podem contribuir para a elaboração de estratégias de

controle de doenças de etiologia viral na carcinicultura praticada no Estado de Santa Catarina e em outras regiões do Brasil.

Referências

- AUSUBEL, F. M., BRENT, R., Kingston, R. E., MOORE, D. D., SEIDMAN, J. G., SMITH, J. A., STRUHL, K. Short Protocols in Molecular Biology. 5 ed., New York: John Wiley & Sons, Inc., 1999.
- BELTRAME, E. Seleção de sítios e planejamento da atividade de cultivo de camarões marinhos com base em geotecnologias. Tese de doutorado em Geografia. UFSC, 2003.
- BUCKUP, L. & BUCKUP, G. Os crustáceos do Sul Brasil. Porto Alegre: Ed. Universidade/UFRGS, 1999
- CHANG, Y.S., KOU, G.H., WANG, S.Y., WANG, C.H., HO, C.H., HSU, H.C., WANG, H.C., PENG, S.E., LO, C.F. Sequencing and Amplified restriction Fragment Length Polymorphism Anaysis of Ribonucleotide Reductase Large Subunit Gene of the White Spot Virus in Blue Crab (*Callinectes sapidus*) from American Coastal Waters. Marine Biotechnology. v.3: 163-171, 2001.
- CLAYDON, K., CULLEN, B., OWENS, L. OIE white spot syndrome virus PCR gives false-positive results in *Cherax quadricarinatus*. Diseases of Aquatic Organisms, v.62: 265-268, 2004.
- EWINGNG, B; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. II. Error probabilities. Genome research, v. 8: 186-194, 1998
- HOSSAIN, M.S., OTTA, S.K., KARUNASAGAR, I., KARUNASAGAR, I. Detection of white Spot Syndrome Virus (WSSV) ind Wild Captured Shrimp and in Non-cultured Crustaceans from Shrimp Ponds in Bangladesh by Polymerase Chain Reaction. Fish Pathology, v. 36(2): 93-95, 2001.
- LO, C.F., Ho, CH., PENG, S., CHEN, CH., HSU, H., CHIU, Y., CHANG, C. White Spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods. Diseases of Aquatic Organisms. v.27: 215-225, 1996a.
- LO, C.F., LEU, J.H., HO, C.H., CHEN, C.H., PENG, S.E., CHEN, Y.T, CHOU, C.M., YEH, P.Y., HUANG, C.J., CHOU, H.Y., WANG, C.H., KOU, G.H. Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimps using polymerase chain reaction. Diseases of Aquatic Organisms, v. 25: 133-141, 1996b.
- MACIEL, M.L.T. Contribuição para o desenvolvimento de uma proposta de monitoramento e certificação sanitária em cultivo de camarão marinho no Estado de Santa Catarina. Dissertação de mestrado em Aqüicultura. UFSC, 2002.
- MELO, G.A.S. Manual de identificação dos Brachyura (caranguejos e siris) do litoral brasileiro. São Paulo: Plêiade. FAPESP, 604p. 1996.
- MÜLLER, I. C. Caracterização e avaliação de metalotioneínas como biomarcador de exposição a cádmio no mexilhão *Perna perna* (LINNÉ, 1758). Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, UFSC. Feereiro de 2004. 93 p.
- OIE – OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals Diseases, 2006.
- SEIFFERT, W.Q. A mancha branca em Santa Catarina. Panorama da Aqüicultura, v.87: 51-53, 2005.

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

WAIKHOM, G., JOHN, K.J., GEORGE, M.R., JEYASEELAN, M.J.P. Differential host passaging alter pathogenicity and induces genomic variation in white spot syndrome virus. *Aquaculture*, v. 261: 54-63, 2006.

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

Prevalência do vírus da mancha branca (WSSV) em uma fazenda de cultivo de *Litopenaeus vannamei* no primeiro ciclo após o vazio sanitário de 2005 em Santa Catarina

Marques, J.S., Marques, M.R.F.

Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica, Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil

Resumo

A Síndrome da Mancha Branca é a enfermidade que mais tem causado impactos econômicos na carcinicultura mundial, sendo caracterizada por uma alta mortalidade, rápida disseminação e ampla gama de hospedeiros, incluindo-se diversas espécies de camarões cultiváveis e outros crustáceos. O vírus da mancha branca (WSSV) é um vírus de DNA dupla fita, o qual é encontrado tanto em fazendas de cultivo de camarão, como no ambiente natural. Em Santa Catarina, seu primeiro registro data de janeiro de 2005 em cultivos de *Litopenaeus vannamei*, quando o ciclo de cultivo em curso foi suspenso e a estratégia de vazio sanitário foi implantada. O objetivo deste trabalho foi avaliar a prevalência do WSSV em uma fazenda de cultivo da região de Laguna-SC no primeiro ciclo realizado após o vazio sanitário. A fazenda foi povoada em outubro de 2005 com pós-larvas (PLs) a uma densidade de 15/m². Foram coletados 30 camarões (*L. vannamei*) e 30 caranguejos (*Chasmagnathus granulata*) em dezembro de 2005 (Tempo1) e em março de 2006 (Tempo2). A presença do vírus foi investigada através de PCR *nested*, utilizando-se os iniciadores recomendados pela OIE. No Tempo1, a prevalência foi estimada em torno de 97% para os caranguejos e 90 % para os camarões. No Tempo 2, não foi detectada nenhuma banda correspondente à amplificação da seqüência alvo do DNA viral nas amostras obtidas de caranguejos. Por outro lado, para os camarões a prevalência estimada foi em torno de 27%. A avaliação da prevalência do WSSV nos animais cultivados e na fauna acompanhante do viveiro contribui para o monitoramento do comportamento viral e fornece subsídios para uma avaliação da estratégia e das medidas sanitárias adotadas na carcinicultura em Santa Catarina.

Palavras chaves: WSSV; *Litopenaeus vannamei*; Prevalência; *Chasmagnathus granulata*; PCR *nested*

1. Introdução

A Síndrome da Mancha Branca é a enfermidade que mais causou impactos econômicos à indústria carcinicultora mundial. O agente etiológico, o vírus da síndrome da mancha branca (*White Spot Syndrome Virus* - WSSV) é um vírus de DNA dupla fita já considerado como cosmopolita, disseminando-se entre diferentes espécies de crustáceos e apresentando graus distintos de virulência, conforme a espécie de hospedeiro. Diversos estudos apontam a família Penaeidae, família de camarões marinhos como muito susceptível ao WSSV, conceito aplicável para a maioria das espécies de camarões cultivados nela classificadas (OIE, 2006).

Em Santa Catarina o cultivo da espécie *Litopenaeus vannamei* foi introduzido em 1998. Desde então, apresentou uma perspectiva ascendente no cenário produtivo do Estado. Em 2004, a produção de camarão atingiu o seu ápice no Estado, registrando um total de 4,2 mil toneladas. O setor já empregou cerca de 1,5 mil pessoas e gerou uma receita anual de R\$ 40 milhões para Santa Catarina até aquele ano.

A partir do primeiro ciclo produtivo em setembro de 2004, o setor sofreu uma queda significativa na produção com o aparecimento da Síndrome da Mancha Branca, a qual atingiu muitas fazendas no Estado. Frente aquela situação, uma das estratégias adotadas foi a realização de um vazio sanitário de seis meses, o qual foi seguido de repovoamento em setembro de 2005. Após este repovoamento, uma nova manifestação da doença foi registrada.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a prevalência do WSSV em uma fazenda de cultivo de *L. vannamei* durante a segunda manifestação da enfermidade (após o vazio sanitário de seis meses) em dois tempos distintos, a partir da coleta de camarões cultivados, *Litopenaeus vannamei*, e de espécimes de *Chasmagnathus granulata*, espécie endêmica de caranguejo, popularmente conhecido como gatanhão, presente como parte da fauna acompanhante e circundante dos viveiros de cultivo.

De acordo com Waikhom (2006) e Wang et al (1999), a susceptibilidade ao WSSV varia de acordo com a espécie. A espécie de camarão *Macrobrachium rosenbergii*, por exemplo, foi descrita anteriormente como sendo resistente ao WSSV por Hameed (2000).

Por outro lado, segundo Tsai et al (1999), Flegel et al (2004) e Umesha et al (2006), o cultivo de *Penaeus monodon* com baixas cargas virais de WSSV é possível e ocorre sem prejuízos para a indústria, não sendo registrados sinais clínicos e mortalidade. Cabe destacar que Umesha et al (2006) registraram ainda que esta situação ocorre com a presença concomitante de outros vírus, em alta prevalência. A interação da cepa viral com seus hospedeiros e vetores depende não somente dos mecanismos de replicação viral, mas é consequência ainda da relação entre os organismos e o ambiente onde eles se encontram (Lightner & Redman, 1998).

A avaliação da prevalência do WSSV nos camarões cultivados e na espécie endêmica de caranguejo contribui para o entendimento do comportamento desta cepa de WSSV presente no Estado de Santa Catarina e para o delineamento de estratégias sanitárias e de manejo que possam minimizar o impacto sobre a carcinicultura local.

2. Material e Métodos

2.1. Coleta das amostras

Foram coletados aleatoriamente 30 camarões (*Litopenaeus vannamei*) e 30 caranguejos (*Chasmagnathus granulata*) em dezembro de 2005 (Tempo1; T1) e em março de 2006 (Tempo2; T2) de um mesmo viveiro de uma fazenda localizada na Lagoa de Santo Antônio, ao sul da Lagoa de Imaruí, no estuário do Complexo Lagunar, SC (Figura 1).

O número de animais coletados foi estabelecido com base na recomendação da Organização Internacional de Epizootias (OIE, 2006), segundo a qual, com uma amostragem de 30 animais, pressupondo-se uma prevalência de 10%, é possível estimar a prevalência do vírus em um determinado local, com um grau de confiança de 95%.

Os caranguejos foram identificados segundo a chave publicada por Melo (1996) para os Brachyura do litoral brasileiro.

Antes da coleta dos tecidos, foram realizadas a biometria e determinação do sexo. Os animais foram ainda examinados externamente quanto ao aspecto e estado geral de saúde. Além das brânquias, foram coletados os pleópodes e as patas dos camarões e dos caranguejos, respectivamente. Os tecidos coletados foram fixados separadamente por indivíduo em etanol 95% (1:10 v/v).

2.2. Extração de DNA genômico

A extração de DNA genômico foi realizada a partir das amostras individuais das brânquias, patas e pleópodes de cada um dos animais, utilizando-se protocolo adaptado de Maciel (2002). Os tecidos foram digeridos em solução de lise contendo proteinase K (1 mg/ml) e SDS (1%) por 120 minutos a 65°C. Após a adição de NaCl (5M) e CTAB (10%), os tecidos foram incubados a 55°C por 60 minutos. Em seguida, as amostras foram tratadas com clorofórmio: álcool isoamílico (24:1 v/v) e centrifugadas a 14000 rpm por 8 minutos. Ao sobrenadante coletado, foi adicionado álcool isopropílico e, após nova centrifugação a 2500 rpm por 3 minutos, o material precipitado foi então lavado com etanol 75%, seco a temperatura ambiente e ressuspenso em tampão TE 1X (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0). Após digestão com RNase A (1 mg/ml), seguida da adição de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1 v/v), as amostras foram submetidas a uma nova centrifugação a 14000 rpm por 8 minutos. O sobrenadante foi coletado e o DNA foi precipitado com a adição de acetato de sódio (3M) e etanol 95%. Após centrifugação a 2500 rpm por 2 minutos o DNA foi lavado com etanol 75%, seco a temperatura ambiente e solubilizado em tampão TE 1X (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0). Uma alíquota da amostra foi utilizada para a determinação da concentração, através de análise espectrofotométrica, pela razão da absorbância a 260 e 280 nm. Após a extração, as amostras de DNA foram mantidas a 4°C até o uso.

2.3. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A presença do vírus da mancha branca foi investigada através de PCR *nested*, utilizando-se os iniciadores recomendados pela OIE e descritos inicialmente por Lo et al (1996): **WS146F1**(5'ACTACTTTCAGCCTATCTAG3'); **WS146R1**(5'TAATGCGGGTGTAAATGTTCTTAGCA3'); **WS146F2**(5'GTAAGTCCCTTCCATCTCCA3'); **WS146R2**(5'TACGGCAGCTGCTGCACCTTGT3'). As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 25 µl, contendo 1 µl de DNA (100 ng/µl), Tris 10 mM, MgCl₂ 3,0 mM, 200 µM de cada dNTP, 140 nM de cada iniciador (146F1 e 146R1) e 1U de *Taq* DNA Polimerase (Biosystems). A amplificação foi realizada no termociclador Biometra com desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, seguida de 39 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 1 minuto e 30 segundos e extensão a 72°C por 2 minutos. A extensão final foi realizada a 72°C por 5 minutos. Após a amplificação, 1 µl do produto foi adicionado a um novo tubo, contendo a mesma mistura de reação descrita acima, exceto os iniciadores, sendo utilizado o par WS146F2 e WS146R2, neste segundo passo de amplificação (*nested*). As amostras foram submetidas à desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, anelamento a 55°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos. A reação prosseguiu por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto. A extensão final foi realizada a 72°C por 5 minutos. Como controle positivo foi utilizada uma amostra de DNA extraída de pleópode de *L.vannamei*, cujo resultado foi positivo para a presença de uma seqüência genômica do WSSV, e como controle negativo foi utilizada uma amostra de DNA extraída de pleópode de *L.vannamei*, cujo

resultado foi negativo para a presença de uma seqüência genômica do WSSV (Moser & Marques, dados não publicados). Como controle de contaminação foram realizadas reações nas quais a amostra de DNA foi substituída por igual volume de água.

Algumas amostras foram submetidas ainda a PCR, utilizando-se iniciadores específicos para a amplificação da seqüência do gene que codifica a enzima Gliceraldeído 3- Fosfato Desidrogenase (GAPDH). A seqüência dos iniciadores utilizados, desenhada a partir da seqüência deste gene determinada para *Penaeus monodon*, bem como as condições da reação de amplificação foram aquelas descritas por Maciel & Marques (2003). Paralelamente, foi elaborado no presente estudo um novo protocolo para as condições de reação de amplificação da seqüência deste gene, com uma menor utilização da enzima *Taq* DNA Polimerase (Biosystems) (dados não publicados).

2.4. Eletroforese em gel de agarose

Para a avaliação da integridade do DNA genômico extraído, uma segunda alíquota de cada uma das amostras foi submetida a eletroforese em gel de agarose a 1% em TBE 1X (Tris 89 mM, Ácido Bórico 89 mM, EDTA 2 mM), a 120 V. O perfil eletroforéticos das amostras foi analisado após intercalação de brometo de etídio (0,5 µg/ml) e visualização em transiluminador em luz UV.

Para a visualização dos resultados, os produtos da reação de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (2%) como descrito acima, utilizando-se o marcador de peso molecular 1 kb DNA *ladder* (Invitrogen). Os resultados foram fotografados através de câmera digital e analisados utilizando-se o programa Gel-Quant™ (Multiplexed Biotechnologies).

3. Resultados

Para algumas amostras, a análise dos produtos de PCR por eletroforese em gel de agarose revelou a presença de uma banda de tamanho equivalente a 941 pb, correspondente a amplificação de um fragmento específico do genoma do WSSV, utilizando-se os iniciadores descritos. As amostras nas quais o fragmento de 941 pb não foi observado foram consideradas como sendo negativas, ou como não apresentando um grau de infecção detectável.

No Tempo1 apenas um caranguejo não foi detectado como sendo positivo para o WSSV (Figura 2A). Por outro lado, no Tempo2 todos os caranguejos foram considerados como negativos (ou como não apresentando níveis detectáveis) (Figura 2B). Com base nestes resultados, a prevalência estimada de 97 % foi reduzida para zero (Tabela1).

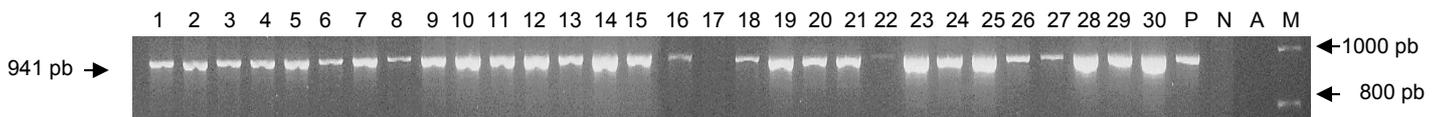


Figura 2A. Gel de agarose (2%) dos produtos amplificados por PCR a partir de amostras de caranguejos do Tempo 1. Tamanho do fragmento esperado = 941 pb. Em: 1-16: amostras positivas para o WSSV ; 17 :amostra negativa para o WSSV; 18-30: amostras positivas para o WSSV; P: controle positivo; N: controle negativo; A: reação sem DNA; M: marcador 1 kb DNA *ladder*.

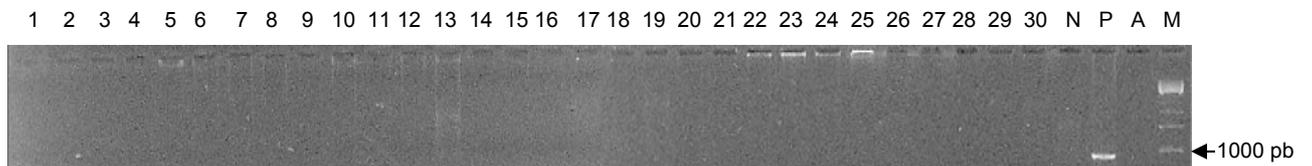


Figura 2B. Gel de agarose (2%) dos produtos amplificados por PCR a partir de amostras de caranguejos do Tempo 2. 1-30: amostras de caranguejos; N: controle negativo; P: controle positivo; A: reação sem DNA; M: marcador de peso molecular 1 kb DNA *ladder*.

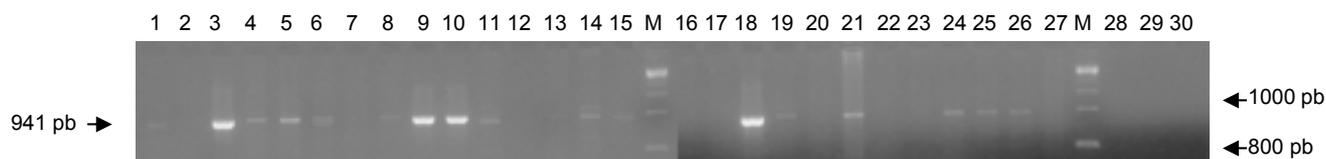


Figura 3A. Gel de agarose (2%) dos produtos amplificados por PCR a partir de amostras de camarões do Tempo 1. Em: 1-15: amostras positivas para o WSSV; M: marcador de peso molecular 1 kb DNA *ladder*; 16-21: amostras positivas para o WSSV; 22: amostra negativa para o WSSV; 23-27: amostras positivas para o WSSV; M: marcador de peso molecular 1 kb DNA *ladder*; 28: amostra positiva para o WSSV; 29-30: amostras negativas para o WSSV.



Figura 3B. Gel de agarose (2%) dos produtos amplificados por PCR a partir de amostras de camarões do Tempo 2. Em: 1-3: amostras negativas para o WSSV; 4: amostra positiva para o WSSV; 5-8: amostras negativas para o WSSV; 9: amostra positiva para o WSSV; 11-12: amostras negativas para o WSSV; 13-15: amostras positivas para o WSSV; 16-18: amostras negativas para o WSSV; 19-20: amostras positivas para o WSSV; 21-27: amostras negativas para o WSSV; 28: amostra positiva para o WSSV; 29-30: amostras negativas para o WSSV; N: controle negativo; P: controle positivo; M: marcador de peso molecular 1kb DNA *ladder*.

Nos camarões, a prevalência estimada em torno de 90% (27 positivos) no T1 (Figura 3A), diminuiu para 27% (8 positivos) no T2 (Figura 3B).

A média de peso dos caranguejos no T1 foi de 12,21g e no T2 foi de 11,55 g. Para os camarões a média de peso no T1 ficou em torno de 1,74 g e no T2 foi de 24,48 g. Durante os três meses transcorridos entre os dois tempos de coleta (T1 e T2), a média de peso dos camarões aumentou 22,74 gramas, o que parece indicar que os animais sobreviventes cresceram normalmente no período. Além disso, com base na observação do aspecto geral dos camarões no momento da coleta, tanto em T1 como em T2, não foi possível detectar sinais clínicos da Síndrome da Mancha Branca. Por outro lado, anorexia foi relatada no caso dos camarões coletados no T1. Deve ser destacado, ainda, que nos camarões sobreviventes (T2) foram observados alguns sinais clínicos que poderiam estar relacionados com outras enfermidades.

A comparação entre a prevalência do WSSV nas duas espécies de crustáceos nos dois tempos de coleta está apresentada na Tabela 1.

Tabela 1. Comparação entre a prevalência para o WSSV nos dois tempos de coleta

ANIMAL*	Caranguejos (<i>C. granulata</i>)			Camarões (<i>L. vannamei</i>)		
	Peso Médio (g)	Nº positivos	Prevalência (%)	Peso Médio (g)	Nº positivos	Prevalência (%)
TEMPO 1 (T1)	12,21 ± 5,10	29	97	1,74 ± 1,58	27	90
TEMPO 2 (T2)	11,55 ± 4,98	0	0	24,48 ± 3,19	8	27

* 30 animais analisados para cada espécie em cada uma das coletas (T1 e T2).

Amostras negativas na reação de PCR para a detecção do WSSV foram também submetidas a ensaios de PCR, utilizando-se iniciadores específicos para a GAPDH. Um gel representativo dos resultados obtidos está mostrado na Figura 4. Podemos observar que, em ambas as condições de PCR, somente as amostras obtidas de camarões apresentaram a banda com o tamanho esperado de 298 pb correspondente à seqüência específica do gene que codifica a GAPDH.

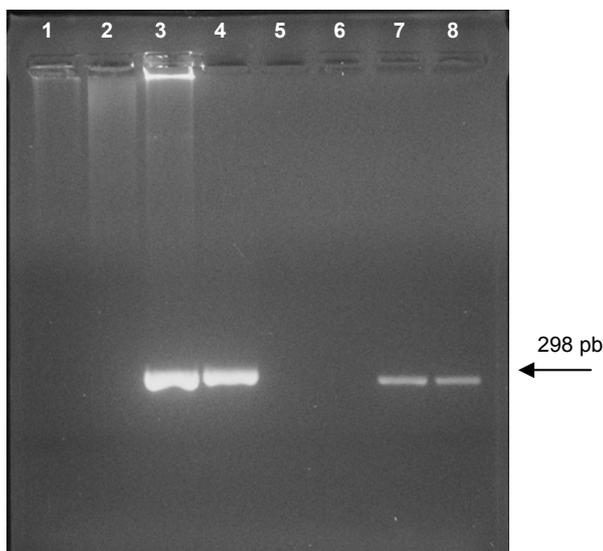


Figura 4. Gel de agarose (2%) representativo dos produtos amplificados por PCR, utilizando-se os iniciadores para amplificação do gene da GAPDH. Tamanho do fragmento esperado = 298 pb. Em: 1: amostra de DNA de caranguejo submetido às condições de PCR padronizadas por Maciel & Marques (2003); 2: outra amostra de DNA de caranguejo submetida às mesmas condições; 3: amostra de DNA de camarão submetida às mesmas condições de PCR; 4: outra amostra de DNA de camarão submetida às mesmas condições descritas por Maciel & Marques (2003); 5: amostra de DNA de caranguejo (20 ng/μl) submetida às condições de PCR para GAPDH padronizadas neste estudo; 6: outra amostra de DNA de caranguejo (20 ng/μl) submetida às novas condições de PCR; 7: amostra de DNA de camarão (20ng/μl) submetida às condições de PCR para GAPDH deste estudo; 8: outra amostra de DNA de camarão (20 ng/μl) submetida às condições de PCR testadas no presente trabalho.

4. Discussão

A partir da amplificação do fragmento de 941 pb, correspondente a uma sequência alvo do genoma do WSSV, foi possível detectar a presença de animais, tanto camarões como caranguejos, infectados pelo vírus. A prevalência detectada para o T1, de 97% e 90% para caranguejos e camarões, respectivamente, diminuiu significativamente no T2, tendo sido estimada em 27% para os camarões, enquanto nenhum animal positivo foi detectado entre os caranguejos desta mesma coleta (T2).

A análise dos resultados no T1 mostrou uma diferença na intensidade das bandas de 941 pb entre os animais investigados. Esta diferença, particularmente evidente nas amostras de camarões deste tempo de coleta (T1), pode indicar uma diferença na carga viral entre estes animais, uma vez que a reação de amplificação foi realizada a partir da mesma quantidade de DNA molde. Poderíamos sugerir que esta diferença possa estar relacionada com uma provável diferença na taxa de replicação viral entre os animais, uma vez que todos foram coletados no mesmo viveiro. Assim, estes resultados poderiam estar refletindo um comportamento distinto entre os animais analisados em relação à presença do vírus, podendo, potencialmente, estar associados a uma diferença dos indivíduos quanto à susceptibilidade para esta cepa viral. No entanto, outras hipóteses não podem ser descartadas, como, por exemplo, uma diferença quanto à carga viral inicial no momento da infecção, em função, por exemplo, de comportamento de canibalismo mais ou menos frequente e intenso. Entre outros, estudos de infecção viral desenvolvidos em condições controladas de laboratório e utilizando inóculos padronizados (experimentos de desafio viral) poderiam contribuir para esclarecer este ponto.

De qualquer modo, ainda em relação a esta hipótese, traçada com base no padrão de amplificação observado em T1, poderíamos sugerir alguns animais como sendo possivelmente resistentes e/ou tolerantes, enquanto outros poderiam ser considerados como mais susceptíveis. Os animais susceptíveis seriam aqueles com maior carga viral detectada no Tempo1. No Tempo2 detectamos uma prevalência menor e uma aparente diminuição também na carga viral. Os camarões sobreviventes (Tempo2), nos quais foi detectada a presença do vírus, poderiam ser considerados como potencialmente “tolerantes”. Os camarões sobreviventes nos quais não foi detectada a presença do vírus poderiam ser considerados como potencialmente “resistentes”. Flegel (2007) chamou a atenção para que sejamos cuidadosos ao checar se os sobreviventes de surtos e desafios estão infectados ou não, sugerindo ainda cautela ao se considerar o uso das palavras “resistência” e “tolerância”. Cabe ressaltar aqui que a não-deteção do vírus nos animais ditos “resistentes” pode ser devido ao fato de que a presença de um número baixo de partículas virais pode estar abaixo do limite de sensibilidade de detecção da técnica de PCR, mesmo da PCR *nested*, o que poderia produzir resultados falso-negativos (Chang, 2001). Esta possibilidade não pode ser descartada neste estudo. O uso de abordagens mais sensíveis como a PCR em Tempo Real, poderia diminuir a possibilidade de falso-negativos e determinar os níveis de carga viral com grande precisão (Marques et al, 2006).

A sobrevivência de animais com baixa carga viral foi descrita anteriormente e aponta para o possível potencial de *L. vannamei* como espécie tolerante ou resistente. A detecção do WSSV nos caranguejos mostrou-se maior no primeiro tempo de coleta (T1), mas foi negativa em T2, necessitando ser mais bem investigada. Este resultado poderia indicar uma susceptibilidade da espécie *C. granulata* ao WSSV no primeiro tempo de coleta (T1), porém não foi observada mortalidade nestes animais.

A água e os fatores ambientais podem ter contribuído para a os resultados aqui apresentados. Uma relação neste sentido foi sugerida em estudos anteriormente reportados por Hossain et al (2001) e Flegel et al (2004). Esses autores e Umesha et al (2006) relataram que o estresse induzido por fatores ambientais como pH, salinidade, temperatura, nível de água, manejo inadequado do viveiro, e altas densidades de cultivo podem aumentar a infecção e levar à manifestação da doença.

A estratégia de coleta de dados relativos a fatores ambientais havia sido planejada no início do presente estudo, de acordo com um questionário elaborado previamente (ver Anexo 1). Infelizmente, devido ao abandono da fazenda alvo do presente estudo, não foi possível coletar dados relativos a parâmetros ambientais, como inicialmente planejado, uma lacuna que poderia trazer respostas para um melhor entendimento dos resultados obtidos.

Cabe salientar que a fazenda analisada neste estudo foi interditada e o ciclo de cultivo perdido. A coleta do Tempo1 foi realizada durante o surto da doença e ambas as espécies apresentaram prevalência para o WSSV igual ou acima de 90%. Os resultados obtidos no Tempo2 demonstram que mesmo nesta fazenda com alta manifestação inicial da doença, a mortalidade não atingiu 100% e os camarões sobreviventes cresceram normalmente, ultrapassando o peso comercial. Devido à interdição e ao abandono da fazenda, não foi possível mensurar a taxa de sobrevivência dos animais restantes no viveiro.

Foi relatada pelos técnicos da fazenda a falta de alimentação dos camarões e também observamos o intestino vazio nos animais coletados no Tempo1, sinais relacionados com anorexia, sinal clínico da Síndrome da Mancha Branca. Porém, devido ao abandono da fazenda e a falta de informações sobre os parâmetros ambientais e as condições do viveiro, não podemos concluir se a falta de alimentação estaria relacionada como sintoma da doença ou como resposta dos animais às condições ambientais submetidas.

A possibilidade de outros vírus ou patógenos nos animais deveria ser investigada uma vez que detectamos sinais clínicos sugestivos com outras enfermidades descritas (Lightner, 1996). Umesha et al (2006) relataram uma alta prevalência de infecções virais, duplas e triplas, em cultivos da Índia. Flegel et al (2004) também relataram a presença de múltiplas viroses com altas prevalências em cultivos, sem que fossem observados sinais clínicos e manifestação de doenças na Tailândia.

Flegel (2007) reportou o fato de que surtos de WSSV em vários países da Ásia foram seguidos, após um período de 1 - 2 anos, por um declínio na severidade da doença e a ocorrência de cultivos com WSSV sem sinais clínicos ou mortalidades. Segundo a teoria da acomodação viral proposta por Flegel (2007) os patógenos reduzem a severidade da doença nas infecções persistentes, um mecanismo que pode ser chave no processo de interação entre os vírus e os

artrópodes. O entendimento deste mecanismo também pode contribuir para a elaboração de estratégias de controle do WSSV nos cultivos do Estado de Santa Catarina.

Referências

BELTRAME, E. Seleção de sítios e planejamento da atividade de cultivo de camarões marinhos com base em geotecnologias. Tese de doutorado em Geografia. UFSC, 2003.

BUCKUP, L. & BUCKUP, G. Os crustáceos do Sul Brasil. Porto Alegre: Ed. Universidade/UFRGS, 1999

CHANG, Y.S., KOU, G.H., WANG, S.Y., WANG, C.H., HO, C.H., HSU, H.C., WANG, H.C., PENG, S.E., LO, C.F. Sequencing and Amplified restriction Fragment Length Polymorphism Anaysis of Ribonucleotide Reductase Large Subunit Gene of the White Spot Virus in Blue Crab (*Callinectes sapidus*) from American Coastal Waters. *Marine Biotechnology*. v.3: 163-171, 2001.

FLEGEL, T.W., NIELSEN, L., THAMAVIT, V., KONGTIM, S., PASHARAWIPAS, T. Presence of multiple viruses in non-diseased cultivated shrimp at harvest. *Aquaculture*, v. 240: 55-68, 2004.

FLEGEL, T.W. Update on viral accommodation, a model for host-viral interaction in shrimp and other arthropods. *Developmental e Camparative Immunology*, v. 31: 217-231, 2007.

HAMEED, A.S.S., CHARLES,M.X., ANILKUMAR,M. Tolerance of *Macrobrachium rosenbergii* to white spot syndrome virus. *Aquaculture*, V.183: 207-213, 2000.

HOSSAIN, M.S., OTTA, S.K., KARUNASAGAR, I., KARUNASAGAR, I. Detection of white Spot Syndrome Virus (WSSV) ind Wild Captured Shrimp and in Non-cultured Crustaceans from Shrimp Ponds in Bangladesh by Polymerase Chain Reaction. *Fish Pathology*, v. 36(2): 93-95, 2001.

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

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

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

MACIEL, M.L.T. Contribuição para o desenvolvimento de uma proposta de monitoramento e certificação sanitária em cultivo de camarão marinho no Estado de Santa Catarina. Dissertação de mestrado em Aqüicultura. UFSC, 2002.

MACIEL, M. L. T. & MARQUES, M. R. F., 2003. Avaliação da ocorrência do vírus da síndrome da mancha branca (White Spot Syndrome Virus - WSSV) em cultivos do camarão marinho (*Litopenaeus vannamei*) através da Reação em Cadeia de Polimerase: investigação preliminar. In: (www.civa2003.org), p. 231-236

MARQUES, M R F; MOSER, J R ; MULLER, IC Virologia de crustáceos e métodos moleculares de diagnostco. In: Sanidade de Organismos Aquáticos no Brasil. SSILVA-SOUZA, A. T. ed. ABRAPOA. Maringá, PR. 2006. 159-185

MELO, G.A.S. Manual de identificação dos Brachyura (caranguejos e siris) do litoral brasileiro. São Paulo: Plêiade. FAPESP, 604p. 1996.

OIE – OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals Diseases, 2006.

TSAI, M.F., KOU, G.H., LIU, H.C., LIU, K.F., CHANG, C.F., PENG, S.E., HSU, H.C., WANG, C.H., LO, C.F. Long-term presence of white spot syndrome virus (WSSV) in a cultivated shrimp population without disease outbreaks. *Diseases of Aquatic Organisms*, v. 38: 107-114, 1999.

UMESHA,K.R., DASS, B.K.M., NAIK, B.M., VENUGOPAL, M.N., KARUNASAGAR, I., KARUNASAGAR, I. High prevalence of dual and triple viral infections in black tiger shrimp ponds in India. *Aquaculture*, v.258 : 91-96, 2006.

WAIKHOM, G., JOHN, K.J., GEORGE, M.R., JEYASEELAN, M.J.P. Differential host passaging alter pathogenicity and induces genomic variation in white spot syndrome virus. *Aquaculture*, v. 261: 54-63, 2006.

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

CONCLUSÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Com base em relatos sobre a sua ocorrência em diferentes regiões e na teoria da acomodação viral proposta por Flegel (2007), o vírus da mancha branca (*White Spot Syndrome Virus*, WSSV), pode ser considerado como um vírus cosmopolita que dissemina-se e adapta-se rapidamente aos ambientes aos quais se introduz e passa a habitar. Após os acontecimentos ocorridos nos últimos anos na carcinicultura mundial, foi relatado que na Ásia a indústria continuou produzindo sem perdas significativas, após 1-2 anos decorridos dos surtos da enfermidade que dizimou os cultivos naquele continente. Esta situação pode ser atribuída a realização de cultivos em condições ambientais e de manejo adequadas ao convívio com a presença do WSSV e, segundo Flegel (2007), ao recuo da severidade na infecção persistente, considerado pelo autor como uma estratégia do próprio vírus.

No Estado de Santa Catarina a baixa densidade de estocagem, o sistema de policultivo com tilápias, o manejo e a localização de algumas fazendas, contribuíram para o cultivo dos camarões sem a manifestação da doença. Esse fato mostra a necessidade do conhecimento das condições ambientais, da adoção de condições de manejo e do sistema de cultivo adequados para o restabelecimento do vigor da indústria no Estado, através do convívio com a cepa viral aqui encontrada. A linhagem ora utilizada de *Litopenaeus vannamei* foi introduzida há 10 anos no Estado de Santa Catarina e vem adaptando-se às condições locais desde então. A cepa de WSSV foi detectada há 3 anos, mas sua presença pode ser anterior a este período. A adaptação e a interação desta cepa com o ambiente e os hospedeiros locais estão envolvidas na virulência que a mesma pode apresentar. Estudos na Ásia monitoram os viveiros e relatam múltiplas e altas prevalências de vários patógenos virais, sem relatos de manifestação de doenças e perdas para a indústria.

O estudo de hospedeiros do WSSV, como o garanguejo *Chasmagnathus granulata*, contribui para o monitoramento do vírus e o entendimento das relações cepa-hospedeiro. O monitoramento do vírus nos camarões *Litopenaeus vannamei* é crucial para a elaboração de estratégias sanitárias e de manejo na carcinicultura praticada no Estado. No presente estudo, podemos sugerir a ocorrência de graus distintos de susceptibilidade à enfermidade ou, ainda, diferenças quanto à carga viral, o que poderia estar refletindo diferenças na relação entre cepa/hospedeiro. Através da identificação de animais com diferentes graus de infecção, poder-se-ia sugerir a ocorrência, entre os animais avaliados, de grupos possivelmente “susceptíveis”, “resistentes” e “tolerantes”, tendo-se, no entanto, em mente, cautela quanto a estas denominações, como mencionado anteriormente.

Muitos estudos e questionamentos têm sido alvo de discussão quanto a formação de famílias de camarão SPF (*Shrimp Pathogen Free*) (linhagens livres de vírus) ou SPR (*Shrimp Pathogen Resistant*) (linhagens resistentes a vírus). No Equador, aparentemente, as linhagens SPR parecem obter maior êxito. Também na Ásia foi reportado êxito em cultivos com camarões tolerantes à presença do vírus. A realização de análises de genômica e proteômica em camarões que apresentem comportamento distinto frente à infecção viral, como sugerido acima, aliadas a técnicas de hibridização subtrativa e avaliação de expressão gênica em camarões ditos tolerantes e resistentes

poderiam contribuir na busca por moléculas relacionadas à resposta de defesa dos camarões ao WSSV e aquelas relacionadas ao reconhecimento ou ancoramento celular do WSSV.

Da mesma maneira, estudos sobre a susceptibilidade e as respostas de defesa de hospedeiros potenciais, mais ou menos próximos do ponto de vista filogenético, contribuem para o conhecimento da cepa viral, sua relação com hospedeiros distintos, contribuindo também, sob a ótica epidemiológica, para o monitoramento e a avaliação de carga viral.

Neste trabalho detectamos resultados distintos sobre a prevalência do WSSV nas amostras de caranguejos. No ambiente, a prevalência estimada ficou entre 5 e 23%, com uma carga viral aparentemente média. Por outro lado, na fazenda estudada, no Tempo1, a prevalência foi de 97%, com uma carga viral aparentemente alta. No Tempo2, não houve detecção do WSSV nas amostras nesta espécie de crustáceo. Talvez a não-detecção do vírus nesta coleta possa ser devido à falta de contato dos animais com as partículas virais, uma vez que possuem vida semi-aérea e se movimentam livremente para fora do viveiro, ou, ainda, a carga viral poderia estar tão baixa que estaria abaixo da faixa ou limite de sensibilidade de detecção tendo em vista o protocolo utilizado. Uma outra consideração seria que o número de animais coletados (n=30) foi inadequado, em função de se estar frente a prevalências inferiores a 10%.

A confirmação dos camarões sobreviventes coletados no Tempo2 como “resistentes” (não-infectados) e “tolerantes” (infectados) deveria ser investigada com a utilização de protocolos mais sensíveis, como PCR em Tempo Real, entre outros. A utilização da PCR como ferramenta de diagnóstico e detecção de estágios virais latentes tem se mostrado uma arma eficiente, porém sua utilização requer sensibilidade e cuidado na interpretação dos resultados (Marques et al, 2006).

A possibilidade de resultados falso-positivos no caranguejo com a utilização dos iniciadores recomendados pela OIE foi descartada pelo sequenciamento do fragmento ou *amplicom* obtido. Porém, cabe salientar que procedemos alterações no protocolo recomendado pela OIE, visando padronizar e otimizar a reação para as nossas condições, procurando diminuir o tempo de corrida (reação), diminuir significativamente a amplificação simultânea de bandas inespecíficas e, principalmente, reduzir pela metade a quantidade da enzima *Taq* DNA Polimerase utilizada, item mais caro na reação de PCR.

A possibilidade de resultados falso-negativos não pode ser inteiramente descartada neste estudo. Uma das possibilidades que poderia acarretar este tipo de resultado seria a presença de inibidores da reação (contaminantes, restos de proteínas, RNA, polissacarídeos) ou a inadequação da qualidade da amostra molde de DNA. Visando eliminar essa possibilidade, no presente estudo, além da avaliação da integridade e do grau de pureza das amostras, estas foram submetidas a uma PCR para a amplificação de uma seqüência alvo no DNA do hospedeiro, ou seja, um gene de *L.vannamei*. Assim, foi realizada uma reação para a amplificação com iniciadores específicos, visando amplificar uma parte da seqüência do gene constitutivo de *L. vannamei* que codifica a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH). Essa reação foi realizada através de dois protocolos distintos, um descrito anteriormente por Maciel & Marques (2003) e outro elaborado no presente estudo (dados não publicados). Apesar de uma banda correspondente ao tamanho esperado ter sido detectada nas amostras de camarão, o mesmo não foi observado para as amostras de caranguejo,

em ambas as condições de reação. Dado que os iniciadores utilizados para a amplificação do gene da GAPDH foram desenhados com base na seqüência de *P. monodon* (Maciel & Marques, 2003), uma possível explicação para a ausência de amplificação deste gene constitutivo nas amostras de caranguejo seria a distancia filogenética entre as duas espécies. Pretendemos em análises futuras padronizar as condições de reação para amplificação do fragmento de 848 pb de uma seqüência do gene do RNA ribossomal 18S, altamente conservado em decápodes, como forma de controle adicional para possíveis resultados falso-negativos.

Outra possibilidade de resultados falso-negativos está relacionada com o limite ou faixa de sensibilidade do método utilizado, no que tange a detecção de cargas virais baixíssimas. A utilização de métodos mais sensíveis como a PCR em Tempo Real, têm a vantagem de detectar e determinar com precisão diferentes níveis de carga viral. Por outro lado, muitos iniciadores para a amplificação de seqüências menores de regiões específicas do vírus têm sido descritos como mais sensíveis, inclusive na detecção de cepas variantes (Galavíz-Silva, 2004). Recentemente, técnicas mais sensíveis como *Microarray* detectaram seqüências virais do WSSV em linhagens de camarão consideradas SPF (Khadijah, 2003), sendo estes animais, na realidade, considerados como portadores assintomáticos (ou tolerantes?).

Uma outra perspectiva envolve a caracterização da cepa de WSSV aqui encontrada. Esta caracterização poderia ser abordada através da análise de diferenças no padrão de digestão de fragmentos por enzimas de restrição, seguida de sequenciamento, e até mesmo, através de análises de genômica e proteômica do próprio vírus.

No caso dos camarões sobreviventes resistentes realmente não estarem infectados pelo WSSV, não podemos descartar ainda a possibilidade destes animais não terem entrado em contato com as partículas virais. Essa possibilidade, porém é remota se considerarmos que os animais estavam em contato com a água durante todo o período (diferentemente dos caranguejos), no mesmo espaço ou viveiro. A água foi descrita como meio de transmissão horizontal do vírus, através da passagem pelas brânquias. Além disso, o canibalismo também é relatado como uma das maiores formas de transmissão de patógenos, inclusive do WSSV (Covarrubias, 2004). Esta observação e o fato dos animais resistentes terem crescido durante o período que permaneceram no viveiro, significa que provavelmente continuaram a se alimentar, mesmo sem o fornecimento de ração. Para tal crescimento, os camarões se não recorreram ao canibalismo, provavelmente se alimentaram da produtividade natural do viveiro. Muitas fontes de alimento natural como diversas classes do zooplâncton foram apontadas como portadores e possíveis vetores para o WSSV. Assim sendo, a investigação dos organismos do zooplâncton quanto à presença do vírus pode ser considerada como uma perspectiva interessante na averiguação desta hipótese.

Na verdade, esta investigação já foi iniciada com a coleta de material deste viveiro durante o presente estudo, na qual diferenciamos três classes distintas de zooplâncton: uma ainda não identificada, um inseto aquático e a espécie de copépode já identificada *Acartia tonsa*. Na seqüência deste trabalho realizaremos análises sobre a presença do WSSV nestes organismos. Paralelamente está sendo realizado pelo nosso grupo um estudo em colaboração com a EPAGRI (Empresa de

Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina S.A.) que visa investigar a presença do WSSV em organismos do plâncton coletados de outras fazendas e outros pontos do estuário.

A avaliação da presença de outros vírus também é uma perspectiva de continuidade e ampliação do presente estudo, uma vez que Umesha et al (2006) e Flegel et al (2004) relataram alta prevalência de infecções virais múltiplas em cultivos da Ásia, sem a presença de sintomas e manifestação de doenças. Moser (2005) detectou uma prevalência natural em torno de 60% para o vírus da Necrose Hipodermal e Hematopoiética Infecciosa (IHHNV) em *Litopenaeus vannamei* adultos dos cultivos de Santa Catarina, sem a observação de sinais clínicos externos da doença, sugerindo que este vírus é bem tolerado pela linhagem de *L. vannamei* catarinense.

Em adição, outras coletas foram realizadas na etapa inicial do presente trabalho, nas outras regiões produtoras: o núcleo Centro (Região de Tijucas) e o núcleo Norte (Região de São Francisco). Nestas coletas também foram obtidos os dados de parâmetros ambientais dos viveiros analisados e um número amostral maior, o que possibilitará, assim, um estudo mais minucioso nestas localidades.

Cabe salientar aqui que o surto de WSSV ocorrido em Santa Catarina foi diferente dos relatados em outros países, pois apresentou fazendas sem mortalidade, o que parece ter relação com a localização geográfica das mesmas e com práticas de manejo nelas efetuadas. Isso pode ser interpretado como estando em concordância com a teoria de acomodação viral proposta por Flegel (2007).

A hipótese do vírus já estar no ambiente há mais tempo, antes do registro de sua manifestação, também não pode ser completamente descartada, uma vez que a ocorrência da doença foi desencadeada, aparentemente, por gatilhos decorrentes do intenso desequilíbrio que as fazendas do primeiro foco apresentavam.

O conhecimento sobre a relação entre a virulência do WSSV e a susceptibilidade dos hospedeiros locais à cepa viral presente no Estado é fundamental para o monitoramento e a elaboração de estratégias no combate à enfermidade. Os camarões sobreviventes são elementos chave para a realização de investigações e estudos que contribuam para minimizar os impactos da enfermidade e que possam levar ao emprego de estratégias corretas de manejo e ao estabelecimento de famílias de animais resistentes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABCC – Associação Brasileira dos Criadores de Camarão. www.abccam.com.br
- BACHÈRE, E. Shrimp immunity and disease control. *Aquaculture*, v. 191, p. 3-11, 2000.
- CHAMBERLAIN, G (1999), Reporte WAS. In: O vírus da síndrome da mancha branca. Panorama da Aqüicultura, V.87: 43-49, 2005.
- CHANG, Y.S., KOU, G.H., WANG, S.Y., WANG, C.H., HO, C.H., HSU, H.C., WANG, H.C., PENG, S.E., LO, C.F. Sequencing and Amplified restriction Fragment Length Polymorphism Anaysis of Ribonucleotide Reductase Large Subunit Gene of the White Spot Virus in Blue Crab (*Callinectes sapidus*) from American Coastal Waters. *Marine Biotechnology*. V.3: 163-171, 2001.
- CHANG Y.S., LO C.F., PENG S.E., LIU K.F., WANG C.H. & KOU G.H. White spot syndrome virus (WSSV) PCR-positive *Artemia* cysts yield PCR-negative nauplii that fail to transmit WSSV when fed to shrimp postlarvae. *Dis. Aquat. Org.*, 49 (1), 1-10, 2002.
- CHEN, L.L., LEU, J.H., HUANG, C.J., CHOU, C.M., CHEN, S.M., WANG, C.H., LO, C.F., KOU, G.H. Identification of a Nucleocapsid Protein (VP35) Gene of Shrimp White Spot Syndrome Virus and Characterization of the Motif Important for Targeting VP35 to the Nuclei of Transfected Insect Cells. *Virology*, v. 293: 44-53, 2002.
- COVARRUBIAS, M.S.M. Enfermedades Del camarón: detección mediante análisis en fresco e histopatología. México: Trillas, 2004.
- Diario Catarinense, Economia. Maricultura lidera ranking. 10 de abril de 2005. Disponível em www.brclip.com.br/brgestor/cl_pesquisa.php?pg=cl_abre&cd=gkhdafa68ASqfi>. Acesso em junho de 2007.
- DURAND , S; LIGHTNER,D.V.;REDEMAN, R.M.; BONAMI, J. R. Ultrastructure and morphogenesis of white spot syndrome baculovirus (WSSV). *Disease of Aquatic Organisms*, 29:205-211, 1997.
- FAO . State of world aquaculture. FAO Fisheries Technical Paper, N500, pp 147, 2006. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/009/a0874e/a0874e00.htm>. Acesso em julho de 2007.
- FERRER, L., ANDRADE, S. ASTEASUAIN, R., MARCOVECCHIO, J. Acute toxicities of four metals on the early life stages of the crab *Chasmagnathus granulata* from Bahía Blanca estuary, Argentina. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, V. 65, Issue 2, 2006,
- FLEGEL, T.W., NIELSEN, L., THAMAVIT, V., KONGTIM, S., PASHARAWIPAS, T. Presence of multiple viruses in non-diseased cultivated shrimp at harvest. *Aquaculture*, v. 240: 55-68, 2004.
- FLEGEL, T.W. Update on viral accommodation, a model for host-viral interaction in shrimp and other arthropods. *Developmental e Comparative Immunology*, v. 31: 217-231, 2007.
- GALAVIZ-SILVA, L., MOLINA-GARZA, Z.J., ALCOCER-GONZÁLEZ, J.M., ROSALES-ENCINAS, J.L., IBARRA-GÁMEZ, C. White spot syndrome virus genetic variantes detected in Mexico by a new multiplex PCR method. *Aquaculture*, v. 242: 53-68, 2004.
- GELINSKI NETO, F. Carcinicultura e meio ambiente: abalando mitos. Tese de doutorado em Engenharia de Produção. UFSC, 2005.
- GUTIÉRREZ, J.L., PALOMO, M.G., IRIBARNE, O.O. Environmental heterogeneity and species responses to fishing disturbance: are the effects of clam harvesting spatially consistent? *Fisheries Research*, Volume 67, 2004.
- HAMEED, A.S.S., CHARLES,M.X., ANILKUMAR,M. Tolerance of *Macrobrachium rosenbergii* to white spot syndrome virus. *Aquaculture*, V.183: 207-213, 2000.

HAMEED, A.S.S., YOGANANDHAN, K., SATHISH, S., RASHEED, M., MURUGAN, V., JAYARAMAN, K. White spot syndrome virus (WSSV) in two species of freshwater crabs (*Paratelphusa hydromous* and *P. pulvinata*). *Aquaculture*, V.201: 179-186, 2001.

HE, N.; QIN, Q.; XU, X. Differential profile of genes expressed in hemocytes of White Spot Syndrome Virus-resistant shrimp (*Penaeus japonicus*) by combining suppression subtractive hybridization and differential hybridization. *Antiviral Research*, v. 6 (1), p. 39-45, 2005.

HOSSAIN, M.S., OTTA, S.K., KARUNASAGAR, I., KARUNASAGAR, I. Detection of white Spot Syndrome Virus (WSSV) in Wild Captured Shrimp and in Non-cultured Crustaceans from Shrimp Ponds in Banglades by Polymerase Chain Reaction. *Fish Pathology*, v. 36(2): 93-95, 2001.

HUANG, C., ZHANG, X., LIN, Q., XU, X., HU, Z., HEW, C.L. Proteomic Analysis of Shrimp White Spot Syndrome Viral Proteins and Characterization of a Novel Envelope Protein VP466. *Molecular e Cellular Proteomics*, v. 1: 223-231, 2002.

ICTVdB. The Universal Virus Database of the International Committee on Taxonomy of Viruses. ICTVdB Management, 2006. 00.103.0.01.001. White spot syndrome virus 1. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.gov/ICTVdb/index.htm>.

KHADIJAH, S., NEO, S.Y., HOSSAIN, M.S., MILLER, L.D., MATHAVAN, S., KWANG, J. Identification of White Spot Syndrome Virus Latency-Related Genes in Specific-Pathogen-Free Shrimps by Use of a Microarray. *Journal of Virology*, 10162-10167, 2003.

KOU, G.H., CHANG, P.S., LO, C.F., WANG, Y.C. Experimental infection of white spot baculovirus in some cultured and wild decapods in Taiwan. *Aquaculture*, V.164: 221-231, 1998.

LI Q., ZHANG J., CHEN Y. & YANG F. White spot syndrome virus (WSSV) infectivity for *Artemia* at different developmental stages. *Dis. Aquat. Org.*, 57 (3), 261-264, 2003.

LI, L., XIE, X., YANG, F. Identification and characterization of a prawn white spot syndrome virus gene that encodes an envelope protein VP31. *Virology*, 2005.

LI, L.J., YUAN, J.F., CAI, C.A., GU, W.G., SHI, Z.L. Multiple envelope proteins are involved in white spot syndrome virus (WSSV) infection in crayfish. *Archives of Virology*, 2006.

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

LO, C.F., HO, CH., PENG, S., CHEN, CH., HSU, H., CHIU, Y., CHANG, C. White Spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods. *Diseases of Aquatic Organisms*. V.27: 215-225, 1996a.

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

LO, C.F., 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 baculovirus (WSBV) in captured brooders of *Penaeus monodon* with special emphasis on reproductive organs. *Diseases of Aquatic Organisms*. V. 30: 53-72, 1997.

LUO, T.; ZHANG, X.; SHAO, Z.; XU, X. PmAV, a novel gene involved in virus resistance of shrimp *Penaeus monodon*. *FEBS Letters*, v. 551, p. 53-57, 2003.

MACIEL, M. L. T. & MARQUES, M. R. F. Avaliação da ocorrência do vírus da síndrome da mancha branca (White Spot Syndrome Virus - WSSV) em cultivos do camarão marinho (*Litopenaeus*

vannamei) através da Reação em Cadeia de Polimerase: investigação preliminar. In: (www.civa2003.org), p. 231-236, 2003.

MARIËLLE, C.W., VAN HULTEN, J.W., SNIPPE, M., VLAK, J.M. White Spot Syndrome Virus Envelope Protein VP28 is involved in the systemic infection of shrimp. *Virology*, v. 285: 228-233, 2001.

MARKS, H., DUIJSE, J.J.A.V., ZUIDEMA, D., HULTEN, M.C.W.V., VLAK, J.M. Fitness and virulence of an ancestral White Spot Syndrome Virus Isolate from shrimp. *Virus Research*, v. 110: 9-20, 2005

MARQUES, M.R.F. & BARRACCO, M.A. Lectins, as non-self-recognition factors in crustaceans. *Aquaculture*, v. 191: 23-44, 2000.

MARQUES, M R F; MOSER, J R ; MULLER, IC Virologia de crustáceos e métodos moleculares de diagnóstico. In: Sanidade de Organismos Aquáticos no Brasil. SSILVA-SOUZA, A. T. ed. ABRAPOA. Maringá, PR. 2006. 159-185.

MAYO, M.A. Virus Taxonomy. *Arch Virol* 147/5, 2002.

MEDESANI, D.A., LÓPEZ, L.S., RODRÍGUEZ, E.M. Interference of cadmium and copper with the endocrine control of ovarian growth, in the estuarine crab *Chasmagnathus granulata*. *Aquatic Toxicology*, V.69, 2004.

MORENO, P.A.R., MEDESANI, D.A., RODRÍGUEZ, E.M. Inhibition of molting by cadmium in the crab *Chasmagnathus granulata* (Decapoda Brachyura) *Aquatic Toxicology*, V. 64, 2003.

MOSER, J., MARQUES, M.R.F. Validação de métodos moleculares de diagnóstico para a detecção do IHHNV em camarões cultivados *L. vannamei*. In: VIII Encontro Brasileiro de Patologistas de Organismos aquáticos – EMBRAPOA 2004, Laguna SC. Resumo do EMBRAPOA, v.1:170, 2004.

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

OIE – OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals Diseases, 2006.

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

PÉREZ FARFANTE, I. & KENSLEY, B.F. Penaeoid and Sergestoid Shrimps and Prawns of the World. Key and Diagnoses for the Families and Genera. *Mémoires du Muséum National D'Histoire Naturelle*, 175: 1-233, 1997.

ROBALINO, J., BARTLETT, T., SHEPARD, E., PRIOR, S., JARAMILLO, G., SCURA, E., CHAPMAN, R.W., GROSS, P.S., BROWDY, C.L., WARR, G.W. Double-Stranded RNA Induces Sequence-Specific Antiviral Silencing in Addition to Nonspecific Immunity in a Marine Shrimp: Convergence of RNA Interference and Innate Immunity in the Invertebrate Antiviral Response? *Journal of Virology*, p.13561-13571. Nov. 2005.

SEIFFERT, W.Q. A mancha branca em Santa Catarina. *Panorama da Aquicultura*, V.87: 51-53, 2005.

TAI, M.F., KOU, G.H., LIU, H.C., LIU, K.F., CHANG, C.F., PENG, S.E., HSU, H.C., WANG, C.H., LO, C.F. Long-term presence of white spot syndrome virus (WSSV) in a cultivated shrimp population without disease outbreaks. *Diseases of Aquatic Organisms*, v. 38: 107-114, 1999.

TAI, J.M., WANG, H.C., LEU, J.H., HSIAO, H.H., WANG, A.H.J., KOU, G.H., LO, C.F. Genomic and Proteomic Analysis of Thirty-Nine Structural Proteins of Shrimp White Spot Syndrome Virus. *Journal of Virology*, p. 11360-11370, 2004.

UMESHA,K.R., DASS, B.K.M., NAIK, B.M., VENUGOPAL, M.N., KARUNASAGAR, I., KARUNASAGAR, I. High prevalence of dual and triple viral infections in black tiger shrimp ponds in India. *Aquaculture*, v.258 : 91-96, 2006.

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

VIJAYAN K.K., STALIN RAJ V., BALASUBRAMANIAN C.P., ALAVANDI S.V., THILLAI SEKHAR V. & SANTIAGO T.C. Polychaete worms - a vector for white spot syndrome virus (WSSV). *Dis. Aquat. Org.*, 63, 107-111, 2005.

WAIKHOM, G., JOHN, K.J., GEORGE, M.R., JEYASEELAN, M.J.P. Differential host passaging alter pathogenicity and induces genomic variation in white spot syndrome virus. *Aquaculture*, v. 261: 54-63, 2006.

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

WANG Y.T., LIU W., SEAH J.N., LAM C.S., XIANG J.H., KORZH V. & KWANG J. White spot syndrome virus (WSSV) infects specific hemocytes of the shrimp *Penaeus merguensis*. *Dis. Aquat. Org.*, 52 (3), 249-259, 2002.

XU, J., HAN, F., ZHANG, X. Silencing shrimp white spot syndrome virus (WSSV) genes by siRNA. *Antiviral Research*, v. 73: 126-131, 2007.

YAN D.C., DONG S.L., HUANG J., YU X.M., FENG M.Y. & LIU X.Y. White spot syndrome virus (WSSV) detected by PCR in rotifers and rotifer resting eggs from shrimp pond sediments. *Dis. Aquat. Org.*, 59 (1), 69-73, 2004.

YOGANANDHAN, K., MUSTHAQ, S.S., SUDHAKARAN, R., BALASUBRAMANIAN, G., HAMMED, A.S.S. Temporal analysis of VP28 gene of Indian white spot syndrome virus isolate (WSSV) in different crustacean hosts. *Aquaculture*, v. 253, 71-81, 2006.

ZANOTTO, F.P., PINHEIRO, F. , BRITO, L.A., WHEATLY, M.G. Some considerations on calcium homeostasis in semi-terrestrial crabs. *International Congress Series*, Volume 1275, 2004.

ZHAN WB; WANG; YH; FRYER, JL; YU, KK; FUKUDA, H; MENG, Q.X. White spot syndrome virus infection of cultured shrimp in China. *Journal of Animal Health* 10:405-410, 1998.

ZHANG, J.S., DONG, S.L., TIAN, X.L., DONG, Y.W., LIU, X.Y., YAN, D.C. Studies on the rotifer (*Brachionus urceus* Linnaeus, 1758) as vector in white spot syndrome virus (WSSV) transmission. *Aquaculture*, v. 261, 1181-1185, 2006.

ANEXO

HISTÓRICO – FAZENDA 1

Fazenda: Portinho

Localização: Laguna-SC, bairro Portinho

Ano em que começou a produzir: 1999

Nº de ciclos já produzidos: 11

Algum problema em algum ciclo? Nos dois últimos, WSSV

De onde compra as PLs? As PLs já foram comprada da UFSC, da Unilarva e do Nordeste.

Qual a média de sobrevivência de despesca nos ciclos anteriores? 65% e 13g

Qual a sobrevivência no ciclo de 2004/2005? 65%

Foi afetado pela mancha branca neste ciclo? No final do ciclo.

Se sim, como descreve a situação que enfrentou? Realizou despesca de emergência? Foi realizada despesca de emergência

Em relação à outras enfermidades, tem algo a relatar? Não

Qual a dimensão dos viveiros? 2 viveiros de 2 ha e um viveiro de 1 ha

Qual a densidade de PLs que utiliza? Entre 15 e 25 Pls/m²

Qual a taxa de renovação de água que utiliza? Difícil de ser mensurado, acredito que em média uns 5% diários.

Qual a fonte de captação de água? Lagoa de Santo Antonio

Sabe se a fonte de captação d'água recebe algum efluente agrícola ou industrial? Se sim, sabe o quê? Não

Para onde vai a água de drenagem? Lagoa de Santo Antonio

Com que frequência fertiliza a água? Somente no início de cultivo

Monitora a transparência da água? Diariamente

Realiza secado e calagem entre os ciclos? Sim

Como é o solo dos viveiros? Dois de turfa e um de areia

Monitora OD, temperatura, alcalinidade e salinidade? Qual a média? Sim; a salinidade fica normalmente entre 15-20ppt; a alcalinidade acima de 100, a temperatura no verão em média uns 26°C mas podendo chegar a 12°C no inverno, OD muito variável, mas alguns dias o OD amanhecia menor que 2 mg/l.

Qual a ocorrência de caranguejos e siris nos viveiros? severa

Como é o aporte de zooplâncton nos viveiros? Nunca foi mensurado

EM RELAÇÃO AO CICLO ATUAL

Sem ciclo atual, fazenda em processo para virar loteamento urbano. Dados de referentes à coleta no Tempo1.

Data de povoamento: 18 de outubro de 2006

Origem das PLs: Unilarva

Densidade de povoamento: 15 pL/m²

Taxa de renovação de água que vem utilizando: cerca de 5%

Realizou fertilização neste ciclo? Sim

Tem monitorado o crescimento dos camarões? Como está? Sim, ruim e o viveiro já apresenta mortalidades pelo WSSV

Detectou mortalidade ou algum problema fora do normal? o viveiro já apresenta mortalidades pelo WSSV