



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE AQUICULTURA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

**Prospecção de fatores associados à manifestação e dispersão da  
enfermidade do vírus da síndrome da mancha branca em Santa  
Catarina**

Tese apresentada como requisito parcial a  
obtenção do título de doutor em Aquicultura,  
Centro de Ciências Agrárias, Universidade  
Federal de Santa Catarina

Orientador: Edegar Roberto Andreatta

**Sérgio Winckler da Costa**

Florianópolis  
2010

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária  
da  
Universidade Federal de Santa Catarina

C837p Costa, Sérgio Winckler da  
Prospecção de fatores associados à manifestação e dispersão da  
enfermidade do vírus da síndrome da mancha branca em Santa Catarina  
[tese] / Sérgio Winckler da Costa ; orientador, Edemar Roberto Andreatta.  
– Florianópolis, SC, 2010.  
145 p.: il., grafs., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de  
Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura.

Inclui referências

1. Aquicultura. 2. Epidemiologia. 3. Vírus da síndrome da mancha  
branca. 4. Siri. 5. Caranguejo. 6. Camarão. 7. *Litopenaeus vannamei*. I.  
Andreatta, Edemar Roberto. II. Universidade Federal de Santa Catarina.  
Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. III. Título.

CDU 639.3

**Prospecção de fatores associados à manifestação e dispersão da enfermidade do vírus da síndrome da mancha branca em santa catarina**

Por

**SÉRGIO WINCKLER DA COSTA**

Esta tese foi julgada adequada para obtenção do título de

**DOUTOR EM AQÜICULTURA**

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

---

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

Banca Examinadora

---

Dr. Edegar Roberto Andreatta – Orientador

---

Dra. Emiko Shinozaki Mendes

---

Dr. Luis Alberto Romano

---

Dra. Maria Risoleta Freire Marques

---

Dra. Walter Quadros Seiffert



Ao saudoso amigo Elpidio  
Beltrame (*in memoriam*)



## **AGRADECIMENTOS**

A miha esposa Sandra e meus filhos Mateus e Tales, por tudo que deixamos de fazer durante o período do doutorado.

Ao meu Orientador Dr. Edegar Roberto Andreatta, pela oportunidade.

A Dra. Maria Risoleta Freire Marques, responsável pelo LABCAI – UFSC e as bolsistas Juliana Moser, Ana Paula Fraga, Talita Medeiros de Souza pelo apoio na realização das análises de PCR .

Ao Dr. Luiz Romano pelos valiosos conhecimentos transmitidos e pela amizade.

A Dra. Emiko Mendes pela participação na banca e contribuições para correção da tese.

Ao Secretário da PGAQUI Carlito Aloisio Klunk pela dedicação e disposição em ajudar.

Aos colegas da EPAGRI, Luiz Rodrigo Vicente, Paulo José Padilha, Jefferson de Oliveira, Joel Gaspar de Souza e a bolsista da FINEP Juliana de Medeiros pela colaboração nas coletas e análises.

As colegas da Epagri Florianópolis Jerusa Paula Beal, Zilma Maria Vasco, Tania Bianchini e Joelma Miszinski pela ajuda e atenção dispensada.

Ao funcionário do LCM - UFSC João Santana pela parceria na administração dos recursos dos projetos de pesquisa utilizados para realização da tese.

Ao amigo de todas as horas Bento Garcia, que compartilhou e ajudou nos momentos difíceis.

Ao colega da EPAGRI e amigo Albertino Zamparetti, cuja colaboração foi fundamental para realização de todas as etapas deste trabalho.

Às instituições FINEP e FAPESC pelos recursos disponibilizados para realização das pesquisas e a EMBRAPA pela concessão de bolsa de estudos.

Aos que não foram citados, mas que diretamente ou indiretamente apoiaram e fizeram parte desta conquista profissional.



## RESUMO

A enfermidade da mancha branca afetou a maioria das fazendas de Camarões de Santa Catarina a partir de 2004. Pelas informações de estudo epidemiológico sugere-se que o ingresso do vírus ocorreu através de náuplius e pós larvas importados de outros estados. A dispersão da enfermidade entre fazendas da mesma região ocorreu através de efluentes contaminados pelo WSSV. Dez das 107 fazendas existentes no estado não sofreram mortalidades pelo WSSV, possivelmente pelo seu isolamento e distância das fazendas afetadas. Valores elevados de amônia e o baixo potencial redox do solo dos viveiros foram o provável gatilho para as primeiras manifestações da enfermidade. A presença do WSSV em camarões, caranguejos e siris silvestres em cinco lagoas do Complexo Lagunar Sul de Santa Catarina foi observada em 112 das 309 (36,24%) amostras analisadas através de *nested* PCR e em sete de 174 (4,02%) camarões analisados por histopatologia. Observou-se um aumento na presença de WSSV nos organismos silvestres ao longo de quatro anos, apesar da redução da área de fazendas afetadas pelo WSSV. No monitoramento de oito fazendas de camarão foi verificada a ocorrência de mortalidade e à presença do WSSV por PCR e histopatologia em cinco delas com focos nos ciclos anteriores. Sugere-se a aplicação de medidas de biossegurança para evitar o ingresso do WSSV nos cultivos e diminuir os riscos de novos surtos da enfermidade.

**Palavras Chave:** cultivo de camarões, vírus da síndrome da mancha branca, WSSV, epidemiologia, fenol, alcalinidade, siris, caranguejos, *Litopenaeus vannamei*,



## **Prospecting factors associated with the outbreak and dispersal of white spot disease in Santa Catarina state, Southern Brazil.**

### **ABSTRACT**

The white spot disease has affected the majority of shrimp farms of Santa Catarina state, southern Brazil since 2004. The results of epidemiological study suggest that the entrance of White Spot Syndrome virus (WSSV) occurred through nauplii and post larvae imported of the others states. The dispersion of the disease among farms in the same region occurred through effluents infected by WSSV. The disease did not affect 10 out of the 107 farms in the state, possibly due to their isolation or distance from affected farms. Elevated levels of ammonia and low redox potential of the soil ponds was the likely trigger for the onset of the disease. The presence of WSSV in wild shrimp, burrowing crabs and blue crabs of Santa Catarina Southern Lagoon Complex was observed in 112 of 309 (36, 24%) samples analyzed by nested PCR and in 7 out of 174 (4.02%) samples of shrimp analyzed by histopathology. We observed an increase in the presence of WSSV in wild organisms along four years, despite the reduction in area of WSSV affected farms. In the monitoring of eight shrimp farms were verified the occurrence of mortality and presence of the WSSV by PCR and histopathology in five of them with outbreaks in previous cycles. Was observed a possible relationship between WSSV mortalities and the concentration of phenol and low alkalinity of the water. Mortalities were observed at intervals of rising water temperature between 24.6 to 29.29 ° C. It is suggested the application of biosecurity measures to prevent the entry of the WSSV in the shrimp farms and reduce the risk of new outbreaks for the disease.

**Key Words:** shrimp culture, white spot syndrome virus, WSSV, epidemiology, burrowing crabs, blue crabs, phenol, alkalinity



## LISTA DE FIGURAS

### CAPITULO I

- Figura 1. Desempenho da carcinocultura brasileira no período de 1998 a 2008. .... 26
- Figura 2. Produção de camarões em Santa Catarina, 2001 a 2009..... 27
- Figura 3. 1 – 5 microscopia eletrônica de transmissão de preparados de vírus de camarões penaeídeos corados com PTA 2%. Escala de barras em nanômetros como indicado. 1 – IHNV; 2 – TSV; 3 – WSSV; 4 – YHV e 5 – IMNV. 6 - Esquema dos principais vírus de camarões penaeídeos agrupados por tipo de ácido nucléico do genoma , tamanho relativo e perfil geral. .... 29
- Figura 4. Produção de camarões em toneladas métricas de 1987 até 2008. Eixo esquerdo representa a produção mundial e da China e o eixo direito representa a produção do Equador. Estão indicados os momentos do surgimento do WSSV no Equador e na Ásia. .... 32
- Figura 5. Alta ampliação do WSSV em microscopia eletrônica. (a) Fina secção do WSSV em um núcleo celular. (b) Virions purificados corados negativamente mostrando um único apêndice tipo cauda no final . .... 34
- Figura 6. A –D – Modelo de interação molecular entre o WSSV com as células do camarão durante a infecção viral. .... 37
- Figura 7. Histopatologia do WSSV. Esquerda: baixa ampliação microscópica, mostrando muitas inclusões características de WSSV no epitélio subcuticular do estômago. Direita: alta ampliação microscópica do núcleo, com inclusões Cowdry tipo A no canto direito inferior. .... 41

### CAPITULO II

- Figura 1. Localização das áreas de cultivo de camarões no litoral de Santa Catarina (1 -17) conforme descrição na Tabela 1..... 57
- Figura 2. Intervalo de temperaturas diárias nos surtos de WSSV por mês de ocorrência ..... 60

### CAPITULO III

- Figura 1. Localização dos pontos de amostragem no Complexo Lagunar Sul de Santa Catarina. 1 – Lagoa de Imaruí; 2 – Lagoa do Ribeirão; 3 – Lagoa de Santo Antônio; 4 – Lagoa de Santa Marta; 5 – Lagoa do Camacho.....73
- Figura 2. Gel de agarose (2%) dos produtos amplificados por PCR de amostras de siris: 13 - 15 – amostras negativas para WSSV, Lagoa do Camacho; 16 - 21 – amostra positivas para WSSV, L. Santa Marta; MK: Marcador 1 Kb Marca Biolabs; + : controle positivo 941pb = positivo para WSSV .....75
- Figura 3. Epitélio gástrico de camarões da Lagoa do Camacho na coleta 2006 (100 x) com inclusões centrais em núcleos hipertróficos características de WSSV. ....78

### CAPITULO IV

- Figura 1. Localização dos pontos de amostragem no Complexo Lagunar Sul de Santa Catarina. 1 – Lagoa de Imaruí; 2 – Lagoa do Ribeirão; 3 – Lagoa de Santo Antônio; 4 – Lagoa de Santa Marta; 5 – Lagoa do Camacho.....91
- Fig. 2. Gel de agarose (2%) dos produtos amplificados por PCR de amostras de camarões 14 – 15 – amostras positivas WSSV, *P. schmitti* L. Santo Antônio; 16 -18 – amostra positiva WSSV *F. paulensis* L. Camacho; 19 – 21 - amostra positivas WSSV *F. paulensis* L. Santa Marta; MK: Marcador 1 Kb Marca Biolabs; + : controle positivo 941pb = positivo para WSSV.....93
- Figura 3. Gel de agarose (2%) dos produtos amplificados por PCR de amostras de siris 16 – 18 – amostras positivas WSSV, *C. danae* L. Santa Marta; 19 -21 – amostras positivas WSSV *C. sapidus* L. Santa Marta; 22 - amostra positivas WSSV *C. danae* L. Imaruí; 23 – 25 - - amostras negativas WSSV *C. danae* L. Imaruí; - 26 -27 – amostra positivas WSSV *C. sapidus* L. Imaruí; MK: Marcador 1 Kb Marca Biolabs; + : controle positivo 941 pb = positivo para WSSV .....94
- Figura 4. Epitélio cuticular (A) e epitélio gástrico (B) do camarão *Farfantepenaeus paulensis* de amostra da Lagoa de Imaruí (100 X) com inclusões centrais em núcleos hipertróficos características de WSSV. ....96

## **CAPITULO V**

Figura 1. Temperaturas máxima, média e mínima da água por fazenda, com a indicação da data de inicio da manifestação da mancha branca. ....	114
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----



## LISTA DE TABELAS

### CAPITULO I

- Tabela 1. Produção de camarões cultivados nos principais países no ano de 2008. .... 25
- Tabela 2. Principais vírus que afetam os camarões de cultivo. .... 30

### CAPITULO II

- Tabela 1. Data do início dos surtos de WSSV, localização e número de fazendas. .... 56
- Tabela 2. Concentrações máxima, mínima e média das variáveis físico-químicos da água de fazendas no dia de início de mortalidades por WSSV e o número de amostras (n)..... 58
- Tabela 3. Média, desvio padrão e número de amostras das variáveis do solo dos viveiros de fazendas onde iniciaram as mortalidades de camarões em Santa Catarina. .... 59

### CAPITULO III

- Tabela 1. Detecção de WSSV por *nested* PCR em camarões, siris e caranguejos, por local e data de coleta. Valores representam o número de amostras (pools) positivas para WSSV em relação ao número total examinado e o percentual correspondente (%). .... 76
- Tabela 2. Área de viveiros (ha), quantidade de pós larvas (pls x 1000) e número de fazendas com surtos de WSSV por lagoa e período de cultivo anteriores as coletas. .... 77

### CAPITULO IV

- Tabela 1. Resultados de PCR (*nested*) positivas para WSSV pelo numero total de amostras (*pools*), por espécie em cada Lagoa. WT é o peso total médio, em gramas, LT o comprimento total médio, em centímetros e n o número de organismos coletados. .... 95
- Tabela 2. Área de viveiros (ha), quantidade de pós larvas (pls x 10<sup>3</sup>) e número de fazendas com surtos de WSSV por lagoa, na safra anterior a coleta..... 96

## CAPITULO V

- Tabela 1. Localização das fazendas, área dos viveiros (Viv.), data de povoamento, ocorrência de mortalidades anteriores por Wssv (S) e densidade de camarões por viveiro .....105
- Tabela 2. Data, tempo de cultivo e peso dos camarões nos eventos de mortalidade, relação do número de amostras positivas para WSSV (PCR) e de camarões com lesões histopatológicas características (histop.) com o número total analisado e sobrevivência final por viveiro .....111
- Tabela 3. Percentual de camarões por grau de severidade de presença de epicomensais nas brânquias, pereiópodos e pleópodos, presença de canibalismo, gregarinas e cianobactérias, condição de stress e do hepatopâncreas em viveiros sem (-) e com (+) WSSV e o número de amostras (n).....113
- Tabela 4. Concentração média e desvio padrão dos parâmetros físico e químicos da água e do solo em viveiros (Viv) com (+) e sem (-) WSSV e o número de amostras.....115

## SUMÁRIO

CAPITULO I - INTRODUÇÃO GERAL.....	23
1. INTRODUÇÃO .....	24
1.1. Cultivo de camarões .....	24
1.1.1. Produção Mundial de camarões .....	24
1.1.2. Cultivo de camarões no Brasil.....	24
1.1.3. Cultivo de camarões em Santa Catarina.....	26
1.1.4. O camarão <i>Litopenaeus vannamei</i> .....	27
1.2. Doenças em cultivo de camarões .....	28
1.3. Enfermidade do Vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV).....	31
1.3.1. Origem e dispersão.....	31
1.3.2. Impactos sócio-econômicos .....	32
1.3.3. Taxonomia do WSSV.....	33
1.3.4. Morfologia do WSSV.....	33
1.3.5. Genoma do WSSV .....	34
1.3.6. Proteínas estruturais do WSSV .....	35
1.3.7. Mecanismo molecular da infecção do WSSV .....	36
1.3.8. Imunidade antiviral em camarões.....	37
1.3.9. Métodos de diagnóstico do WSSV .....	39
1.3.10. Epidemiologia e sinais clínicos da enfermidade da mancha branca .....	40
1.3.11. Histopatologia e tecidos alvo da infecção por WSSV.....	40
1.3.12. Fatores ambientais e de cultivo e a infecção por WSSV.....	41
1.3.13. Transmissão do WSSV.....	43
1.3.14. Hospedeiros e vetores do WSSV.....	44
1.3.15. Medidas de controle para o WSSV .....	47
2. JUSTIFICATIVA.....	48
3. OBJETIVOS .....	49
3.1. Objetivo Geral .....	49
3.2. Objetivos Específicos.....	49
4. FORMATAÇÃO DOS ARTIGOS.....	49

CAPITULO II - ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA ENFERMIDADE DA MANCHA BRANCA NO ESTADO DE SANTA CATARINA, SUL DO BRASIL .....	50
RESUMO.....	51
ABSTRACT.....	52
INTRODUÇÃO .....	53
MATERIAL E MÉTODOS .....	53
RESULTADOS.....	55
DISCUSSÃO .....	60
CONCLUSÕES .....	64
REFERÊNCIAS.....	64
CAPITULO III - PRESENÇA DO VÍRUS DA SÍNDROME DA MANCHA BRANCA (WSSV) EM CRUSTÁCEOS DECÁPODES SELVAGENS E A RELAÇÃO COM FAZENDAS DE CAMARÕES AFETADAS PELA ENFERMIDADE NO SUL DO BRASIL.....	68
ABSTRACT.....	69
RESUMO.....	70
INTRODUÇÃO .....	71
MATERIAL E MÉTODOS .....	72
RESULTADOS.....	75
DISCUSSÃO .....	79
REFERÊNCIAS.....	82
CAPITULO IV - VÍRUS DA SÍNDROME DA MANCHA BRANCA (WSSV) EM CAMARÕES PENEÍDEOS E SIRIS NO COMPLEXO LAGUNAR SUL DE SANTA CATARINA, BRASIL.....	87
ABSTRACT.....	88
RESUMO.....	89
INTRODUÇÃO .....	90
MATERIAL E MÉTODOS .....	90
RESULTADOS.....	93
DISCUSSÃO .....	94
CONCLUSÃO .....	97
REFERÊNCIAS.....	98

CAPITULO V - RELAÇÃO ENTRE PARÂMETROS DE CULTIVO E A ENFERMIDADE DA MANCHA BRANCA EM FAZENDAS DE CAMARÕES DE SANTA CATARINA .....	101
ABSTRACT.....	102
RESUMO .....	103
INTRODUÇÃO .....	104
MATERIAL E MÉTODOS .....	104
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	110
CONCLUSÕES.....	117
REFERÊNCIAS .....	117
CONCLUSÕES GERAIS .....	121
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	123
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO .....	126



## **CAPITULO I**

### **INTRODUÇÃO GERAL**

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Cultivo de camarões

#### 1.1.1. Produção Mundial de camarões

O cultivo de camarões surgiu no sudeste da Ásia a centenas de anos com a entrada de larvas de forma natural em viveiros de milkfish abastecidos pela maré nas Filipinas e Índia, o que contribuiu para o processo de estocagem de viveiros através da captura de pós larvas na região costeira, assim como para o início dos estudos para a produção de pós larvas em laboratório (PRIMAVERA, 1985). Esta prática evoluiu para sistemas extensivos de cultivo em grandes viveiros, estocados a baixa densidade com pós larvas capturadas na natureza.

O cultivo moderno de camarões iniciou-se no Japão nos anos 30 com a reprodução e larvicultura do camarão *Marsupenaeus japonicus* em laboratório (HUDINAGA, 1942).

O domínio da tecnologia de produção massal de pós larvas e a formulação de rações para camarões peneídeos permitiram o surgimento de sistemas semi intensivos e intensivos de cultivo (HSU et al., 2000).

No ano de 2008 a produção mundial de camarões cultivados foi de 3.398.673 toneladas, gerando mais de 14 bilhões de dólares e envolvendo mais de 40 países da Ásia, Américas do Norte, Central e do Sul. China, Tailândia, Indonésia e Vietnã foram responsáveis por 74% de toda produção. Os maiores produtores de camarão do mundo no ano de 2008 constam na Tabela 1 (FAO, 2010).

*Litopenaeus vannamei* foi a principal espécie cultivada no ano de 2008, representando 63,4% da produção total e o restante ficou dividido entre outras espécies, onde as principais foram *Penaeus monodon*, *Fenneropenaeus chinensis*, *F. merguensis*, *Marsupenaeus japonicus* e *F. indicus* (FAO, 2010).

#### 1.1.2. Cultivo de camarões no Brasil

Os primeiros experimentos com o cultivo de camarões no Brasil foram realizados na década de 70, destacando-se a implantação do “Projeto Camarão”, no Rio Grande do Norte. Entre 1978 e 1984 surgiram as primeiras fazendas comerciais que utilizaram a espécie *Penaeus japonicus* em estados do nordeste. Esta espécie apresentou problemas de viabilidade técnica decorrentes da sua adaptação as

condições ambientais da região. No período de 10 anos seguintes trabalhou-se com a domesticação das espécies nativas (*Litopenaeus subtilis*, *Farfantepenaeus paulensis* e *L. schimtti*) que apresentaram baixo desempenho produtivo, comprometendo a rentabilidade da atividade, culminando com o fechamento de várias fazendas de cultivo. Uma nova fase da carcinicultura brasileira iniciou-se com a reintrodução da espécie *L. vannamei* e o domínio das técnicas de larvicultura e reprodução da mesma no início dos anos 90. A partir de 1995/1996 foi demonstrada a viabilidade comercial do cultivo desta espécie no país, provocando um acelerado crescimento da atividade em termos de área, produção e produtividade. (BRASIL, 2001).

Tabela 1. Produção de camarões cultivados nos principais países no ano de 2008.

<b>Países</b>	<b>Produção t</b>
China	1.225.522
Tailândia	507.500
Indonésia	408.246
Vietnam	381.300
Equador	150.000
México	130.201
Índia	86.600
Bangladesh	67.197
Brasil	65.000
Malásia	51.047
Filipinas	48.199
Outros	277.861
<b>Total</b>	<b>3.398.673</b>

(Fonte: FAO, 2010).

O acelerado crescimento culminou com a produção de 90 mil toneladas no ano de 2003, seguindo uma significativa redução da

produção nos anos seguintes em decorrência da enfermidade da Mionecrose Infecciosa em fazendas do nordeste, problemas de mercado e problemas climáticos (Figura 1) (ROCHA & ROCHA, 2009).

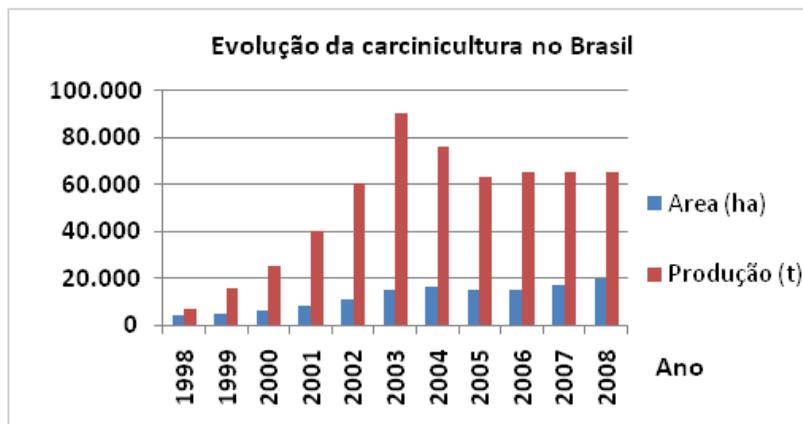


Figura 1. Desempenho da carcinicultura brasileira no período de 1998 a 2008. (Fonte: FAO, 2010).

### 1.1.3. Cultivo de camarões em Santa Catarina

As primeiras iniciativas de cultivo do camarão em cativeiro em Santa Catarina ocorreram no ano de 1970, com a produção das primeiras pós larvas em laboratório da América Latina (LARA, 1974) e desenvolvidas pesquisas de cultivo em viveiros abastecidos pela maré com larvas capturadas na natureza (POLI, 1972). Apesar do pioneirismo, a atividade somente assumiu características comerciais a partir de 1983, quando foram implantadas várias fazendas, além da construção do Laboratório de Larvicultura da UFSC no ano de 1985 (COSTA, 1998). Os cultivos foram desenvolvidos com as espécies nativas *Farfantepenaeus paulensis* e *Litopenaeus schmitti*, que apresentaram fraco desempenho econômico, provocando o fechamento de grande parte das fazendas. No ano de 1998 foi introduzida a espécie *L. vannamei* no estado, a qual apresentou excelentes resultados técnico-econômicos, iniciando-se um novo ciclo de crescimento da atividade. (COSTA et al., 2000). A partir deste momento ocorreu um rápido incremento no número de fazendas, área e produção, atingindo-se a produção de 4.189 toneladas em 106 fazendas e 1.563 hectares de viveiros no ano de 2004. Esses valores sofreram uma forte queda nos anos subseqüentes (Figura 2) em função do surgimento da enfermidade

da mancha branca (WSSV) no estado no final de 2004 (SEIFFERT et al., 2005).

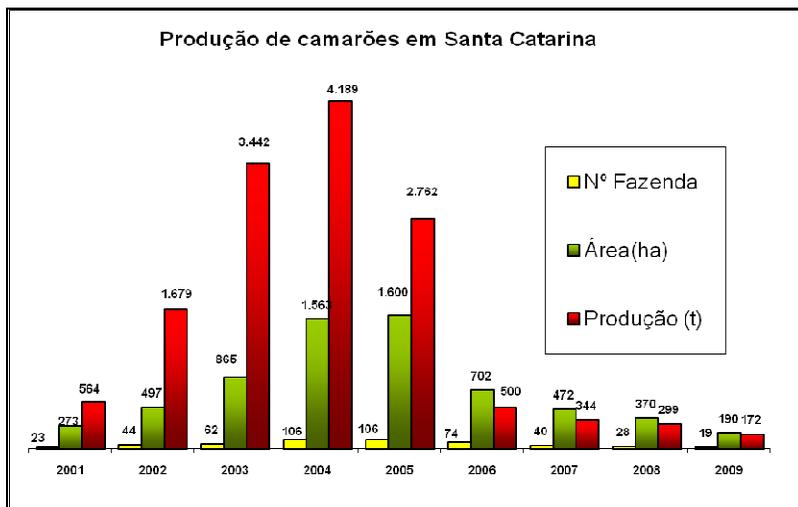


Figura 2. Produção de camarões em Santa Catarina, 2001 a 2009. (Fonte: COSTA, 2010).

#### 1.1.4. O camarão *Litopenaeus vannamei*

O camarão *L. vannamei* distribui-se na costa do Pacífico entre o estado de Sonora, México e o norte do Peru em profundidades entre zero e 72 m, adultos em água salgada e juvenis em estuários. Recebe o nome comum de camarão pata branca (Whiteleg shrimp) pela FAO e de camarão branco nos países onde se distribui naturalmente (HOLTHUIS, 1980). A classificação sistemática é descrita a seguir (PÉREZ-FARFANTE e KENSLEY, 1997):

**Filo** Arthropoda  
**Sub filo** Crustacea  
**Classe** Malacostraca  
**Sub classe** Eumalacostraca  
**Superordem** Eucarida  
**Ordem** Decapoda  
**Subordem** Dendrobranchiata  
**Superfamília** Penaeoidea  
**Família** Penaeidae

**Gênero** *Litopenaeus***Espécie** *Litopenaeus vannamei* Boone 1931

A espécie *L. vannamei* apresenta várias vantagens comparadas a outras espécies cultivadas. Entre elas está a disponibilidade de cepas livres (SPF) e resistentes (SPR) a patógenos específicos, alta taxa de crescimento, aptidão para altas densidades de estocagem, tolerância a um amplo intervalo de salinidade e temperatura, uma dieta com baixo requerimento de proteínas, fácil de reproduzir e alta taxa de sobrevivência na larvicultura (BRIGGS et al., 2004). Estes aspectos explicam o aumento da preferência pelo cultivo desta espécie.

**1.2. Doenças em cultivo de camarões**

As doenças de camarões peneídeos cultivados incluem síndromes de origem infecciosa e não infecciosa. Entre as doenças infecciosas de importância econômica estão as causadas por vírus, rickettsias, bactérias, fungos e parasitas. As doenças não infecciosas importantes para a indústria de cultivo de camarões são causadas por condições ambientais extremas, problemas nutricionais, agentes tóxicos e fatores genéticos (LIGHTNER e REDMAN, 1998). Entre as doenças infecciosas de camarões cultivados, as causadas por vírus sobressaem-se como as mais significativas em relação às perdas econômicas (LIGHTNER, 2005).

Mais de 20 vírus tem sido descritos por infectar camarões marinhos. Muitos não têm sido associados com sinais clínicos de doenças e alguns têm sido observados somente por microscopia eletrônica e pouco caracterizados (WALKER e MOHAN, 2009). Seis patógenos virais de camarões marinhos estão listados pela Organização Internacional de Epizootias (OIE) como notificáveis causadores de doenças de animais aquáticos (OIE, 2009). Os principais vírus de camarões marinhos cultivados encontram-se na Tabela 2

As pandemias devido aos vírus WSSV e TSV, e em menor extensão para IHNV e YHV têm custado à indústria de cultivo de camarões bilhões de dólares em perdas de colheitas, empregos e divisas de exportações. Os impactos sociais e econômicos das pandemias causadas por estes vírus tem sido profundos em países em que o cultivo de camarões constitui uma indústria significativa (LIGHTNER & PANTOJA, 2001).

Embora cerca de 10 dos vírus conhecidos tenham sido encontrados em camarões peneídeos cultivados no Hemisfério Leste

(Tabela 2), somente quatro destes tem causado doenças panzóticas com sérias conseqüências econômicas nas Américas na década passada, (LIGHTNER, 2003). Estas viroses, ou talvez mais corretamente grupos de cepas diferentes das mesmas espécies de vírus, são IHHNV, TSV, WSSV, e IMNV (Tabela2; Figura 3).

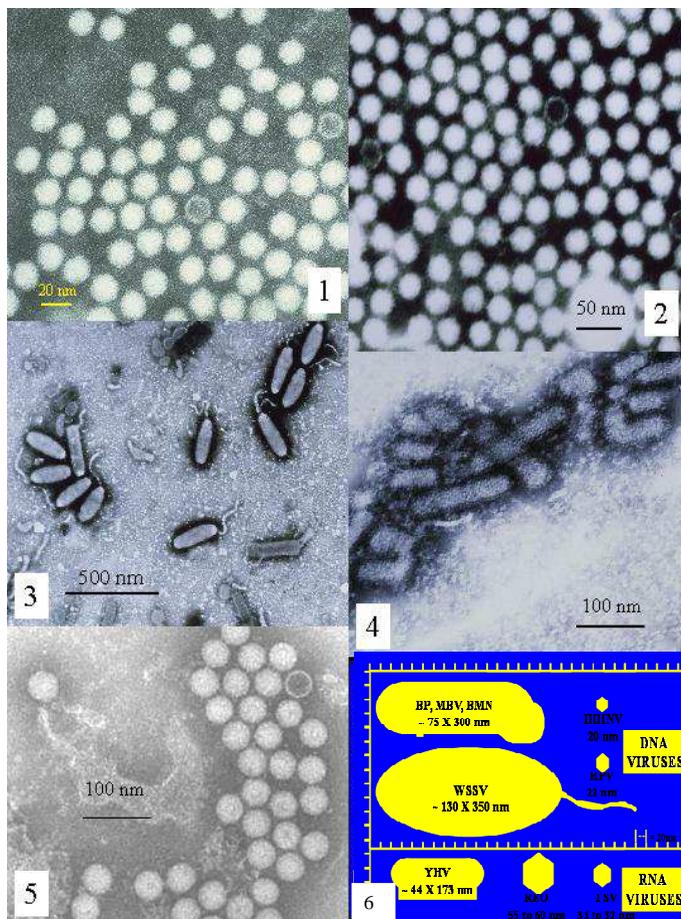


Figura 3. 1 – 5 microscopia eletrônica de transmissão de preparados de vírus de camarões penaeídeos corados com PTA 2%. Escala de barras em nanômetros como indicado. 1 – IHHNV; 2 – TSV; 3 – WSSV; 4 – YHV e 5 – IMNV. 6 - Esquema dos principais vírus de camarões peneídeos agrupados por tipo de ácido nucléico do genoma, tamanho relativo e perfil geral. (Fonte: LIGHTNER, 2003).

Tabela 2. Principais vírus que afetam os camarões de cultivo.

<b>Vírus</b>	<b>Abrev</b>	<b>Família</b>	<b>Gênero</b>	<b>Genoma</b>	<b>Distribuição Conhecida</b>
White spot syndrome virus *	WSSV	Nimaviridade	Whispovirus	dsDNA	Ásia, Américas
Yellow head virus *	YHV	Roniviridae	Okavirus	(+) ssRNA	Ásia, América Central
Gill-associated virus	GAV	Roniviridae	Okavirus	(+) ssRNA	Austrália, Ásia, Pacífico
Taura Syndrome virus*	TSV	Dicistroviridae	não atribuído	(+) ssRNA	Ásia, Américas
Infectious myonecrosis virus*	IMNV	Totiviridae	não atribuído	(+) ssRNA	América do Sul, Ásia
Baculovirus penaei*	BP	Baculoviridae	não atribuído	dsDNA	Ásia
Monodon baculovirus	MBV	Baculoviridae	Nucleopolyhe- drosivirus	dsDNA	Ásia, Austrália, África, Américas
Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus*	IHHNV	Parvoviridade	Brevidensovirus	ssDNA	Ásia, Austrália, África, Américas, Pacífico
Hepatopancreatic parvovirus	HPV	Parvoviridade	Brevidensovirus	ssDNA	Ásia, Austrália, África, Américas
Mourilyan virus	MoV	Bunavirus-like	não atribuído	(-)ssRNA	Austrália, Ásia
Laem singh virus	LSNV	Leuteovirus-like	não atribuído	(+)ssRNA	Ásia
Spawner-isolataed mortality virus	SMV	Parvoviridade	não atribuído	ssDNA	Austrália, Ásia
Baculoviral midgut gland necrosis virus	BMNV	Baculoviridae	não atribuído	dsDNA	Austrália, Ásia
Lymphoid organ vacuolization virus	LOW	Togavirus-like	não atribuído	(+) ssRNA?	Américas

\* OIE (2009) listadas (Fonte: WALKER e MOHAN, 2009)

O vírus da síndrome da mancha branca (WSSV) é reconhecido como o patógeno mais devastador do cultivo de camarões, infectando todos os peneídeos cultivados, e responsável por grande parte do impacto de doenças na produção global de camarões (WALKER e MOHAN, 2009; ESCOBEDO BONILLA, 2008).

### **1.3. Enfermidade do Vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV)**

#### **1.3.1. Origem e dispersão**

A enfermidade da mancha branca foi primeiro observada em agosto de 1992 em viveiros de *Penaeus japonicus* na Província de Fujian, China, (ZHAN et al. 1998), espalhando-se rapidamente para fazendas ao sul e ao norte e possivelmente para fazendas de Taiwan (LO, 2003). No início de 1993, mortalidades foram relatadas em várias fazendas do Japão que haviam importado juvenis de *P. japonicus* da China (NAKANO et al., 1994), onde ocorreu a identificação e caracterização do agente causador da doença (INOUYE et al., 1994; MOMOYAMA et al., 1994; NAKANO et al., 1994; TAKAHASHI et al., 1994). No mesmo período surtos de WSSV foram observados na Coreia (PARK et al., 1998) e desde então se espalhou por vários países asiáticos como Tailândia (LO et al. 1996a) e, Índia (KARUNASAGAR et al., 1997) em 1994, Indonésia (DURAND et al. 1996) e Malásia (KASORNCHANDRA et al. 1998) em 1996, Vietnã em 1997 (BONDAD-REANTASO et al. 2001) e Filipinas em 1999 (MAGBANUA et al. 2000).

No continente Americano o WSSV foi primeiro relatado no ano de 1995 em laboratórios de larvicultura no Texas e na Carolina do Sul, nos Estados Unidos (LIGHTNER 1996; WANG et al. 1999). Em seguida ele foi relatado no Peru em 1998 (ROSENBERRY, 2001), Equador, México e países da América Central em 1999 ((RODRIGUEZ et al., 2003; BONDAD-REANTASO et al., 2001) e recentemente no Brasil (SEIFFERT et al., 2005).

Desde o primeiro relato do seu surgimento, diferentes nomes têm sido usados para descrever o mesmo vírus. Rod-shaped virus de *P. japonicus* (RV-PJ) (INOUYE et al., 1994), Systemic ectodermal e mesodermal baculovirus (SEMBV) (WONGTEERASUPAYA et al., 1995), Penaeid rod-shaped DNA vírus (PRDV) (INOUYE et al., 1996), Hypodermal e hematopoietic necrosis baculovirus (HHNBV) (HUANG et al., 1995), Chinese baculovirus (CBV) (NADALA et al., 1998) e

White spot baculovirus (WSBV) (CHOU et al., 1995; WANG et al., 1995) e *Penaeus monodon* non-occluded baculovirus (PmNOB) (CHOU et al. 1995). Atualmente, o nome “White spot syndrome virus” (WSSV) ou síndrome do vírus da mancha branca é o nome oficial aprovado pela ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses) e utilizado pela maioria dos grupos de pesquisadores (VLAK et al., 2005).

### 1.3.2. Impactos sócio-econômicos

Os impactos do WSSV na produção mundial de camarões cultivados e em dois dos principais produtores, China e Equador, podem ser observados na Figura 4.

Estima-se que os prejuízos causados pelo WSSV na produção de camarão do ano do surgimento até 2001 tenham sido na ordem de US\$ 4 – 6 bilhões na Ásia e superiores a US\$ 2 bilhões nas Américas (LIGHTNER, 2003).

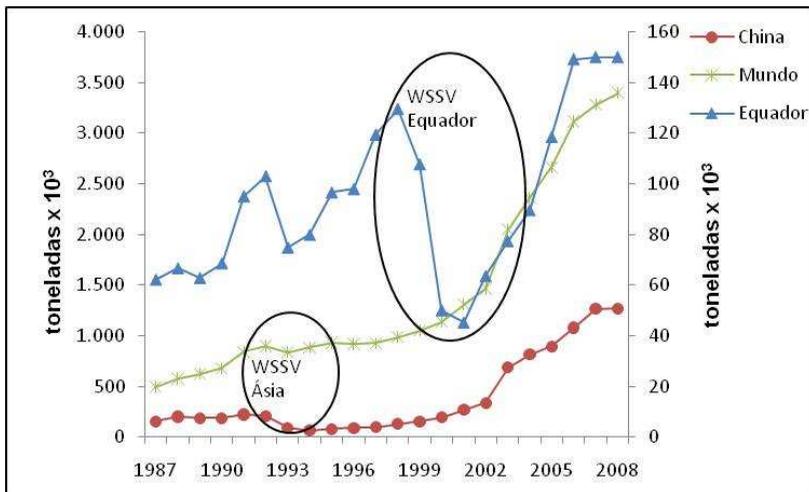


Figura 4. Produção de camarões em toneladas métricas de 1987 até 2008. Eixo esquerdo representa a produção mundial e da China e o eixo direito representa a produção do Equador. Estão indicados os momentos do surgimento do WSSV no Equador e na Ásia. (Fonte: FAO, 2010)

Embora nesta época o agente causativo ainda não havia sido identificado, a indústria Taiwanesa de cultivo do camarão *P. japonicus*

foi seriamente afetada por surtos de WSSV em 1992, com quebras na produção acima de 90% de 1991 a 1993. (LO et al., 2003).

Perdas provocadas pelo WSSV na Tailândia nos anos de 1996 e 1997 foram de aproximadamente US\$ 1 bilhão (FLEGEL, 2006), cerca de US\$ 50 milhões no Delta do Mekong no Vietnã no ano de 1994 (CHANRATCHAKOOL & PHILLIPS, 2002), de US\$ 25 milhões na Malásia em 1995 (YANG et al., 2001b), de US\$ 10 milhões em Bangladesh em 1996 (RAHMAN, 2001), de US\$ 40 milhões em divisas de exportação, fechamento de laboratórios de larvicultura e perdas de 5.000 empregos no Panamá (MORALES et al., 2001) e cerca de US\$ 100 milhões no Peru entre 1999 e 2000 (HILL, 2002)

O impacto sócio econômico do WSSV foi particularmente dramático no Equador onde a produção de 160 mil toneladas no início de 1999 caiu para 40 mil toneladas no final de 2000, com perdas econômicas de US\$ 280 milhões em 1999 e de US\$ 575 milhões em 2000, com perda de 150 mil empregos diretos e com estimativas de perda total de 500 mil empregos no país (HILL, 2002).

### **1.3.3. Taxonomia do WSSV**

Análise filogenética na DNA polimerase (VAN HULTEN et al., 2001a), ribonucleotídeo redutase (VAN HULTEN et al., 2000b), dois genes proteína kinase (VAN HULTEN & VLAK, 2001) e uma endonuclease não específica (WITTEVELDT et al., 2001) confirmaram uma única posição taxonômica do WSSV, sem relação ou distante de outras famílias de vírus de larga dsDNA. Então, WSSV foi classificado como uma espécie exclusiva (Whispovirus) de uma nova família monotípica chamada *Nimaviridae* (gênero *Whispovirus*) (VLAK et al., 2005) aprovado pela ICTV no ano de 2002.

### **1.3.4. Morfologia do WSSV**

Whispovirus (WSSV) são grandes partículas com formato ovóide a bacilariforme com cerca de 275 nm de comprimento e 120 nm de largura com um apêndice na forma de flagelo na extremidade (Figura 5). Consiste de um nucleocápsídeo na forma cilíndrica com uma estreita parede de cápsídeo e cercada por um envelope trilaminar. O nucleocápsídeo possui uma aparência segmentada e um tamanho de

cerca de 300 x 70 nm e contém uma molécula de DNA dupla fita (VLAK et al., 2002).

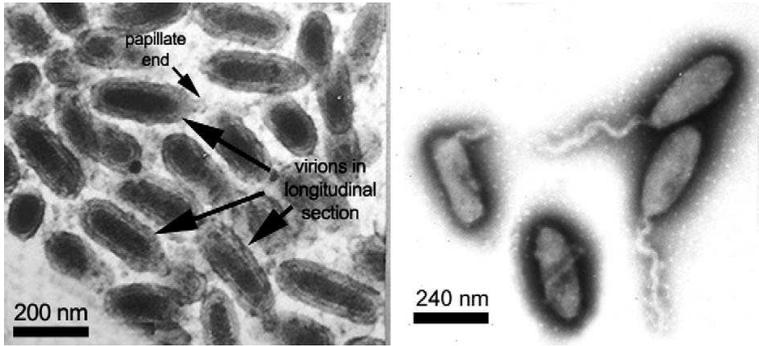


Figura 5. Alta ampliação do WSSV em microscopia eletrônica. (a) Fina secção do WSSV em um núcleo celular. (b) Virions purificados corados negativamente mostrando um único apêndice tipo cauda no final. (Fonte: WONGTEERASUPAYA et al., 1995)

### 1.3.5. Genoma do WSSV

O agente causador da enfermidade da mancha branca é um vírus com genoma de DNA de dupla cadeia, circular, de grande tamanho e com envelope (VLAK et al. 2005). A seqüência completa do seu genoma foi determinada para três isolados distintos da China, Tailândia e Taiwan, respectivamente (CHEN et al. 2002, VAN HULTEN et al. 2001a, YANG et al. 2001a). No total, ambas as cadeias contêm entre 531 e 684 janelas de leitura de transcrição gênica (open reading frames' ORFs, por sua sigla em inglês) formados por um cordão de início ATG e um de terminação. Entre eles, 180 a 184 ORFs codificam para polipeptídios de 51 a 6.077 aminoácidos, os quais representam 92% da informação genética contida no genoma (VAN HULTEN et al. 2001a; YANG et al. 2001a).

O genoma dos três isolados seqüenciados de WSSV mostra diferenças em tamanho. O isolado chinês tem um tamanho de genoma de 305107 bp (número de acesso Genbank AF332093) com 181 ORFs os quais representam 50 ou mais aminoácidos cada um. O isolado de Taiwan representa 307287 bp (Genbank AF440570) e o isolado da Tailândia que é o menor e conta com 292967 bp (Genbank AF369029). Essas variações de tamanho, provavelmente, se devem a supressões de

aproximadamente 12 kpb, o qual indica um grau de instabilidade genética (LAN et al. 2006). Porém, há uma variação genética muito pequena, com uma identidade genética entre pares de nucleotídeos entre os três isolados, sugerindo que eles, provavelmente, evoluíram de um ancestral comum, e estão intimamente relacionados (MARKS et al., 2004).

Supressões também foram observadas entre isolados de diferentes espécies hospedeiras da mesma área (LAN et al., 2002). Altas variações em n 54 bp DNA repetidos foram encontrados em amostras de diferentes regiões na Tailândia (WONGTEERASUPAYA et al., 2003). Essas variações na seqüência do genoma têm sido utilizadas em estudos de epidemiologia molecular para traçar o movimento do WSSV e identificar fontes de infecção (WONGTEERASUPAYA et al. 2003; DIEU et al. 2004; HOA et al. 2005; MUSTHAQ et al. 2006). Há também evidência que diferentes isolados variam significativamente em virulência (MARKS et al. 2005) e a passagem do WSSV em diferentes hospedeiros pode alterar a patogenicidade e as seqüências de regiões curtas repetidas (do inglês *tandem repeat regions*) (WAIKHOM et al., 2006).

Müller (2009) através de genotipagem verificou que os isolados de WSSV de camarões de Santa Catarina e da Bahia apresentam padrões diferentes, podendo ter diferentes origens ou ter sofrido mutações ao longo do tempo. Não foi identificado um padrão entre os isolados de WSSV do Brasil e de outros países analisando três minissatélites, mas foi observada uma similaridade na ORF 94 nos isolados de Santa Catarina, México, Nicarágua, Honduras e Panamá e entre os isolados da Bahia e dos EUA. No mesmo trabalho foram identificados genes diferencialmente expressos em camarões de cultivo infectados por WSSV, observando-se a indução de genes envolvidos na síntese da ATP, citoesqueleto, adesão celular, metabolismo e transporte de moléculas e a repressão de genes envolvidos na defesa contra bactérias e na transdução e biossíntese de ácidos nucléicos

### **1.3.6. Proteínas estruturais do WSSV**

Mais de 50 proteínas estruturais e uma proteína não estrutural VP9 (LIU, Y et al., 2006) têm sido detectadas em WSSV até agora. Elas foram denominadas de acordo com o peso molecular estimados das bandas de proteínas em SDS-PAGE (dodecil sulfato de sódio em gel de poliacrilamida e eletroforese) ou pelo número de aminoácidos. Proteínas localizadas no envelope são: VP12, VP19, VP22, VP24, VP28, VP31,

VP36B, VP38A, VP39, VP41, VP41A, VP41B, VP51B, VP52A, VP52B, VP53, VP53A, VP68, VP110, VP124, VP150, VP187, VP281, VP292, VP466 (VAN HULTEN et al., 2000b; HUANG et al., 2002a; HUANG et al., 2002b; VAN HULTEN et al., 2002; ZHANG et al., 2002; TSAI et al., 2004; YI et al., 2004; WU et al., 2005; ZHU et al., 2005; LI, H. et al., 2006; LI, L.J. et al., 2006; LI, L et al., 2005, TSAI et al., 2006; XIE & YANG, 2006; XIE et al., 2006; ZHU et al., 2006), no nucleocapsídeo: VP15, VP35, VP51C, VP60B, VP388, VP664 (VAN HULTEN et al., 2002; TSAI et al., 2004; LEU. et al., 2005; WITTEVELDT et al., 2005; TSAI et al., 2006; XIAO et al., 2006) e no tegumento: VP36A, VP39A, VP95 (TSAI et al., 2006). A localização de outras proteínas não é conhecida. As funções da maioria destas proteínas não têm sido totalmente elucidadas. VP15 parece ser uma proteína de ligação a DNA e é uma das maiores proteínas da estrutura do nucleocapsídeo de WSSV (WITTEVELDT et al., 2005). Ensaio de neutralização sugerem que proteínas do envelope VP24, VP28, VP31, VP36B, VP68, VP76, VP281 e VP466 estão envolvidas em estágios iniciais de replicação do WSSV (VAN HULTEN et al., 2001b; HUANG et al., 2005; LI, L. et al., 2005; WU et al., 2005; LI, H. et al., 2006; LI, L.J et al., 2006; XIE & YANG, 2006). VP28 está envolvida na fixação e penetração nas células (YI et al., 2004) e infecção sistêmica (VAN HULTEN et al., 2001b; WU et al., 2005). *Primers* desenhados contra o gene VP28 ou anticorpos produzidos contra VP28 (POULOS et al., 2001) foram considerados adequados para detectar diferentes isolados (MUSTHAQ et al., 2006).

Braüinig (2009), a partir da clonagem, seqüenciamento e expressão da proteína do envelope de WSSV VP28, obteve uma proteína recombinante de 21 KDa denominada VP28r que poderá ser utilizada para produzir anticorpos monoclonais para o emprego em testes de detecção do WSSV.

### **1.3.7. Mecanismo molecular da infecção do WSSV**

O mecanismo de entrada o WSSV na célula hospedeira é pouco conhecido. Estudos revelaram que a que a replicação do WSSV ocorre nos núcleos das células (WONGTEERASUPAYA et al., 1995; DURAND et al., 1997; WANG, Y. et al., 1999). Um recente estudo descreve que a molécula integrina da superfície celular está envolvida na infecção do WSSV, a qual pode servir como um receptor celular (LI, D-F. et al., 2007). Algumas proteínas da envoltura viral têm motivos

RGD (arginina-glicina-acido aspártico) que podem mediar a adesão do vírus a integrina celular e então entrar na célula (RUIZ, 2009). Alguma proteína do WSSV contém motivos RGD, entre elas VP31, VP36A, VP36B, VP110, VP136, VP281 e a VP664 (HUANG et al., 2002a; TSAI et al., 2004), sugerindo-se que a infecção por WSSV pode ser mediada pela adesão dos RGD das proteínas estruturais nas células alvo.

Ruiz et al. (2009) sugeriram um modelo de interação molecular entre o WSSV e as células do camarão no momento da infecção (Fig. 6.). A interação da proteína estrutural do vírus ocorre em um receptor celular específico (Fig. 6A) e os domínios RGD (arginina-glicina-acido aspártico) que interagem com regiões tipo integrina dos receptores celulares (Fig. 6B). Existe mais de uma interação proteína estrutural-receptor para que se estabeleça a infecção viral (Fig. 6C) e finalmente ao ocorrer a transferência do material genético viral para célula, se inicia a transcrição e síntese de proteínas virais (Fig. 6D).

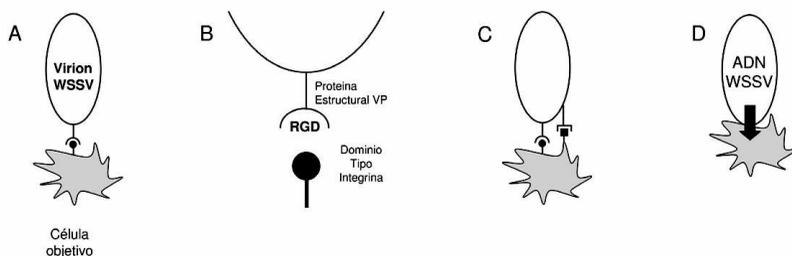


Figura 6. A –D – Modelo de interação molecular entre o WSSV com as células do camarão durante a infecção viral. (Fonte: RUIZ, 2009).

### 1.3.8. Imunidade antiviral em camarões

Em crustáceos, somente existe um sistema imunológico inato, sem memória imunológica (LEE & SÖDERHÄLL, 2002). A imunidade inata incluiu barreiras físicas e resposta humoral e celular. Em estudos recentes foi demonstradas evidências de uma imunidade antiviral em camarões, incluindo a existência de receptores TLR (do inglês, *Toll-like receptors*), RNA de interferência, substâncias antivirais em tecidos e genes imunes. Receptores TLR em mamíferos estão envolvidos em atividades imunológicas (SCHRÖDER e BOWIE, 2005), os quais foram descobertos em *L. vannamei* (YANG et al., 2007) e *P. monodon* (ARTS et al., 2007) e o seu papel contra infecções virais estão em estudo.

Injeção de RNA de dupla fita (dsRNAs) induziu a imunidade antiviral em *L. vannamei* (ROBALINO et al., 2004) e em *P. chinensis* (KIM et al., 2007). RNAs de interferência curtas (siRNA) correspondendo às proteínas virais VP15 ou VP28 foram efetivas para reduzir a mortalidade em *P. monodon* (WESTENBERG et al., 2005) e *P. japonicus* (XU et al., 2007). Replicação viral foi inibida por múltiplas injeções de vírus VP28-si RNA (XU et al., 2007). Um gene antiviral denominado PmAV foi clonado de *P. monodon* infectado por WSSV, o qual foi altamente expressado no hepatopâncreas no segundo dia após infecção com alta carga viral (LUO et al., 2003).

Uma resposta quase imune foi descrita em *P. japonicus* sobreviventes de surto de WSSV e a presença de moléculas neutralizantes de WSSV no plasma dos camarões (VENEGAS et al., 2000).

A indução da apoptose (morte celular) em estágio precoce da infecção viral, pode limitar a produção de partículas virais e reduzir ou eliminar a propagação da progênie viral para outros tecidos. Muitos vírus conseguem, porém, retardar o processo apoptótico, matando as células apenas no *final* do ciclo infeccioso, após suficiente progênie ter sido produzida. Os corpos apoptóticos com grande quantidade de vírus replicados são fagocitados por outras células, garantindo a propagação e infecção viral (BARRACO et al., 2008) Células apoptóticas foram detectadas em camarões infectados por WSSV naturalmente e experimentalmente (SAHTOUT et al., 2001; WONGPRASERT et al., 2003; SAHUL HAMEED et al., 2006).

Flegel (1998; 2007) propôs um conceito de acomodação viral, onde ocorre uma adaptação dos crustáceos aos novos vírus patogênicos, a partir de uma memória específica que impede o mecanismo de apoptose induzido pelo vírus. Por este conceito, os camarões sobreviventes desenvolvem uma *tolerância* ao vírus e se tornam portadores de *infecção persistente*, sem nenhum efeito negativo aparente ou sintoma da doença.

Reforçando este conceito, foi ainda evidenciado que camarões sem sintomas de doença, mas com infecção viral persistente não apresentavam apoptose nas células infectadas (WONGPRASERT et al., 2003). Entretanto, faltam informações sobre os mecanismos moleculares subjacentes a essa tolerância e se ela é efetivamente provocada por uma redução da apoptose ou por outros processos ainda desconhecidos.

### 1.3.9. Métodos de diagnóstico do WSSV

Métodos de detecção para WSSV são utilizados para dois principais propósitos: - **confirmação** da infecção dos animais (LIGHTNER 1996; OIE 2003) e **certificação** do estado de saúde em reprodutores e pós larvas utilizadas em larvicultura ou viveiros de cultivo (OIE, 2003).

Técnicas de diagnóstico podem ser divididas em:

1 – Presuntivas: que incluem a observação de sinais clínicos nos viveiros; história de surtos anteriores da enfermidade na fazenda; origem das larvas e observação de sinais da doença em teste de tingimento rápido (LIGHTNER, 1996; OIE, 2003);

2 – Confirmatórias: que incluem **análise histopatológica** de tecidos alvo (BELL & LIGHTNER, 1998); **imunoensaios** com anticorpos policlonal e monoclonal, incluindo o teste de Western Blot (WB) (NADALA et al. 1997; SAHUL-HAMEED et al., 1998), imuno dot-blot (NADALA e LOH, 2000), ensaio de imuno adsorção ligado à enzima (ELISA) (ZHANG et al., 2001), imuno fluorescência indireta (IIF) (ESCOBEDO-BONILLA et al., 2005) e imuno histoquímica (IHC) (POULOS et al., 2001); tecnologia **do ácido nucléico** que inclui vários protocolos de reação em cadeia da polimerase (PCR), que pode ser qualitativo (LO et al., 1996a, 1996b; TAPAY et al., 1999; KIATPATHOMCHAI, et al. 2001) ou quantitativo (TANG e LIGHTNER, 2000; TAN et al. 2001; DHAR et al. 2001; DURAND e LIGHTNER, 2002).

Outros métodos baseados em DNA incluem dot-blot e hibridização *in situ* (ISH) (DURAND et al., 1996; NUNAN e LIGHTNER, 1997; WANG et al., 1998), os quais são menos sensíveis do que a PCR. PCR é um método sensível e poderoso para a detecção de WSSV, podendo detectar quantidades pequenas como 5 fg (femtograma) de DNA de WSSV (20 partículas virais) em extrato cru de amostras de pós larvas, pleópodos e hemolinfas de camarões grandes (KIATPATHOMCHAI et al., 2001).

A técnica denominada PCR *in situ* pode detectar infecções em tecidos em estágio inicial (JIAN et al., 2005). Outro método chamado amplificação circular isotérmica (LAMP) é considerado mais sensível que os outros protocolos de PCR e pode detectar até 1 fg do vírus (KONO et al., 2004).

PCR é comumente utilizado para varredura de potenciais portadores de WSSV e particularmente para determinar o status

sanitário de pos larvas antes da estocagem em viveiros de cultivo (OTTA et al., 1999; HOUSSAIN et al., 2001).

Na detecção de WSSV em *L. vannamei* cultivado em fazendas de Santa Catarina com diferentes métodos o PCR em Tempo Real foi capaz de detectar 3,55 cópias virais/ $\mu\text{l}$ ,  $3,55 \times 10^5$  por nested PCR e  $2 \times 10^{17}$  por *blooting* e na hibridização *in situ* somente ocorreu marcação pela sonda de DNA para WSSV em amostras com carga virais de moderadas a altas (SOUZA, 2008).

### **1.3.10. Epidemiologia e sinais clínicos da enfermidade da mancha branca**

Mortalidades cumulativas podem chegar a cerca de 100% no prazo de 10 dias após o início da doença (KARUNASAGAR et al., 1997; LOTZ e SOTO, 2002). Em viveiros de cultivo, camarões juvenis de todas as idades e tamanhos são suscetíveis a doença, mas mortalidades maciças geralmente ocorrem um ou dois meses após a estocagem (KASORNCHANDRA et al., 1998).

Algumas espécies de camarões peneídeos da Ásia e América infectados com WSSV apresentaram depósitos de cálcio de 0,5 - 2,0 mm de diâmetro na cutícula do cefalotórax ou carapaça (WANG, et al., 1995; LIGHTNER, 1996). Outras condições podem produzir estas manchas como bactérias e alta alcalinidade da água de cultivo (WANG et al., 2002). Animais afetados pelo WSSV apresentam cromatóforos expandidos com coloração rosa avermelhado para marrom avermelhado na cutícula do cefalotórax (INOUYE et al., 1996). Camarões doentes exibem uma redução na alimentação e aumento da letargia, nadando lentamente próximo à superfície dos viveiros e antes de morrerem afundam (CHANG et al., 1996; LIGHTNER, 1996; SUDNA et al., 1997; JORY e DIXON 1999).

### **1.3.11. Histopatologia e tecidos alvo da infecção por WSSV**

Na histopatologia a infecção por WSSV é caracterizada por células com núcleo hipertrofiado, mostrando inclusões intranucleares basófilas e cromatina marginal em tecidos de origem ectodermal e mesodermal (DURAND et al., 1997; WANG et al., 2000). Essas inclusões intranucleares são marcadamente distintas e maiores que as inclusões Cowdry tipo A, características do vírus da infecção hipodermal e hematopoiética (IHHNV) (WONGTEERASUPAYA et al., 1995). Núcleos infectados tornam-se progressivamente mais basófilos e

aumentados (CHANG et al., 1996; LO et al., 1996b; DURAND et al., 1996; 1997; FLEGEL, 1997; OTTA et al., 1999; LIGHTNER, 1996). Em estágios finais de infecção podem ocorrer fragmentação do núcleo (karyorrhexis) e desintegração celular, levando a formação de áreas de necrose caracterizadas por vacuolização (KARUNASAGAR et al. 1997; KASORNCHANDRA et al., 1998).

Flegel (2006) sugeriu que o tecido mais conveniente para diagnóstico é o epitélio subcuticular e que cortes do tecido do estômago geralmente proporcionam excelentes visões (Fig. 7).

Análises patogênicas quantitativas sugerem que os principais tecidos alvos para replicação do WSSV são as brânquias, epitélio cuticular do estômago e corpo, tecido hematopoietico, órgão linfóide e glândula antenal (TAN et al., 2001; DURAND e LIGHTNER, 2002; ESCOBEDO-BONILLA et al., 2007).

Segundo Escobedo Bonilla (2007), as brânquias e o epitélio cuticular do estômago em *P. vannamei* são as portas de entrada do WSSV após inoculação oral. Após replicação primária nestes tecidos, o vírus cruza a membrana basal e atinge a capa de tecido conectivo e/ou os locais associados aos seios sanguíneos de onde o vírus é transportado a outros órgãos alvo pela circulação da hemolinfa.

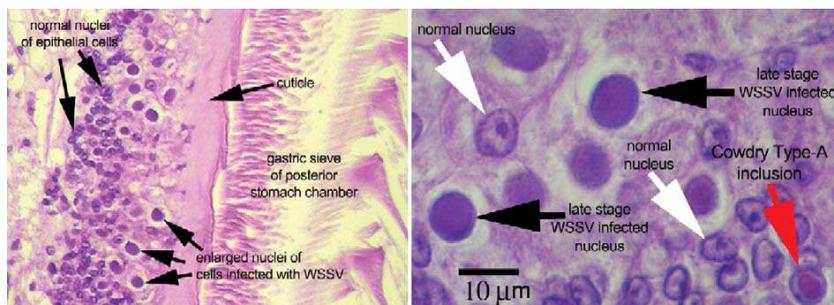


Figura 7. Histopatologia do WSSV. Esquerda: baixa ampliação microscópica, mostrando muitas inclusões características de WSSV no epitélio subcuticular do estômago. Direita: alta ampliação microscópica do núcleo, com inclusões Cowdry tipo A no canto direito inferior. (Fonte: FLEGEL, 2006)

### 1.3.12. Fatores ambientais e de cultivo e a infecção por WSSV

Uma das principais características da enfermidade da mancha branca é a replicação viral mediante condições estressantes (LO, et al., 2005). Temperatura da água, salinidade, oxigênio dissolvido, amônia, pH e toxinas derivadas de pesticidas podem estar associados com

mortalidades massivas devido ao WSSV (FEGAN e CLIFFORD, 2001). Variações de temperatura baixas para altas provocaram mortalidades por WSSV em *Farfantepenaeus monodon* e *Marsupenaeus japonicus* levemente infectadas com WSSV (HSU et al., 2000). Sonnenholzher e Rodríguez (2002), em condições experimentais, observaram que temperaturas de 33 °C provocaram diminuição da infecção por WSSV e aumentaram a sobrevivência de *L. vannamei*, comparado a temperatura de 27 °C. Guan et al. (2003) observaram maior replicação do WSSV em temperaturas de 23 e 28 °C comparativamente a 15 e 33 °C em *M. japonicus* e Maldonado et al. (2004) mencionaram que a suscetibilidade ao vírus da mancha branca seria maior a temperaturas frias, inferiores a 29°C. Em estudos epidemiológicos em fazendas do Equador foi observada uma aparente associação entre baixas temperaturas e aumento da taxa de mortalidade de *L. vannamei* (RODRÍGUEZ et al., 2003.)

Foi observado que altas temperaturas (32 – 33 °C) impediram a progressão da enfermidade da macha branca em juvenis de *L. vannamei* (VIDAL et al., 2001, RAHMAN et al., 2006). Uma possível explicação para a redução das mortalidades é de que a 33 °C ocorreu a inibição da replicação do vírus (RAHMAN et al., 2006) e uma redução da carga viral (GRANJA et al., 2006).

Reyes (2007) relatou que o principal efeito da hipertermia nas células do epitélio subcuticular é a redução da expressão dos genes do WSSV mais do que induzir genes do camarão que possam contribuir para o controle da infecção.

Em estudo com camarões inoculados, foi observado que flutuações diárias de temperatura da água ótima (27°C) para alta (33°C) pode ter efeitos positivos ou negativos na doença, mortalidade e infecção de WSSV, dependendo do regime de temperatura e da cepa viral utilizada (RAHMAN, 2007).

Foi observada uma redução na infectividade do WSSV em altas concentrações de amônia (5 mg/l) na água de cultivo (JIANG et al., 2004).

No México, flutuações abruptas na temperatura e salinidade da água devido a fortes chuvas foram relacionadas com o aumento da carga viral em *L. vannamei*, resultando em 80% de mortalidade (PEINADO-GUEVARA e LOPEZ-MEYER, 2006). Chuvas em vários dias consecutivos e a diminuição da temperatura da água foram relacionadas com a ocorrência de mortalidades por WSSV em *P. monodon* (TENDÊNCIA et al., 2010a). Tendência et al., (2010b) sugerem que o risco de uma infecção por WSSV é reduzido quando a temperatura da

água é alta, as flutuações de salinidades são pequenas e a porcentagem de colônias de víbrios amarelas é maior que as verdes.

Variações na salinidade maiores que 4 ppt em 1 hora, assim como pequenos ajustes contínuos de salinidade, aumentaram a suscetibilidade de *Fenneropenaeus chinensis* a infecção por WSSV (LIU et al., 2006).

A manutenção de níveis elevados de oxigênio dissolvido, maior intensidade de aeração e a sua utilização desde o início do cultivo diminuíram o impacto da enfermidade da mancha branca em pequenos viveiros intensivos de *L. vannamei* (RUIZ-VELASCO et al., 2010).

Infecções experimentais duplas com WSSV e *Vibrio campbellii* resultaram em aumento na mortalidade de juvenis de *L. vannamei* SPF, sem alterar a replicação de WSSV, mas com um grande aumento da densidade de víbrios na hemolinfa (PHUOC et al., 2008).

Corsin et al. (2001) encontraram maior probabilidade da presença de WSSV na despesca em viveiros localizados mais próximos ao mar e em viveiros que apresentaram camarões com menor tamanho médio um mês após o povoamento em cultivos de camarão e arroz no Vietnã.

Em estudos epidemiológicos no Vietnã e Índia (CORSIN et al., 2005) foi observado que surtos de WSSV foram precedidos ou coincidiram com altos níveis de pH e amônia não ionizada na água, assim como com baixa temperatura da água ou quedas na temperatura do ar. No mesmo estudo foi verificado que altos níveis de clorofila no Vietnã e a aplicação de fertilizantes antes ou durante o cultivo na Índia reduziram o risco da enfermidade. Também foi observado que a aplicação de pesticidas para eliminar vetores antes do povoamento e o uso de pós larvas negativas para WSSV apresentaram uma redução no risco da enfermidade da mancha branca. Foi observada uma relação entre surtos de WSSV com períodos de entrada de marés altas nos viveiros no Vietnã e com o compartilhamento de trabalhadores entre viveiros na Índia.

### **1.3.13. Transmissão do WSSV**

Infecção por WSSV pode ser transmitida tanto horizontalmente quanto verticalmente. As infecções horizontais de camarões e outros crustáceos têm sido demonstradas experimentalmente por exposição à água infectada ou por ingestão de tecidos contaminados (CHOU et al. 1998; KANCHANAPHUM et al. 1998; SUPAMATTAYA et al. 1998; CORBEL et al. 2001; SOTO et al. 2001). Ingestão parece ser o mais efetivo meio de transmissão em camarões (SOTO et al, 2001). A transmissão vertical de reprodutores para estágios iniciais de vida parece

ser uma fonte comum de infecção, através da superfície de ovos contaminados (LO et al., 1997; LO e KOU, 1998).

Fontes potenciais de transmissão do WSSV incluem atividades humanas, migração de pássaros e outros animais, produtos congelados infectados, sedimentos de viveiros infectados, insumos e instrumentos de aquicultura contaminados, subprodutos contaminados e não tratados de plantas processadoras (LIGHTNER et al., 1997; KANCHANAPHUM et al., 1998; SUPAMATAYA et al., 1998; HAMEED et al., 2002).

### 1.3.14. Hospedeiros e vetores do WSSV

Espécies de camarões e caranguejos selvagens têm sido apontadas como possíveis vetores na transmissão e dispersão do WSSV (KANCHANAPHUM et al., 1998; MAEDA et al., 1998; PO & HE, 2003; MOMOYAMA et al., 2003; HE, 2003; CHAPMAN et al., 2004; WANG et al., 1998; HAMEED et al., 2003; RAJENDRAN et al., 1999; SUPAMATTAYA et al., 1998).

Vários estudos foram realizados para avaliar a presença de WSSV em crustáceos selvagens em diferentes locais.

Em Taiwan, a presença do WSSV foi detectada em espécies de camarões selvagens da costa, em insetos, copépodos, camarões peste e caranguejo peste em fazendas com infecções por WSSV por PCR e em larvas de caranguejo da costa por PCR, hibridização e histologia (LO et al. 1996b; WANG et al., 1998; CHEN et al., 2000).

Na China, a presença de WSSV foi detectada em quatro populações de reprodutores de *Fenneropenaeus chinensis* por *nested* PCR (DENG, et al., 2005) e em fêmeas selvagens desovantes por PCR *real time* (JANG et al., 2009). He et al. (2003) detectaram a presença de WSSV por *nested* PCR, histopatologia, bioensaio e/ou microscopia eletrônica em 14 espécies de camarões, 16 espécies de caranguejos, um *Trachypleus* sp e um *Oratosquilla* capturados na natureza ou em viveiros de cultivo, sendo todos considerados hospedeiros naturais de WSSV. Meng et al. (2009) encontraram WSSV em larvas selvagens do caranguejo azul *Portunus trituberculatus* e em reprodutores por *real time* PCR ao longo da costa do Mar Amarelo.

A presença de WSSV foi detectada em fêmeas maduras e imaturas de *P. japonicus* de estoques naturais (MAEDA et al., 1998; TAKAHASHI et al., 2003) e em quatro espécies de pequenos camarões selvagens da costa do Japão por *nested* PCR (MOMOYAMA, 2003).

Na Índia, o WSSV foi detectado em 77 de 89 (86,52%) espécies de crustáceos selvagens por PCR 1 e 2 passos e confirmado por hibridização dot blot (CHAKRABORTY et al. (2002) e em reprodutores *P. monodon*, juvenis de *P. indicus*, *Metapenaeus* sp, *S. serrata* e em *Squilla mantis* selvagens por *nested* e não *nested* PCR (OTTA et al. 1999; VASEEHARAN et al. 2003). Nesta mesma região, a presença de WSSV foi detectada em cinco espécies de camarões e cinco de caranguejos selvagens da costa e em duas espécies de camarões selvagens de viveiros e *gher* por *nested* e não *nested* PCR (HOSSAIN et al., 2001) e em camarão *Acetes* sp e caranguejo *Scylla. serrata* selvagens da costa por *nested* PCR (PRADEEP et al., 2008).

De la Peña et al. (2007) encontraram WSSV em camarões *P. monodon* selvagens de sete locais da costa das Filipinas por *nested* PCR.

WSSV foi detectado em duas espécies de caranguejos e um paleomonídeo selvagens na costa do Havaí (ALBERT & LEONG, 2004) e nos camarões *Litopenaeus setiferus* e *Farfantepenaeus aztecus* na costa sul do EUA por *nested* PCR (CHAPMAN et al., 2004).

Mijangos-Alquisires et al. (2006) observaram a presença de WSSV em camarões selvagens da costa de Sinaloa, próximo a áreas de cultivo por PCR e Nunan et al. (2001) encontraram WSSV em 2% de reprodutores selvagens de *L. vannamei* na costa do Panamá por meio de hibridização dot blot.

A presença de WSSV na espécie *Callinectes sapidus* foi relatada em exemplares de canais de fazendas de cultivo no México (LÓPEZ-FÉLIX, 2002), em um exemplar coletado na costa sudeste dos Estados Unidos (BROWDY, SHEPARD e POWELL, 2006) e em amostras coletadas na costa de Nova Iorque, Nova Jérsei e Texas (CHANG et al., 2001).

No Peru, a presença do WSSV por *nested* PCR foi detectada em 10,54% das amostras de pós larvas de peneídeos, zooplâncton, caranguejos e camarões pré adulto nos anos de 1999 e 2000 e em 4,79% de amostras de organismos de canais de marés e em 5,51% de pós larvas de peneídeos do mar, no período de 2001 a 2004 (RODRIGUEZ et al., 2004). No ano de 2005 a frequência de amostras positivas para o WSSV foi de 3,3% em organismos de canais de marés, não sendo detectado em pós larvas de peneídeos do mar (RODRIGUEZ e ALFARO-AGUILERA, 2005) e em 2006 foi de 1,7% em organismos de canais de marés, sem detecção em pós larvas de peneídeos do mar (RODRIGUEZ et al., 2006).

Marques (2008) encontrou o WSSV em 23,3% de amostras de *Chasmagnathus granulata* na Lagoa de Imaruí, Complexo Lagunar Sul

de Santa Catarina coletadas no ano de 2006. No mesmo ano, Cavalli et al. (2008) não encontraram camarões silvestres positivos para WSSV em amostras de cinco estações no Complexo Lagunar Sul, atribuindo a não-deteccção a problemas de tamanho amostral. Posteriormente, em 2008, foram encontradas amostras positivas para o WSSV entre 3 e 9% em *Farfantepenaeus paulensis* no Complexo Lagunar Sul e em amostras de camarões (*F. paulensis* e *F. brasiliensis*) capturadas em águas oceânicas nos anos de 2007 e 2009 (CAVALLI, 2009). WSSV foi detectado em camarões *L. vannamei* de cultivos de São José do Norte e Rio Grande, em camarões silvestres *F. paulensis* da Lagoa dos Patos e em amostras de caranguejo (*Neohelice granulata*) e de solo de uma fazenda de São José do Norte, com mortalidade por WSSV (CAVALLI, 2009).

Stentiford et al. (2009) concluíram que das 98 espécies de decápodos hospedeiros potenciais para WSSV citadas na literatura somente 67 apresentam suporte científico para demonstrar a suscetibilidade ao vírus.

A deteção de WSSV por *nested* PCR em solos contaminados foi possível até 10 meses de armazenamento, sem avaliar a infectividade das partículas virais (NATIVIDAD et al., 2008). Partículas virais de WSSV foram detectadas por *nested* PCR 20 meses após surto da enfermidade em amostras de água de viveiros abandonados e canais do entorno (QUANG et al., 2009).

A deteção de WSSV foi relatada em copépodos no ambiente e viveiros (RAMIREZ et al., 2004; HUANG et al., 1995), em larvas de quetognatos e de decápodos, pós larvas de camarões e ovos de peixes no ambiente (RAMIREZ et al., 2004), em ovos e cistos de rotíferos do solo de viveiros contaminados (YANG et al., 2004) e em poliquetas do ambiente e de viveiros contaminados (VIJAYAN et al., 2005; LAOAROON et al., 2005).

A capacidade das microalgas transportarem partículas virais de WSSV e infectarem camarões em condições experimentais (LIU et al. 2007) e a infecção de camarões alimentados com copépodos (ZANGH, 2008), rotíferos (ZANGH, 2006), poliquetas (VIJAYAN et al., 2005), identificam estes organismos como possíveis vetores mecânicos de WSSV.

Partículas virais de WSSV foram encontradas em várias frações líquidas e particuladas entre 0.45 e 100 µm em amostras de água de viveiros com surto de WSSV e causaram infecções em camarões expostos a estas frações (ESPARZA-LEAL et al., 2009).

### 1.3.15. Medidas de controle para o WSSV

Não existem tratamentos adequados disponíveis contra WSSV (WITTEVELDT et al. 2004b).

A aplicação de medidas de biossegurança tem sido recomendada para reduzir o risco de surtos de WSSV em cultivos de camarões (LIGHTNER e PANTOJA, 2001). Isto inclui o uso de camarões SPF, exclusão do vírus de laboratórios e fazendas, tratamento da água antes do cultivo e troca zero de água, medidas de higiene de trabalhadores e uso de alimentos de qualidade, entre outras medidas (LIGHTNER, 2005). Em alguns países são utilizados produtos químicos para eliminar patógenos, vetores e predadores de camarões, como desinfetantes (cloro), pesticidas (carbaryl, malathion) ou substâncias biocidas (torta de semente de chá) (WESTON, 2000). Estudos demonstraram que o uso contínuo do desinfetante ácido hipocloroso (produzido a partir da eletrolise da água do mar) na desinfecção da água dos viveiros pode ser efetivo para prevenir a infecção de WSSV em camarões (PARK et al., 2004).

Vários produtos destinados a reduzir o impacto da infecção de WSSV em camarões cultivados têm sido testados experimentalmente. Fucoïdan na dieta de juvenis de *P. monodon* mostraram um incremento na taxa de sobrevivência (CHOTIGEAT et al., 2004).

Utilização de extrato de plantas bioativas produziu um aumento na sobrevivência em *P. monodon* infectados com WSSV (CITARASU et al., 2006; RAMESTHANGAM & RAMASAMY, 2007; BALASUBRAMANIAN et al., 2007; 2008). A adição de b- 1,3-glucan, na dieta de melhorou a imunidade e sobrevivência de camarões *P. monodon* desafiados com WSSV (CHANG et al., 2003). Extrato da microalga *Dunaliella* sp produziu um efeito positivo na resistência de *P. monodon* à infecção por WSSV (SUPAMATTAYA, et al., 2005).

Dieta contendo polissacarídeos sulfatados de macroalga (*Gracilaria birdiae*) em camarões *L. vannamei* infectados por WSSV não resultaram em aumento importante na imunoestimulação, mas aumentaram a sua sobrevivência (11%), sugerindo que os mesmos possam atuar em outros processos fisiológicos (CANTELLI, 2009).

Injeção de RNA (dsRNAs) de dupla fita induziu proteção em *L. vannamei* contra WSSV dependendo da dose de inoculação (ROBALINO et al., 2004) e o grau de proteção difere entre os genes alvos (ROBALINO et al., 2005). DsRNA correspondendo as proteínas virais VP28, VP281, gene proteína kinase de WSSV e gene proteína

fluorescente verde (GFP) deram proteção a *P. chinensis* (KIM et al., 2007).

Injeção de curtos RNA de interferência (siRNA) VP15-siRNA ou VP28-siRNA demonstraram efetividade na proteção em *P. monodon* (WESTENBERG et al., 2005). Injeções múltiplas de VP28-siRNA atrasaram e reduziram a mortalidade de *P. japonicus* infectados com WSSV (XU et al., 2007).

Administração de proteínas virais ou proteínas virais recombinantes VP19, VP26, VP28, VP31, VP292 demonstraram proteção em camarões (NAMIKOSHI et al., 2004; WITTEVELDT et al., 2004a, 2004b; VASEEHARAN et al., 2006; WITTEVELDT et al., 2006; ROUT et al., 2007). A duração da proteção (máximo sete semanas) e a eficácia variaram entre as proteínas virais e entre os estudos.

WSSV inativados por formalina induziram a proteção em *P. japonicus*, *P. indicus* e *P. vannamei* desafiados (NAMIKOSHI et al., 2004; BRIGHT SINGH et al., 2005; MELENA et al., 2006).

Pós larvas e juvenis de *P. vannamei* e *P. stylirostris* infectados por IHNV tiveram redução na mortalidade em desafios com WSSV (TANG et al., 2003; BONNICHON et al., 2006; MELENA et al., 2006).

A hipertermia (32 – 33 °C) impediu a progressão da enfermidade da mancha branca em juvenis de *L. vannamei* (VIDAL et al., 2001, RAHMAN et al., 2006).

## 2. JUSTIFICATIVA

A enfermidade da mancha branca causou forte impacto na indústria de cultivo de camarões de Santa Catarina, provocando a sua quase extinção. Os esforços para superar este grave problema esbarram no pouco conhecimento sobre o comportamento da enfermidade no que diz respeito às formas e fontes de transmissão do vírus, gatilhos da enfermidade e a relação com os fatores de cultivo e ambientais. Diante desta realidade, faz-se necessária a obtenção de informações que possam auxiliar a indústria do cultivo de camarões a definir os mecanismos mais eficientes para o controle e a prevenção da enfermidade da mancha branca, diminuindo os riscos de perdas.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo Geral**

Realizar uma prospecção de fatores associados à manifestação da enfermidade da mancha branca em Santa Catarina para formulação de estratégias de prevenção e controle.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

- Obter informações epidemiológicas sobre manifestação da enfermidade da mancha branca em Santa Catarina;
- Analisar possíveis relações entre variáveis ambientais e parâmetros de cultivo com a manifestação da enfermidade da mancha branca;
- Avaliar a presença do vírus da mancha branca em crustáceos decápodos do ambiente de entorno das fazendas da região do Complexo Lagunar e a relação com fazendas afetadas pela enfermidade em função do tempo.

### **4. FORMATAÇÃO DOS ARTIGOS**

A tese está dividida em cinco capítulos. O primeiro referente a introdução e revisão de literatura e os quatro demais correspondem cada um a um artigo. O segundo e quarto capítulos estão formatados de acordo com as normas da revista **Arquivo Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, o terceiro de acordo com a revista **Aquaculture Research** e o quarto segundo a **Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira (PAB)**.

## CAPITULO II

### **ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA ENFERMIDADE DA MANCHA BRANCA NO ESTADO DE SANTA CATARINA, SUL DO BRASIL**

Sérgio Winckler da Costa<sup>1</sup>, Albertino de Souza Zamparetti<sup>1</sup>, Edegar Roberto Andreatta<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina – EPAGRI

e <sup>3</sup>Departamento de Aqüicultura, Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC.

## RESUMO

A enfermidade da mancha branca afetou a maioria das fazendas de camarões de Santa Catarina a partir de 2004. Realizou-se uma análise retrospectiva dos eventos de mortalidades através de questionários e pesquisa em bancos de dados para uma maior compreensão da patogenia viral. Foram obtidas evidências de que o ingresso do vírus em Santa Catarina ocorreu através da importação de náuplios e pós larvas no período do surgimento da enfermidade. A dispersão da enfermidade ocorreu através da captação de água e contaminada por efluentes contaminados de fazendas com mortalidades. A enfermidade não afetou 10 das 107 fazendas no estado, possivelmente pelo seu isolamento ou distância de fazendas afetadas. O estresse causado pela má qualidade do solo foi o provável gatilho para a manifestação da enfermidade nas primeiras fazendas atingidas. A não aplicação de medidas de controle sanitário pode ter contribuído para o agravamento e persistência da enfermidade. Mortalidades pela mancha branca foram observadas com temperatura da água entre 25 a 28°C, intervalo comum durante todo o período de cultivo no estado, e pode ser um fator de risco para novos surtos em ambientes com elevada carga viral. Tentativas de exclusão do vírus dos cultivos devem ser feitas para evitar novas perdas pela mancha branca.

**Palavras Chave:** epidemiologia, enfermidade, vírus da mancha branca,

## ABSTRACT

The white spot disease has affected most of the shrimp farms of Santa Catarina state starting from 2004. A retrospective analysis of mortality events through questionnaires and research available databases to a wider understanding of the behavior of the disease it was accomplished. Evidence indicates that the entry of the virus occurred in Santa Catarina by importing nauplii and post larvae in the onset of the disease. The dispersion of the disease between farms in the same region occurred through contaminated effluents from farms with mortality. The disease did not affect 10 of the 107 farms in the state, possibly due to their isolation or distance from affected farms. The stress caused by poor soil quality was the likely trigger for the outbreak in the first affected farm. The non-application of control measures in health by the producers may have contributed to the worsening of the disease. The mortality rates for white spot occurred in the temperature range between 25 - 28°C, which occurs throughout the cultivation season of the Santa Catarina, increasing the risk of new events of mortality in environments with high load of WSSV. Attempts to exclude viruses from the shrimp farms should be made to avoid further losses by the white spot disease.

**Key Words:** Epidemiology, Shrimp farming, White spot disease.

## INTRODUÇÃO

O vírus da síndrome da mancha branca (WSSV) foi identificado como causador de eventos de mortalidade de camarões em fazendas da Ásia Oriental durante 1992 e 1993 (Nakano et al., 1993; Chou et al., 1995) e desde então se tornou a mais séria doença viral de camarões dos principais países produtores do mundo (Sanchez et al., 2007). Em termos socioeconômicos, a enfermidade causou danos consideráveis, com perdas de produção global de muitos bilhões de dólares e perdas de centenas de milhares de empregos, afetando a economia de países em desenvolvimento (Hill, 2002).

A primeira ocorrência da enfermidade da mancha branca no Brasil foi registrada no ano de 2005, em fazendas de camarões do estado de Santa Catarina (Seiffert, et al., 2005). A produção de camarões no estado teve um acentuado declínio em decorrência dos elevados índices de mortalidades pela mancha branca, passando de 4.189 t em 2004 para 172 t no ano de 2009 (Costa, 2010). Mortalidades por WSSV foram observadas na maioria das fazendas, as quais não conseguiram retomar a produção sem novas perdas, gerando dúvidas sobre a patogenia do vírus e as medidas necessárias para o seu controle.

Segundo Ortega (2002), as patologias de natureza infecciosa na aqüicultura apresentam um claro componente multifatorial, fazendo com que a aplicação das diferentes estratégias de controle das enfermidades passe pelo conhecimento prévio de fatores de risco associados à manifestação das mesmas. Estudos epidemiológicos têm sido utilizados para identificar fontes potenciais de infecção, rotas de introdução e fatores associados à enfermidade da mancha branca para elaboração de programas de controle (Corsin et al., 2001; 2006; Seok, 2007).

Realizou-se uma análise retrospectiva sobre a ocorrência da enfermidade da mancha branca em fazendas de Santa Catarina, buscando uma maior compreensão sobre a forma de ingresso, mecanismos de dispersão e fatores associados a sua manifestação. As informações obtidas podem auxiliar no desenvolvimento de estratégias para minimizar ou eliminar o risco de novos surtos da enfermidade.

## MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido utilizando-se ferramentas descritas para estudos epidemiológicos em aqüicultura (Ortega, 2002). Realizou-se um

estudo retrospectivo a partir da aplicação de um questionário junto aos técnicos e produtores e o resgate dos registros dos cultivos e pesquisa em bancos de dados das instituições públicas e organizações envolvidas com a carcinicultura em Santa Catarina.

O questionário do tipo estruturado estava composto por duas partes, a inicial composta por variáveis contínuas com informações relativas aos surtos de WSSV, como data do evento, tempo de cultivo e peso dos camarões no início das mortalidades e densidades de cultivo. A segunda parte estava composta por perguntas, com questões relativas ao comportamento da enfermidade e práticas de cultivo empregadas pelos produtores. Os questionários foram aplicados nos anos de 2008 e 2009 englobando todas as regiões de produção do estado.

Informações sobre a origem das pós larvas, localização e data do início das mortalidades, fazendas interditadas e diagnósticos do WSSV em fazendas e laboratórios, foram obtidas junto aos bancos de dados do Comitê de Coordenação das Ações de Prevenção, Controle e Combate da Mancha Branca de Crustáceos (CAPCMB), da Companhia Integrada de Desenvolvimento Agrícola de Santa Catarina (CIDASC), da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI), dos laboratórios de produção de larvas e da Associação Catarinense dos Criadores de Camarões (ACCC).

Parâmetros físico-químicos da água das fazendas no início das mortalidades foram obtidos junto aos técnicos responsáveis pelas fazendas. Foram analisados temperatura, salinidade, alcalinidade, sulfeto, amônia, nitrito, ferro e ortofosfato com o emprego do mesmo método em todas as fazendas.

Análises físico-químicas de amostras de solo de viveiros coletadas em janeiro de 2005 em seis fazendas onde ocorreram as primeiras manifestações da enfermidade da mancha branca em Santa Catarina foram resgatadas e analisadas. As variáveis analisadas foram fenol, amônia, nitrato, nitrito, ortofosfato e sulfeto, pelo método colorimétrico para fotocolorímetro, conforme descrito em Alfakit (2007). O potencial redox foi analisado utilizando-se um medidor polarográfico, com uma sonda de eletrodo de pino modelo ORP897, conforme método descrito por Lemann (2008).

As informações obtidas foram tabuladas em planilhas do Excel e analisadas por meio de estatística descritiva.

## RESULTADOS

Foram aplicados 87 questionários, representando 81% das 107 fazendas de camarões existentes em Santa Catarina. Na análise das respostas verificou-se que 94% das fazendas realizavam o monitoramento das variáveis de qualidade da água e em 96% delas não foram relatadas alterações significativas das mesmas durante os eventos de mortalidades. A recirculação da água e o tratamento dos efluentes eram realizados em 20% das fazendas e a liberação dos efluentes no mesmo ambiente de captação da água ocorria em 88% das fazendas. O tratamento da água antes do povoamento era realizado em 6% das fazendas e o cultivo sem reposição ou renovação de água era realizado em 27% das fazendas. A desinfecção de utensílios e equipamentos era realizada em 22% das fazendas, de veículos e pessoas em 11% e das caixas de despesca dos compradores em 26%. Nas mortalidades por mancha branca, os camarões mortos foram enterrados em 33% das fazendas, incinerados em 3%, esterilizado em 4%, comercializado em 5%, doado em 8%, consumido por aves em 42%, deixado nos tanques em 5%.

As informações sobre a data de início das mortalidades pela mancha branca por área de cultivo e localização encontram-se na Tabela 1 e Figura 1, respectivamente. Observa-se que no período entre novembro de 2004 até abril de 2009 ocorreram mortalidades pela mancha branca em 94 das 107 fazendas em atividade e que das 13 não atingidas três pararam de cultivar após a ocorrência das primeiras perdas pela enfermidade. Nesse período, foi relatado um total de 216 surtos com 73 (34%) interdições efetuadas pelo órgão responsável pela sanidade animal no Estado.

A primeira manifestação da enfermidade da mancha branca foi relatada em uma fazenda localizada na Lagoa de Imarú, localidade de Samambaia (área 1), espalhando-se por 18 fazendas vizinhas, em um intervalo de 30 dias. A enfermidade foi observada nas fazendas de todas as regiões de cultivo na safra subsequente, seis meses após a primeira manifestação.

O peso médio dos camarões e o tempo de cultivo na primeira manifestação da enfermidade em 72 fazendas foram de 9,9 g e 88 dias, respectivamente e nas mortalidades subsequentes de 3,2 g e 39 dias, respectivamente, em 87 eventos.

Os valores das variáveis físico químicas da água dos viveiros no dia do início dos surtos em fazendas das três regiões de cultivo do estado, entre os anos de 2004 a 2009, encontram-se na Tabela 2.

Os resultados das análises do solo de seis fazendas, na maioria turfa, onde ocorreram as primeiras mortalidades, incluindo o primeiro relato (fazenda A), encontram-se na Tabela 3. Na fazenda A foi descrito forte odor de "ovo podre" e coloração negra do solo no momento da coleta.

Tabela 1. Data do início dos surtos de WSSV, localização e número de fazendas.

<b>Local</b>	<b>Início surtos</b>	<b>Nº faz</b>	<b>Observações</b>
<b>Lagoa Imaruí</b>			
Área 1	nov/dez-2004	19	1 não morreu e parou
	nov/dez-2005	2	
	maio-2006	1	
Área 2	fev-2005	4	1 não morreu e parou
	nov-2005	2	
Área 3	abr-2005	6	
	out-2005	5	
<b>Lagoa Mirím</b>			
Área 4	nov -2005	2	
<b>Lagoa Santo Antônio</b>			
Área 5	abr-2005	3	
Área 6	mar-2005	7	1 não morreu e parou
	dez-2005	1	
	fev-2006	1	1º cultivo da fazenda
<b>Lagoa do Ribeirão</b>			
Área 7	fev-2005	9	
	out/dez-2005	3	
<b>Lagoa Santa Marta</b>			
Área 8	mar-2005	8	
<b>Lagoa Camacho</b>			
Área 9	fev-2005	6	
	jan/mar-2006	3	
	mar-2007	1	
<b>Região Centro</b>			
Área 10 - (imbituba/Garopaba)	<b>não morreu</b>	2	
Área 11 - Tijuquinhas	<b>não morreu</b>	4	
Área 12 - (Baia de Tijucas)	jan-05	1	
	abr-05	2	
<b>Região Norte</b>			
Área 13 - (Itapocu)	<b>não morreu</b>	3	
Área 14 - (Babitonga/Linguado)	mai-05	4	
Área 15 - (Rio Parati) -	abr-07	2	
Área 16 - (Babitonga)	fev-08	2	
Área 17 - (Rio Palmital)	<b>não morreu</b>	1	

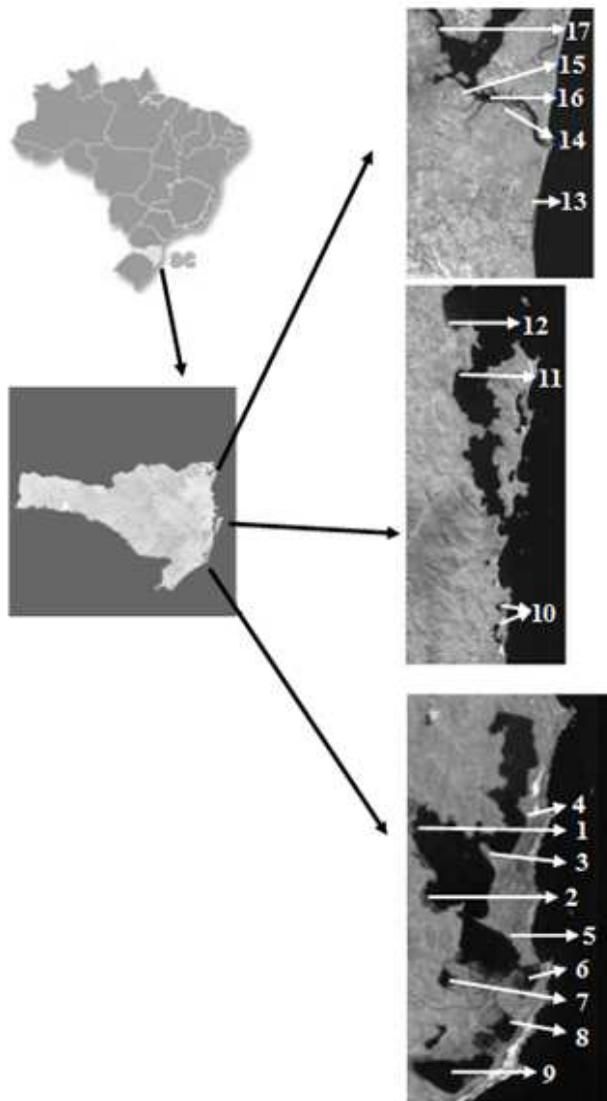


Figura.1. Localização das áreas de cultivo de camarões no litoral de Santa Catarina (1 -17) conforme descrição na Tabela 1.

Também foi relatada a dificuldade de renovação de água dos viveiros antes do início das mortalidades, por problemas de má qualidade da água no ambiente de captação (Seiffert et al., 2005).

A variação da temperatura diária no dia de início de eventos de mortalidade encontra-se na Figura 2, onde se observa a ocorrência de oscilações diárias de até 5 °C e a predominância de intervalos entre 25 a 28 °C.

Tabela 2. Concentrações máxima, mínima e média das variáveis físico-químicas da água de fazendas no dia de início de mortalidades por WSSV e o número de amostras (n).

<b>Parâmetro</b>	<b>Máximo</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Média</b>	<b>n</b>
Oxigênio (mgL <sup>-1</sup> )*	5,6	3,12	4,07	13
Salinidade (‰)	30	6	13,5	14
Alcalinidade (mgL <sup>-1</sup> )	170	60	119	15
Amonia total (mgL <sup>-1</sup> )	1,7	0,18	0,74	14
Ferro total (mgL <sup>-1</sup> )	0,78	0	0,32	15
Orto-fosfato (mgL <sup>-1</sup> )	0,65	0,08	0,29	15
Sulfeto (mgL <sup>-1</sup> )	0,09	0	0,02	16
Nítrito (mgL <sup>-1</sup> )	0,33	0	0,06	12

\* Valores relativos a primeira leitura diária.

No que diz respeito à origem das pós larvas, na safra anterior ao surgimento da enfermidade da mancha branca (outubro 2003 – março 2004) foram importadas 92,5 milhões de pós larvas de um laboratório de Pernambuco e 60 milhões da Bahia e na safra em que ocorreu a enfermidade (outubro 2004) 7,5 milhões de pós larvas de Pernambuco e 1,5 milhões da Bahia. Os quatro laboratórios do estado importaram náuplios de laboratórios do nordeste, sendo 114 milhões de Pernambuco e 45 milhões da Bahia na safra anterior a manifestação a enfermidade (janeiro a março/2004) e 190 milhões de Pernambuco na safra em que ocorreu a enfermidade (outubro/novembro 2004). No mês de março de 2005 foi diagnosticado WSSV por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) em pós larvas de um laboratório de larvicultura do norte do estado e em maio de 2005 de um laboratório de Florianópolis. O primeiro diagnóstico positivo por PCR para WSSV no único banco de reprodutores do estado ocorreu em maio de 2006.

Tabela 3. Média, desvio padrão e número de amostras das variáveis do solo dos viveiros de fazendas onde iniciaram as mortalidades de camarões em Santa Catarina.

Fazenda	Sulfetos mgL <sup>-1</sup>	N-amoniacal mgL <sup>-1</sup>	Nitrato mgL <sup>-1</sup>	Nitrato mgL <sup>-1</sup>	Fenóis mgL <sup>-1</sup>	P. Redox mV
A	0,08 ± 0,03 (8)	23,20 ± 6,07 (8)	0,40 ± 0,14 (8)	11,56 ± 6,68 (8)	7,86 ± 2,62 (8)	- 167 ± 97 (11)
B	0,07 ± 0,05 (6)	26,78 ± 8,99 (6)	0,41 ± 0,28 (6)	14,29 ± 29,76 (6)	3,83 ± 1,68 (6)	- 187 ± 45 (12)
C	0,08 ± 0,05 (3)	33,28 ± 1,32 (3)	0,72 ± 0,56 (3)	14,82 ± 13,76 (3)	8,32 ± 5,11 (3)	- 235 ± 44 (36)
D	0,04 ± 0,001 (3)	33,26 ± 5,97 (3)	1,27 - 1,21 (3)	7,08 ± 4,14 (3)	5,79 ± 2,63 (3)	- 237 ± 33 (24)
E	0,09 ± 0 (2)	36,07 ± 1,12 (2)	0,20 ± 0,15 (2)	21,54 ± 0,65 (2)	10,75 ± 2,99 (2)	- 280 ± 22 (16)
F	0,04 ± 0,001 (2)	44,09 ± 9,60 (2)	0,07 ± 0,03 (2)	6,75 ± 2,22 (2)	6,35 ± 1,53 (2)	- 252 ± 9,18 (14)

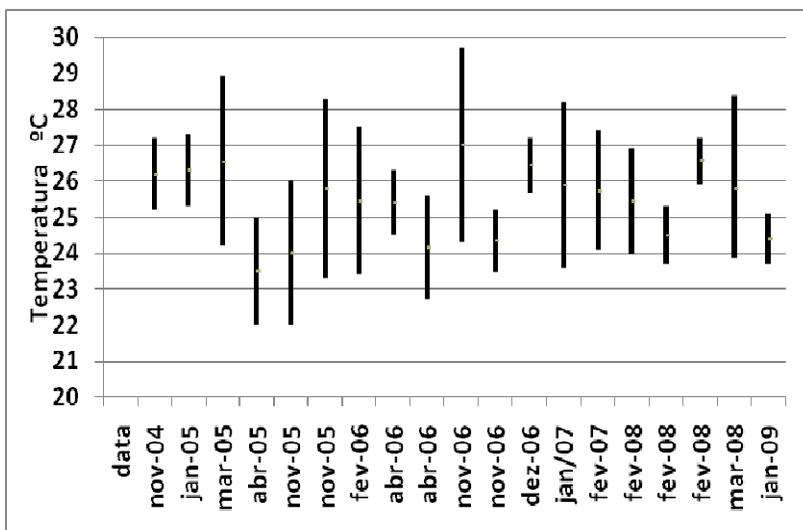


Figura 2. Intervalo de temperaturas diárias nos surtos de WSSV por mês de ocorrência.

A densidade de cultivo das fazendas onde surgiram as primeiras mortalidades variou entre 20 e 41 camarões/m<sup>2</sup>, com povoamentos realizados entre setembro e outubro/2004. Anteriormente ao surgimento da enfermidade as safras eram realizadas em dois ciclos de cultivo ao ano, 1º ciclo de setembro a dezembro e 2º ciclo de janeiro a maio. A partir do ano de 2006, as fazendas atingidas pela enfermidade passaram a realizar apenas um ciclo de cultivo, entre os meses de novembro a abril, com redução da densidade para 5 a 10 camarões/m<sup>2</sup>. As 10 fazendas não atingidas continuaram a realizar dois ciclos/ano, sem redução da densidade, utilizando as mesmas pós larvas das fazendas onde ocorreram mortalidades.

## DISCUSSÃO

Análises de PCR (*nested*) para o WSSV em pós larvas e camarões adultos em laboratórios de larvicultura e fazendas no estado de Santa Catarina nos anos de 2002 e 2003 foram negativas (Maciel, 2003; Lenocho, 2004), indicando que o ingresso do vírus ocorreu no ano de 2004. As primeiras manifestações da enfermidade coincidiram com o ingresso de grandes volumes de pós larvas e náuplius importados de

estados do nordeste do Brasil. No estado do Ceará foi observada mortalidade de camarões causada pelo WSSV em uma fazenda em outubro de 2005 (OIE, 2005), demonstrando que o vírus estava presente na região. A movimentação de reprodutores e pós larvas livremente entre países foi considerado o mais rápido e efetivo meio de introdução do WSSV em países da Ásia e Américas (Flegel, 2006). Pós larvas contaminadas foram consideradas as responsáveis pela introdução de WSSV no Japão (Nakano, 1994) e a dispersão entre regiões da Índia (Shanchankar e Mohan, 1998) e China (Zhan, 1998). As informações obtidas trazem fortes indícios de que o ingresso do WSSV em Santa Catarina ocorreu através da importação de pós larvas e náuplius.

A hipótese da entrada do WSSV em Santa Catarina ter ocorrido através do ingresso clandestino de camarões contaminados para descasque foi levantada (Seiffert et al., 2005), porém não foram encontrados quaisquer vestígios de que isso tenha ocorrido. A presença do WSSV em camarões congelados para consumo humano e a possibilidade da transmissão para cultivos e camarões selvagens tem sido relatada em vários estudos (Lightner et al. 1997; Durand et al., 2000; Hasson et al., 2006; Nunan et al., 1998). Flegel (2009), através de revisão da literatura científica disponível sobre o assunto, concluiu que não existem evidências epidemiológicas que indiquem que surtos de doenças virais em fazendas ou em estoques selvagens tenham sido originados de camarões processados para consumo humano. Em contraste, o autor reforça a existência de ampla evidência de que os vírus têm sido transportado via reprodutores e pós larvas usados para aquíicultura.

As pós larvas também podem ter sido o meio contaminação nas fazendas localizadas nas regiões centro e norte de Santa Catarina tendo em vista os diagnósticos positivos para WSSV obtidos em dois laboratórios no início de 2005. O fato da enfermidade da mancha branca não ter se manifestado em algumas fazendas, utilizando pós larvas da mesma procedência de fazendas com mortalidades pode estar relacionado à baixa carga viral nas pós larvas e a ausência de gatilhos nos cultivos. Isto está de acordo com trabalhos em que os autores relatam o sucesso de cultivos com uso de pós larvas com baixa carga viral em fazendas com condições de baixo estresse (Lo et al., 1998; Tsai, 1999).

A disseminação entre as regiões também pode ter ocorrido através dos caminhões utilizados nas despescas, os quais circulavam entre as fazendas sem a desinfecção das caixas, como observado nos resultados dos questionários. A rápida dispersão do vírus entre fazendas de uma mesma região, principalmente no Complexo Lagunar Sul, pode ser

atribuída à alta carga viral lançada no ambiente pelo efluente sem tratamento de fazendas contaminadas, conforme observado pelo baixo percentual de interdições em relação ao número de ocorrências da enfermidade. Pelos resultados dos questionários verifica-se que os efluentes da maioria das fazendas eram liberados no mesmo ambiente de captação da água, sendo os cultivos realizados com renovação de água, possibilitando a introdução do vírus no sistema de cultivo. Algumas fazendas localizadas na Área 1, onde ocorreram as primeiras manifestações da mancha branca, conseguiram terminar o cultivo sem serem afetadas por não terem realizado captações de água do ambiente. A adição de água contaminada nos viveiros a partir de efluentes de fazendas não tratados tem sido apontada como um dos principais meios de contaminação de cultivos (Nakano et al., 1994; Wu et al., 2001). Na China, durante um período epidêmico de WSSV foi verificado que quanto mais trocas de água eram realizadas, maior era a gravidade dos surtos (Zhan, 1988).

A transmissão horizontal do vírus ocorre oralmente, pela predação de vetores contaminados, ou por partículas virais na água, possivelmente através das brânquias (Chou et al., 1995). Durand et al. (2002) concluíram que é necessária uma dose mínima de  $10^5$  cópias de WSSV por ml de água para transmitir WSSV por imersão, o que pode explicar a dispersão da enfermidade entre as fazendas próximas devido à maior carga viral na água.

Uma característica comum entre as 10 fazendas onde nunca ocorreram mortalidades pela enfermidade da mancha branca até o presente momento é a distância de fazendas contaminadas ou mesmo o isolamento em um ambiente, como no caso das fazendas da área 10. Na China, verificou-se uma rápida dispersão da enfermidade entre fazendas próximas e a não contaminação de uma fazenda localizada em uma área isolada (Zhan, 1998).

As aves são consideradas possíveis fontes de transferência do vírus da mancha branca entre fazendas (Sanchez-Martinez, 2007) e podem ter contribuído para dispersão do vírus em Santa Catarina, tendo em vista grande parte dos camarões mortos nos viveiros terem sido consumidos pelas aves, conforme relato dos produtores.

A diminuição no tamanho dos camarões entre a primeira manifestação e as subseqüentes também foi observada na China, onde o tamanho médio dos camarões no ano de 1993, início das mortalidades, foi de 6 a 9 cm e no ano seguinte foi de 2,6 a 3,6 cm (Zhan, 1998). O menor tamanho e tempo de cultivo nas mortalidades subseqüentes de cada fazenda pode indicar a permanência do WSSV nos ambientes de cultivo. A

decomposição de camarões mortos no fundo dos viveiros foi apontada como um importante meio de transmissão do vírus para vetores, água e camarões (Lo & Kou, 1988) e pode ter sido uma das fontes de contaminação nos sucessivos eventos de mortalidades em fazendas de Santa Catarina.

As condições do solo das fazendas onde ocorreram as primeiras mortalidades da mancha branca em Santa Catarina, associadas às dificuldades de renovação da água no período podem ter provocado estresse nos camarões, transformando-se no gatilho para manifestação da enfermidade. Uma das principais características da enfermidade da mancha branca é a replicação viral mediante condições estressantes (Lo et al., 2005). Solos com baixo potencial redox, como observado nestas fazendas, apresentam condições anaeróbicas e podem produzir fermentação dos substratos orgânicos formando uma série de substâncias potencialmente tóxicas para os camarões, como gás sulfídrico, metano, ácidos orgânicos, cetonas, aldeídos (Avnimelech e Ritvo, 2003, Boyd, 2001).

A elevada concentração de amônia nos solos pode ser conseqüência da degradação da matéria orgânica (Boyd, 2001) e a formação de fenol pode correr naturalmente em ambientes aquáticos pela decomposição de restos de vegetação (CCME, 1999). A coloração negra solo dos viveiros, principalmente nos da fazenda A, que apresentava solo de turfa, é uma conseqüência da presença de ferro ferroso, indicando condições anaeróbicas (Boyd, 1998). Problemas de qualidade do solo e água também foram relatados nas fazendas onde ocorreram as primeiras mortalidades nas regiões centro e norte do estado.

Os parâmetros físico-químicos da água observados no período anterior e no dia de início dos surtos permaneceram dentro dos limites recomendáveis para o cultivo de camarões (Boyd e Tucker, 1998). A temperatura da água dos viveiros foi associada à mortalidade pela mancha branca no Equador (Rodriguez, 2003). Na Colômbia, em fazendas localizadas na costa pacífica, as manifestações da mancha branca ocorreram em temperaturas entre 22 e 25°C na estação seca e entre 25 a 28 °C na estação chuvosa (Trivino, 2005). Temperaturas da água entre 32°C e 33°C favoreceram uma redução na mortalidade pela mancha branca em *Litopenaeus vannamei* (Vidal et al., 2001). Os intervalos de temperatura registrados nos dias de início dos surtos em fazendas de Santa Catarina são semelhantes aos observados em outros países, ressaltando-se que os mesmos ocorreram em todos os meses em que se realiza o cultivo no estado.

## CONCLUSÕES

- 1 – A mais provável via de ingresso do vírus da mancha branca em Santa Catarina foi a importação de náuplius e pós larvas de outros estados;
- 2 – Os efluentes contaminados de fazendas afetadas pela mancha branca foram o principal meio de dispersão do WSSV entre fazendas de uma mesma região;
- 3 – A não aplicação de medidas sanitárias preventivas por parte dos produtores contribuiu para o agravamento da enfermidade da mancha branca em Santa Catarina;
- 4 – O stress causado pelas más condições do solo de algumas fazendas foi o provável gatilho para a manifestação da enfermidade da mancha branca em Santa Catarina;
- 5 – O intervalo de temperatura mais favorável a manifestações da mancha branca (entre 25 a 28 °C) ocorre durante todo período de cultivo em Santa Catarina, aumentando o risco de novos eventos de mortalidade.

## AGRADECIMENTOS

A Financiadora de Estudos e Projetos - FINEP pela disponibilidade dos recursos financeiros utilizados na pesquisa. A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária EMBRAPA pela concessão de Bolsa de Doutorado para Sérgio Winckler da Costa.

## REFERÊNCIAS

ALFAKIT. *Informações das Metodologias de Análise Colorimétricas*. Florianópolis, 2007. 5 p. Disponível em: [www.alfakit.com.br/fmanager/alfakit/metodologia/metodologias.pdf](http://www.alfakit.com.br/fmanager/alfakit/metodologia/metodologias.pdf). Acessado em 02 fev. 2008.

AVNIMELECH, Y. e RITVO, G. Shrimp and fish pond soils: processes and management. *Aquaculture*, v. 220, p. 549-567, 2003.

BOYD, C. E.; TUCKER, C.S. *Pond Aquaculture Water Quality Management*. Boston, Kluwer Academic Publishers, 1998. 700 p.

BOYD, C.E. Consideraciones sobre la calidad del agua y del suelo en cultivos de camarón. In: HAWS, M.C.; BOYD, C.E. (Ed.). *Métodos para mejorar la camaricultura en Centroamérica*. Managua: Imprenta UCA, 2001. p. 1-30.

CANADIAN COUNCIL OF MINISTERS OF THE ENVIRONMENT. 1999. *Canadian water quality guidelines for the protection of aquatic life: Phenols — Mono- and dihydric phenols*. In: Canadian environmental quality guidelines. Winnipeg, 1999. 5p. Disponível em: [ceqg-rcqe.ccme.ca/download/en/204/](http://ceqg-rcqe.ccme.ca/download/en/204/) Acesso em: 19 dez. 2009.

CHOU, H.Y., HUANG, C.Y., WANG, C.H. et al. Pathogenicity of a baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. *Dis. Aquat. Org.*, v. 23, p.165-173, 1995.

CORSIN, F.; TURNBULL, J.F.; HAO, N.V. et al. Risk factors associated with white spot syndrome virus infection in a Vietnamese rice-shrimp farming system. *Dis. Aquat. Org.*, v. 47, p. 1–12, 2001.

CORSIN, F; MONGKHON, P.; AZIZZADEH, M. Outbreak Investigation To Identify The Source Of The Largest White Spot Disease Outbreak Of I.R. Iran. In: International Symposium on Veterinary Epidemiology and Economics, 11. 2006. Cairns. *Proceedings... Cairns*, 2006.

COSTA, S.W. Aquicultura no Estado de Santa Catarina: situação atual e perspectivas. *Revista da ABCC*, v.12, p.49-50, 2010.

DURAND, S.V.; TANG, K.F.J.; LIGHTNER, D.V. Frozen commodity shrimp: potential avenue for introduction of white spot syndrome virus and yellow head virus. *J.Aquat. Anim. Health*, v. 12, p. 128–135, 2000.

DURAND, S.V.; LIGHTNER, D.V. Quantitative real time PCR for the measurement of white spot syndrome virus in shrimp. *J. Fish Dis*, v.25, p.381–389, 2002.

FLEGEL, T. The Special Danger of Viral Pathogens in Shrimp Translocated for Aquaculture. *Science Asia*, v. 32, p. 215-221, 2006.

FLEGEL, T.W. Review of disease transmission risks from prawn products exported for human consumption. *Aquaculture*, v. 290, p.179-189, 2009.

HASSON, K.W.;FAN, Y.; REISINGER, T. et al. White-spot syndrome virus (WSSV) introduction into the Gulf of Mexico and Texas freshwater systems through imported, frozen bait-shrimp. *Dis. Aquat. Org.* 71, 91–100, 2006.

HILL, B. National and international impacts of white spot disease of shrimp. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, v. 2, p. 58 - 65, 2002.

LEHMANN, M.; VINATEA, V. Metodologia de amostragem de solo para a determinação do potencial redox em viveiros de cultivo de água doce e salgada. *B. Inst. Pesca*, v.34, p.: 131 - 140, 2008.

LENOCH, R. *Avaliação do risco epidemiológico da carcinicultura catarinense usando como modelo a síndrome de taura e da doença da mancha branca*.

2004. 86 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) - Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí.

LIGHTNER, D.V., REDMAN, R.M., POULOS, B.T., et al. Risk of spread of penaeid shrimp viruses in the Americas by the international movement of live and frozen shrimp. *Rev. Sci. Tech. - Off. Int. Epizoot.*, v. 16, p.146–160, 1997

LO, C.F.; CHANG, Y.S.; CHENG, C.T. et al. PCR monitoring cultured shrimp for white spot syndrome virus (WSSV) in growout ponds. *In* Flegel, T.W. (ed.). *Advances in Shrimp Biotechnology, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology*, Bangkok. p. 281-286, 1998.

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

LO, C-F.; PENG, S.E.; CHANG, Y.S. et al. 2005. White Spot Syndrome - What we have learned about the virus and the disease. *In* Diseases in Asian Aquaculture Symposium, 5, 2002. Gold Coast. *Proceedings...* Manila, 2005. p. 421-433..

MACIEL, M. L. T. *Contribuição para o desenvolvimento de uma proposta de monitoramento e certificação sanitária em cultivo de camarão marinho no Estado de Santa Catarina*. 2002. 35 f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

NAKANO, H.; KOUBE, H.; UMEZAWA, S.; et al. Mass mortalities of cultured kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, in Japan in 1993: Epizootiological survey and infection trails. *Fish Pathol.*, v. 29, p. 135-139, 1994.

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

OIE. White spot disease in Brazil. *Disease Information*. v.18. 2005. Disponível em: [http://www.oie.int/eng/info/hebdo/AIS\\_58.HTM#Sec0](http://www.oie.int/eng/info/hebdo/AIS_58.HTM#Sec0) Acessado em 18 jul. 2010.

ORTEGA, C.; MUZQUIZ, J. L. Vigilancia epidemiológica y medicina preventiva en acuicultura: Principios generales . Congreso Internacional Virtual de Acuicultura (CIVA), 1. 2002. Zaragoza. *Anais.....* Zaragoza, 2002. p. 148-162. Disponível em: [www.revistaaquatic.com/civa2002/coms/resumen.asp?...](http://www.revistaaquatic.com/civa2002/coms/resumen.asp?) Acessado em: 30 jan. 2003.

RODRIGUEZ, J.; BAYOT, B.; AMANO, Y. et al. White spot syndrome virus infection in cultured *Penaeus vannamei* (Boone) in Ecuador with emphasis on histopathology and ultrastructure. *J. Fish Dis.*, v. 26, 439–450, 2003.

SANCHEZ-MARTINEZ, J.G.; AGUIRRE-GUZMÁN, G.; MEJIA-RUIZ, H. White Spot Syndrome Virus in cultured shrimp: A review. *Aquac. Res.*, 2007, v.38, p.1339 -1354, 2007.

- SEIFFERT W.; COSTA S. W.; MAGGIONI, D. A mancha branca em Santa Catarina. *Revista Panorama da Aquicultura*, v. 15, p.51-53. 2005.
- SEOK, H.S.; BAEK, M.W.; LEE, H.Y. et al. Increasing Production in Korean Shrimp Farms with White-Spot Syndrome Virus PCR-Negative Brood Stock *J. Microbiol. Biotechnol.*, v. 17, p.511–515, 2007.
- SHANCHANKAR, K.M.; MOHAN, C.V. Epidemiological aspects of shrimp viral diseases in India – A review. *J. Aqua. Trop.*, v. 13, p.43-49, 1998.
- TRIVINO, A. Breve análise da carcinicultura na Colômbia com a presença do WSSV. *Revista da ABCC*, v. 7, p. 31- 32, 2005.
- TSAI, M.F.; KOU, G.H.; LIU, H.C. et al. Long-term presence of white spot syndrome virus (WSSV) in a cultivated shrimp population without disease outbreaks. *Dis. Aquat. Org.*, v.38, p. 107–114, 1999.
- VIDAL, O.M.; GRANJA, C.B.; ARANGUREN, F. et al. A profound effect of hyperthermia upon the survival of *L. vannamei* juveniles infected with the WSSV. *J. World Aquacult. Soc.*, v. 32, p.364–372, 2001.
- WU, J.L.; A. NAMIKOSHI, T.; NISHIZA, W. et al. Effects of shrimp density on transmission of penaeid acute viremia in *Penaeus japonicus* by cannibalism and the waterborne route. *Dis. Aquat. Org.*, v.47, p. 129-135, 2001.
- ZHAN, W.B.; WANG, Y.H. White spot syndrome virus infection of cultured shrimp in China. *J. Aquat. Anim. Health*, v. 10, p.405-410, 1998.

### CAPITULO III

## **PRESENÇA DO VÍRUS DA SÍNDROME DA MANCHA BRANCA (WSSV) EM CRUSTÁCEOS DECÁPODES SELVAGENS E A RELAÇÃO COM FAZENDAS DE CAMARÕES AFETADAS PELA ENFERMIDADE NO SUL DO BRASIL**

Sérgio Winckler da Costa<sup>1</sup>, Juliana R. Moser<sup>2</sup>, Ana Paula de Medeiros Fraga<sup>2</sup>, Albertino de Souza Zamparetti<sup>1</sup>, Edegar Roberto Andreatta<sup>3</sup>,  
Maria Risoleta Freire Marques<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina  
– EPAGRI

<sup>2</sup> Departamento de Bioquímica, CCB e <sup>3</sup> Departamento de Aquicultura,  
CCA, Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

Artigo formatado de acordo com as normas da revista  
**Aquaculture Research**

## ABSTRACT

The presence of WSSV in wild penaeid shrimp, blue crabs, and burrowing crabs in the southern portion of the Santa Catarina state, Southern Brazil, was monitored by nested PCR during four years in five lagoons where shrimp farm effluents are discharged into. The presence of WSSV was observed in 112 of the 309 (36.24%) samples analyzed. Histopathological analysis revealed the inclusion of the virus in seven of the 174 (4.02%) of the shrimp tissue samples analyzed. No significant ( $P \geq 0.05$ ) correlation was observed between the WSSV percentage in samples and the area and number of shrimp postlarvae stocked in the farms affected by the disease in the previous production cycle. The WSSV percentages of the last sampling were significantly higher ( $P < 0.05$ ) than the other samplings, although the farming area was reduced. Results indicate a possible concentration of WSSV in the hosts with time, which supports the importance of taking measures of exclusion and control of vectors to prevent new disease outbreaks.

**Keywords:** WSSV, shrimp, blue crabs, burrowing crabs, shrimp farming

## RESUMO

A presença do vírus da mancha branca (WSSV) em camarões peneídeos, caranguejos e siris selvagens na porção sul do Estado de Santa Catarina, Sul do Brasil, foi monitorada através de *nested* PCR durante quatro anos em cinco lagoas costeiras onde são liberados efluentes de fazendas de camarões. A presença de WSSV foi observada em 112 das 309 (36,24%) amostras analisadas. As análises histopatológicas revelaram inclusões do vírus em sete das 174 (4,02%) amostras de tecidos dos camarões analisadas. Não foi encontrada correlação significativa ( $P \geq 0,05$ ) entre os percentuais de animais positivos para WSSV das coletas em relação à área e quantidade de pós-larvas povoadas das fazendas afetadas pela doença no ciclo anterior. Os valores percentuais de WSSV da última coleta foram significativamente superiores ( $P < 0,05$ ) aos das demais coletas, apesar da redução da área cultivada. Observou-se o aumento da presença de WSSV nos hospedeiros com o passar do tempo, reforçando a importância da aplicação de medidas de exclusão e controle dos vetores para prevenir novos surtos da enfermidade.

**Palavras chave:** vírus da síndrome da mancha branca, camarões, siris, caranguejos, cultivo de camarões

## INTRODUÇÃO

O vírus da síndrome da mancha branca (WSSV) é o agente causal da mais séria doença relatada até o presente para camarões cultivados (Flegel, 2009). Foi inicialmente relatado em 1992 – 1993 no nordeste da Ásia e se espalhou rapidamente para a maioria das áreas de cultivo de camarões da região do Indo Pacífico (Takahashi, Itami, Kondo, Maeda, Fujii, Tomonaga, Supamattaya e Boonyaratpalin, 1994; Chou, Huang, Wang, Chiang e Lo, 1995).

A ocorrência de WSSV em cultivos na América do Norte WSSV foi relatada no ano de 1995 (Lightner, Redman, Nunan, Mohney, Mari e Poulos, 1997) e em 1999 causou severo impacto nos cultivos de camarões na América Central e do Sul (Durand, Tang e Lightner, 2000; Vidal, Granja, Aranguren, Broca e Salazar, 2001; Lightner, 2003).

O primeiro registro de WSSV no Atlântico Sul ocorreu no ano de 2005, em fazendas localizadas no estado de Santa Catarina, extremo sul do Brasil (Seiffert, Costa e Maggioni, 2005). O cultivo de camarões nesta região teve um acelerado crescimento a partir da introdução da espécie *Litopenaeus vannamei* no ano de 1998 e o estabelecimento de um programa governamental para o desenvolvimento do cultivo de camarões (Andreatta, Beltrame e Winckler, 2002). A produção de camarões do estado atingiu o patamar de 4.189 t no ano de 2004, caindo para 172 t no ano de 2009 em decorrência do surgimento da enfermidade da mancha branca (Costa, 2010).

A maioria das fazendas está localizada na região sul do estado, na Cidade de Laguna, no entorno de cinco lagoas de água salobra, onde a produção teve queda de mais de 90% (Fracalossi, Lemos, Yasumar, Neto, Kitagima e Moro, 2009). Desde o surgimento da enfermidade, praticamente todas as fazendas da região foram atingidas pela enfermidade e não conseguiram cultivar camarões sem mortalidades.

Lo, Ho, Peng, Chen, Hsu, Chiu, Chang, Liu, Su, Wang e Kou (1996b) ressaltaram a importância de se conhecer a interação entre camarões peneídeos cultivados e outros hospedeiros presumidos de WSSV, que habitam fazendas, estuários e águas costeiras, para a implantação de medidas profiláticas e de controle da enfermidade.

O WSSV tem ocorrência generalizada em uma gama de hospedeiros, os quais podem atuar como vetores em sistemas naturais e de cultivo (Kanchanaphum, Wongteerasupaya, Sitidilokratana, Boonsaeng, Panyim, Tassanakajon, Withyachurnnarnk e Flegel, 1998; Maeda, Itami, Furumoto, Henning, Imamura, Kondo, Hirono, Takashi, Takahashi, 1998; Po e He, 2003; Momoyama, Hiraoka, Nakano, Koube,

Inouye e Oseko, 2003; He, Chen, Deng, Yao, Zhou, Weng, Jiang, Long e Chan, 2003; Chapman, Browdy, Savin, Prior e, Wenner, 2004; Wang, Lo, Chang e Kou, 1998; Hameed, Balasubramanian, Musthaq e Yoganandhan, 2003; Rajendran, Vijayan, Santiago e Krol, 1999; Supamattaya, Hoffmann, Boonyaratpalin e Kanchanaphum, 1998).

A descarga de água dos cultivos de camarões tem sido apontado como responsável pela contaminação das populações naturais de decápodes e outros organismos suscetíveis (Lo, et al., 1996b) e pela alta prevalência de WSSV em organismos selvagens (Vaseeharan, Jayakumar & Ramasamy, 2003; Meng, Jang, Seo e Cho, 2009; de la Peña, Lavilla-Pitogo, Villar, Paner, Sombito, Capulos, 2007).

Dada a necessidade de aplicação de práticas de controle da enfermidade da síndrome da mancha branca, avaliou-se a presença do WSSV nas principais espécies de crustáceos decápodes de ambientes que recebem os efluentes de fazendas de camarões em função do tempo e a relação com a ocorrência de surtos.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Área de estudo**

A área de estudo está inserida na região do Complexo Lagunar Sul de Santa Catarina, abrangendo os Municípios de Laguna, Imaruí e Jaguaruna, onde estão instaladas 92 das 107 fazendas de cultivo de camarões do Estado. Foram selecionados cinco pontos de amostragens localizados nas cinco lagoas de água salobra onde são liberados os efluentes dos cultivos, sendo: ponto 1 - Lagoa de Imaruí (28° 19' 6" S , 48° 52' 12" W); ponto 2 – Lagoa do Ribeirão (28° 29' 29" S , 48° 53' 0" W); ponto 3 - Lagoa de Santo Antônio (28° 31' 14,6" S , 48° 46' 32,47" W); ponto 4 – Lagoa de Santa Marta (28° 32' 55" S , 48° 48' 47" W) e ponto 5 – Lagoa do Camacho (28° 36' 24" S , 48° 51' 48" W) (Figura 1).

### **Amostragens**

Realizaram-se cinco amostragens por ponto, uma no final do período de vazio sanitário (outubro 2005), entre duas safras de cultivo (janeiro 2006) e três coletas após os períodos de colheita dos camarões (maio/junho 2006; junho/2007 e maio/junho 2008).

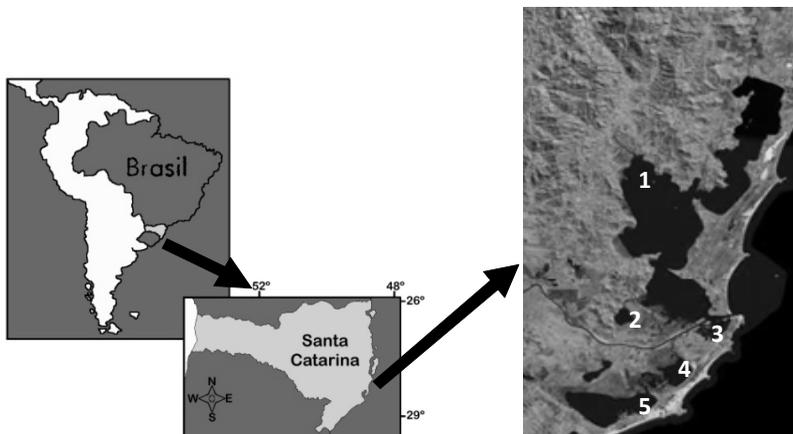


Figura 1. Localização dos pontos de amostragem no Complexo Lagunar Sul de Santa Catarina. 1 – Lagoa de Imarui; 2 – Lagoa do Ribeirão; 3 – Lagoa de Santo Antônio; 4 – Lagoa de Santa Marta; 5 – Lagoa do Camacho

Em cada amostragem foram coletados 150 organismos de três grupos de crustáceos da macro fauna, composta por camarões nativos (*Farfantepenaeus paulensis*, *F. brasiliensis* e *Litopenaeus schmitti*), siris (*Calinectes* sp) e caranguejos (*Chasmagnatus granulata*), totalizando 3.750 organismos para cada grupo. Os camarões foram coletados através de tarrafas e os caranguejos e siris através de armadilhas tipo covos. Para cada ponto foram obtidas amostras de pleópodos nos camarões, brânquias e patas de siris e de caranguejos, para análise de PCR, imediatamente fixadas em etanol 95% (1:10, w/v) e colocadas em frascos de vidro. Para análise de histopatológica, foi injetada solução de Davidson em camarões vivos de tamanho variado, estocados por 24 horas em frascos contendo a mesma solução e transferidos para etanol 70%, o qual foi trocado após 24 horas (Bell e Lightner, 1988).

### **Informações sobre cultivos**

Os dados relativos às fazendas afetadas pela mancha branca para cada ciclo de cultivo no período amostral, o local de liberação dos efluentes nas lagoas, as áreas em operação e quantidade de pós larvas povoadas foram obtidos junto aos órgãos responsáveis pela extensão e defesa

sanitária do estado, laboratórios fornecedores de pós – larvas e diretamente com os produtores.

### **Análise histopatológica**

Foram preparadas lâminas histológicas de acordo com procedimento descrito por Lightner (1996), onde as amostras fixadas em Davidson foram desidratadas, incluídas em parafina e seccionadas em micrótomo (EP-31-20091, EasyPath) na espessura de 3-5  $\mu\text{m}$ , coletadas em lâminas e posteriormente coradas em Hematoxilina e Eosina (HE). As lâminas foram fotografadas (dsc-w 120, Sony) e examinadas em microscópio óptico (Biocular, Bioval) para observação da presença de núcleos hipertróficos com inclusões centrais basófilas cercadas por cromatina marginal em tecidos de origem ectodérmica e mesodérmica (Wongteerasupaya, Vickers, Sriurairatana, Nash, Akarajamorn, Boonsaeng, Panyim, Tassanakajon, Withyachumnarnkul e Flegel, 1995). Em estágios iniciais, a inclusão pode ser eosinófila com um espaço hialino entre a inclusão e a parede nuclear, conhecido como inclusões Cowdry tipo A. Os tecidos mais utilizados para observação do WSSV foram o sub-cuticular do estômago e do cefalotórax e as brânquias.

### **Extração do DNA genômico -**

A extração do DNA genômico foi realizada a partir de amostras compostas por um pool de tecidos (brânquias, pleópodos e patas) de cinco animais, usando o protocolo descrito em Souza (2008). A integridade das amostras foi avaliada pelo seu perfil eletroforético em gel de agarose 1%. A concentração de DNA foi determinada através da razão da absorbância em 260/280 nm.

### **PCR nested**

A detecção do vírus da mancha branca foi realizada através da amplificação de um fragmento do genoma viral através da Reação em Cadeia da Polimerase em dois passos, *nested* PCR, utilizando-se dois pares de iniciadores WS146F1/WS146R1 (externos) e WS146F2/WS146R2 (internos) descritos por Lo, Lei, Ho, Chen, Peng, Chen, Chou, Yeh, Huang, Chou, Wang e Kou (1996a) e recomendados pela OIE.

Como controle positivo foi utilizado uma amostra de DNA extraída de pleópodo de *L. vannamei*, cujo resultado foi positivo para a presença de uma seqüência gênica do WSSV e como controle negativo foi utilizado uma amostra sem DNA molde.

A análise dos produtos de PCR foi realizada através de eletroforese em gel de agarose 2% e o resultado foto documentado em câmera digital.

### **Análise estatística**

As diferenças entre os valores de detecção de WSSV entre lagoas, entre os grupos de organismos e os períodos de amostragem foram analisadas através de teste de Qui Quadrado a um nível mínimo de significância de 5% ( $P < 0,05$ ).

A Correlação entre o percentual de detecção de WSSV por coleta com a quantidade de pós larvas e a área das fazendas onde ocorreram mortalidades por WSSV na safra anterior a coleta foi analisada através de teste de correlação de Sperman, a um nível de significância de 5% ( $P < 0,05$ ).

## **RESULTADOS**

Na análise dos produtos da *nested* PCR por eletroforese em gel de agarose verificou-se a presença de uma única banda equivalente ao tamanho esperado de 941 pb, correspondente a amplificação de um fragmento específico do genoma de WSSV, utilizando os indicadores descritos (Figura 2). A presença deste fragmento foi observada em 151 das 504 amostras analisadas. Os resultados positivos para o WSSV obtidos em **patas** de siri (25/107) e caranguejos (16/84) foram inferiores aos encontrados nas **brânquias** destes organismos (36/104 e 19/96, respectivamente), utilizando-se apenas os últimos no presente trabalho.

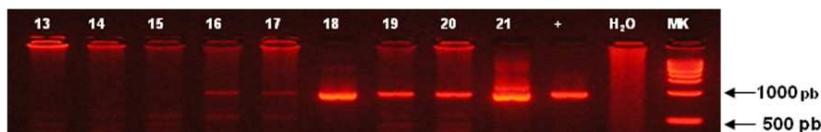


Figura 2. Gel de agarose (2%) dos produtos amplificados por PCR de amostras de siris: 13 - 15 – amostras negativas para WSS, Lagoa do Camacho; 16 - 21 – amostra positivas para WSSV, L. Santa Marta; MK: Marcador 1 Kb Marca Biolabs; + : controle positivo 941pb = positivo para WSSV

Na Tabela 1 observa-se que não foram encontradas amostras positivas para o WSSV na coleta de **outubro/2005**. No entanto, foram encontradas 26 de 60 (43,3%) amostras positivas em **janeiro/2006**, 17 de 60 (28,3%) em **maio-junho/2006**, 18 de 48 (37,5%) em **junho/2007** e 51 de 81 (62,96%) em **maio-junho/2008**. Nas lagoas, 16 de 64 (25,0%) amostras foram positivas para o WSSV na **Lagoa de Imaruí**,

27 de 67 (40,29%) na **Lagoa de Santo Antônio**, 32 de 66 (48,48%) na **Lagoa de Santa Marta**, 20 de 62 (32,25%) na **Lagoa do Camacho** e 17 de 50 (34,0%) na **Lagoa do Ribeirão**.

Tabela 1. Detecção de WSSV por *nested* PCR em camarões, siris e caranguejos, por local e data de coleta. Valores representam o número de amostras (pools) positivas para WSSV em relação ao número total examinado e o percentual correspondente (%).

Lagoas	Organismos	Coletas					Total
		Out/05	Jan/06	Mai-jun/06	Jun/07	Mai-Jun/08	
Imaruí	Camarão	0/4 (0)	0/4 (0)	4/4 (100)	0/4 (0)	2/6 (33,33)	16 /64 (25,0)
	Siri	0/4 (0)	0/4 (0)	0/4 (0)	0/4 (0)	4/6 (66,66)	
	Caranguejo	0/4 (0)	4/4 (100)	0/4 (0)	2/4 (50)	0/4 (0)	
Santo	Camarão	0/4 (0)	3/4 (75)	4/4 (100)	3/4 (75)	9/9 (100)	27/67 (39,68)
Antonio	Siri	0/4 (0)	0/4 (0)	0/4 (0)	0/4 (0)	6/6 (100)	
	Caranguejo	0/4 (0)	0/4 (0)	0/4 (0)	2/4 (50)	0/4 (0)	
Santa	Camarão	0/4 (0)	4/4 (100)	0/4 (0)	4/4 (100)	7/8 (87,5)	32/66 (48,48)
Marta	Siri	0/4 (0)	4/4 (100)	0/4 (0)	1/4 (25)	6/6 (100)	
	Caranguejo	0/4 (0)	2/4 (50)	0/4 (0)	4/4 (100)	0/4 (0)	
Camacho	Camarão	0/4 (0)	0/4 (0)	4/4 (100)	2/4 (50)	3/4 (75)	20/62 (32,25)
	Siri	0/4 (0)	3/4 (75)	2/4 (50)	0/4 (0)	5/6 (83,33)	
	Caranguejo	0/4 (0)	1/4 (25)	0/4 (0)	0/4 (0)	0/4 (0)	
Ribeirão	Camarão	0/4 (0)	0/4 (0)	2/4 (50)	NR	6/6 (100)	17/50 (34,0)
	Siri	0/4 (0)	1/4 (25)	1/4 (25)	NR	3/4 (75)	
	Caranguejo	0/4 (0)	4/4 (100)	0/4 (0)	NR	0/4 (0)	
<b>Total</b>		<b>0/60</b>	<b>26/60</b> (43,3)	<b>17/60</b> (28,3)	<b>18/48</b> (37,5)	<b>51/81</b> (62,96)	<b>112/309</b> (36,24)

A quantidade de pós-larvas e a área total cultivada das fazendas nas quais ocorreram mortalidades devido à presença do WSSV passaram de 189.205 milhões e 664 ha na safra anterior à coleta de outubro/2005 para 14.905 milhões e 172 ha, respectivamente, na safra anterior à coleta de maio-junho/2008 (Tabela 2).

Tabela 2. Área de viveiros (ha), quantidade de pós larvas (pls x 1000) e número de fazendas com surtos de WSSV por lagoa e período de cultivo anteriores as coletas.

<b>Período</b>	<b>Lagoa</b>	<b>área ha</b>	<b>pls .10<sup>3</sup></b>	<b>n fazendas</b>
<b>jan-maio/05</b>	<b>Ribeirão</b>	55,87	15.740	5
	<b>Camacho</b>	144,39	49.654	6
	<b>Sto Antonio</b>	112,5	37.020	10
	<b>Imaruí</b>	295,67	68.661	24
	<b>Sta Marta</b>	55,84	18.130	9
<b>out-dez/05</b>	<b>Ribeirão</b>	60,25	11.444	4
	<b>Camacho</b>	0	0	0
	<b>Sto Antonio</b>	179,16	28.141	13
	<b>Imaruí</b>	198,9	36.579	24
	<b>Sta Marta</b>	10,85	1.911	3
<b>jan-maio/06</b>	<b>Ribeirão</b>	7,73	1.800	1
	<b>Camacho</b>	82,9	10.201	4
	<b>Sto Antonio</b>	56,4	5.800	2
	<b>Imaruí</b>	81,17	10.492	12
	<b>Sta Marta</b>	0	0	0
<b>dez/06-mar/07</b>	<b>Ribeirão</b>	12,02	650	2
	<b>Camacho</b>	16,1	2.850	3
	<b>Sto Antonio</b>	58,5	6.600	4
	<b>Imaruí</b>	98,63	5.885	11
	<b>Sta Marta</b>	0	0	0
<b>Dez/07-mar/08</b>	<b>Ribeirão</b>	35,2	4.340	1
	<b>Camacho</b>	0	0	0
	<b>Sto Antonio</b>	70,4	6.495	6
	<b>Imaruí</b>	66,56	4.070	7
	<b>Sta Marta</b>	0	0	0

Na análise histopatológica foram observadas inclusões correspondentes ao WSSV no epitélio gástrico, no epitélio cuticular e nas brânquias em sete das 174 amostras (4,02%) analisadas (Figura 3).

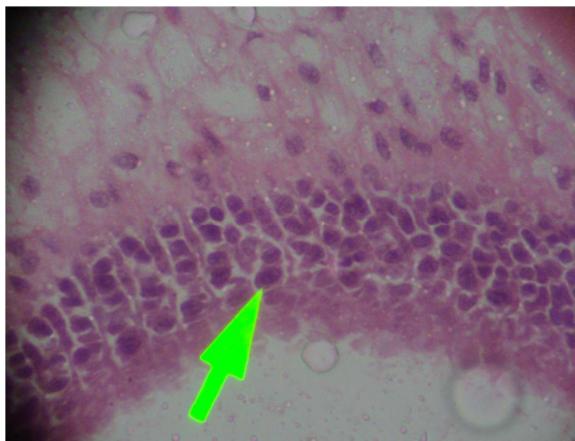


Figura 3. Epitélio gástrico de camarões da Lagoa do Camacho na coleta 2006 (100 x) com inclusões centrais em núcleos hipertróficos características de WSSV.

Os resultados de PCR para WSSV obtidos em camarões (57/109) foram significativamente maiores ( $P < 0,05$ ) que para siris (36/104) e caranguejos (19/96), os quais foram significativamente diferentes entre si ( $P < 0,05$ ). Por outro lado, não foram encontradas diferenças significativas entre os resultados de PCR para WSSV entre as lagoas ( $P \geq 0,05$ ).

A coleta realizada em **maio-junho/2008** apresentou resultados de PCR para WSSV significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ) das demais coletas, as quais não apresentaram diferenças significativas entre si ( $P \geq 0,05$ ).

Não foram encontradas correlações significativas ( $P \geq 0,05$ ) entre o percentual de detecção de WSSV por coleta com a quantidade de pós-larvas e com a área dos viveiros das fazendas onde ocorreram mortalidades pelo vírus na safra anterior à coleta.

## DISCUSSÃO

A presença de WSSV em crustáceos do ambiente natural tem sido associada à influência e proximidade de áreas de cultivo onde ocorreram

surtos da enfermidade (Lo et al., 1996b; Vaseeharan et al., 2003; de La Peña et al., 2007; Meng et al., 2009).

Foi detectada a presença de WSSV em camarões, siris e caranguejos silvestres, nas lagoas do Complexo Lagunar Sul de Santa Catarina, onde está situada uma grande quantidade de fazendas de camarões, o que é indicativo que o vírus se manteve presente nestes organismos quatro anos após o primeiro surto da enfermidade.

No ano de 2006 Marques (2008) encontrou o WSSV em 23,3% de amostras de *Chasmagnathus granulata* na Lagoa de Imaruí. No mesmo ano, Cavalli, Marins, Netto e Abreu (2008) não encontraram camarões positivos para WSSV em amostras de cinco estações nas lagoas de Imaruí, Mirim e Santo Antônio, em duas coletas, atribuindo a não-deteção a problemas de tamanho amostral. Posteriormente, em 2008, os mesmos autores, utilizando um maior número de organismos, encontraram amostras positivas para o WSSV entre 3 e 9% em *Farfantepenaeus paulensis* no Complexo Lagunar Sul e em amostras de camarões (*F. paulensis* e *F. brasiliensis*) capturadas em águas oceânicas no ano de 2007 e 2009 (Cavalli, 2009).

Desde o relato de Lo et al. (1996b), vários autores relataram a presença de WSSV em crustáceos selvagens em diferentes locais e com taxas de infecção distintas. Chakraborty, Ota, Joseph, Kumar, Hossain, Karunasagar, Venugopal e Karunasagar (2002) encontraram WSSV em 77 de 89 (86,52%) espécies de crustáceos selvagens na costa da Índia utilizando as técnicas de PCR e dot blot. He et al. (2003) detectaram o WSSV através de *nested* PCR, histopatologia, bioensaio e/ou microscopia eletrônica em 14 espécies de camarões, 16 de caranguejos, um exemplar de *Trachypleus* sp e um exemplar de *Oratosquilla*, capturados na natureza ou em viveiros de cultivo da China, sendo todos considerados hospedeiros naturais de WSSV.

Vaseeharan et al. (2003) detectaram WSSV em 34,5% de reprodutores de *Penaeus monodon*, em 23,5% juvenis de *P. indicus*, em 16,80% *Metapenaeus* sp, em 22,72% *Scylla serrata* e em 15% *Squilla mantis* selvagens na costa leste da Índia. Chapman et al. (2004) encontraram WSSV em 2,5% de *Litopenaeus setiferus*, 0,35% em *Farfantepenaeus aztecus* e 0% em *F. duorarum* na costa sul do EUA por *nested* PCR. Mijangos-Alquisires, Quintero-Arredondo, Castro-Longorita, Grijalva-Chon & Ramos-Paredes (2005) detectaram a presença de WSSV por PCR entre 9,2 e em 16,92% camarões selvagens capturados próximos a áreas de cultivo, na costa de Sinaloa.

A presença de WSSV na espécie *Callinectes sapidus* foi relatada em exemplares de canais de fazendas de cultivo no México (López-Félix,

2002), em um exemplar coletado na costa sudeste dos Estados Unidos (Browdy, Shepard e Powell, 2006) e em 27,2 % de amostras coletadas na costa de Nova Iorque, Nova Jersey e Texas (Chang, Peng, Wang, Hsu, Ho, Wang, Wang, Lo e Kou, 2001).

A ausência de resultados positivos na amostragem de outubro de 2005 pode estar relacionada ao fato da mesma ter sido coletada seis meses após o término da safra e depois de um período de vazio sanitário de três meses. Outro aspecto a ser considerado é que a safra anterior (dezembro a maio) foi a primeira ocorrência do surto da macha branca e foram realizadas despescas emergenciais em muitas fazendas, com perdas reduzidas, o que não ocorreu nas safras subseqüentes, quando a enfermidade ocorreu no início dos cultivos, ocasionando perdas próximas a 100%. Alday (1999) relatou que o aparecimento de um novo vírus em uma área determinada é acompanhado de um período para a sua multiplicação e dispersão, o qual é influenciado por fatores ambientais.

A inexistência de correlação entre a porcentagem de organismos WSSV positivos com a quantidade de larvas e a área das fazendas afetadas pela mancha branca nas safras anteriores às coletas pode ter ocorrido devido a baixa circulação e renovação da água nas lagoas, resultando na concentração do vírus nos ambientes e na contaminação dos organismos, através de transmissão horizontal (Chou et al., 1995; Kanchanaphum et al., 1998; Maeda et al., 1998) e/ou vertical (Lo, Ho, Chen, Liu, Chiu, Yeh, Peng, Hsu, Liu, Chang, Su, Wang, Kou, 1997; Hsu, Lo, Lin, Liu, Peng, Chang, Chen, Liu, e Kou, 1999; Peng, Lo, Lin, Chen, Chang, Liu, Su, e Kou, 2001; Tsai, Kou, Liu, Liu, Chang, Peng, Hsu, Wang e Lo, 1999; Mohan, Sudha, Shankar e Hegde, 1997). Essa hipótese é baseada no número significativamente superior de amostras positivas para o WSSV da última coleta em relação aos das demais, ocorrendo após a safra com menor quantidade de pós larvas e área povoada.

Outro indício é o alto percentual de WSSV positivo na Lagoa de Santa Marta na coleta de maio-junho/2008, mesmo não tendo havido cultivo nas fazendas localizadas no seu entorno nos três anos anteriores à coleta. Porém, a circulação da água nesta lagoa é muito baixa.

Deng et al. (2005) associaram um alto número de *Fanneropenaeus chinensis* positivos para o WSSV a problemas ambientais e às condições geográficas do local de coleta. De la Peña et al. (2007) encontraram taxas maiores de WSSV em *Penaeus monodon* selvagens na estação seca em comparação com a estação úmida. Em outros estudos foi demonstrado que parte dos caranguejos infectados em surtos de WSSV

sobrevivem ao inverno e pode transmitir o WSSV no ano seguinte (Po & He, 2003; He et al., 2003). Quang, Hoa, Da e Anh (2009) detectaram a presença de WSSV por PCR na água de viveiros e canais 20 meses após o surto, persistindo também em vetores, mesmo na ausência de camarões.

A diferença de positividade de WSSV entre as espécies de crustáceos selvagens encontrada no presente estudo foi observada entre camarões, caranguejos e squila na costa da Índia (Chakraborty et al., 2002) e entre três espécies de camarões (*Penaeus aztecus*, *P. setiferus* e *P. duorarum*) na costa Atlântica dos EUA (Chapman et al., 2004).

Os baixos percentuais de camarões com inclusões histopatológicas observados no presente trabalho são similares a resultados encontrados em outros estudos com camarões selvagens e indicam a ocorrência de replicação do vírus da síndrome da mancha branca nos camarões nativos do Complexo Lagunar. Mijangos-Alquisires et al. (2006) encontraram apenas um camarão com sinais histopatológicos entre 11 camarões *Litopenaeus vannamei* selvagens positivos por PCR. Chapman et al. (2004) relataram a presença de sinais histopatológicos em apenas um exemplar entre vinte e oito de *Penaeus setiferus* selvagem positivos por PCR. Mohan, Corsin, Thakur, Padiyar, Madhusudan, Turnbull, Hao e Morgan (2002) relacionaram a ausência de inclusões histopatológicas em amostras de camarões positivas por nested PCR ao baixo nível de infecção.

O fato de infecções graves raramente serem vistas na natureza em camarões e caranguejos pode ser decorrente da possível vulnerabilidade dos organismos doentes à predação e a rápida progressão da doença, fazendo com que somente os fracamente infectados sobrevivam (Chapman et al., 2004; Meng et al., 2009). Por outro lado, em regiões onde foram encontradas infecções de WSSV em populações de crustáceos selvagens não foram encontradas evidências do desenvolvimento da doença (Hill, 2002) e da ocorrência de diminuições nas capturas (Hill, 2002; Flegel, 2009). Outra possibilidade seria de que as doenças de pouca ou nenhuma importância para as populações selvagens em seu habitat natural só poderiam tornar-se epidêmicas em condições de cultivo intensivo (Brigs, Funge-Smith, Subasinghe e Phillips, 2004).

As informações sobre a presença e a persistência do WSSV nos crustáceos selvagens nas lagoas do Complexo Lagunar Sul de Santa Catarina demonstram a importância da aplicação de medidas de controle e exclusão de vetores, para diminuição dos riscos de novos surtos da enfermidade. Recomenda-se a continuidade da avaliação do WSSV,

incluindo outros organismos presentes nas fazendas e ambientes de entorno, assim como a realização de estudos, envolvendo a análise de fatores ambientais, para o melhor entendimento dos mecanismos de contaminação e desenvolvimento da doença nos camarões selvagens e de cultivo.

## AGRADECIMENTOS

A Financiadora de Estudos e Projetos FINEP pela disponibilidade dos recursos financeiros utilizados na pesquisa e a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária EMBRAPA pela outorga de Bolsa de Doutorado para Sérgio Winckler da Costa.

## REFERÊNCIAS

- Andreatta E.R., Beltrame E. & Winckler S. (2002) Pacific White Shrimp Culture in Southern Brazil. *Global Aquaculture Advocate* **5**, 76-77.
- Alday V. G.(1999) Aclaraciones sobre el virus de la mancha blanca y la tecnica del PCR. *El Mundo Acuicola* **5**, 8–10.
- Briggs M., Funge-Smith S., Subasinghe R. & Phillips M. (2004) Introductions and movement of *Penaeus vannamei* and *Penaeus stylirostris* in Asia and the Pacific. *RAP publication 2004/10*, FAO Regional Office for Asia and the Pacific, Bangkok, p. 92.
- Browdy C.L., Shepard E.F., Powell J.W.B.( 2006) *Evaluation of ecological and commercial impact of white spot syndrome virus (WSSV) infections in the white shrimp, Litopenaeus setiferus, and the blue crab, Callinectes sapidus, in Southeastern United States using an immunoassay technique*. Final Report Program of NMFS/NOAA, Grant No. NA03NMF4270090. [www.nmfs.noaa.gov/mb/sk/pdf/Report\\_11.pdf](http://www.nmfs.noaa.gov/mb/sk/pdf/Report_11.pdf)
- Cavalli L. (2009) *White spot syndrome virus em camarões peneídeos nativos e cultivados no estuário da Lagoa dos Patos, Sul do Brasil*. Tese (Doutorado em Oceanografia Biológica) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil.
- Cavalli L. S.,Marins L.F., Netto S. & Abreu P.C. (2008) Evaluation of White Spot Syndrome Virus (WSSV) in wild shrimp after a major outbreak in shrimp farms at Laguna, Southern Brazil. *Atlântica* **30**, 45-52.
- Chakraborty A., Otta S.K., Joseph B., Kumar S., Hossain M.S., Karunasagar I., Venugopal M. N. & Karunasagar I. (2002) Prevalence of white spot syndrome virus in wild crustaceans along the coast of India. *Current Science* **82**, 1392–1397.

- Chang Y.S., Peng S. E., Wang H.C., Hsu H.C., Ho C. H., Wang C. H., Wang S.Y., Lo C.F. & Kou G.H. (2001) Sequencing and Amplified Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of Ribonucleotide Reductase Large Subunit Gene of the White Spot Syndrome Virus in Blue Crab (*Callinectes sapidus*) from American Coastal Waters. *Marine Biotechnology* **3**, 163–171.
- Chapman R. W., Browdy C. L., Savin S., Prior S. & Wenner E. (2004) Sampling and evaluation of white spot syndrome virus in commercially important Atlantic penaeid shrimp stocks. *Diseases of Aquatic Organisms* **59**, 179–185.
- Chou H. Y., Huang C. Y., Wang C. H., Chiang H. C. & Lo C. F. (1995) Pathogenicity of a baculovirus infection causing White spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. *Diseases of Aquatic Organisms* **23**, 165–173
- Costa, S.W. (2010) Aquicultura no Estado de Santa Catarina: situação e perspectivas. *Revista da ABCC*, **12**, 49-50.
- de la Peña, L.D.; Lavilla-Pitogo, C.R.; Villar, C.B.; Paner, M.G.; Sombito, C.D.; Capulos, G.C. (2007) Prevalence of white spot syndrome virus (WSSV) in wild shrimp *Penaeus monodon* in the Philippines. *Diseases of Aquatic Organisms* **77**, 175-179.
- Deng, D.; Zhang, Q.W.; Wang, W.J.; Liu, P.; Meng, X.H.; Kong, J.; Kong X.Y. (2005) Investigation on status carrying WSSV in several spawning ground populations of *Fenneropenaeus chinensis*, *Journal of Fisheries of China* **29**, 74-78.
- Durand, S.V., Tang, K.F.J., Lightner, D.V. (2000) Frozen commodity shrimp: potential avenue for introduction of white spot syndrome virus (WSSV) and yellow head virus (YHV). *Journal of Aquatic Animal Health* **12**, 128-135.
- Flegel, T. W. (2009) Review of disease transmission risks from prawn products exported for human consumption. *Aquaculture* **290**, 179-189.
- Fracalossi D. M., Lemos, L.F., Yasumaru, F.A., Neto, F. M. O., Kitagima, R.E. & Moro, G.V. (2009) Aquaculture in Santa Catarina State, Southern Brazil. *World Aquaculture* **40**, 41-46.
- Hameed, A.S.; Balasubramanian, G.; Musthaq, S.S.; Yoganandhan, K. (2003) Experimental infection of twenty species of Indian marine crabs with white spot syndrome virus (WSSV). *Diseases of Aquatic Organisms* **57**, 157-161.
- He J.G., Chen Y.G., Deng M., Yao P., Zhou H.M., Weng S.P., Jiang S.G., Long Q.X. & Chan, S.-M. (2003) Natural host range and pathogenicity of white spot syndrome virus infection in shrimp and crab species in China. In: *Proceedings of the Third World Fisheries Congress: Feeding the World*

- with Fish in the Next Millennium—the Balance between Production and Environment.* (Ed. by B. Phillips, B.A. Megrcy & Y. Zhou), pp. 195–203. Symposium vol. 38, American Fisheries Society, Bethesda, Maryland, USA.
- Hill, B. (2002) National and international impacts of white spot disease of shrimp. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* **2**, 58-65.
- Kanchanaphum P., Wongteerasupaya C., Sitidilokratana N., Boonsaeng V., Panyim S., Tassanakajon A., Withyachurnnarnk B. & Flege1, T. W. (1998) Experimental transmission of White Spot Syndrome Virus (WSSV) from crabs to shrimp *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms* **34**, 1-7.
- Lightner D.V. (Ed.) (1996) *Handbook of Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Penaeid Shrimp*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, USA. . 304 p
- Lightner, D.V., Redman, R.M., Nunan, L.N., Mohney, L.L., Mari, J.L. & Poulos, B.T. (1997) Occurrence of WSSV, YHV and TSV in Texas shrimp farms in 1995: Possible mechanisms for introduction. In: *World Aquaculture '97 Book of Abstracts*, pp. 288. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA.
- Lightner, DV. (2003) The penaeid shrimp viral pandemics due to IHHNV, WSSV, TSV and YHV: History in the Americas and Current Status. In: *Proceedings of 32nd UJNR Aquaculture Panel Symposium. Aquaculture and Pathobiology of Crustacean and Other Species.* pp. 1-20. Davis and Santa Barbara, California, USA.
- Lo, C. F., Lei, 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. (1996a) Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimps using polymerase chain reaction. *Diseases of Aquatic Organisms* **25**, 133-141.
- Lo, C.F., Ho, C.H., Peng, S.E., Chen, C.H., Hsu, H.C., Chiu, Y.L., Chang, C.F., Liu, K.F., Su, M.S., Wang, C.H., Kou, G.H. (1996b) White spot syndrome baculovirus WSBV detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods. *Diseases of Aquatic Organisms* **27**, 215–225.
- Lo C.F., Ho C.H., Chen C.H., Liu K.F., Chiu Y.L., Yeh P.Y., Peng, S.E., Hsu H.C., Liu H.C., Chang C.F., Su M.S., Wang C.H. & Kou G.H. (1997) Detection and tissue tropism of white spot syndrome baculovirus (WSBV) in captured brooders of *Penaeus monodon* with a special emphasis on reproductive organs. *Diseases of Aquatic Organisms* **30**, 53-72.
- López-Félix, SC. (2002) *Determinación y evaluación por PCR, de la presencia del virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV), en unidades de producción camaronícola del estado de Sinaloa*. Dissertación (Maestría) -

Centro de Investigación em Alimentación y Desarrollo, Mazatlán, Sinaloa, México.

- Marques J.S. (2008) *Contribuição para o monitoramento do vírus da Síndrome da Mancha Branca na carcinicultura de Santa Catarina*. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.
- Meng X.H., Jang I.K., Seo H.C. & Cho, Y.R. (2009) White spot syndrome virus quantification in blue crab *Portunus trituberculatus* hatchery-produced larvae and wild populations by TaqMan real-time PCR, with an emphasis on the relationship between viral infection and crab health. *Aquaculture* **291**, 18-22.
- Mijangos-Alquisires Z., Quintero-Arredondo N., Castro-Longorita R., Grijalva-Chon J.M. & Ramos-Paredes J. (2006) White spot syndrome virus (WSSV) in *Litopenaeus vannamei* captured from the Gulf of California near an area of extensive aquaculture activity. *Diseases of Aquatic Organisms* **71**, 87-90.
- Mohan C. V., Corsin F., Thakur P. C., Padiyar P. A., Madhusudan M., Turnbull J. F., Hao N. V. & Morgan K. L. (2002) Usefulness of dead shrimp specimens in studying the epidemiology of white spot syndrome virus (WSSV) and chronic bacterial infection. *Diseases of Aquatic Organisms* **50**, 1-8.
- Po, Y.& He, J.G. (2003) Study on host in winter of shrimp White spot syndrome baculovirus. *Marine Environmental Science* **22**, 48-52.
- Quang N.D., Hoa P. T. P., Da T. T. & Anh P. H.(2009) Persistence of white spot syndrome virus in shrimp ponds and surrounding areas after an outbreak. *Environmental Monitoring and Assessment* **156**, 69-72.
- Seiffert W., Costa S. W. & Maggioni, D. (2005) A mancha branca em Santa Catarina. *Revista Panorama da Aquicultura* **15**, 51-53.
- Souza, T. M. (2008). *Dectecção do vírus da mancha branca (wsv) em Litopenaeus vannamei por métodos de diagnóstico moleculares : hibridização in situ e PCT em tempo real*. 46 f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.
- Supamattaya K., Hoffmann R.W., Boonyaratpalin S. & Kanchanaphum P. (1998) Experimental transmission of white spot syndrome virus (WSSV) from black tiger shrimp *Penaeus monodon* to the sand crab *Portunus pelagicus*, mud crab *Scylla serrata* and krill *Acetes* sp. *Diseases of Aquatic Organisms* **32**, 79-85.

- Vaseeharan, B., Jayakumar, R. & Ramasamy, P. (2003) PCR-based detection of white spot syndrome virus in cultured and captured crustaceans in India. *Letters in Applied Microbiology* **37**, 443-447.
- Wongteerasupaya C., Vickers J.E., Sriurairatana S., Nash G.L., Akarajamorn A., Boonsaeng V., Panyim S., Tassanakajon A., Withyachumnarnkul B. & Flegel T.W. (1995) A non-occluded, systemic baculovirus that occurs in cells of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in the black tiger prawn *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms* **21**, 69-77.

## CAPITULO IV

**VÍRUS DA SÍNDROME DA MANCHA BRANCA (WSSV) EM  
CAMARÕES PENEÍDEOS E SIRIS NO COMPLEXO LAGUNAR  
SUL DE SANTA CATARINA, BRASIL**

**Sérgio Winckler da Costa<sup>1</sup>, Ana Paula de Medeiros Fraga<sup>2</sup>,  
Albertino de Souza Zamparetti<sup>1</sup>, Edemar Roberto Andreatta<sup>3</sup>,  
Maria Risoleta Freire Marques<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina  
– EPAGRI

<sup>2</sup> Departamento de Bioquímica, CCB e <sup>3</sup> Departamento de Aquicultura,  
CCA, Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC.

Artigo formatado de acordo com as normas da revista **Arquivo  
Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**

**ABSTRACT**

The presence of WSSV in the main species of shrimps, blue crabs, and burrowing crabs of five lagoons where shrimp farm effluents are discharged into that receive the effluents the disease affected farms was

analyzed by nested PCR and the infection in the shrimps for histopathology. The nested PCR analysis indicated the presence of WSSV in 13 of 16 (81,25%) samples of shrimps *Farfantepenaeus paulensis*, in 13 of 14 (92,85%) of *Litopenaeus schmitti*, in 1 of 2 of *F. brasiliensis* (50%), in 13 de 15 (86,6%) of blue crabs *Callinectes danae*, 11/12 (91,6%) and of *C. sapidus* and it was not detected in the burrowing crab *Chasmagnathus granulata* in 10 samples. The inclusions of WSSV were observed 3 samples of 50 (6,0%) in the gastric and cuticular epithelium and in the gills of 2 exemplary of *F. paulensis* and 1 of *L. schmitti*. The presence of WSSV in wild shrimp *L. schmitti* and in the blue crab *C. danae* is related for the first time in the present work. The results indicate that the main species of shrimps and blue crabs of the environments surrounding the farms were infected by WSSV has been considered potential vectors of the virus.

**Keywords:** WSSV, *Farfantepenaeus paulensis*, *F. brasiliensis*, *Litopenaeus schmitti*, *Callinectes sapidus*, *C. danae*, *Chasmagnathus granulata*

## RESUMO

A presença do WSSV nas principais espécies de camarões, siris e caranguejo de cinco lagoas que recebem o efluente de fazendas afetadas pela enfermidade foi analisada por *nested* PCR e a infecção nos

camarões por histopatologia. A análise de *nested* PCR indicou a presença de WSSV em 13 de 16 (81,25%) amostras de camarões *Farfantepenaeus paulensis*, em 13 de 14 (92,85%) de *Litopenaeus schmitti*, em um de dois (50%) de *F. brasiliensis*, em 13 de 15 (86,6%) de siri *Callinectes danae*, em 11 de 12 (91,6%) de *C. sapidus* e não foi detectada no caranguejo *Chasmagnathus granulata* em 10 amostras. As inclusões de WSSV foram observadas três amostras de 50 (6,0%) no epitélio gástrico e cuticular e nas brânquias de dois exemplares de *F. paulensis* e Um de *L. schmitti*. É o primeiro relato da presença de WSSV em camarões *L. schmitti* e no siri *C. danae* silvestres. As principais espécies de camarões e siris dos ambientes de entorno das fazendas foram contaminadas pelo WSSV, constituindo-se em vetores potenciais do vírus.

**Palavras-chave:** WSSV, *Farfantepenaeus paulensis*, *F. brasiliensis*, *Litopenaeus schmitti*, *Callinectes sapidus*, *C. danae*, *Chasmagnathus granulata*

## INTRODUÇÃO

O vírus da mancha branca (WSSV) é um patógeno que tem devastado a indústria do cultivo de camarões em vários países (Lightner et al., 1998)

e atualmente é considerado o mais sério patógeno viral de camarões no mundo (Flegel, 2009).

No Brasil, o primeiro registro de WSSV ocorreu no ano de 2005, em cultivos de *L. vannamei* do Estado de Santa Catarina (Seiffert et al., 2005). A enfermidade provocou a queda de mais de 90% na produção de camarões do estado, passando de 4.189 t no ano de 2004 para 172 t no ano de 2009 (Costa, 2010), afetando a maioria das fazendas.

WSSV tem sido detectado em uma larga gama de crustáceos silvestres, incluindo camarões peneídeos e não peneídeos, caranguejos, lagostas, e outros artrópodos, como copépodos e insetos (Lo et al., 1996<sup>a</sup>, b). A descarga de água dos cultivos de camarões tem sido apontada como responsável pela contaminação das populações naturais de decápodes e outros organismos suscetíveis (Lo, et al., 1996b) e pela alta prevalência de WSSV em organismos selvagens (Meng et al., 2009; de la Peña et al. 2007).

Informações sobre os hospedeiros de WSSV no ambiente natural e os riscos que os mesmos possam trazer são de grande importância para a prevenção de infecções pelos criadores de camarões (Chakraborty, 2002).

A principal região produtora de camarões de Santa Catarina está localizada no entorno do Complexo Lagunar Sul, composto por Cinco lagoas de água salobra, onde existe uma importante pesca de camarões sub adultos e também de siri (Governo do Estado de Santa Catarina, 2002). Outra espécie de crustáceo encontrada em abundância neste ecossistema é o caranguejo “gatanhão” *Chasmagnathus granulata*, bastante presente nas fazendas de camarões (Marques, 2008).

Com o presente estudo busca-se avaliar a presença de WSSV através de *nested* PCR nos estoques naturais das principais espécies de camarões, siris e caranguejo no Complexo Lagunar Sul, em áreas próximas às fazendas afetadas pela enfermidade da mancha branca. Pretende-se também obter informações sobre a possível infecção por WSSV nos camarões silvestres, através de estudo histopatológico.

## MATERIAL E MÉTODOS

A área de estudo está inserida na região do Complexo Lagunar Sul de Santa Catarina, abrangendo os Municípios de Laguna, Imaruí e Jaguaruna, onde estão instaladas 92 das 106 fazendas de cultivo de camarões do Estado, com área de viveiros de 1.207 ha. Foram selecionados cinco pontos de amostragens localizados nas cinco lagoas de água salobra onde são liberados os efluentes dos cultivos, sendo:

ponto 1 - Lagoa de Imaruí (lat 28° 19' 6" S , long 48° 52' 12" W); ponto 2 – Lagoa do Ribeirão (lat 28° 29' 29" S, long 48° 53' 0" W); ponto 3 – Lagoa de Santo Antônio (lat 28° 31' 14,6" S , long 48° 46' 32,47" W); ponto 4 – Lagoa de Santa Marta (lat 28° 32' 55" S , long 48° 48' 47" W) e ponto 5 – Lagoa do Camacho (lat 28° 36' 24" S , long 48° 51' 48" W) (Figura 1).

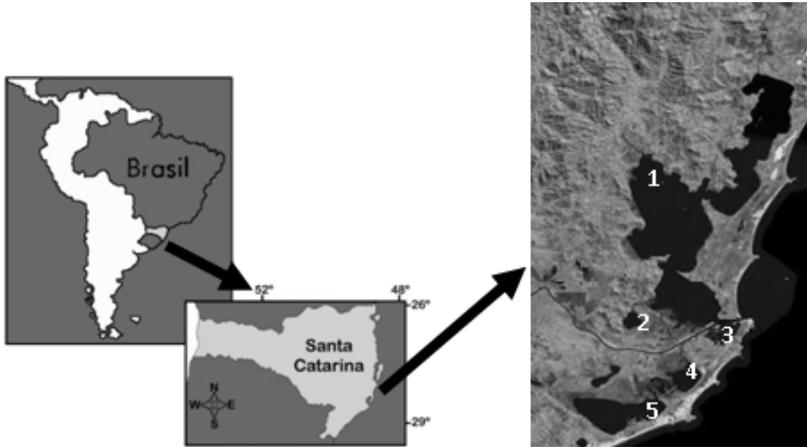


Figura 1. Localização dos pontos de amostragem no Complexo Lagunar Sul de Santa Catarina. 1 – Lagoa de Imaruí; 2 – Lagoa do Ribeirão; 3 – Lagoa de Santo Antônio; 4 – Lagoa de Santa Marta; 5 – Lagoa do Camacho.

As coletas ocorreram no período de maio/junho 2008, após a safra de camarões (dezembro 2007 a março 2008). Em cada lagoa foram coletados exemplares das espécies de camarões nativos *Farfantepenaeus paulensis* (Perez Farfante, 1967), *F. brasiliensis* (Latreille, 1817) e *Litopenaeus schmitti* (Burkenroad, 1936), das espécies de siri *Calinectes danae* (Smitt, 1869) e *C. sapidus* (Rathbun, 1896) e do caranguejo *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851). As espécies de siri e caranguejo foram identificadas através das características descritas em Mello (1996) e as espécies de camarões através de Pérez-Farfante (1969).

Os camarões foram coletados através de tarrafas e os caranguejos e siris através de armadilhas tipo covos. Para cada ponto foram obtidas amostras de pleópodos nos camarões, brânquias e patas em siris e caranguejos, para análise de PCR, imediatamente fixadas em etanol 95% e colocadas em frascos de vidro, na proporção de 1:10. Para análise de

histopatológica foram capturados camarões vivos de tamanho variado, nos quais foi injetado solução de Davidson (Lightner, 1996). Logo após o camarão foi colocado em frasco com solução de Davidson, permanecendo por 24 horas, passando para uma solução de etanol 70%, substituído por outro etanol 70% após 24 horas.

Os dados relativos às fazendas afetadas pela mancha branca no período amostral, o local de liberação dos efluentes nas lagoas, as áreas em operação e quantidade de pós larvas povoadas foram obtidos junto aos órgãos responsáveis pela extensão e defesa sanitária do estado, laboratórios fornecedores de pós – larvas e diretamente com os produtores.

Foram preparadas lâminas histológicas de acordo com procedimento descrito por Lightner (1996), onde as amostras fixadas em Davidson foram desidratadas, incluídas em parafina e seccionadas em micrótomo (EP-31-20091, EasyPath) na espessura de 3-5  $\mu\text{m}$ , coletadas em lâminas e posteriormente coradas em Hematoxilina e Eosina (HE). As lâminas foram fotografadas (dsc-w 120, Sony) e examinadas em microscópio óptico (Biocular, Bioval) para observação da presença de núcleos hipertróficos com inclusões centrais basófilas cercadas por cromatina marginal em tecidos de origem ectodérmica e mesodérmica (Wongteerasupaya, Vickers, Sriurairatana, Nash, Akarajamorn, Boonsaeng, Panyim, Tassanakajon, Withyachumnarnkul e Flegel, 1995). Em estágios iniciais, a inclusão pode ser eosinófila com um espaço hialino entre a inclusão e a parede nuclear, conhecido como inclusões Cowdry tipo A. Os tecidos mais utilizados para observação do WSSV foram o sub-cuticular do estômago e do cefalotórax e as brânquias.

A extração de DNA genômico foi realizada a partir de amostras compostas por um pool de tecidos (brânquias, pleópodos ou patas) de cinco animais, utilizando-se protocolo descrito em Marques (2008). A integridade das amostras foi avaliada pelo seu perfil eletroforético em gel de agarose 1%. A concentração de DNA foi determinada através da razão da absorbância em 260/280 nm.

A detecção do vírus da mancha branca foi realizada através da amplificação de um fragmento do genoma viral através da Reação em Cadeia da Polimerase em dois passos, *nested* PCR, utilizando-se dois pares de iniciadores WS146F1/WS146R1 (externos) e WS146F2/WS146R2 (internos) descritos por Lo et al., (1996a) e recomendados pela OIE. Na primeira etapa, o tamanho do fragmento esperado é de 1447 pb e na segunda etapa o tamanho do fragmento é de 941 pb. Como controle positivo foi utilizado uma amostra de DNA

extraída de pleópodo de *L. vannamei*, cujo resultado foi positivo para a presença de uma seqüência gênômica do WSSV e como controle negativo foi utilizado uma amostra sem DNA molde. A análise dos produtos de PCR foi realizada através de eletroforese em gel de agarose 2% e o resultado foto documentado em câmara digital.

## RESULTADOS

A análise dos produtos da *nested* PCR por eletroforese em gel de agarose revelou a presença de uma única banda equivalente ao tamanho esperado de 941 pb, correspondente a amplificação de um fragmento específico do genoma de WSSV, utilizando os indicadores descritos (Figuras 2 e 3). A presença deste fragmento foi observada em 59 das 118 amostras analisadas. Os resultados positivos para o WSSV obtidos em patas de siri (08/27) foram inferiores aos encontrados nas brânquias deste organismo (24/27), optando-se por utilizar somente os resultados das análises nas brânquias no presente trabalho.

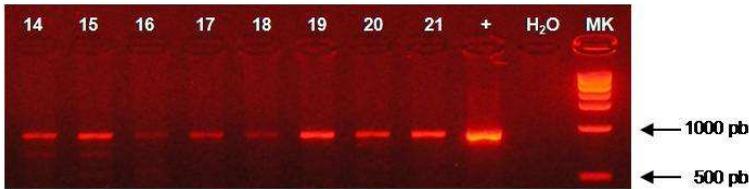


Fig. 2. Gel de agarose (2%) dos produtos amplificados por PCR de amostras de camarões 14 – 15 – amostras positivas WSSV, *P. schmitti* L. Santo Antônio; 16 -18 – amostra positiva WSSV *F. paulensis* L. Camacho; 19 – 21 - amostras positivas WSSV *F. paulensis* L. Santa Marta; MK: Marcador 1 Kb Marca Biolabs; + : controle positivo 941pb = positivo para WSSV

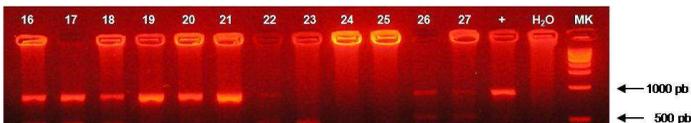


Figura 3. Gel de agarose (2%) dos produtos amplificados por PCR de amostras de siris 16 – 18 – amostras positivas WSSV, *C. danae*, L. Santa Marta; 19 -21 – amostras positivas WSSV *C. sapidus*, L. Santa Marta; 22 - amostra positivas WSSV *C. danae*, L. Imaruí; 23 – 25 - - amostras negativas WSSV *C. danae*, L. Imaruí; - 26 -27 – amostras positivas WSSV *C. sapidus*, L. Imaruí; MK: Marcador 1 Kb Marca Biolabs; + : controle positivo 941 pb = positivo para WSSV.

A presença de WSSV, através da análise de *nested* PCR, foi detectada em 13 de 16 (81,25%) amostras de *F. paulensis*, em 13 de 14 (92,85%) de *L. schmitti*, em um de dois de *F. brasiliensis* (50%), 13 de 15 (86,6%) de *C. danae*, 11 de 12 (91,6%) de *C. sapidus* e não foi detectada em *C. granulata* em 10 amostras (Tabela 1).

Na análise histopatológica foram observadas inclusões correspondentes ao WSSV no epitélio gástrico, no epitélio cuticular e nas brânquias em três das 50 amostras (6,0 %) analisadas (Figura 4), todas provenientes da Lagoa de Imaruí, em dois exemplares de *F. paulensis* e um de *L. schmitti*.

No período anterior a coleta 15 fazendas realizaram cultivo no entorno das lagoas, das quais 14 apresentaram mortalidades pela mancha branca, com um total de 14.905 milhões de pós larvas povoadas, em uma área de 172 ha (Tabela 2).

## DISCUSSÃO

A presença do WSSV foi verificada em três espécies de camarões peneídeos (*L. schmitti*, *F. paulensis* e *F. brasiliensis*) e em duas espécies de siri azul (*C. danae* e *C. sapidus*) silvestres em lagoas que receberam efluentes de fazendas de camarões que tiveram surtos da enfermidade da mancha branca a partir do ano de 2005.

A presença de WSSV em crustáceos silvestres tem sido relatada em vários estudos em diferentes locais (Lo *et al.*, 1996b; Chen *et al.* 2000; He *et al.*, 2003; Chapman *et al.*, 2004; Mijangos-Alquisires *et al.*, 2006; Pradeep *et al.*, 2008; Jang *et al.* 2009; Meng *et al.*, 2009). Recentemente, foi relatado o diagnóstico de WSSV por *nested* PCR e PCR real time em camarões *Artemesia longinaris*, caranguejo *Cyrtograpsus angulatus* e no paleomonídeo *Palaemon macrodactylus* silvestres capturados na costa da Argentina, (Martorelli *et al.*, 2010).

Tabela 1. Resultados de PCR (*nested*) positivas para WSSV pelo número total de amostras (*pools*), por espécie em cada Lagoa. WT é o peso total médio, em

gramas, LT o comprimento total médio, em centímetros e n o número de organismos coletados.

LAGOAS	ESPÉCIES	PCR	BIOMETRIA	
			WT(g) – LT (cm)	n
IMARUI	<i>Farfantepenaeus paulensis</i>	0/3	WT – 4,9	54
	<i>Litopenaeus schimitti</i>	2/3	WT – 7,82	100
	<i>F. brasiliensis</i>	-	-	-
	<i>Calinectes danae</i>	1/3	LT – 10,82	50
	<i>C. sapidus</i>	3/3	LT – 12,28	60
	<i>Chasmagnatus granulata</i>	0/2	WT – 12,30	80
SANTO ANTONIO	<i>F. paulensis</i>	4/4	WT – 4,46	100
	<i>L. schimitti</i>	5/5	WT – 6,2	100
	<i>F. brasiliensis</i>	-	-	-
	<i>C. danae</i>	3/3	LT – 7,6	167
	<i>C. sapidus</i>	3/3	LT – 8,28	50
	<i>C. granulata</i>	0/2	WT – 10,20	63
SANTA MARTA	<i>F. paulensis</i>	3/3	WT – 6,58	100
	<i>L. schimitti</i>	3/3	WT – 3,72	100
	<i>F. brasiliensis</i>	1/2	WT – 3,78	8
	<i>C. danae</i>	3/3	LT – 7,9	100
	<i>C. sapidus</i>	3/3	LT – 9,12	100
	<i>C. granulata</i>	0/2	WT – 11,30	110
CAMACHO	<i>F. paulensis</i>	3/3	WT – 7,2	150
	<i>L. schimitti</i>	-	-	-
	<i>F. brasiliensis</i>	-	-	-
	<i>C. danae</i>	3/3	LT – 8,82	50
	<i>C. sapidus</i>	2/3	LT – 11,84	75
	<i>C. granulata</i>	0/2	WT – 10,5	100
RIBEIRÃO	<i>F. paulensis</i>	3/3	WT – 6,4	100
	<i>L. schimitti</i>	3/3	WT – 4,5	100
	<i>F. brasiliensis</i>	-	-	-
	<i>C. danae</i>	3/3	LT – 7,32	50
	<i>C. sapidus</i>	-	-	-
	<i>C. granulata</i>	0/2	WT – 12,3	45

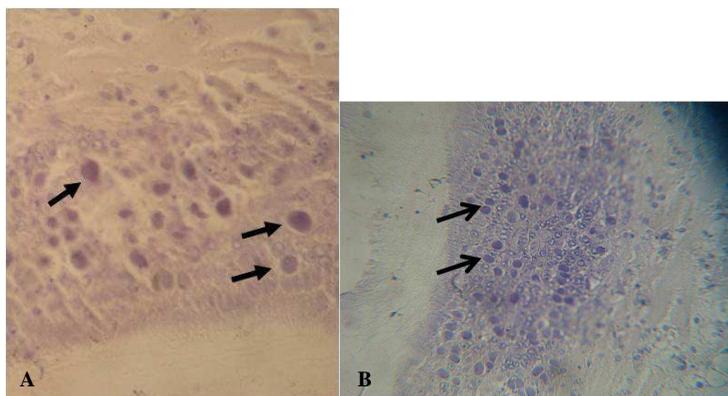


Figura 4. Epitélio cuticular (A) e epitélio gástrico (B) do camarão *Farfantepenaeus paulensis* de amostra da Lagoa de Imaruí (100 X) com inclusões centrais em núcleos hipertróxicos características de WSSV.

Tabela 2. Área de viveiros (ha), quantidade de pós larvas (pls x 10<sup>3</sup>) e número de fazendas com surtos de WSSV por lagoa, na safra anterior a coleta.

Safra	Lagoa	Área viv.		
		(ha)	Pls.10 <sup>3</sup>	n faz
dez-mar/08	Ribeirão	35,2	4.340	1
	Camacho	0	0	0
	Sto Antonio	70,4	6.495	6
	Imarui	66,56	4.070	7
	Sta Marta	0	0	0
Total		172,13	14.905	14

A baixa presença de inclusões histopatológicas para WSSV verificadas nos camarões nativos no presente trabalho é semelhante ao observado em outros estudos. Mijangos-Alquisires et al. (2006) encontraram apenas um camarão com sinais histopatológicos entre 11 camarões *L. vannamei* silvestres positivos por PCR. Chapman et al. (2004) relatam a presença de sinais histopatológicos em apenas um exemplar entre 28 de *Penaeus setiferus* selvagem positivos por PCR. A ausência de inclusões histopatológicas em camarões positivos por nested PCR foram

relacionadas a um baixo nível de infecção nestes organismos (Mohan et al., 2002). O fato de infecções graves raramente serem vistas na natureza, em camarões e caranguejos, poderia ser decorrente da possível vulnerabilidade dos organismos doentes a predação e a rápida progressão da doença, fazendo com que somente os fracamente infectados sobrevivam (Chapman et al., 2004; Meng et al., 2009). Por outro lado, em regiões onde foram encontradas infecções de WSSV em populações de crustáceos selvagens poucas evidências do desenvolvimento da doença foram encontradas (Hill, 2000) e a ocorrência de diminuições das capturas (Flegel, 2009). Assim, outra possibilidade seria que as doenças que são de pouca ou de nenhuma importância em populações selvagens em seus habitat naturais somente se tornem epidêmicas em condições intensivas de cultivo (Brigs et al., 2004).

O diagnóstico de WSSV por nested PCR na espécie *Chasmagnathus granulata* de amostras da Lagoa de Imaruí coletadas no ano de 2006 foi relatado por Marques (2008). Amostras positivas de WSSV por nested PCR em *Farfantepenaeus paulensis* foram encontradas no Complexo Lagunar Sul no ano de 2008 e em *F. paulensis* e *F. brasiliensis* de águas oceânicas, da costa de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, nos anos de 2007 e 2009 (Cavalli, 2009).

A presença de WSSV na espécie *Callinectes sapidus* foi relatada em exemplares de canais de fazendas de cultivo no México (López-Félix, 2002), em um exemplar coletado na costa sudeste dos Estados Unidos (Browdy et al., 2006) e em 27,2 % de amostras coletadas na costa de Nova Iorque, Nova Jersey e Texas (Chang et al., 2001).

Não foram encontrados relatos anteriores de diagnóstico de WSSV para o camarão *L. schmitti* e para o siri *C. danae* capturados na natureza.

Os resultados indicam a necessidade da aplicação de medidas para evitar o ingresso de espécies silvestres de crustáceos nos cultivos e para evitar a liberação de efluentes contaminados com o vírus no ambiente natural.

## CONCLUSÃO

As principais espécies de crustáceos decápodes do Complexo Lagunar Sul foram contaminadas pelo vírus da síndrome da mancha branca (WSSV) a partir de efluentes de fazendas de camarões.

## AGRADECIMENTOS

A Financiadora de Estudos e Projetos FINEP pela disponibilidade dos recursos financeiros utilizados na pesquisa. A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária EMBRAPA pelo fornecimento de Bolsa de Doutorado para Sérgio Winckler da Costa.

## REFERÊNCIAS

BRIGGS, M.; FUNGE-SMITH, S.; SUBASINGHE, R. et al. Introductions and movement of *Penaeus vannamei* and *Penaeus stylirostris* in Asia and the Pacific. *RAP publication 2004/10*, FAO. Bangkok, 2004. 92 p.

BROWDY, C.L.; SHEPARD, E. F.; POWELL, J.W.B. Evaluation of ecological and commercial impact of white spot syndrome virus (WSSV) infections in the white shrimp, *Litopenaeus setiferus*, and the blue crab, *Callinectes sapidus*, in Southeastern United States using an aquaculture technique. Final Report aquacultur NMFS/NOAA, Grant No. NA03NMF4270090. Disponível em: [www.nmfs.noaa.gov/mb/sk/pdf/Report\\_11.pdf](http://www.nmfs.noaa.gov/mb/sk/pdf/Report_11.pdf). Acessado em: 07 jul. 2009.

CAVALLI, L. (2009) *White spot syndrome quac em camarões peneideos nativos e cultivados no estuário da Lagoa dos Patos, Sul do Brasil*. 2009, 137f. Tese (Doutorado em Oceanografia Biológica) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande.

CHAKRABORTY, A.; OTTA, S.K., JOSEPH, B. et al. Prevalence of white spot syndrome virus in wild crustaceans along the coast of India. *Current Science*, v.82, p.1392–1397, 2002.

CHANG, Y.S.; PENG, S. E.; WANG, H.C. et al. Sequencing and Amplified Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of Ribonucleotide Reductase Large Subunit Gene of the White Spot Syndrome Virus in Blue Crab (*Callinectes sapidus*) from American Coastal Waters. *Mar. Biotechnol.*, v.3, p.163–171, 2001.

CHAPMAN, R. W.; BROWDY, C. L.; SAVIN, S. et al. Sampling and evaluation of white spot syndrome virus in commercially important Atlantic penaeid shrimp stocks. *Dis. Aquat. Org.*, v.59, p.179–185, 2004.

CHEN, L.L.; LO, C.F.; CHIUL, Y.L. et al. Natural and experimental infection of white spot syndrome quac (WSSV) in benthic larvae of mud crab *Scylla serrata*. *Dis. Aquat. Org.*, v.40, p.157–161, 2000.

COSTA, S.W. Aquicultura no Estado de Santa Catarina: situação atual e perspectivas. *Revista da ABCC*, v.12, p. 49-50, 2010.

DE LA PEÑA, L.D.; LAVILLA-PITOGO, C.R.; VILLAR, C.B. et al. Prevalence of white spot syndrome virus (WSSV) in wild shrimp *Penaeus monodon* in the Philippines. *Dis. Aquat. Org.*, v.77, p.175-179, 2007.

FLEGEL, T.W. Review of disease transmission risks from prawn products exported for human consumption. *Aquaculture*, v.290, 179-189, 2009.

GOVERNO DO ESTADO DE SANTA CATARINA. Plano integrado de recursos hídricos da bacia hidrográfica do Rio Tubarão e complexo lagunar. 2002. 930p. Disponível em:

[www.aguas.sc.gov.br/sirhsc/biblioteca\\_visualizar\\_arquivos.jsp?IdEmpresa=1&IdPasta=116](http://www.aguas.sc.gov.br/sirhsc/biblioteca_visualizar_arquivos.jsp?IdEmpresa=1&IdPasta=116). Acessado em: 05 fev.2010.

HE, J.G.; CHEN, Y.G.; DENG, M. et al. Natural host range and pathogenicity of white spot syndrome virus infection in shrimp and crab species in China. In: World Fisheries Congress: Feeding the World with Fish in the Next Millennium—the Balance between Production and Environment, 3, 2003. Maryland. *Proceedings...* Maryland: 2003. P. 195–203.

HILL, B. National and international impacts of white spot disease of shrimp. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol*, v.2, p.58-65, 2002.

JANG, I.K. ; MENG, X.H. ; SEO, H. Et al. A TaqMan real-time PCR assay for quantifying white spot syndrome virus (WSSV) infections in wild broodstock and hatchery-reared postlarvae of fleshy shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. *Aquaculture*, v.287, p.40-45, 2009.

LIGHTNER, D.V. *Handbook of Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Penaeid Shrimp. USA*: World Aquaculture Society, 1996. 304 p

LIGHTNER, D.; HASSON, K.; WHITE, B. et al. Experimental infection of western hemisphere penaeid shrimps with Asian white spot syndrome virus and Asian yellow head virus. *J. Aquat. Anim. Health*, v.10, p.271–281, 1998.

LO, C. F.; LEI, J. H.; HO, C. H. et al. Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimps using polymerase chain reaction. *Dis. Aquat. Org.*, v.25, p.133-141, 1996a.

LO, C.F.; HO, C.H.; PENG, S.E. et al. White spot syndrome baculovirus WSBV detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods. *Dis. Aquat. Org.*, v.27, p.215–225, 1996b.

LÓPEZ-FÉLIX, S.C. (2002) *Determinación y evaluación por PCR, de la presencia del virus de la síndrome de la mancha blanca (WSSV), en unidades de producción camarónicola del estado de Sinaloa*. 2002. Dissertación (Maestría) – Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Mazatlán.

MARTORELLI, S.R.; OVERSTRETT, R.M.; JOVONOVICH, J.A. First report of viral pathogens WSSV and IHHNV in Argentine Crustaceans. *Bull. Mar. Sci.*, v.86, p.117-131, 2010.

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

MELLO, G.A.S. Manual de identificação dos Brachyura (caranguejos e siris) do Litoral Brasileiro. Plêiade/FAPESC. 1996, 604 p.

MENG, X.H.; JANG, I.K.; SEO, H.C. et al. White spot syndrome virus quantification in blue crab *Portunus trituberculatus* hatchery-produced larvae and wild populations by TaqMan real-time PCR, with an emphasis on the relationship between viral infection and crab health. *Aquaculture*, v.291, p.18-22, 2009.

MIJANGOS-ALQUISIRE, Z.; QUINTERO-ARREDONDO, N.; CASTRO-LONGORITA, R. et al. White spot syndrome virus (WSSV) in *Litopenaeus vannamei* captured from the Gulf of California near the area of extensive aquaculture activity. *Dis. Aquat. Org.*, v.71, p.87-90, 2006.

MOHAN, C. V.; CORSIN, F.; THAKUR, P.C. et al. Usefulness of dead shrimp specimens in studying the epidemiology of white spot syndrome virus (WSSV) and chronic bacterial infection. *Dis. Aquat. Org.*, v.50, p.1-8, 2002.

PEREZ-FARFANTE, I. Western Atlantic shrimps of the genus *Penaeus*. *Fish. Bull.*, v.67, p.462-591, 1969.

PRADEEP, B.; SHEKAR, M.; GUDKOV, N et al. Genotyping of white spot syndrome virus prevalent in shrimp farms of India. *Dis. Aquat. Org.*, v.78, p.189-198, 2008.

SEIFFERT, W.; COSTA, S. W.; MAGGIONI, D. A mancha branca em Santa Catarina. *Revista Panorama da Aquicultura*, v.15, p.51-53, 2005.

WONGTEERASUPAYA, C.; VICKERS, J.E., SRIURAIRATANA, S., et al. A non-occluded, systemic baculovirus that occurs in cells of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in the black tiger prawn *Penaeus monodon*. *Diseases Dis. Aquat. Org.*, v.21, p.69-77, 1995.

## CAPITULO V

### **RELAÇÃO ENTRE PARÂMETROS DE CULTIVO E A ENFERMIDADE DA MANCHA BRANCA EM FAZENDAS DE CAMARÕES DE SANTA CATARINA**

Sérgio Winckler da Costa<sup>1</sup>, Luiz Rodrigo Mota Vicente<sup>1</sup>, Talita Medeiros de Souza<sup>2</sup>, Edegar Roberto Andreatta<sup>2</sup> e Maria Risoleta Freire Marques<sup>2</sup>

<sup>(1)</sup> Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina – EPAGRI.

Artigo formatado de acordo com as normas da revista: **Revista  
Pesquisa Agropecuária Brasileira (PAB)**

**RESUMO** – Avaliou-se a relação entre parâmetros físico-químicos e biológicos do cultivo de camarão com a enfermidade do vírus da síndrome da mancha branca (WSSV). Foram consideradas a ocorrência de mortalidades, características físico-químicas da água e solo, exame e análise microscópica a fresco, análise microbiológica, histopatológica e molecular (PCR) para WSSV em camarões de oito fazendas de Santa Catarina, entre 2008 e 2009. A presença do WSSV foi detectada em camarões de cinco fazendas, com registros da enfermidade em ciclos anteriores. A temperatura da água foi semelhante entre fazendas com e sem WSSV, com mortalidades ocorrendo em intervalos ascendentes entre 24,6 to 29,29°C. Não foram encontradas diferenças significativas ( $P \geq 0,05$ ) entre as alterações observadas nas análises microscópicas a fresco, o tempo de coagulação e presença de vibrios na hemolinfa em camarões de viveiros com e sem WSSV. As concentrações de nitrito, sílica, fenol e alcalinidade na água e pH do solo apresentaram diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre os viveiros com e sem WSSV. Os valores de nitrito, sílica e pH do solo estiveram dentro dos limites recomendados para o cultivo de camarões, não ocorrendo o mesmo com a alcalinidade e concentração de fenol, sugerindo uma relação dos últimos com a manifestação da enfermidade da mancha branca.

**Termos para indexação:** *Litopenaeus vannamei*, fenol, alcalinidade, vírus da mancha branca,

**ABSTRACT** - We evaluated the relation among physicochemical and biological parameters in shrimp farming with the disease White spot syndrome virus (WSSV). The occurrence of mortality, physical chemical characteristics of water and soil, clinical and microscopic analysis, microbiological analysis, as well as histopathological and molecular diagnosis (PCR) were used to monitoring the white spot virus (WSSV) in ponds of eight farms in Santa Catarina, Brazil, between 2008 and 2009. The virus was detected in five farms, which had displayed the disease in previous cycles. The temperature of the water was similar among farms independently of the presence of the virus, whereas mortalities were seen during temperature elevation, in the range from 24,6 to 29,29°C. No significant differences ( $P \geq 0.05$ ) were seen regarding the hemolymph clotting time, circulating vibrios and microscopic analysis in shrimps among ponds either with or without the virus. Nitrite, silica, phenol and alkalinity as well as soil pH values presented significant differences ( $P < 0.05$ ) among the ponds affected or not by the WSSV. Nitrite, silica and pH values were within the recommended limits for shrimp cultivation, whereas the opposite was seen for the alkalinity and phenol concentration, suggesting a relation of the latter with the manifestation of the white spot disease

**Index terms:** *Litopenaeus vannamei*, phenol, alkalinity, white spot syndrome virus (WSSV)

## INTRODUÇÃO

Enfermidades virais têm provocado sérios impactos econômicos nos cultivos de camarões peneídeos nos principais países produtores, destacando-se entre elas a doença da mancha branca, causada pelo vírus da síndrome da mancha branca (WSSV) (Lightner, 2005).

O primeiro registro da enfermidade da mancha branca no Oceano Atlântico ocorreu no ano de 2005, em fazendas do Estado de Santa Catarina, sul do Brasil (Seiffert et al., 2005). Assim como relatado para outros países, os efeitos da enfermidade nesta região foram desastrosos, provocando uma queda de aproximadamente de 95% na produção, passando de 4.189 t no ano de 2004 para 172 t no ano de 2009 (Costa, 2010).

Alterações na qualidade física e química da água dos viveiros de cultivo podem ocasionar stress e alteração no estado imunológico dos camarões, tornando-os suscetíveis ao ataque de patógenos (Kautsky, 2000).

Uma das principais características da enfermidade da mancha branca é a replicação viral mediante condições estressantes (Lo, et al, 2005). Fatores como a temperatura da água, salinidade, oxigênio dissolvido, amônia, ph e toxinas derivadas de pesticidas tem sido associados com mortalidades massivas devido ao WSSV (Fegan e Clifford, 2001).

Poucos estudos foram realizados para buscar uma associação entre parâmetros físico-químicos e biológicos e a manifestação da mancha branca em camarões cultivados. Corsin et al. (2001) apontaram a localização das fazendas, o peso médio dos camarões no primeiro mês de cultivo, as datas de povoamento e o uso de rações comerciais como fatores de risco para infecção por WSSV em camarões cultivados em arrozais no Vietnã. Peinado-Guevara e Lopez-Meyer (2006) relacionaram a alteração de parâmetros de cultivo devido a um período de fortes chuvas com a ocorrência de mortalidades pelo WSSV em viveiros de camarão no México.

Diante do grande impacto causado pelo vírus da mancha branca na criação de camarões de Santa Catarina, o presente trabalho buscou-se avaliar a relação entre a enfermidade e parâmetros físico-químicos e biológicos de cultivos de camarões do estado.

## MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado em dois viveiros de oito fazendas de camarões, seis no ano de 2008, cinco localizadas no Município de Laguna (B, C, E,

F e G) e uma no Município de Biguaçu (A) e duas no ano de 2009, localizadas no Município de Laguna (D e G) (Tabela 1).

Tabela 1. Localização das fazendas, área dos viveiros (viv.), data de povoamento, ocorrência de mortalidades anteriores por WSSV (S) e densidade de camarões por viveiro.

<b>Fazenda Viv</b>	<b>Município</b>	<b>Coordenadas</b>	<b>Área (ha)</b>	<b>Data Pov.</b>	<b>Mort. WSSV</b>	<b>Dens. cam/m<sup>2</sup></b>
A V1	Biguaçu	27° 24' 56,4" S	3,2	24/01/08	-	15,0
V3		48° 36' 22" W	3,7	24/01/08	-	15,0
B V1	Laguna	28° 35' 24,5" S	4,5	18/12/07	-	11,0
V2		48° 50' 15,1" W	4,9	18/12/07	-	10,0
C V2	Laguna	28° 31' 26,3" S	3,5	05/02/08	S	9,4
V7		48° 47' 48,3" W	3,5	05/02/08	S	9,4
D V2	Laguna	28° 29,7' 48" S	5,0	11/02/09	S	8,0
2009 V3		48° 47' 54,5" W	4,6	11/02/09	S	8,6
E V2	Laguna	28° 21' 44,8" S	4,0	18/12/07	S	3,8
V3		48° 53' 21,5" W	3,5	18/12/07	S	5,7
F V1	Laguna	28° 21' 47" S	3,4	18/12/07	S	8,9
V2		48° 53' 18,5" W	3,1	18/12/07	S	4,8
G V2	Laguna	28° 31' 31,2" S	2,5	11/01/08	S	18,0
2008 V3		48° 46' 58,2" W	1,9	11/01/08	S	15,8
G V1	Laguna	28° 31' 31,2" S	2,4	08/12/08	S	7,9
2009 V2		48° 46' 58,2" W	2,5	08/12/08	S	8,0

Não foram verificadas mortalidades ou diagnósticos pela mancha branca em ciclos anteriores na fazenda A e na fazenda B nos cultivos dos anos de 2006 e 2007. Na fazenda C foram observadas mortalidades no ano de 2006, não ocorrendo cultivo em 2007. Na fazenda D ocorreram mortalidades no ano de 2005, não sendo realizados cultivos em 2006 e 2007 e 2008. Nas fazendas E e F ocorreram mortalidades nos anos 2004, 2005, não sendo realizados cultivos no ano de 2006 e observando-se mortalidade no cultivo realizado no ano de 2007. A Fazenda G apresentou mortalidades nos anos de 2005, 2006 e 2007. No ano de 2008 as fazendas foram povoadas com pós larvas de três origens, a fazenda A utilizou pós larvas de banco de reprodutores cultivado, as fazendas B, E e F pós larvas produzidas a partir de náuplios do nordeste, as fazendas C e G pós larvas de camarões sobreviventes a mortalidades

por WSSV. No ano de 2009 as fazendas D e G povoaram com as mesmas pós larvas produzidas a partir de camarões sobreviventes.

Os cultivos foram monitorados desde o povoamento até a despesca, registrando-se a quantidade de pós larvas povoadas, peso dos camarões na colheita e biomassa final, para posterior cálculo da sobrevivência em cada viveiro. No caso de ocorrência de eventos de alta mortalidade foram obtidas informações sobre o peso dos camarões e tempo de cultivo.

Semanalmente foram coletados entre seis a 10 camarões por viveiro com auxílio de tarrafa, sendo o número de coletas por viveiro dependeu do tempo de cultivo. No momento da coleta, na fazenda, foi realizado o exame clínico dos camarões através da observação de alterações na coloração da carapaça, dos apêndices (pereiópodos, pleópodos, urópodos e antenas) e brânquias, deformidades no rostro, abdômen e apêndices, repleção intestinal, registrando as informações em planilha de amostragem (Cuéllar-Anjel, 2008). Em seguida, os camarões foram colocados em sacos plásticos com água e oxigênio, para transporte vivo até o Laboratório de Diagnóstico para Aqüicultura (LADA), da Epagri, na Cidade de Tubarão. No laboratório, com os camarões vivos, efetuou-se o cálculo do tempo de coagulação da hemolinfa (TCH) em segundos, a partir de amostras de hemolinfa retiradas com seringa de 1mL introduzida na parte ventral do camarão, entre o cefalotórax e o primeiro somito abdominal e espalhadas em lâmina histológica (Aguirre-Guzmán e Sánchez Martínez., 2005), realizando-se um total de 96 análises.

A quantificação de víbrios em amostras individuais da hemolinfa (entre 0,1 a 0,3 mL) de seis camarões por viveiro, sete amostras por fazenda, foram coletadas em câmara de fluxo laminar. A hemolinfa de cada camarão foi semeada em uma placa contendo meio de cultura tiosulfato citrato bile sacarose (TCBS) com posterior incubação em estufa por 24 h à temperatura de 35 °C (Cuéllar-Anjel, 2008). Após o período de incubação foi observado e registrado o número de placas com crescimento de colônias de víbrios em cada amostra por viveiro e os resultados expressos em percentual do total analisado.

Utilizando-se as mesmas amostras de camarões, procedeu-se a análise a fresco através da montagem de lâminas e observação direta de tecidos em microscópio óptico (Lightner, 1996; Aguirre-Guzmán e Sánchez-Martínez, 2005). Observou-se a presença de epicomensais nos pleópodos, pereiópodos e brânquias e avaliou-se o grau de estresse a partir da observação da coloração dos apêndices e expansão dos cromatóforos. Posteriormente, fez-se a dissecação dos camarões para

exame do hepatopâncreas (deformidades e quantidade de lipídios) e análise do conteúdo intestinal (presença de gregarinas, cianobactérias e restos de outros camarões (canibalismo)). Para cada item estudado foi estabelecido um valor numérico do grau de severidade em uma escala de 0 a 4 seguindo critérios descritos por Lightner (1996) e Cuéllar-Anjel (2008) e os resultados foram expressos em percentual de camarões de cada amostra por grau de severidade.

Para a realização de análise histopatológica foram capturados camarões vivos, de tamanhos variados, nos quais foi injetada solução de Davidson, onde foram mantidos por 24 horas. Em seguida, foram transferidos para uma solução de etanol 70%, a qual foi substituída por outra idêntica, após 24 horas. Foram preparadas lâminas histológicas de acordo com procedimento descrito por Lightner (1996), onde as amostras fixadas em Davidson foram desidratadas, incluídas em parafina e seccionadas em micrótomo (EP-31-20091, EasyPath) na espessura de 3-5  $\mu\text{m}$ , coletadas em lâminas e posteriormente coradas em Hematoxilina e Eosina (HE). As lâminas foram fotografadas (dsc-w 120, Sony) e examinadas em microscópio óptico (Biocular, Bioval) para observação da presença de núcleos hipertróficos com inclusões centrais basófilas, cercadas por cromatina marginal em tecidos de origem ectodérmica e mesodérmica características de infecção por WSSV (Wongteerasupaya et al., 1995). Foram examinadas duas lâminas por camarão, num total de 197 camarões analisados, com variações no número de animais por viveiro. Os resultados foram expressos em número camarões com diagnóstico positivo em relação ao total de camarões examinados por viveiro.

A detecção do WSSV foi realizada através da análise de PCR em amostras de pós larvas coletadas no momento do povoamento e amostras de camarões capturados com auxílio de tarrafa, quando ocorriam elevadas mortalidades ou na despesca de cada viveiro. Cada amostra foi composta por 150 exemplares, constituídas de pós larvas inteiras ou pleópodos retirados dos camarões, fixados em etanol 95% e armazenados em frascos plásticos de 200 mL na proporção de 1:10. As análises de PCR foram realizadas no Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica (LABCAI), UFSC. Para a extração do DNA genômico foi utilizado o protocolo de Souza (2008), a partir de um *pool* de tecidos (pós larvas ou pleópodos) de cinco animais da amostra inicial. Foram realizadas duas análises por amostra de cada viveiro para pós larvas e de duas a quatro para camarões de uma única amostra, sendo que para as fazendas C e G ano 2008 foram realizadas

análises em quatro amostras por viveiro, totalizando 16 análises para pós larvas e 77 para camarões.

A detecção do WSSV foi realizada a partir da amplificação de um fragmento do genoma viral através da Reação em Cadeia da Polimerase em dois passos, *nested* PCR, em termociclador de 96 poços (TGradient, Biometra, Goettingen, DE), utilizando-se dois pares de iniciadores WS146F1/WS146R1 (externos) e WS146F2/WS146R2 (internos) descritos por Lo, (1996) e recomendados pela OIE. As reações de amplificação foram realizadas conforme o protocolo descrito por Marques (2007) em um volume final de 25 µl, contendo 1 µl de DNA (100 ng/µl), Tris 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 3,0 mM, 200 µM de cada dNTP, 140 nM de cada iniciador (WS146F1 e WS146R1) e 1U de *Taq* DNA Polimerase (Biosystems). A desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos foi 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, sendo, neste caso, utilizados o par de iniciadores 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 utilizado uma amostra de DNA extraída de pleópodo de *L. vannamei*, cujo resultado foi positivo para a presença de uma sequência genômica do WSSV e como controle negativo foi utilizado uma amostra sem DNA molde. A análise dos produtos de PCR foi realizada através de eletroforese em gel de agarose 2%, após coloração com brometo de etídeo, e o resultado foto documentado em câmera digital. Os resultados foram expressos pelo número de análises (*pools*) positivas em relação ao total de análises realizadas por viveiro.

A temperatura da água foi medida através de sensor eletrônico de registro de temperatura (Stowaway Tid Bit, Onset, Pocasset, USA), com medidas de 30 em 30 minutos, mantido fixo no local de coleta da água em um viveiro por fazenda, com exceção das fazendas E e F, onde foi utilizado apenas um sensor por serem vizinhas.

Foram realizadas coletas semanais de água e quinzenais de solo ao longo de todo o cultivo, no período da manhã. As amostras de água

foram coletadas na comporta de despesca na interface água/solo, através de um frasco coletor, sendo armazenadas em frascos plásticos. As amostras de solo foram coletadas na comporta de despesca retirando um perfil de 10 a 15 cm, com auxílio de coletor de solo e armazenadas em sacos plásticos. Após a coleta, as amostras de água e solo foram acondicionadas em caixas isotérmicas para transporte até o LADA, em Tubarão.

A água foi previamente filtrada (14  $\mu\text{m}$ ) para posterior análise, conforme metodologia a seguir: pH, através do pHmêtro (modelo AT 350, Alfakit, Florianópolis); salinidade, através de refratômetro manual (precisão 0 – 100‰) (S/Mill-E, ATAGO, Saitama, JP); alcalinidade, pelo método titulométrico de neutralização, adaptado por Alfakit (2007); sulfetos totais, nitrato, amônia, nitrito, ferro, ortofosfato, fenol e sílica, através do método colorimétrico para fotocolorímetro, adaptado por Alfakit (2007). A concentração de sulfeto não ionizável ( $\text{H}_2\text{S}$ ) foi calculada a partir dos valores de sulfeto total e os valores de pH e temperatura da água na coleta (Boyd, 1998). As determinações foram realizadas em um fotocolorímetro (modelo AT100PB, Alfakit, Florianópolis) que apresenta 100 curvas pré programadas, sendo compatível com a metodologia “Standard Methods 2005” com resolução de 0,01  $\text{mgL}^{-1}$  para concentração e 0,01 para absorvância, com precisão relativa de 2%. Para cada parâmetro foi realizado um total de 194 análises.

Para efetuar as análises de solo (exceto matéria orgânica), inicialmente as amostras foram diluídas em água destilada, centrifugada (4.000 rpm) por cinco minutos, filtrada (14  $\mu\text{m}$ ) com auxílio de bomba de vácuo. Para o cálculo dos parâmetros foi levado em consideração o peso da amostra e o volume de água utilizado. Os parâmetros analisados foram fenol, amônia, nitrato, nitrito, ortofosfato, sulfeto e pH, matéria orgânica e alumínio, utilizando método colorimétrico para fotocolorímetro, adaptado por Alfakit (2007) e as determinações foram realizadas como descrito anteriormente, com um total de 124 análises por parâmetro, exceto para matéria orgânica, com 79 análises.

Os resultados de cada parâmetro determinado foram agrupados, de acordo com o diagnóstico da presença ou ausência de WSSV, por viveiro. Os resultados das análises microscópicas a fresco entre os grupos com e sem WSSV foram analisadas através do teste de Qui Quadrado, a 5% de probabilidade. Os valores das análises físico-químicas da água e solo, tempo de coagulação da hemolinfa e presença de vibrios, quando observadas distribuição normal e homogeneidade das variâncias, as diferenças entre os grupos foram analisadas através do

teste de comparação de médias “Z” e, caso contrário, pelo teste não paramétrico de Mann Whitney, considerando um nível mínimo de significância de 5%.

As análises foram realizadas através do programa estatístico SysEAPRO – Sistema Estatístico Aplicado a Produção, versão 2.0 (Pernambuco).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com base nos resultados dos cultivos de oito fazendas de camarões verificou-se a ocorrência de mortalidades elevadas e diagnósticos positivos para WSSV em cinco fazendas, quatro no ano de 2008 e uma no ano de 2009 (Tabela 2). Foram registrados resultados positivos para o WSSV por PCR *nested* nos camarões das fazendas C (viveiros 2 e 3), nos da G, safra 2008 (viveiros 2 e 3), da E (viveiro 3) e da G, safra 2009 (viveiro 2) e, presença de inclusões histopatológicas características de WSSV, nos camarões das fazendas C (viveiro 2), da F (viveiro 1), da G, safra 2008 (viveiros 2 e 3), da E (viveiro 3) e da G, safra 2009 (viveiros 1 e 2) (Tabela 2). As sobrevivências observadas nos viveiros das fazendas afetadas pelo WSSV foram baixas, variando de 3,26 a 23,8%, com exceção do viveiro 1 da Fazenda G safra 2009, com 65%, por ter ocorrido uma despeça emergencial, poucos dias após o início do cultivo. Nas Fazendas A, B, e D não foram verificadas mortalidades elevadas com sobrevivências entre 36 e 55%, sem a observação de sinais clínicos de WSSV e com resultados negativos por *nested* PCR e histopatologia.

As mortalidades elevadas e resultados positivos para WSSV ocorreram em fazendas onde a enfermidade já havia se manifestado em ciclos anteriores, com exceção da Fazenda D, que permaneceu três anos sem cultivo após o último evento do WSSV. Estes resultados são sugestivos de que o vírus permaneceu nos viveiros ou no ambiente externo às fazendas infectadas entre os ciclos de cultivo. Estas possibilidades são relatadas por Quang et al.(2008) que realizaram a detecção de WSSV, com taxas superiores a 10%, em amostras de viveiros infectados e em canais circunvizinhos, 20 meses após do surto da enfermidade.

As altas mortalidades nos viveiros afetados ocorreram entre 26 e 51 dias após o povoamento, com peso dos camarões variando de 4,0 a 8,1 g. Nestas fazendas foram observados camarões com coloração avermelhada, sinal típico da mancha branca, presença de camarões moribundos e mortos na lateral dos viveiros, presença de caranguejos mortos e aves alimentando-se de camarões mortos. O comportamento da

enfermidade da mancha branca observado no presente trabalho é semelhante ao descrito para *Litopenaeus vannamei* no Equador, onde as mortalidades elevadas geralmente ocorreram entre 30 a 40 dias após o povoamento, com mortalidades variando de 60 a 95% de cinco a oito dias após detecção dos primeiros sinais clínicos (Rodríguez et al., 2003).

Tabela 2. Data, tempo de cultivo e peso dos camarões nos eventos de mortalidade, relação do número de amostras positivas para WSSV (PCR) e de camarões com lesões histopatológicas características (histop.) com o número total analisado e sobrevivência final por viveiro.

Fazenda Viv	Data Mortal.	Tempo Cultivo (dias)	Peso mortal. (g)	PCR	Histop.	Sobrev. (%)
A V1	-	-	-	0/3	0/10	36,0
V3		-	-	0/2	0/20	49,8
B V1	-	-	-	0/4	0/5	53,0
V2	-	-	-	0/4	0/5	55,0
C V2	03/03/08	26	4,5	3/13	1/40	< 5,0
V7	04/03/08	27	5,0	6/11	nr	< 5,0
D V2	-	-	-	0/2	0/15	47,9
2009 V3	-	-	-	0/2	0/15	41,6
E V2	04/02/08	47	8,1	nr	nr	23,8
V3	04/02/08	47	7,9	2/2	01/7	12,0
F V1	07/02/08	50	5,5	0/2	01/6	9,6
V2	07/02/08	50	6,0	nr	nr	13,5
G V2	03/03/08	51	5,0	2/8	01/6	5,0
2008 V3	03/03/08	51	5,0	10/14	05/17	3,26
G V1	06/01/09	29	4,5	0/4	3/17	65,0
2009 V2	06/01/09	29	4,0	2/4	1/34	21,5

nr = não realizado; - = não ocorreu mortalidade.

Pérez et al. (2005) sugeriram que as pós larvas podem ser a fonte inicial da carga viral, considerando também a possibilidade da amplificação da doença ou mesmo a fonte do vírus ser devido a portadores positivos que fazem parte do habitat ou da dieta normal dos camarões. A não detecção de WSSV nas amostras de pós larvas por *nested* PCR e a utilização das mesmas pós larvas por fazendas com e sem mortalidades pela mancha

branca são indicativos de que as pós larvas não foram responsáveis pela manifestação da enfermidade.

Não foram encontradas diferenças significativas ( $P \geq 0,05$ ) nos resultados das análises microscópicas a fresco nos camarões entre os viveiros com e sem WSSV (Tabela 3). Nos parâmetros presença de epicomensais nos pereiópodos, nas brânquias e nos pleópodos, presença de cianobactérias no intestino e canibalismo, foi observado maior percentual de camarões com graus de severidade variando de 0 a 2. Para os parâmetros condições do hepatopâncreas, presença de gregarinas e grau de estresse ocorreram maiores percentuais nos graus de severidade 2 a 4.

Esses resultados são indicativos de problemas de saúde nos camarões cultivados em todas as fazendas analisadas e podem ter influenciado nas baixas sobrevivências em fazendas sem a presença de WSSV. Infecções severas de gregarinas podem produzir anomalias no epitélio e mucosa do intestino médio, provocando perfurações, criando uma rota de entrada de bactérias

oportunistas, tipo víbrios (Gómez, 2001). Por outro lado, alterações significativas no hepatopâncreas, como deformidades e baixo nível de lipídios, estão relacionadas a problemas nutricionais e presença de microrganismos patogênicos (Mendes et al., 2007).

O percentual de camarões com presença de víbrios na hemolinfa foi de 14% para viveiros com WSSV e de 12,8% para viveiros sem WSSV, não apresentando diferenças significativas entre si ( $P \geq 0,05$ ). Existem indicativos de que o processo da enfermidade da mancha branca é aumentado grandemente pela presença de bactérias patogênicas ou oportunistas, existindo uma possível associação entre surtos de WSSV com a presença de víbrios luminescente em *L. vannamei* (Horowitz & Horowitz, 2001).

O tempo médio de coagulação da hemolinfa observado em camarões de viveiros com WSSV foi de 36,25 segundos e para camarões viveiros sem WSSV de 37,16 segundos, não apresentando diferenças significativas entre si ( $P \geq 0,05$ ). Valores de tempo de coagulação da hemolinfa superiores a 30 segundos indicam a existência de problemas na saúde dos camarões (Aguirre Guzman & Sánchez Martínez, 2005).

O percentual de amostras com tempo de coagulação da hemolinfa superior a 30 segundos foi de 83% para camarões de viveiros com WSSV e de 72 % em viveiros sem WSSV, podendo ser reflexo dos elevados percentuais de infecção por parasitos e bactérias conforme observadas nas análises microscópicas de tecidos a fresco.

Tabela 3. Percentual de camarões por grau de severidade de presença de epicomensais nas brânquias, pereiópodos e pleópodos, presença de canibalismo, gregarinas e cianobactérias, condição de stress e do hepatopâncreas em viveiros sem (-) e com (+) WSSV e o número de amostras (n).

Parâmetros	%/GRAUS					n	Estatística
	0	1	2	3	4		
<b>Brânquias</b>							
WSSV -	84,38	3,13	4,69	7,81	0	64	a
WSSV +	74,32	1,35	9,46	12,16	2,7	74	a
<b>Pereiópodos</b>							
WSSV -	41,54	10,77	13,85	26,15	7,69	65	a
WSSV +	53,73	1,49	19,4	13,43	11,94	67	a
<b>Pleópodos</b>							
WSSV -	33,85	3,08	21,54	26,15	15,38	65	a
WSSV +	59,09	1,52	13,64	18,18	7,58	66	a
<b>Canibalismo</b>							
WSSV -	69,35	1,61	19,35	3,23	6,45	62	a
WSSV +	62,50	0,00	21,88	12,50	3,13	64	a
<b>Gregarinas</b>							
WSSV -	43,0	1,5	17,0	15,4	23,1	65	a
WSSV +	52,0	0	13,8	24,6	9,6	65	a
<b>Cianobactérias</b>							
WSSV -	58,93	0	23,21	10,71	7,14	56	a
WSSV +	64,18	2,99	23,88	5,97	2,99	67	a
<b>Stress</b>							
WSSV -	0	1,64	27,87	44,26	26,23	61	a
WSSV +	0	0	34,85	39,39	25,76	66	a
<b>Hepatopâncreas</b>							
WSSV -	0	0	41,27	33,33	25,4	63	a
WSSV +	0	0	24,62	46,15	29,23	65	a

Percentuais por parâmetro com a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Qui Quadrado, a 5% de probabilidade.

Os intervalos de temperatura da água das fazendas onde foram observadas mortalidades massivas foram semelhantes aos das fazendas sem mortalidade, não ocorrendo oscilações bruscas diárias. As

temperaturas médias diárias da água dos viveiros variaram entre 22,45 a 29,9°C na Fazenda A, entre 22,94 a 29,99°C na Fazenda B, entre 19,17 e 30,10°C na fazenda C, entre 19,70 a 29,64°C na Fazenda D, entre 23,19 a 30,51°C nas Fazendas E e F, entre 22,85 a 29,87°C na fazenda G, safra 2008 e entre 21,21 a 29,85°C na Fazenda G, safra 2009. As temperaturas no dia de início das altas mortalidades situaram-se na faixa de 26,25 a 28,57°C na Fazenda C, entre 24,6 a 27,6°C nas fazendas E e F, entre 27,20 a 29,29°C na Fazenda G, safra 2008 e entre 25,07 a 26,6°C na Fazenda G, safra 2009. Em todas as fazendas as mortalidades ocorreram em períodos de elevação da temperatura da água (Fig. 1). A elevação na temperatura da água aumentou a mortalidade de *L. vannamei* infectados experimentalmente com WSSV (Sonnenholzher & Rodríguez, 2002).

As temperaturas observadas nos períodos de mortalidade estão dentro do intervalo de oscilação diária de 26 a 30°C registrado em mortalidades massivas em cultivos no México em 2007 (CIBNOR, 2008).

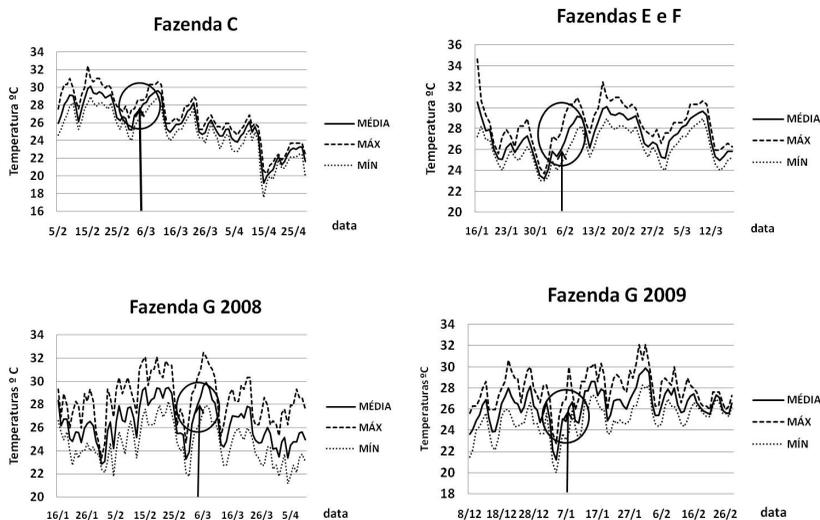


Figura 1. Temperaturas máxima, média e mínima da água por fazenda, com a indicação da data de início da manifestação da mancha branca.

Na análise dos parâmetros físico-químicos da água foram encontradas diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) nas concentrações de alcalinidade, fenol, nitrito e sílica entre os viveiros com e sem WSSV, não ocorrendo diferenças significativas ( $P \geq 0,05$ ) nos parâmetros amônia, ferro, pH, nitrato, ortofosfato, salinidade e sulfeto (Tabela 4). Nos parâmetros

físico-químicos do solo foram encontradas diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) nos valores do pH entre viveiros com e sem WSSV, não ocorrendo diferenças significativas entre as concentrações de alumínio, amônia, ferro, ortofosfato, fenol, sulfeto e matéria orgânica ( $P \geq 0,05$ ).

Tabela 4. Concentração média e desvio padrão dos parâmetros físico e químicos da água e do solo em viveiros (Viv) com (+) e sem (-) WSSV e o número de amostras.

	Viv WSSV +	Viv WSSV -
<b>Parâmetros água</b>		
Alcalinidade ( $\text{mgL}^{-1}$ )	88,35* $\pm$ 23,76 (108)** a	119,76 $\pm$ 48,52 (86) b
Salinidade (%o)	13,73 $\pm$ 3,72 (108) a	12,93 $\pm$ 5,33 (86) a
Amônia ( $\text{mgL}^{-1}$ )	0,61 $\pm$ 0,65 (108) a	0,84 $\pm$ 1,22 (86) a
Fenol ( $\text{mgL}^{-1}$ )	2,95 $\pm$ 1,90 (108) a	2,06 $\pm$ 1,28 (86) b
Ferro ( $\text{mgL}^{-1}$ )	0,29 $\pm$ 0,24 (108) a	0,26 $\pm$ 0,19 (86) a
Nitrato ( $\text{mgL}^{-1}$ )	0,16 $\pm$ 0,47 (108) a	0,10 $\pm$ 0,17 (86) a
Nitrito ( $\text{mgL}^{-1}$ )	0,03 $\pm$ 0,05 (108) a	0,02 $\pm$ 0,02 (86) b
Ortofosfato ( $\text{mgL}^{-1}$ )	0,38 $\pm$ 0,36 (108) a	0,34 $\pm$ 0,30 (86) a
pH	7,86 $\pm$ 0,41 (108) a	7,91 $\pm$ 0,55 (86) a
Sulfeto ( $\text{mgL}^{-1}$ )	0,03 $\pm$ 0,04 (108) a	0,03 $\pm$ 0,03 (86) a
Silica ( $\text{mgL}^{-1}$ )	0,87 $\pm$ 0,73 (108) a	1,09 $\pm$ 0,55 (86) b
<b>Parâmetros solo</b>		
Aluminio ( $\text{mgL}^{-1}$ )	0,55 $\pm$ 0,40 (63) a	0,55 $\pm$ 0,35 (61) a
Amônia ( $\text{mgL}^{-1}$ )	1,60 $\pm$ 1,50 (63) a	1,51 $\pm$ 1,33 (61) a
Fenol ( $\text{mgL}^{-1}$ )	0,49 $\pm$ 0,42 (63) a	0,64 $\pm$ 0,61 (61) a
Ferro ( $\text{mgL}^{-1}$ )	1,11 $\pm$ 1,25 (63) a	0,82 $\pm$ 0,52 (61) a
Mat. Orgânica (%)	3,84 $\pm$ 5,98 (37) a	3,26 $\pm$ 3,13 (42) a
Otofosfato ( $\text{mgL}^{-1}$ )	1,07 $\pm$ 0,95 (63) a	1,26 $\pm$ 0,91 (61) a
pH	7,68 $\pm$ 0,36 (63) a	8,04 $\pm$ 0,43 (61) b
Sulfeto ( $\text{mgL}^{-1}$ )	0,06 $\pm$ 0,06 (63) a	0,07 $\pm$ 0,04 (61) a

\*Médias  $\pm$  desvio padrão seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Mann Whitney e Teste "Z" (salinidade e pH solo), a 5% de probabilidade

\*\* número de amostras

As concentrações de nitrito e sílica na água e o pH do solo estão dentro ou muito próximos aos limites considerados adequados para o cultivo de camarões (Boyd, 2001) e possivelmente não tiveram papel relevante na manifestação da enfermidade da mancha branca. A alcalinidade está diretamente relacionada com fatores importantes durante o cultivo de camarões como o efeito tampão e variação diária do pH da água, produtividade dos viveiros, toxicidade de metais (Boyd & Tucker, 1998) e na ecdise dos camarões (Chanratchakool, 2003). Não foram encontrados estudos relacionando a manifestação da mancha branca com valores de alcalinidade em camarões cultivados. Os valores de alcalinidade estiveram abaixo dos limites recomendados por Boyd (2001) para o cultivo de camarões ( $100 \text{ mgL}^{-1}$ ) em 70,4 % das amostras nos viveiros com WSSV e em 38,34% das amostras nos viveiros sem WSSV, podendo ter influenciado direta ou indiretamente nestes resultados

A presença de fenóis em ambientes aquáticos pode ocorrer naturalmente, pela decomposição de vegetação aquática, ou pela introdução, por efluentes industriais e esgoto doméstico ou formado pela degradação de certos pesticidas no solo (CCME, 1999). A água de abastecimento das fazendas de camarões onde foram verificados os maiores valores de fenol é captada no Complexo Lagunar Sul de Santa Catarina, que apresenta um forte comprometimento na qualidade, devido à poluição decorrente da extração de carvão, efluentes industriais, esgoto doméstico, agrotóxicos e dejetos de suínos (Munhoz, 2001).

Não foram encontrados relatos sobre a toxicidade do fenol para camarões peneídeos, no entanto, para o camarão *Crangon septemspinosa* e o molusco *Mya arenaria* foi encontrado o valor de LT 50 de 21 horas de exposição à concentração de  $7,5 \text{ mgL}^{-1}$  de fenol (McLeese, et al., 1979). Boyd & Tucker (1998) incluem

o fenol entre produtos químicos com risco de contaminar viveiros de cultivo, com um valor para toxicidade aguda de  $10 \text{ mgL}^{-1}$  para o LC50 em 96 h, sem mencionar a espécie. Alguns valores de fenol encontrados estão próximos aos limites anteriormente citados, principalmente nas Fazendas E e F. Estas fazendas estão localizadas em uma região próxima a áreas de plantio de arroz e apresentam solo de turfa nos seus viveiros, que poderiam ser uma fonte de fenol. As concentrações de fenol encontradas no presente trabalho podem não ter atingido níveis letais, mas ter atingido níveis sub-letais, suficientes para causar stress nos camarões e provocar o surgimento da enfermidade da mancha branca.

## CONCLUSÕES

1 - Fazendas de camarões com histórico recente de ocorrência da enfermidade da mancha branca apresentam maiores riscos de incidência de surtos.

2 - Temperatura da água dos viveiros em elevação (entre 24,6 e 29,29°C) pode favorecer a manifestação da enfermidade da mancha branca em camarões *L. vannamei*.

3 - Concentrações elevadas de fenol e baixas alcalinidades da água podem estar relacionadas com a manifestação da enfermidade da mancha branca em camarões *L. vannamei*.

## AGRADECIMENTOS

A Financiadora de Estudos e Projetos - FINEP pela disponibilidade dos recursos financeiros utilizados na pesquisa. A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária EMBRAPA pela concessão de Bolsa de Doutorado para Sérgio Winckler da Costa.

## REFERÊNCIAS

AGUIRRE-GUSZMÁN, G.; SÁNCHEZ MARTÍNEZ, G. Análisis en fresco de camarón, un proceso rápido para el diagnóstico presuntivo de enfermedades. **Panorama Acuicola Magazine**, v.19, p.59- 5, 2005.

ALFAKIT. **Informações das Metodologias de Análise Colorimétricas**. Florianópolis, 2007. 5 p. Disponível em: <  
[www.alfakit.com.br/fmanager/alfakit/metodologia/metodologias.pdf](http://www.alfakit.com.br/fmanager/alfakit/metodologia/metodologias.pdf)>  
Acessado em 02 fev. 2008.

BOYD, C.E. **Consideraciones sobre la calidad del agua y del suelo en cultivos de camarón**. In: HAWS, M.C.; BOYD, C.E. (Ed.). **Métodos para mejorar la camaricultura en Centroamérica**. Managua: Imprenta UCA, 2001. p. 1-30.

BOYD, C. E.; TUCKER, C.S. **Pond Aquaculture Water Quality Management**. Boston, Kluwer Academic Publishers, 1998. 700 p.

CANADIAN COUNCIL OF MINISTERS OF THE ENVIRONMENT. 1999. **Canadian water quality guidelines for the protection of aquatic life: Phenols — Mono- and dihydric phenols**. In: Canadian environmental quality guidelines. Winnipeg, 1999. 5p. Disponível em: [ceqg-rcqc.ccme.ca/download/en/204/](http://ceqg-rcqc.ccme.ca/download/en/204/)  
Acesso em: 19 dez. 2009.

CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS DEL NORDESTE. **Resumen ejecutivo del informe final del proyecto Programa Integral de Sanidad Acuícola em Camaron.** CIBNOR, 2008. 33p. Disponível em: <[www.cibnor.mx/pisa/Informe\\_final\\_CONSORCIO-CONACYT.pdf](http://www.cibnor.mx/pisa/Informe_final_CONSORCIO-CONACYT.pdf)> Acesso em: 20 jul. 2009.

CHANRATCHAKOOL, P. Problems in shrimp culture during the wet season. **Aquaculture Asia**, v. 8, p. 38-39. 2003.

CORSIN, F.; TURNBULL, J.F.; HAO, N.V.; MOHAN, C.V.; PHI, T.T.; PHUOC, L. H.; TINH, N.T.N.; MORGAN, K. L. Risk factors associated with white spot syndrome virus infection in a Vietnamese rice-shrimp farming system. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.47, p. 1-12, 2001.

COSTA, S.W. Aquicultura no Estado de Santa Catarina: situação atual e perspectivas. *Revista da ABCC*, v.12, p.49-50, 2010.

CUÉLLAR-ANJEL, J. **Métodos de Diagnóstico de Enfermedades en Camarones Marinos de Cultivo.** pp. 15-54. En: Morales, V. y J. Cuéllar-Anjel (eds.). Guía Técnica - Patología e Inmunología de Camarones Penaeidos. Programa CYTED Red II-D Vannamei, Panamá, Rep. de Panamá. 2008. 270 pp.

FEGAN, D.F.; CLIFFORD III, H.C. Health management for viral diseases in shrimp farms. In: SPECIAL SESSION ON SUSTAINABLE SHRIMP CULTURE, AQUACULTURE 2001. Baton Rouge. **Proceedings.** Baton Rouge: The World Aquaculture Society, 2001. p.168-198.

GÓMEZ-GIL B.; ROQUE, A.; GUERRA-FLORES, A. Enfermedades infecciosas más comunes en la camaronicultura en México y El impacto del uso de antimicrobianos. En: Páez-Osuna F. (Ed.). **Camaronicultura y Medio Ambiente.** México: Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, 2001. p. 273-274.

HOROWITZ, A.; HOROWITZ, S. .Disease control in shrimp aquaculture from a microbial ecology perspective. In: SPECIAL SESSION ON SUSTAINABLE SHRIMP CULTURE, AQUACULTURE 2001. Baton Rouge. **Proceedings.** Baton Rouge: The World Aquaculture Society, 2001. p. 199-218.

KAUTSKY, N.; RONNBACK, P.; TEDENGREN, M.; TROELL, M. Ecosystem perspectives on management of disease in shrimp pond farming. **Aquaculture**, v. 191, p. 145-161. 2000.

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

LIGHTNER, D.V. Biosecurity in Shrimp Farming: Pathogen Exclusion through Use of SPF Stock and Routine Surveillance. **J. World Aquac. Soc.**, v.36, p.229-248. 2005.

LO, C. F.; LEI, 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, p.133-141. 1996.

LO, C-F.; PENG, S-E.; CHANG, Y-S.; KOU, G-H. White Spot Syndrome - What we have learned about the virus and then disease. In: DISEASES IN ASIAN AQUACULTURE, 5. 2005, Manila. **Proceedings**. Manila: Asian Fisheries Society, 2005. p. 421-433.

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

McLEESE, D. W.; ZITKO, V.; PETERSON, M.R. Structure-Lethality Relationships for Phenol, Anilines and other Aromatic Compounds in Shrimp and Clams. **Chemosphere**, v.2, p.53-57. 1979.

MENDES, E.S.; BARRETO, A.C.G.; GÓES, L.M.N.B.; GUIMARÃES, J.M.; NASCIMENTO, D. L.; DINIZ FILHO, R.S.; MENDES, P.P. Avaliação do exame a fresco em camarões marinhos *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) associado à contagem e identificação de *Vibrio* spp. em água de cultivo. **Medicina Veterinária**, v.1, p.7-15. 2007.

MUÑOZ, H. R. Impactos e conflitos na gestão de recursos hídricos do sul da Santa Catarina, Brasil.. In: ENCUESTRO DE LAS AGUAS – AGUA, VIDA Y DESARROLLO, 3. 2001, Santiago: Instituto Interamericano de Capacitación Agrícola - IICA, 2001. Disponível em: [www.aguabolivia.org/situacionaguaX/IIIEncAguas/contenido/trabajos\\_azul/TC-049.htm](http://www.aguabolivia.org/situacionaguaX/IIIEncAguas/contenido/trabajos_azul/TC-049.htm). Acesso em: 10 jan. 2010.

PÉREZ, F.; VOLCKAERT, F. A.M.; CALDERON, J. Pathogenicity of white spot syndrome virus on postlarvae and juveniles of *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. **Aquaculture** v. 250, p. 586–591. 2005.

QUANG, N.D.; HOA, P. T. P.; DA, T. T.; ANH, P. H. Persistence of white spot syndrome virus in shrimp ponds and surrounding areas after an outbreak. **Environmental Monitoring and Assessment**, v.156, p.69-72. 2009.

RODRÍGUEZ, J.; BAYOT, B.; AMANO, Y.; PANCHANA, F.; BLAS, I.; ALDAY, V.; CALDERON, J. White spot syndrome virus infection in cultured *Penaeus vannamei* (Boone) in Ecuador with emphasis on histopathology and ultrastructure. **Journal of Fish Diseases**, v.26, p.439–450. 2003.

SEIFFERT W.; COSTA S. W.; MAGGIONI, D. A mancha branca em Santa Catarina. **Revista Panorama da Aquicultura**, v. 15, p.51-53. 2005.

SONNENHOLZNER, S.; RODRÍGUEZ, J. Temperature and WSSV: CENAIM studies promising shrimp culture technique. **Global Aquaculture Advocate**, v.5, p.55-57. 2002.

SOUZA, T. M. **Dectecção do vírus da mancha branca (wsv) em Litopenaeus vannamei por métodos de diagnóstico moleculares : hibridização in situ e PCT em tempo real**. 2008. 46 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

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

## CONCLUSÕES GERAIS

1 – A mais provável via de ingresso do vírus da mancha branca em Santa Catarina foi a importação de náuplius e pós larvas de outros estados.

2 – Os efluentes contaminados de fazendas afetadas pela mancha branca foram o principal meio de dispersão do WSSV entre fazendas de uma mesma região.

3 – A não aplicação de medidas sanitárias preventivas por parte dos produtores contribuiu para o agravamento da enfermidade da mancha branca em Santa Catarina.

4 – O stress causado pelas más condições do solo de algumas fazendas foi o provável gatilho para a manifestação da enfermidade da mancha branca em Santa Catarina.

5 – O intervalo de temperatura mais favorável a manifestações da mancha branca (entre 25 a 28 °C) ocorre durante todo período de cultivo em Santa Catarina, aumentando o risco de novos eventos de mortalidade.

6 - As principais espécies de crustáceos decápodes do Complexo Lagunar Sul foram contaminadas pelo vírus da síndrome da mancha branca (WSSV) a partir de efluentes de fazendas de camarões.

7 – A presença de WSSV em crustáceos decápodes silvestres em áreas adjacentes a fazendas de camarões afetadas pela enfermidade aumenta ou se mantém em função do tempo, independente de novos aportes de efluentes contaminados, possivelmente pela transmissão vertical e/ou horizontal.

8 - Fazendas de camarões com histórico recente de ocorrência da enfermidade da mancha branca apresentam maiores riscos de incidência de surtos.

9 - Temperatura da água dos viveiros em elevação (entre 24,6 e 29,29°C) pode favorecer a manifestação da enfermidade da mancha branca em camarões *L. vannamei*.

10 - Concentrações elevadas de fenol e baixas alcalinidades da água podem estar relacionadas com a manifestação enfermidade da mancha branca em camarões *L. vannamei*



## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O surgimento da enfermidade da mancha branca em Santa Catarina no ano de 2004 causou perplexidade nas instituições e setor produtivo pela inexistência de qualquer indício da presença do agente etiológico da enfermidade no Brasil. A atividade que se encontrava em fase de consolidação em Santa Catarina não estava preparada para enfrentar um problema sanitário de extrema gravidade. Esse episódio demonstrou uma fragilidade institucional, tanto na esfera federal como estadual nas áreas de prevenção e controle das enfermidades aquícolas. Uma prova disto foi o desconhecimento do status sanitário dos estabelecimentos de reprodução e larvicultura nacionais, fazendo com que fossem subestimados os riscos de importação de pós larvas e náuplius de outros estados, a mais provável via de ingresso do vírus em Santa Catarina.

Foi verificado que os mecanismos envolvidos na manifestação da enfermidade da mancha branca são muito complexos, como relatados em estudos anteriores. Os primeiros surtos em cada região foram relacionados à ação de gatilhos causados pela má qualidade de solo e água dos viveiros, que possivelmente levaram ao stress e mortalidade de camarões portadores do vírus, desencadeando a contaminação dos demais camarões do viveiro por canibalismo e partículas virais na água. A carga viral na água, liberada a partir dos efluentes contaminados, foi responsável pela contaminação das fazendas próximas em um curto espaço de tempo, independente das condições de cultivo das mesmas. A abrangência das fazendas atingidas a partir dos focos iniciais da enfermidade indica que existe uma concentração mínima de partículas virais liberadas na água necessárias para provocar mortalidades nas demais fazendas.

A não ocorrência da enfermidade em 10 fazendas localizadas em áreas isoladas ou distantes de áreas contaminadas, utilizando pós larvas de mesma origem das fazendas afetadas, reforça a importância da carga viral na água na dispersão da enfermidade. Também é razoável supor que nestas fazendas não tenham surgido gatilhos suficientes para causar elevadas mortalidades.

Falhas na aplicação de medidas sanitárias, pela maioria dos produtores, principalmente no que concerne a liberação da água contaminada com vírus no ambiente e a não eliminação dos camarões mortos, contribuíram de forma decisiva na dispersão do vírus e na contaminação dos organismos silvestres, vetores potenciais. A persistência de mortalidades altas em cultivos sucessivos possibilitou a

permanência do vírus no ambiente de cultivo ou no seu entorno, que pode ter sido uma consequência dessas práticas.

A presença do vírus nas principais espécies de macro crustáceos silvestres do Complexo Lagunar Sul em percentuais elevados, mesmo com a redução dos cultivos, indica a existência de uma possível transmissão viral entre elas através da reprodução ou canibalismo, como relatado em outros trabalhos. Não foi possível estabelecer se as espécies estudadas atuaram como vetores nos sucessivos surtos da enfermidade. Outros organismos foram apontados em diversos estudos como vetores potenciais do WSSV, entre os quais espécies do zooplâncton e poliquetas. Amostras do plâncton foram coletadas durante o monitoramento das lagoas e fazendas de cultivo, assim como amostras de poliquetas, solo e água das fazendas para avaliação da presença do WSSV. As amostras foram preservadas em álcool, como no caso dos crustáceos, mas, infelizmente, não foi possível a extração de DNA íntegro das mesmas para a realização da análise de PCR, utilizando-se três diferentes protocolos descritos na literatura. Essa dificuldade deu origem a um estudo de mestrado que avaliou diferentes formas de fixação de amostras e protocolos de extração de DNA pra análise de PCR.

O monitoramento de fazendas de cultivo indicou problemas de saúde nos camarões em todos os cultivos, refletindo em baixas sobrevivências, mesmo em fazendas onde não foi verificada a ocorrência da mancha branca. Esses problemas foram relacionados à má qualidade da água e solo dos viveiros como demonstrado pelos parâmetros físico-químicos e biológicos analisados. A presença de elevadas concentrações de fenol na água e solo dos viveiros chamou a atenção, principalmente em fazendas com solo de turfa e próximas a regiões de cultivo de arroz no Complexo Lagunar, onde ocorreram as primeiras mortalidades pela mancha branca. Este composto é um indicador de poluição podendo ter constituído no gatilho para manifestação da enfermidade, necessitando de maiores estudos para avaliar o seu efeito na imunologia dos camarões.

Variações na temperatura da água dos viveiros têm sido associadas a manifestações da enfermidade da mancha branca no intervalo entre 25 a 28°C. Em Santa Catarina a maioria dos surtos ocorreu dentro deste intervalo de temperatura, o qual foi registrado em todos os meses de cultivo.

Cinco anos após o seu surgimento em Santa Catarina a enfermidade da mancha branca continua causando sérios prejuízos ao setor produtivo, provocando o fechamento da maioria das fazendas. As

informações obtidas na presente tese são indicativas de que a severidade da enfermidade está relacionada ao sistema de cultivo empregado e as características ambientais e climáticas encontradas no estado, os quais dificultam o seu controle. Diante deste contexto, verifica-se a necessidade de uma mudança no sistema de produção de camarões em Santa Catarina com a aplicação de medidas de biossegurança capazes de evitar o ingresso do WSSV nos cultivos. Dentre estas medidas estão a utilização de larvas originadas de camarões SPF, eliminação dos vetores potenciais na água e fundo dos viveiros, prevenção do ingresso de vetor através do uso de barreiras ao redor dos viveiros e a realização de cultivos sem renovação de água. Acredita-se que estas medidas poderão auxiliar no retorno dos cultivos aos patamares anteriores ao surgimento da enfermidade, como observado em outros países afetados pela mancha branca.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO

- ALBERT, D.;LEONG, J.A. **Monitoring of Hawaiian Invertebrates (Crustaceans) for White Spot Syndrome Virus (WSSV)**. 2004. Disponível em: [www.hawaii.edu/ssri/hcri/files/research/pdf/leong\\_noaa\\_final\\_2004.pdf](http://www.hawaii.edu/ssri/hcri/files/research/pdf/leong_noaa_final_2004.pdf)  
Acesso em 20/11/2009.
- ARTS, J.A.J. et al. Molecular cloning and expression of a Toll receptor in the giant tiger shrimp, *Penaeus monodon*. **Fish Shellfish Immunol**, v.23, p.504-513, 2007.
- BALASUBRAMANIAN, G. et al. Oral administration of antiviral plant extract of *Cynodon dactylon* on a large scale production against White spot syndrome virus (WSSV) in *Penaeus monodon*. **Aquaculture**, v.279, p.2-5, 2008.
- BALASUBRAMANIAN, G. et al. Screening the antiviral activity of Indian medicinal plants against white spot syndrome virus in shrimp. **Aquaculture**, v.263, p.15-19, 2007.
- BARRACCO, M.A.;PERAZZOLO, L.M.; ROSA,R.D. Inmunología del Camarón. pp. 171-214. *En: Morales, V. y J. Cuéllar-Anjel (eds.). Guía Técnica - Patología e Inmunología de Camarones Penaeidos*. Programa CYTED Red II-D Vannamei, Panamá, Rep. de Panamá. 270 p. 2008
- BELL, T.A.;LIGHTNER, D.V. **A handbook of normal penaeid shrimp histology**, Vol. World aquaculture society, Baton Rouge, Louisiana, USA. 1988.
- BONDAD-REANTASO, M..G. et al.. **Asia Diagnostic Guide to Aquatic Animal Diseases**. FAO Fisheries Technical Paper, n°. 402, Supplement 2. Rome, FAO. 2001. 240 p.
- BONNICHON, V.;LIGHTNER, D.V.; BONAMI, J-R. Viral interference between infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus and white spot syndrome virus in *Litopenaeus vannamei*. **Dis. Aquat. Org.**, v.72, p.179-184, 2006.
- BRASIL. DEPARTAMENTO DE PESCA E AQUICULTURA. **Plataforma tecnológica do camarão marinho cultivado: seguimento de mercado**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Pesca e Aquicultura – Brasília: MAPA/SAR/DPA, CNPq, ABCC. 276 p. 2001.
- BRAÜNING, P. **Clonagem e expressão de um fragmento recombinante da proteína de 28 KDa do vírus da síndrome da mancha branca (WSSV) de camarões**. 2009. 51 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.
- BRIGGS, M. et al. **Introductions and movement of *Penaeus vannamei* and *Penaeus stylirostris* in Asia and the pacific**. FAO, Bangkok, 32 p. 2004.

BRIGHT SINGH, I.S. et al. *Fenneropenaeus indicus* is protected from white spot disease by oral administration of inactivated white spot syndrome virus. **Dis. Aquat. Org.** v.66, p.265-270, 2005.

BROWDY, C.L.;SHEPARD, E.F.;POWELL, J.W.B. *Evaluation of ecological and commercial impact of white spot syndrome virus (WSSV) infections in the white shrimp, Litopenaeus setiferus, and the blue crab, Callinectes sapidus, in Southeastern United States using an immunoassay technique.* Final Report Program of NMFS/NOAA, Grant No. NA03NMF4270090. 2006.

CANTELLI, L. **Avaliação do efeito de polissacarídeos sulfatados da macroalga Gracilaria birdiae sobre as condições de imunocompetência de camarões Litopenaeus vannamei infectados com o vírus da síndrome da mancha branca (WSSV).** 2009. 67 f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

CAVALLI L. **White spot syndrome virus em camarões peneideos nativos e cultivados no estuário da Lagoa dos Patos, Sul do Brasil.** 2009. 125 f. Tese (Doutorado e Oceanografia Biológica), Fundação Universidade Federal de Rio Grande, Rio Grande, 2009.

CAVALLI L. S. et al. Evaluation of White Spot Syndrome Virus (WSSV) in wild shrimp after a major outbreak in shrimp farms at Laguna, Southern Brazil. **Atlântica**, v.30, p.45-52, 2008.

CHAKRABORTY A. et al. Prevalence of white spot syndrome virus in wild crustaceans along the coast of India. **Current Science**, v.82, p.1392-1397. 2002.

CHANG, C-F. et al. Dietary  $\beta$ -1,3-glucan effectively improves immunity and survival of *Penaeus monodon* challenged with white spot syndrome virus. **Fish. Shellfish Immunol.**, v.15, p.297-310, 2003.

CHANG P.S. et al. Identification of white spot syndrome associated baculovirus WSBV target organs in the shrimp *Penaeus monodon* by in situ hybridization. **Dis. Aquat. Org.**, v.7, p.131-139, 1996.

CHANG Y.S. et al. Sequencing and Amplified Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of Ribonucleotide Reductase Large Subunit Gene of the White Spot Syndrome Virus in Blue Crab (*Callinectes sapidus*) from American Coastal Waters. **Mar. Biotechnol.**, v.3, p.163–171. 2001.

CHANRATCHAKOOL, P. & PHILLIPS, M.J. Social and economic impacts and management of shrimp disease among small-scale farmers in Thailand and Vietnam. **FAO Fish. Tech. Pap.**, n. 406, p. 177-189. 2002.

CHAPMAN, R.W. et al. Sampling and evaluation of white spot syndrome virus in commercially important Atlantic penaeid shrimp stocks. **Dis. Aquat. Org.**, v.59, p.179–185. 2004.

- CHEN, L.L., et al. Natural and experimental infection of white spot syndrome virus (WSSV) in benthic larvae of mud crab *Scylla serrata*. **Dis. Aquat. Org.**, v.40, p.157-161, 2000.
- CHEN, L.L. et al. Transcriptional analysis of the DNA polymerase gene of shrimp white spot syndrome virus. **Virology**, v.301, p.136-147, 2002.
- CHOTIGEAT, W. et al. Effect of fucoidan on disease resistance of black tiger shrimp. **Aquaculture**, v.233, p.23-30, 2004.
- CHOU, H.Y. Studies on transmission of white spot syndrome associated baculovirus (WSBV) in *Penaeus monodon* and *P. japonicus* via waterborne contact and oral ingestion. **Aquaculture**, v.164, p.263-276, 1998.
- CHOU, H.Y. Pathogenicity of a baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. **Dis. Aquat. Organ.**, v.23, p.165-173, 1995.
- CITARASU, T. Influence of selected Indian immunostimulant herbs against white spot syndrome virus (WSSV) infection in black tiger shrimp, *Penaeus monodon* with reference to haematological, biochemical and immunological changes. **Fish Shellfish Immunol.**, v.21, p.372-384, 2006.
- CORBEL, V. et al. Investigation on the potential hosts of the white spot syndrome virus (WSSV) in European waters, by experimental infection. **J. Fish Diseases**, v.24, p.377-382, 2001.
- CORSIN, F. et al. Risk factors associated with white spot syndrome virus infection in a Vietnamese rice-shrimp farming system. **Dis. Aquat. Org.**, v.47, p.1-12, 2001.
- CORSIN, F. et al. Use of epidemiological methods to limit the impact of white spot disease in *Penaeus monodon* farms of Vietnam and India. **Aquaculture Asia**, v.10, p.21-30, 2005.
- COSTA S. W. et al. Caracterização do cultivo de camarões no Sul do Brasil. Em: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AQUICULTURA, 11., 2000, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: ABRAq (CD Room). Florianópolis, 2000.
- COSTA, S.W. et al. **Cadeias produtivas do Estado de Santa Catarina: Aquicultura e Pesca**. Florianópolis, Epagri. 62p. (Epagri. Boletim Técnico, 97). 1998.
- COSTA, S.W. Aquicultura no Estado de Santa Catarina: situação atual e perspectivas. **Revista da ABCC**, v.12, p.49-50, 2010.
- DHAR, A.K.; ROUX, M.M.; KLIMPEL, K.R. Detection and quantification of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus and white spot virus in shrimp using real-time quantitative PCR and SYBR green chemistry. **J. Clin. Microbiol.**, v.39, p.2835-2845, 2001.

De LA PEÑA, L.D. et al. Prevalence of white spot syndrome virus (WSSV) in wild shrimp *Penaeus monodon* in the Philippines. **Dis. Aquat. Org.**, v.77, p.175-179. 2007.

DENG, D. et al. Investigation on status carrying WSSV in several spawning ground populations of *Fenneropenaeus chinensis*, **Journal of Fisheries of China**, v. 29, p.74-78. 2005.

DIEU, B.T.M. et al. Molecular epidemiology of white spot syndrome virus within Vietnam. **J. Gen. Virol.**, v. 85, p.3607-3618, 2004.

DURAND, S. V. et al. (1996) Application of gene probes as diagnostic tools for white spot baculovirus (WSBV) of penaeid shrimp. **Dis. Aquat. Org.**, v. 27, p. 59-66, 1996.

DURAND, S.V.;LIGHTNER, D.V. Quantitative real time PCR for the measurement of white spot syndrome virus in shrimp. **J. Fish Diseases**, v.25, p.381-389, 2002.

DURAND, S.V. et al. Ultrastructure and morphogenesis of white spot syndrome baculovirus (WSSV). **Dis. Aquat. Org.**, v.29, p.205-211, 1997.

ESCOBEDO-BONILLA, C.M. et al. *In vivo* titration of white spot syndrome virus (WSSV) in SPF *Litopenaeus vannamei* by intramuscular and oral routes. **Dis. Aquat. Org.**, v.66, p.163-170, 2005.

ESCOBEDO-BONILLA, C. M. A review on the morphology, molecular characterization, morphogenesis and pathogenesis of white spot syndrome virus. **J. Fish Diseases**, v.31, p.1-18, 2008.

ESCOBEDO-BONILLA, C.M. et al. Pathogenesis of a Thai strain of white spot syndrome virus (WSSV) in juvenile, specific pathogen free *Litopenaeus vannamei*. **Dis. Aquat. Org.**, v.74, p.85-94, 2007

ESPARZA-LEAL, H. M. et al. Detection of white spot syndrome virus in filtered shrimp-farm water fractions and experimental evaluation of its infectivity in *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. **Aquaculture**, v.292, p.16-22, 2009.

FAO. FishStat Plus: Universal software for fishery statistical time series. 2010. <http://www.fao.org/fishery/statistics/software/fishstat/en>

FEGAN, D.F.;CLIFFORD III, H.C., Health management for viral diseases in shrimp farms. In: SPECIAL SESSION ON SUSTAINABLE SHRIMP FARMING: THE NEW WAVE, AQUACULTURE 2001, Lake Buena Vista. **Proceedings**.... Baton Rouge: The World Aquaculture Society, 2001, p. 168-198.

- FLEGEL T.W. Update on viral accommodation, a model for host-viral interaction in shrimp and other arthropods. **Dev. Comp. Immunol.**, v.31, p.217-231, 2007.
- FLEGEL, T.W. Special topic review: major viral diseases of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. **World J. Microb. Biot.**, v.13, p.433-442, 1997.
- FLEGEL, T.W. Detection of major penaeid shrimp viruses in Asia, a historical perspective with emphasis on Thailand. **Aquaculture**, v.258, p.1–33, 2006.
- FLEGEL, T.W.;PASHARAWIPAS T. Active viral accommodation: a new concept for crustacean response to viral pathogens.In: SPECIAL SESSION ON SHRIMP BIOTECHNOLOGY IN ASIAN FISHERIES FORUM, 5, 1998, Chiangmai. **Proceedings...** Bangkok, 1998 p.245-250.
- GRANJA, C.B. et al. Hyperthermia reduces viral load of white spot syndrome virus in *Penaeus vannamei*. **Dis. Aquat. Org.**, v.68, p.175–180, 2006.
- GUAN, Y.;YU, Z.;LIA, C. The effects of temperature on white spot syndrome infections in *Marsupenaeus japonicus*. **J. Invertebr. Pathol.**, v.83, p.257-260, 2003.
- HAMEED, A.S.S. et al. An investigation of *Artemia* as a possible vector for white spot syndrome virus (WSSV) transmission to *Penaeus indicus*. **Aquaculture**, v.204, p.1-10, 2002.
- HAMEED, A.S. et al. Experimental infection of twenty species of Indian marine crabs with white spot syndrome virus (WSSV). **Dis. Aquat. Org.**, v.57, p.157–161. 2003.
- HE J.G. et al. Natural host range and pathogenicity of white spot syndrome virus infection in shrimp and crab species in China. In: WORLD FISHERIES CONGRESS, 3, 2003. Beijing. **Proceedings...** Marylando: American Fisheries Society, 2003, p. 195–203.
- HILL, B. National and international impacts of white spot disease of shrimp. **Bulletin of the European Association of Fish Pathologists**, v.2 p.58-65, 2002.
- HOA, T.T.T. et al. Genotypic variations in tandem repeat DNA segments between ribonucleotide reductase subunit genes of WSSV isolates from Vietnam. In: DISEASES IN ASIAN AQUACULTURE, 5., 2002, Gold Coast. **Proceedings...** Manila: Asian Fisheries Society, 2005. p. 339-351.
- HOLTHUIS, L.B. **Shrimps and prawns of the world. An annotated catalogue of species of interest to fisheries.** FAO Fish.Synop., (125) v. 1., 271 p. 1980.

- HOSSAIN, S. et al. Detection of new hosts for white spot syndrome virus of shrimp using nested polymerase chain reaction. **Aquaculture**, v.198, p.1-11, 2001.
- HSU Y.L. et al. Diagnosis of *Penaeus monodon*-type baculovirus by PCR and by ELISA of occlusion bodies. **Dis. Aquat. Org.**, v.40, p.93-99, 2000.
- HUANG, C. et al. Proteomic analysis of shrimp white spot syndrome viral proteins and characterization of a novel envelope protein VP466. **Mol. Cell. Proteomics**, v.1, p.223-231, 2002.
- HUANG, J. et al. Baculoviral hypodermal and hematopoietic necrosis, study on the pathogen and pathology of the shrimp explosive epidemic disease of shrimp. **Mar. Fish. Res.**, v.16, p. 1-10, 1995.
- HUANG, C. et al. Characterization of a novel envelope protein (VP281) of shrimp white spot syndrome virus by mass spectrometry. **J. Gen. Virol.**, v.83, p.2385-2392, 2002a.
- HUANG, C. et al. Proteomic analysis of shrimp white spot syndrome viral proteins and characterization of a novel envelope protein VP466. **Mol. Cell. Proteomics**, v.1, p.223-231, 2002b.
- HUANG, R. et al. A novel envelope protein involved in White spot syndrome virus infection. **J. Gen. Virol.**, v.86, p.1357-1361, 2005.
- HUDINAGA, M. Reproduction, development and rearing of *Penaeus japonicus* Bate. **Japan J. Zool.**, v.10, p.305-393, 1942.
- INOUYE K. et al. The penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV), which causes penaeid acute viremia. **Fish Pathology**, v.31, p. 39-45.1996.
- INOUYE, K. et al. Mass mortalities of cultured kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, in Japan in 1993: electron microscopic evidence of the causative virus. **Fish Pathology**, v.29, p.149-158. 1994.
- JANG I.K. et al. A TaqMan real-time PCR assay for quantifying white spot syndrome virus (WSSV) infections in wild broodstock and hatchery-reared postlarvae of fleshy shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. **Aquaculture**, v. 287, p.40-45. 2009.
- JIAN, X-F. et al. Comparison of a novel *in situ* polymerase chain reaction (ISPCR) method to other methods for white spot syndrome virus (WSSV) detection in *Penaeus vannamei*. **Dis. Aquat. Org.**, v.67, p.171-176. 2005.
- JIANG, G.;YU, R.; ZHOU, M. Modulatory effect of ammonia-Non the immune system of *Penaeus japonicus* to virulence of white spot syndrome virus. **Aquaculture**, v. 241, p.61-75. 2004.
- JORY D.E.;DIXON, H.M. Shrimp white spot virus in the Western Hemisphere. **Aquaculture Magazine**, v.25, p.83-91. 1999.

- KANCHANAPHUM P. et al. Experimental transmission of white spot syndrome virus (WSSV) from crabs to shrimp *Penaeus monodon*. **Dis. Aquat. Org.**, v.34,p.1-7. 1998.
- KARUNASAGAR, I.;OTTA, S.K.;KARUNASAGAR, I. Histopathological and bacteriological study of white spot syndrome of *Penaeus monodon* along the west coast of India. **Aquaculture**, v.153, p. 9-13. 1997.
- KASORNCHANDRA, J.;BOONYARATPALIN, S.;ITAMI, T. Detection of white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Asia: Microscopic observation and polymerase chain reaction. **Aquaculture**, v.164, p.243-251. 1998.
- KIATPATHOMCHAI W. et al. A non-stop, single-tube, semi-nested PCR technique for grading the severity of white spot syndrome virus infections in *Penaeus monodon*. **Dis. Aquat. Org.**, v.47, p.35-239. 2001.
- KIM, C.S. et al. Protection of shrimp (*Penaeus chinensis*) against white spot syndrome virus (WSSV) challenge by double-stranded RNA. **Fish Shellf. Immunol.**, v.23, p.242-246. 2007.
- KONO, T. et al. Detection of white spot syndrome virus in shrimp by loop-mediated isothermal amplification. **J. Virol. Method.**, v.115, p.59-65. 2004.
- LAN Y. et al. Transcriptional profile of shrimp white spot syndrome virus (WSSV) genes with DNA microarray. **Arch. Virol.**, v.151, p.1723-1733. 2006.
- LAN, Y.;LU, W.; XU, X. Genomic instability of prawn white spot bacilliform virus (WSBV) and its association to virus virulence. **Virus Res.**, v. 90, p.269-27. 2002.
- LAOAROON, S. et al. Infectivity of White Spot Syndrome Virus (WSSV) to the Polychaete *Pereneis nuntia* and a possibility of WSSV transmission from the polychaete to the Black Tiger Shrimp *Penaeus monodon*. In: DISEASES IN ASIAN AQUACULTURE, 5., 2002. Gold Coast **Proceedings...** Manila: Asian Fisheries Society, 2005. p. 353-361.
- LARA, D.B.G.;MACKAY, R. Contribuição ao estudo da larvicultura do camarão *Penaeus paulensis* Pérez Farfante, 1967. **ACARPESC Científica**, v.3, p.1-36. 1974
- LEE, S.Y.;SÖDERHÄLL, K. Early events in crustacean innate immunity. **Fish Shellf. Immunol.**, v.12, p.421-437. 2002.
- LENOCH, R. **Avaliação do risco epidemiológico da carcinicultura catarinense usando como modelo a síndrome de taura e da doença da mancha branca**. 2004. 86 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) - Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2004.

- LEU, J.H. et al. The unique stacked rings in the nucleocapsid of the white spot syndrome virus virion are formed by the major structural protein VP664, the largest viral structural protein ever found. **J. Virol.**, v.79, p.140-149, 2005.
- LI, D-F. et al.  $\beta$ -integrin mediates WSSV infection. **Virology**, v.368, p.122-132. 2007.
- LI, H. et al. Identification of a novel envelope protein (VP187) gene from shrimp white spot syndrome virus. **Virus. Res.**, v.115, p.76-84. 2006.
- LI, L.;LIN, S.; YANG, F. Characterization of an envelope protein (VP110) of white spot syndrome virus. **J. Gen. Virol.**, v.87, p.1909-1915. 2006.
- LI, L.;XIE, X.;YANG, F. 2005. Identification and characterization of a prawn white spot syndrome virus gene that encodes an envelope protein VP31.**Virology**, v.340, p.125-32. 2005.
- LI, L.J. et al. Multiple envelope proteins are involved in white spot syndrome virus (WSSV) infection in crayfish. **Arch. Virol.**, v.151, p.1309-1317. 2006.
- LIGHTNER, D.V. et al. Risk of spread of penaeid shrimp viruses in the Americas by the international movement of live and frozen shrimp. **Rev. Sci. Tech. OIE**, v.16, p.146-160. 1997.
- LIGHTNER, D.V. **Handbook of Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Penaeid Shrimp**. Baton Rouge. World Aquaculture Society, 1996. 304 p.
- LIGHTNER, D.V.;PANTOJA, C. Biosecurity in shrimp farming. In: Haws MC, Boyd CE (eds) **Methods for improving shrimp farming in central America**. Managua, Nicaragua, p. 123-165. 2001.
- LIGHTNER, DV. The penaeid shrimp viral pandemics due to IHNV, WSSV, TSV and YHV: History in the Americas and Current Status. In: UJNR AQUACULTURE PANEL MEETING, 32., Davis and Santa Barbara, 2003. **Proceedings...** 2003, p. 1-20.
- LIGHTNER, D.V.;REDMAN, R.M. Shrimp diseases and current diagnostic methods. **Aquaculture**, v.164, p.201-220. 1998.
- LIGHTNER, D.V. Biosecurity in shrimp farming: pathogen exclusion through use of SPF stock and routine surveillance. **J. World. Aquac. Soc.**, v.36, p.229-247. 2005.
- LIGHTNER, D.V. et al. Occurrence of WSSV, YHV and TSV in Texas shrimp farms in 1995: Possible mechanisms for introduction. In: WORLD AQUACULTURE'97, 1997, Seattle. **Abstracts...**Baton Rouge: World Aquaculture Society, 1997, p. 288.

- LIU, B. et al. The effect of acute salinity change on white spot syndrome (WSS) outbreaks in *Fenneropenaeus chinensis*. **Aquaculture**, v.253, p.163-170. 2006.
- LIU, B. et al. Studies on the transmission of WSSV (white spot syndrome virus) in juvenile *Marsupenaeus japonicus* via marine microalgae. **J. Invertebr. Pathol.**, v.95, p.87-92. 2007.
- LIU, Y. Identification of a Novel Nonstructural Protein, VP9, from White Spot Syndrome Virus: Its Structure Reveals a Ferredoxin Fold with Specific Metal Binding Sites. **J. Virol.** v.80, p.10419-10427. 2006.
- LO, C.F. White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods. **Dis. Aquat. Org.**, v.27, p.215-225. 1996b.
- LO, C.F. Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimp using polymerase chain reaction. **Dis. Aquat. Org.**, v.25, p.133-141. 1996a.
- LO, C.F. Major viral diseases of *Penaeus monodon* in Taiwan. **J. Fish. Soc. Taiwan**, v.30, p.1-13. 2003.
- LO, C.F. Detection and tissue tropism of white spot syndrome baculovirus (WSBV) in captured brooders of *Penaeus monodon* with a special emphasis on reproductive organs. **Dis. Aquat. Org.**, v.30, p.53-72. 1997.
- LO, C.F.; KOU, G.H. Virus-associated white spot syndrome of shrimp in Taiwan: a review. **Fish Pathology**, v.33, p.365-371. 1998.
- LO, C.F. et al. White Spot Syndrome - What we have learned about the virus and then disease. In: DISEASES IN ASIAN AQUACULTURE, 5., 2002, Gold Coast. **Proceedings...** Manila: Asian Fisheries Society, 2005. p. 421-433.
- LÓPEZ-FÉLIX, SC. *Determinación y evaluación por PCR, de la presencia del virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV), en unidades de producción camarónicola del estado de Sinaloa*. Dissertación Maestría, CIAD, Mazatlán, Sinaloa, México. 2002.
- LOTZ, J.M.;SOTO, A.M. Model of white spot syndrome virus (WSSV) epidemics in *Litopenaeus vannamei*. **Dis. Aquat. Org.**, v.50, p.199-209. 2002.
- LUO, T. et al. *PmAV*, a novel gene involved in virus resistance of shrimp *Penaeus monodon*. **FEBS Lett.**, 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 da Polimerase.. In: CONGRESSO IBEROAMERICANO VIRTUAL

DE ACUICULTURA, 2, 2003, Zaragoza. **Anais...** 2003, Zaragoza. 2003. v. 1. p. 231 – 236.

MAEDA, M. et al. Detection of penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV) in wild-caught shrimp and other crustaceans. **Fish Pathology**, v.33, p.373-380.1998.

MAGBANUA, F.O. et al. White spot syndrome virus (WSSV) in cultured *Penaeus monodon* in the Philippines. **Dis. Aquat. Org.**, v. 42, p. 77–82, 2000.

MALDONADO, M.;RODRÍGUEZ, J.; BLAS, I. 2004. El camarón de cultivo frente al WSSV, su principal patógeno. **Revista AquaTIC**, n. 21, p. 78-91. 2004.

MARKS, H. et al. Genetic variation among isolates of white spot syndrome virus. **Arch. Virol.** v.149, p.673-697. 2004.

MARKS, H. et al. Fitness and virulence of an ancestral white spot syndrome virus isolate from shrimp. **Virus Res.**, v.110, p.9-20. 2005.

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

MELENA, J. Pre-exposure to infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus or to inactivated white spot syndrome virus (WSSV) confers protection against WSSV in *Penaeus vannamei* (Boone) post-larvae. **J. Fish. Dis.** v.29, p.589-600. 2006.

MENG, X.H. et al. White spot syndrome virus quantification in blue crab *Portunus trituberculatus* hatchery-produced larvae and wild populations by TaqMan real-time PCR, with an emphasis on the relationship between viral infection and crab health. **Aquaculture**, v. 291, p.18-22. 2009.

MIJANGOS-ALQUISIREZ Z. et al. White spot syndrome virus (WSSV) in *Litopenaeus vannamei* captured from the Gulf of California near the area of extensive aquaculture activity. **Dis. Aquat. Org.**, v.71, p.87-90. 2006.

MOMOYAMA, K. Mass mortalities of cultured kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, in Japan in 1993: histopathological study. **Fish Pathology**, v. 29, p.141-148. 1994.

MOMOYAMA, K. Detection of white spot syndrome virus from small penaeid shrimp species caught in the western Seto Inland Sea. **Fish Pathology**, v.38, p.81-85. 2003.

MORALES, R.;BECERRA, L.;LARA, C. Panama: national review on management strategies for major diseases in shrimp aquaculture. In: THEMATIC REVIEW ON MANAGEMENT STRATEGIES FOR MAJOR

DISEASES IN SHRIMP AQUACULTURE, 1999, Cebu. **Proceedings...** WB/NACA/WWF/FAO, 2001. p. 29–31.

MÜLLER, I. C. ;ANDRADE, T.P.D. ;TANG-NELSON, K.F.J. ; MARQUES, M.R.F.; LIGHTNER, D.V. Genotyping of WSSV geographical isolates from Brazil and comparison to other isolates from the Americas. **Dis. Aquat. Org.**, v. 88, p. 91- 98. 2010.

MUSTHAQ, S.S., et al. Variability in the tandem repetitive DNA sequences of white spot syndrome virus (WSSV) genome and suitability of VP28 gene to detect different isolates of WSSV from India. **Aquaculture**, v.256, p.34-41. 2006.

NADALA, E.C.B.;TAPAY, L.M.; LOH, P.C. Characterization of a non-occluded baculovirus-like agent pathogenic to penaeid shrimp. **Dis. Aquat. Organ.**, v.33, p.221-229. 1998.

NADALA, E.C.B.;LOH, P.C. Dot-blot nitrocellulose enzyme immunoassays for the detection of white-spot virus and yellow-head virus of penaeid shrimp. **J. Virol. Methods**, v.84, p.175-179. 2000.

NADALA, E.C.B. et al. Detection of yellowhead virus and chinese baculovirus in penaeid shrimp by western blot technique. **J. Virol. Methods**, v.69, p.39-44. 1997.

NAKANO, H. Mass Mortalities Of Cultured Kuruma Shrimp *Penaeus Japonicus*, In Japan In 1993: Epizootiological Survey And Infection Trials. **Fish Pathology**, v.29, p.135-139. 1994.

NAMIKOSHI, A. Vaccination trials with *Penaeus japonicus* to induce resistance to white spot syndrome virus. **Aquaculture**, v.229, p.25-35. 2004.

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

NUNAN, L. et al. Prevalence of Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus (IHHNV) and White Spot Syndrome Virus (WSSV) in *Litopenaeus vannamei* in the Pacific Ocean off the Coast of Panama. **J. World. Aquac. Soc**, v.32, p.330-334. 2001.

NUNAN, L.M.;LIGHTNER, D.V. Development of a non-radioactive gene probe by PCR for detection of white spot syndrome virus (WSSV). **J. Virol. Methods**, v.63, p.193-201.1997.

OIE. Aquatic Animal Health Code, 11th edn. World Organization for Animal Health, Paris. 2009.

OIE . Manual of diagnostic tests for aquatic animals, Office International des Epizooties, Paris, France. 2003.

OTTA, S.K. et al. Polymerase chain reaction (PCR) detection of white spot syndrome virus (WSSV) in cultured and wild crustaceans in India. **Dis. Aquat. Org.**, v.38, p.67-70. 1999.

PARK J.H. et al. An infectious viral disease of penaeid shrimp newly found in Korea. **Dis. Aquat. Org.**, v.34, p.71-75. 1998.

PARK J.H. et al. Safety and protective effect of a disinfectant (STEL water) for white spot syndrome viral infection in shrimp. **Dis. Aquat. Org.**, v.60, p.253-257. 2004.

PEINADO-GUEVARA, L.I.;LOPEZ-MEYER, M. Detailed monitoring of white spot syndrome virus (WSSV) in shrimp commercial ponds in Sinaloa, Mexico by nested PCR. **Aquaculture**, v. 251, p.33-45. 2006.

PÉREZ-FARFANTE I.;KENSLEY, B. Penaeoid and Sergestoid shrimps and prawns of the world. Keys and diagnoses for the Families and Genera. **Mem. Mus. Natn. Hist. Nat.**, v.175, p.1-233. 1997.

PHUOC, L.H. et al. Increased susceptibility of white spot syndrome virus-infected *Litopenaeus vannamei* to *Vibrio campbellii*. **Environ. Microbiol.**, v.10, p.2718–2727. 2008.

PO, Y.;HE, J.G.Study on host in winter of shrimp White spot syndrome baculovirus. **Marine Environmental Science**, v. 22, p.48 -52. 2003.

POLI, C.R. A criação de camarões peneídeos (*Penaeus schmitti* e *Penaeus aztecus*) na ACARPESC. ACARPESC (Serviço de Extensão da Pesca), Florianópolis. 61p. 1972.

POULOS, B.T. et al. Development and application of monoclonal antibodies for the detection of white spot syndrome virus of penaeid shrimp. **Dis. Aquat. Org.**, v.47, p.13–23. 2001.

PRADEEP, B. et al. Genotyping of white spot syndrome virus prevalent in shrimp farms of India. **Dis. Aquat. Org.**, v.78, p.189–198. 2008.

PRIMAVERA, J.H. A review of maturation and reproduction in closed thelycum penaeids. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON THE CULTURE OF PENAEID PRAWNS/SHRIMPS, 1, 1984, Iloilo. **Proceedings**.... Iloilo, 1985, p. 47-64.

QUANG, N.D. Persistence of white spot syndrome virus in shrimp ponds and surrounding areas after an outbreak. **Environ. Monit. Assess.**, v.156, p.69-72.2009.

RAHMAN, M. M. Bangladesh: national review on management strategies for major diseases in shrimp aquaculture,. In: THEMATIC REVIEW ON MANAGEMENT STRATEGIES FOR MAJOR DISEASES IN SHRIMP

AQUACULTURE, 1999, Cebu. **Proceedings...** WB/NACA/WWF/FAO, 2001. p. 45–50.

RAHMAN, M.M. et al. Impact of daily fluctuations of optimum (27 °C) and high water temperature (33 °C) on *Penaeus vannamei* juveniles infected with white spot syndrome virus (WSSV). **Aquaculture**, v.269, p.107-113. 2007.

RAHMAN, M.M. et al. Effect of high water temperature (33 °C) on the clinical and virological outcome of experimental infections with white spot syndrome virus (WSSV) in specific pathogen free (SPF) *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**. v.261, p.842–849. 2006.

RAJENDRAN, K.V. et al. Experimental host range and histopathology of white spot syndrome virus (WSSV) infection in shrimp, prawns, crabs and lobsters from India. **J. Fish. Dis**, v. 22, p.183-191. 1999.

RAMESHTHANGAM, P.;RAMASAMY, P., Antiviral activity of bis(2-methylheptyl)phthalate isolated from *Pongamia pinnata* leaves against White spot syndrome virus of *Penaeus monodon* Fabricus. **Virus. Res.**, v.126, p.38-44. 2007.

RAMIREZ-DOURIET, C.M. et al. Detección molecular del *Virus del síndrome de la mancha blanca* (WSSV) en organismos del zooplancton de bahía y estanques comerciales de camarón en el Norte de Sinaloa”. In: CONGRESO NACIONAL DE VIROLOGÍA DE LA RAMA DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE VIRUS, 3, 2004, Morelia,. **Resúmenes...**Morelia: Sociedad Mexicana de Bioquímica, 2004, p. 28.

REYES, A.;SALAZAR, M.;GRANJA, C. Temperature modifies gene expression in subcuticular epithelial cells of white spot syndrome virus-infected *Litopenaeus vannamei*. **Dev. Comp. Immunol.** V.31, p.23–29. 2007.

ROBALINO, J. et al. 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? **J. Virol.**, v.79, p.13561-13571. 2005.

ROBALINO, J. et al. Induction of antiviral immunity by double-stranded RNA in a marine invertebrate. **J. Virol.**, v.78, p.10442-10448. 2004.

ROBALINO, J. et al. Inactivation of white spot syndrome virus (WSSV) by normal rabbit serum: implications for the role of the envelope protein VP28 in WSSV infection of shrimp. **Virus Res.**, v.118, p.55-61. 2006.

ROCHA, I. P.;ROCHA, D. M. Produção mundial de camarão: principais produtores, mercados e oportunidades para o Brasil. **Revista da ABCC**, v.11, p.50 – 59. 2009.

RODRIGUEZ, J. et al. White spot syndrome virus infection in cultured *Penaeus vannamei* (Boone) in Ecuador with emphasis on histopathology and ultrastructure. **J. Fish Diseases**, v.26, p.439–450. 2003.

RODRIGUEZ, J.R.;ALFARO-AGUILERA, R.;GUERRERO, A. M. **Prevalencia y distribución del virus de la Mancha Blanca (WSV) em ambientes naturales y estanques de cultivo de *Penaeus vannamei* de Tumbes-Perú**. Informe Anual 2006. Centro Regional de Investigaciones Pesquera y Acuícola Del Instituto Del Mar de Perú. 18p. 2006.

RODRIGUEZ, J.R.;ALFARO-AGUILERA, R. **Monitoreo del virus de la Mancha Blanca (WSV) em ambientes naturales (canales de marea) de Tumbes-Perú**. Informe Anual 2005. Centro Regional de Investigaciones Pesquera y Acuícola Del Instituto Del Mar de Perú. 21p. 2005.

RODRIGUEZ, J.R. et al. **Monitoreo del virus de la Mancha Blanca (WSV) em ambientes naturales (canales de marea) de Tumbes-Perú**. Informe consolidado 2001 – 2004. Centro Regional de Investigaciones Pesquera y Acuícola Del Instituto Del Mar de Perú. 32 p. 2004.

ROSENBERRY, B. **World shrimp farming 2000**. Shrimp news international, San Diego, California,U.S.A. 2001.

ROUT, N. et al. DNA vaccines encoding viral envelope proteins confer protective immunity against WSSV in black tiger shrimp. **Vaccine**, v.25, p.2778-2786. 2007.

RUIZ, M.I.B;ESCOBEDO-BONILLA, C.M.; SOTELO-MUNDO, R.R. Revisión de patogénesis y estrategias moleculares contra el virus del síndrome de la mancha blanca en camarones peneidos. **Revista de Biología Marina y Oceanografía**, v.44, p.1-11. 2009.

RUIZ-VELAZCO, J.M. et al. Dynamics of intensive production of shrimp *Litopenaeus vannamei* affected by white spot disease. **Aquaculture**, v.300, p.113–119. 2010.

SAHTOUT, A.H.;HASSAN, M.D.;SHARIFF, M. DNA fragmentation, an indicator of apoptosis, in cultured black tiger shrimp *Penaeus monodon* infected with white spot syndrome virus (WSSV). **Dis. Aquat. Org.**, v.44, p.155-159. 2001.

SAHUL-HAMEED, A.S. et al. Quantitative assessment of apoptotic hemocytes in white spot syndrome virus (WSSV) infected penaeid shrimp, *Penaeus monodon* and *Penaeus indicus*, by flow cytometric analysis. **Aquaculture**, v.256, p.111-120. 2006.

SAHUL-HAMEED, A.S. et al. Studies on the pathogenicity of systemic ectodermal and mesodermal baculovirus and its detection in shrimp by immunological methods. **Aquaculture**, v.160, p.31-45. 1998.

- SCHRÖDER, M.;BOWIE, A.G. TLR3 in antiviral immunity: key player or bystander? **Trends Immunol.**, v.26, p. 462-468. 2005.
- SEIFFERT W.; COSTA S. W.;MAGGIONI, D. A mancha branca em Santa Catarina. **Revista Panorama da Aquicultura**, v.15, p.51-53. 2005.
- SONNENHOLZNER, S.;RODRIGUEZ, J. Temperature and WSSV: CENAIM studies promising shrimp culture technique. **Global Aquac. Advocate**, v.5, p.55-57. 2002.
- SOTO, M.A.;LOTZ, J.M. Epidemiological parameters of white spot syndrome virus infections in *Litopenaeus vannamei* and *L. setiferus*. **J. Invertebr. Pathol.**, v.78, p.9-15. 2001.
- SOTO, M.A.;SHERVETTE, V.R.;LOTZ, J.M. Transmission of white spot syndrome virus (WSSV) to *Litopenaeus vannamei* from infected cephalothorax, abdomen, or whole shrimp cadaver. **Dis. Aquat. Org.**, v.45, p.81-87. 2001.
- SOUZA, T. M. **Dectecção do vírus da mancha branca (wsv) em *Litopenaeus vannamei* por métodos de diagnóstico moleculares : hibridização in situ e PCT em tempo real.** 2008. 46 f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.
- STENTIFORD, G. D.;BONAMI, J. R.;ALDAY-SANZ, V. A critical review of susceptibility of crustaceans to Taura syndrome, Yellowhead disease and White Spot Disease and implications of inclusion of these diseases in European legislation. **Aquaculture**, v.291, p.1-17. 2009.
- SUDNA P.M. et al. Relation between white spot syndrome virus infection and clinicalmanifestation in Indian cultured penaeid shrimp. **Aquaculture**, v.167, p.95-101. 1997.
- SUPAMATTAYA K. et al. Experimental transmission of white spot syndrome virus (WSSV) from black tiger shrimp *Penaeus monodon* to the sand crab *Portunus pelagicus*, mud crab *Scylla serrata* and krill *Acetes* sp. **Dis. Aquat. Org.**, v.32, p.79-85. 1998.
- SUPAMATTAYA K. et al. Efect of a *Dunaliella* extract on growth performance, health condition, immune response and disease resistance in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). **Aquaculture**, v.248, p.207-216. 2005.
- TAKAHASHI, Y. et al. Electron microscopic evidence of bacilliform virus infection in kuruma shrimp (*Penaeus japonicus*). **Fish Pathology**, v.29, p.121-125.1994.
- TAKAHASHI Y. et al. Detection and prevention of WSSV in cultured shrimp. **Asian Aquaculture Magazine**, nov/dez, p.25-27. 2003

- TAN, L.F. Quantitative analysis of an experimental white spot syndrome virus (WSSV) infection in *Penaeus monodon* Fabricius using competitive polymerase chain reaction. **J. Fish Diseases**, v.24, p.315-323. 2001.
- TANG, K.F.J.;LIGHTNER, D.V. Quantification of white spot syndrome virus DNA through a competitive polymerase chain reaction. **Aquaculture**, v.189, p.11-21. 2000.
- TANG, K.F.J. et al. Induced resistance to white spot syndrome virus infection in *Penaeus stylirostris* through pre-infection with infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus – a preliminary study. **Aquaculture**, v.216, p.19-29. 2003.
- TAPAY, L.M.;NADALA, E.C.B.;LOH, P.C. A polymerase chain reaction protocol for the detection of various geographical isolates of white spot virus. **J. Virol. Methods**, v.82, p.39-43. 1999.
- TENDENCIA, E.A. et al. Effect of rainfall and atmospheric temperature on the prevalence of the whitespot syndrome virus in pondcultured *Penaeus monodon*. **Aquac. Res.**, v.41, p.594-597. 2010a.
- TENDENCIA, E.A.;BOSMA,R.H.;VERRETH, J.A.J. WSSV risk factors related to water physico-chemical properties and microflora in semi-intensive *Penaeus monodon* culture ponds in the Philippines. **Aquaculture**, v.302, p.164–168. 2010b.
- TSAI, J.M. et al. Genomic and proteomic analysis of thirty-nine structural proteins of shrimp white spot syndrome virus. **J. Virol.**, v.78, p.11360-70. 2004.
- TSAI, J.M. et al. Identification of the nucleocapsid, tegument, and envelope proteins of the shrimp white spot syndrome virus virion. **J. Virol.**, v.80, p.3021-29. 2006.
- VAN HULTEN, M.C. et al. . Identification of VP19 and VP15 of white spot syndrome virus (WSSV) and glycosylation status of the WSSV major structural proteins. **J. Gen. Virol.**, v. 83, p.257-265. 2002.
- VAN HULTEN, M.C. et al. Identification of two major virion protein genes of white spot syndrome virus of shrimp. **Virology**, v.266, p.227-36. 2000a.
- VAN HULTEN, M. C. W.;VLAK, J. M. Identification and phylogeny of a protein kinase gene of White spot syndrome virus. **Virus Genes**, v. 22, p.201-207. 2001.
- VAN HULTEN, M.C. et al. Analysis of a genomic segment of White spot syndrome virus of shrimp containing ribonucleotide reductase genes and repeat regions. **J. Gen. Virol**, v.81, p.307-316. 2000b.

- VAN HULTEN, M.C. et al. White spot syndrome virus envelope protein VP28 is involved in the systemic infection of shrimp. **Virology**, v.285, p.228-233. 2001b.
- VAN HULTEN, M.C. et al. The white spot syndrome virus DNA genome sequence. **Virology**, v.286, p.7-22. 2001a.
- VASEEHARAN, B. et al. Shrimp vaccination trials with the VP292 protein of white spot syndrome virus. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 43, p.137-142. 2006.
- VASEEHARAN, B.;JAYAKUMAR, R.;RAMASAMY, P. PCR-based detection of white spot syndrome virus in cultured and captured crustaceans in India. **Lett. Appl. Microbiol.**, v.37, p.443-447. 2003.
- VENEGAS, C.A. et al. Pathogenicity of penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV) to kuruma prawn in different developmental stages. **Fish pathol.**, v.34, p.19-23. 1999.
- VIDAL, O.M. et al. A profound effect of hyperthermia upon the survival of *L. vannamei* juveniles infected with the WSSV. **J. World Aquacult. Soc.**, v.32, p.364-372. 2001.
- VIJAYAN, K.K. et al. Polychaete worms-a vector for white spot syndrome virus (WSSV). **Dis. Aquat. Org.**, v. 63, p 107-111. 2005.
- VLAK, J.M. et al. **Nimaviridae. A new virus family infecting aquatic invertebrates.** Report from the XIIth Int Congr Virol, Paris. 2002.
- VLAK, J.M. et al. (2005). Nimaviridae. In: *VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Fauquet C, Mayo M, Maniloff J, Desselberger U & Ball LA (eds), pp. 187-192 (Elsevier, Amsterdam).
- WAIKHOM, G. et al. Differential host passaging alters pathogenicity and induces genomic variation in white spot syndrome virus. **Aquaculture**, v.261, p.54-63. 2006.
- WALKER, P.J.;MOHAN, C.V. Viral disease emergence in shrimp aquaculture: origins, impact and the effectiveness of health management strategies. **Reviews in Aquaculture**, v.1, p.125-154. 2009.
- WANG C.H. et al. Purification and genomic analysis of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) of *Penaeus monodon*. **Dis. Aquat. Org.**, v.23, p.239-242. 1995.
- WANG, C.S.; TSAI, Y.J.; CHEN, S.N. Detection of white spot disease virus (WSDV) infection in shrimp using *in situ* hybridization. **J. Invertebr. Pathol.**, v.72, p.170-173. 1998.
- WANG, Q.;POULOS, B.T.;LIGHTNER, D.V. Protein analysis of geographic isolates of shrimp white spot syndrome virus. **Arch. Virol.**, v.145, p.263-27. 2000.

WANG Q. et al. *Per os* challenge of *Litopenaeus vannamei* postlarvae and *Farfantepenaeus duorarum* juveniles with six geographic isolates of white spot syndrome virus. **Aquaculture**, v.170, p.179-194.1999.

WANG, Y.T. et al. White spot syndrome virus (WSSV) infects specific hemocytes of the shrimp *Penaeus merguensis*. **Dis. Aquat. Org.**, v.52, p.249-259. 2002.

WESTENBERG, M. et al. siRNA injection induces sequence-independent protection in *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus. **Virus Res.**, v.114, p.133-139. 2005.

WESTON, D.P. Ecological effects of the use of chemicals in aquaculture. MEETING ON THE USE OF CHEMICALS IN AQUACULTURE IN ASIA, 1996, Tigbauan. **Proceedings...** Tigbauan, 2000, p 23-30.

WITTEVELDT, J. et al. Protection of *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus by oral vaccination. **J. Virol.**, v.78, p.2057-61. 2004b.

WITTEVELDT, J.;VAN HULTEN, M. C. W.;VLAK, J. M. Identification and phylogeny of a non-specific endonuclease gene of White spot syndrome virus of shrimp. **Virus Genes**, v. 23,p.331-337. 2001.

WITTEVELDT, J. et al. Nucleocapsid protein VP15 is the basic DNA binding protein of white spot syndrome virus of shrimp. **Arch. Virol.**, v.150, p.1121-1133. 2005.

WITTEVELDT, J.;VLAK, J.M.;VAN HULTEN, M.C.W. Protection of *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus using WSSV subunit vaccine. **Fish Shellfish Immunol.**, v.16, p.571-579. 2004a.

WITTEVELDT, J.;VLAK, J.M.;VAN HULTEN, M.C.W. Increased tolerance of *Litopenaeus vannamei* to white spot syndrome virus (WSSV) infection after oral application of the viral envelope protein VP28. **Dis. Aquat. Org.** v.70, p.167-170. 2006.

WONGPRASERT, K. et al. Time-course and levels of apoptosis in various tissues of black tiger shrimp *Penaeus monodon* infected with white spot syndrome virus. **Dis. Aquat. Org.**, v.55, p.3-10. 2003.

WONGTEERASUPAYA C. et al. High variation in repetitive DNA fragment length for white spot syndrome virus (WSSV) isolates in Thailand. **Dis. Aquat. Org.**, v.54, p.253-257. 2003.

WONGTEERASUPAYA C. et al. A non-occluded, systemic baculovirus that occurs in cells of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in the black tiger prawn *Penaeus monodon*. **Dis. Aquat.Org.**, v.21, p.69-77. 1995.

- WU, W.;WANG, L.;ZHANG, X. Identification of white spot syndrome virus (WSSV) envelope proteins involved in shrimp infection. **Virology**, v.332, p.578-83. 2005.
- XIAO, N. et al. Isolation and identification of a novel WSSV nucleocapsid protein by cDNA phage display using an scFv antibody. **J. Virol. Methods**, v.137, p.272-279. 2006.
- XIE, X.;YANG, F. White spot syndrome virus VP24 interacts with VP28 and is involved in virus infection. **J. Gen. Virol.**,v.87, p.1903-19. 2006.
- XIE, X.;XU, L.;YANG, F. Proteomic analysis of the major envelope and nucleocapsid proteins of white spot syndrome virus. **J. Virol.**, v.80, p.10615-10623. 2006.
- XU, J.;HAN, F.;ZHANG, X. Silencing shrimp white spot syndrome virus (WSSV) genes by siRNA. **Antiviral Res.**, v.73, p.126-131. 2007.
- YAN, D.C. et al. White spot syndrome virus (WSSV) detected by PCR in rotifers and rotifer resting eggs from shrimp pond sediments. **Dis. Aquat. Org.**, v.59, p.69-73. 2004.
- YANG, F. et al. Complete genome sequence of the shrimp white spot bacilliform virus. **J. Virol.**, v.75, p.11811-11820. 2001a.
- YANG, L-S. et al. A toll receptor in shrimp. **Mol. Immunol.**, v.44, p.1999-2008. 2007.
- YANG, Y.G. et al. Malaysia: national review on management strategies for major diseases in shrimp aquaculture, In: THEMATIC REVIEW ON MANAGEMENT STRATEGIES FOR MAJOR DISEASES IN SHRIMP AQUACULTURE, 1999, Cebu. **Proceedings...** WB/NACA/WWF/FAO, 2001b. p. 65-66.
- YI, G. et al. VP28 of shrimp white spot syndrome virus is involved in the attachment and penetration into shrimp cells. **J. Biochem. Mol. Biol.**, v.37, p.726-34. 2004.
- ZHAN, W.B. et al. White spot syndrome infection of cultured shrimp in China. **J. Aquat. Anim. Health**, v.10, p.405-410. 1998.
- ZHANG, J.S. et al. Bioassay evidence for the transmission of WSSV by the harpacticoid copepod *Nitocra* sp. **J. Invertebr. Pathol.**, v.97, p. 33- 39. 2008.
- ZHANG, J.S. et al. Studies on the rotifer (*Brachionus urceus* Linnaeus, 1758) as a vector in white spot syndrome virus (WSSV) transmission. **Aquaculture**, v.261, p.1181-1185. 2006.
- ZHANG, X.;XU, L.;XU, X. Detection of pawn white spot bacilliform virus by immunoassay with recombinant antigen. **J. Virol. Methods**, v.92, p.193- 197. 2001.

ZHANG, X. et al. Identification and localization of a prawn white spot syndrome virus gene that encodes an envelope protein. **J. Gen. Virol.**, v.83, p.1069-74. 2002.

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

ZHU, Y.B.;LI, J.Y.;YANG, F. 2006. Identification of an envelope protein (VP39) gene from shrimp white spot syndrome virus. **Arch. Virol.**, v.151,p.71-82. 2006.