



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

**“PADRONIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE MÉTODOS
MOLECULARES PARA A DETECÇÃO DO VÍRUS DA
SÍNDROME DA MANCHA BRANCA EM AMOSTRAS DE
PLÂNCTON E SEDIMENTO COLETADAS EM VIVEIROS DE
CAMARÕES MARINHOS, *Litopenaeus vannamei*.”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Aquicultura.

Orientadora: Maria Risoleta Freire Marques

ANA PAULA DE MEDEIROS FRAGA

Florianópolis, 2011

Fraga, Ana Paula de Medeiros,

Padronização e avaliação de métodos moleculares para a detecção do Vírus da Síndrome da Mancha Branca em amostras de plâncton e sedimento coletadas em viveiros de camarões marinhos, *Litopenaeus vannamei* [dissertação] / Ana Paula de Medeiros Fraga – 2011.

96 f.: 23 figs., 13 tabs.

Orientadora: Maria Risoleta Freire Marques.

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

1. *Litopenaeus vannamei*; 2. WSSV; 3. Diagnóstico; 4. Plâncton; 5. Sedimento.

Padronização e avaliação de métodos moleculares para a detecção do Vírus da Síndrome da Mancha Branca em amostras de plâncton e sedimento coletadas em viveiros de camarões marinhos, *Litopenaeus vannamei*

Por

ANA PAULA DE MEDEIROS FRAGA

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

MESTRE EM AQUICULTURA

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

Prof. Evoy Zaniboni Filho, Dr.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Dra. Maria Risoleta Freire Marques – *Orientadora*

Dra. Isabel Cristina Müller

Dr. Walter Quadros Seiffert

AGRADECIMENTOS

À Dra. Maria Risoleta Marques pela orientação durante o mestrado, confiança, ensinamentos e amizade.

À Dra. Isabel Cristina Müller e ao Dr. Walter Quadros Seiffert pela participação na banca e contribuições para correção da dissertação.

À Dra. Roselane Laudares Siva, pelo apoio na identificação das microalgas nas amostras de fitoplâncton.

À toda a equipe do LABCAI, pela ajuda compreensão, amizade e momentos divertidos.

Aos colegas de laboratório Lucas Miranda e Pedro Alexandre Valentim Neto pela ajuda nas coletas.

À EPAGRI, por facilitar o acesso às fazendas e às coletas, em particular a Sérgio Winckler e Albertino Zamparetti.

À FINEP pela concessão dos recursos que viabilizaram a execução deste trabalho.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa.

Ao Secretário da Pós-graduação em Aquicultura Carlito Klunk, por toda dedicação e disposição em ajudar.

Aos professores do curso de graduação e pós-graduação em Aquicultura pela contribuição na minha formação.

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

À minha família, por sempre me apoiar e incentivar.

RESUMO

Camarões, em diferentes estágios de desenvolvimento, alimentam-se de plâncton, de forma direta ou indireta, podendo este funcionar como um vetor passivo de agentes patogênicos, como, por exemplo, o Vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV). Por outro lado, o DNA genômico do vírus pode permanecer intacto por vários meses no sedimento de viveiros de cultivo de camarões. Visando contribuir para o desenvolvimento de estratégias de detecção e monitoramento do WSSV, o presente estudo teve como objetivo padronizar a extração de DNA e a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para a detecção do WSSV em amostras de água e sedimento de viveiros de cultivo de camarões *Litopenaeus vannamei*. Os resultados foram comparados com aqueles obtidos por outras estratégias de diagnóstico, como a PCR de dois passos (PCR *nested*), utilizando-se diferentes iniciadores, e com a PCR em Tempo Real (qPCR). O FTA *gene card* mostrou-se uma boa alternativa para a coleta e o armazenamento de amostras de água, visando à detecção viral por PCR. Os iniciadores IK apresentaram maior sensibilidade para a detecção do WSSV, quando comparados com os iniciadores WS146 para amostras de camarão, plâncton e sedimento, porém menos sensíveis em relação à qPCR. Os conjuntos de iniciadores desenhados para RuBisCO (fitoplâncton) e rRNA 18S (zooplâncton) foram essenciais para a verificação da qualidade e integridade do DNA extraído das amostras de água e sedimento, além de comprovar a presença de material genômico específico e avaliar a existência ou não de inibidores enzimáticos para reações de amplificação por PCR. O monitoramento da presença do WSSV na água e no solo pode representar uma importante ferramenta de avaliação do potencial de infecção de um viveiro, assim como evitar a propagação do WSSV em uma determinada área e a introdução do patógeno em uma nova região.

Palavras-chave: WSSV, PCR, plâncton, sedimento, *Litopenaeus vannamei*

ABSTRACT

Shrimp, in different stages of development, feed on plankton, either directly or indirectly. Therefore, plankton may function as a passive vector of pathogens, such as the White Spot Syndrome Virus (WSSV). On the other hand, the virus genomic DNA can be kept intact in the sediment of farmed shrimp ponds for several months. In order to contribute to the development of strategies for WSSV detecting and monitoring, the present study aimed to standardize the DNA extraction and the Polymerase Chain Reaction (PCR) for the detection of the virus in samples of water and pond sediment obtained from *Litopenaeus vannamei* farming facilities. The results were compared with those obtained by other diagnostic strategies, such as two-step PCR (nested PCR), using different primers, and Real-Time PCR (*q*PCR). FTA gene card proved to be a good alternative for collecting and storing water samples for the purpose of viral detection using PCR. IK primers were more sensitive for WSSV detection, when compared with WS146 primers for shrimp, plankton and sediment samples but less sensitive than *q*PCR. The set of primers designed for RuBisCO (phytoplankton) and 18S rRNA (zooplankton) were essential for checking the quality and integrity of DNA extracted from samples of water and sediment, besides indicating the presence of specific genomic material. Moreover, they enabled the evaluation of the potential presence of PCR enzyme inhibitors. Monitoring the presence of WSSV in water and soil may represent an important tool for evaluating the infecting potential of a pond as well as preventing the spread of WSSV in a certain area and its introduction in a pathogen free region.

Keywords: WSSV, PCR, plankton, sediment, *Litopenaeus vannamei*

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Exemplares do camarão marinho, *Litopenaeus vannamei*.... 18
- Figura 2:** Micrografias eletrônicas do vírus da síndrome da mancha branca - WSSV. As setas indicam o apêndice na forma de flagelo. Fonte: ESCOBEDO-BONILLA et al., 2008..... 23
- Figura 3:** Aspecto externo da carapaça de um indivíduo de *L. vannamei* infectado com o WSSV, mostrando as manchas brancas 25
- Figura 4:** Frequência relativa de microalgas identificadas nas amostras de plâncton coletadas na Fazenda 1 e na Fazenda 2..... 46
- Figura 5:** Eletroforese representativa em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio, mostrando a integridade e a qualidade do material genômico extraído de amostras de camarão. 1-5) DNA extraído de animais coletados na Fazenda 1. 6-10) DNA extraído de animais coletados na Fazenda 2 47
- Figura 6:** Eletroforese em gel de agarose 2% representativa dos produtos de PCR resultantes da amplificação do gene constitutivo 18S de decápodes. (A) 1-10) Amostras de DNA extraído de animais coletados na Fazenda 1. (B) 11-20) Amostras de DNA extraído de animais coletados na Fazenda 2. P) Controle positivo (848pb). N) Controle negativo. MK) Marcador de peso molecular 1 kb..... 47
- Figura 7:** Eletroforese representativa em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio, mostrando a integridade e a qualidade do material genômico extraído das amostras de plâncton. 1-4) Amostras de DNA extraído de plâncton coletados nas Fazendas 1, 2, 3 e 4 respectivamente. 5-9) Amostras de DNA extraído plâncton coletado nas Lagoas Imarui, Santa Marta Pequena, Santo Antônio, Camacho e Rio Parobé respectivamente. P) Controle positivo da extração de DNA 48
- Figura 8:** Eletroforese em gel de agarose 2% representativa de produtos de PCR resultantes da amplificação do gene constitutivo RUBISCO em amostras de DNA extraído de plâncton. (A) 1-12) Amostras de DNA extraído de plâncton coletados em Laguna. (B) 13-16) Amostras de DNA extraído de plâncton coletados em Tijucas. P) Controle positivo. N) Controle negativo. MK) Marcador de peso molecular 100 pb..... 49

Figura 9: Eletroforese em gel de agarose 2% representativa dos produtos de PCR resultantes da amplificação do gene constitutivo 18S em amostras de DNA extraído de plâncton. (A) 1-12) Amostras de DNA extraído de plâncton coletados em Laguna. (B) 13-16) Amostras de DNA extraído de plâncton coletados em Tijucas. P) Controle positivo. N) Controle negativo. MK) Marcador de peso molecular 100 pb.....49

Figura 10: Eletroforese em gel de agarose 2% representativa dos produtos de PCR resultantes da amplificação do gene constitutivo RUBISCO de amostras de plâncton imobilizadas no FTA *gene card*. (A) 1-10) Amostras de DNA extraído de plâncton coletados em Laguna. (B) 11-14) Amostras de DNA extraído de plâncton coletados em Tijucas. P) Controle positivo. N) Controle negativo. MK) Marcador de peso molecular 100 pb50

Figura 11: Eletroforese em gel de agarose 2% representativa dos produtos de PCR resultantes da amplificação do gene constitutivo 18S de amostras de plâncton imobilizadas no FTA *gene card*. (A) 1-4) Amostras de DNA de plâncton coletados em Laguna. (B) 5-8) Amostras de DNA de plâncton coletados em Tijucas. P) Controle positivo. N) Controle negativo. MK) Marcador de peso molecular 100 pb51

Figura 12: Eletroforese representativa em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio, mostrando a integridade e a qualidade do material genômico extraído das amostras de sedimento. 1-4) Amostras de DNA extraído de sedimento coletados nas Fazenda 1 e 2 em Tijucas. 5- 6) Amostras de DNA extraído de sedimento coletados nas Fazendas 3 e 4 em Laguna.....51

Figura 13: Eletroforese em gel de agarose 2% representativa dos produtos de PCR resultantes da amplificação do gene constitutivo RUBISCO. 1-4) Amostras de DNA extraído de sedimento coletado nas Fazendas 1 e 2 em Tijucas. 5-8) Amostras de DNA extraído de sedimento coletado nas Fazendas 3 e 4 em Laguna. P) Controle positivo. N) Controle negativo. MK) Marcador de peso molecular 100 pb52

Figura 14: Eletroforese em gel de agarose 2% representativa dos produtos de PCR resultantes da amplificação do gene constitutivo 18S. 1-4) Amostras de DNA extraído de sedimento coletado nas

Fazendas 1 e 2 em Tijucas. 5-8) Amostras de DNA extraído de sedimento coletado nas Fazendas 3 e 4 em Laguna. P) Controle positivo. N) Controle negativo. MK) Marcador de peso molecular 100 pb..... 52

Figura 15: Eletroforese em gel de agarose 2% apresentando o resultado da *nested* PCR para detecção do WSSV para as amostras de camarão das Fazendas de Tijucas. (A) 1-10) Fazenda 1 e (B) 11-20) Fazenda 2. P) Controle positivo. N) Controle negativo. MK) Marcador de peso molecular 1 Kb 53

Figura 16: Eletroforese em gel de agarose 2% apresentando o resultado da *nested* PCR para detecção do WSSV com iniciadores WS146 para as amostras de sedimento das Fazendas de Laguna e Tijucas. 1-2) Fazenda 1. 3-4) Fazenda 2. 5-6) Fazenda 3. 7-8) Fazenda 4. P) Controle positivo. N) Controle negativo. MK) Marcador de peso molecular 1 Kb 54

Figura 17: Eletroforese em gel de agarose 2% apresentando o resultado da *nested* PCR para detecção do WSSV com iniciadores WS146 para as amostras de plâncton das Fazendas de Laguna e Tijucas e das Lagoas de Laguna. (A) Fazendas de Laguna e Tijucas. 1 - 2) Fazenda 1. 3-4) Fazenda 2. 5-6) Fazenda 3. 7-8) Fazenda 4. (B) Lagoas de Laguna 9-10) Imaruí. 11-12) Santa Marta Pequena. 13-14) Santo Antônio. 15-16) Camacho. 17-18) Rio Parobé. P) Controle positivo. N) Controle negativo. MK) Marcador de peso molecular 1 Kb..... 55

Figura 18: Eletroforese em gel de agarose 2% apresentando o resultado da *nested* PCR para detecção do WSSV com iniciadores IK para as amostras de camarão das Fazendas de Tijucas. (A) Fazenda 1 1-10) Amostras de camarão analisadas da Fazenda 1. (B) Fazenda 2. 11-20) Amostras de camarão analisadas da Fazenda 2. P) Controle positivo. N) Controle negativo. MK) Marcador de peso molecular 100 pb..... 56

Figura 19: Eletroforese em gel de agarose 2% apresentando o resultado da *nested* PCR para detecção do WSSV com iniciadores IK em amostras de sedimento das Fazendas de Tijucas e Laguna. 1-2) sedimento Fazenda 1. 3-4) sedimento Fazenda 2. 5-6) sedimento Fazenda 3. 7-8) sedimento Fazenda 4. P) Controle positivo. N) Controle negativo. MK) Marcador de peso molecular 100 pb..... 57

Figura 20: Eletroforese em gel de agarose 2% apresentando o resultado da *nested* PCR para detecção do WSSV com iniciadores IK para as amostras de plâncton de Laguna e Tijucas. (A) Fazendas e Lagoas de Laguna 1-2) Fazenda 3. 3-4) Fazenda 4. 5-6) Imaruí. 7-8) Santa Marta Pequena. 9-10) Santo Antônio 11-12) Camacho 13-14) Rio Parobé. (B) Fazendas de Tijucas. 15-16) Fazenda 1. 17-18) Fazenda 2. P) Controle positivo. N) Controle negativo. MK) Marcador de peso molecular 1 Kb59

Figura 21: Curva de dissociação para verificar a especificidade dos produtos obtidos por PCR em Tempo Real.....60

Figura 22: Análise de sensibilidade de PCR com iniciadores IK para a detecção do WSSV, utilizando como molde um plasmídeo recombinante em diluição seriada. (A) PCR *First* (B) PCR *Nested*. 1 -12) 10^{-1} , 1, 10, 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} cópias virais, respectivamente. N) controle negativo. MK) Marcador de peso molecular 100pb61

Figura 23: Análise de sensibilidade de PCR com iniciadores descritos WS146 para a detecção do WSSV, utilizando como molde um plasmídeo recombinante em diluição seriada. (A) PCR *First* (B) PCR *Nested*. 1-12) 10^{-1} , 1, 10, 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} cópias virais, respectivamente. N) controle negativo. MK) Marcador de peso molecular 1Kb62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Cronologia dos primeiros relatos de surtos de WSSV em países produtores de camarão na Ásia, América e Europa. Fonte: ESCOBEDO-BONILLA et al., 2008 com atualizações WAHID, 2010.....	22
Tabela 2: Condições dos ensaios de PCR padronizados no presente estudo para a amplificação dos genes constitutivos selecionados.....	42
Tabela 3: Condições dos ensaios utilizados nas <i>nested</i> PCRs para WSSV no presente estudo	43
Tabela 4: Condições utilizadas nos ensaios de <i>q</i> PCR realizados no presente estudo	44
Tabela 5: Resultado dos diagnósticos obtidos pela técnica de PCR <i>nested</i> com iniciadores WS146 para amostras de camarão	53
Tabela 6: Resultado dos diagnósticos obtidos pela técnica de PCR <i>nested</i> com iniciadores WS146 para amostras de sedimento	54
Tabela 7: Resultado dos diagnósticos obtidos pela técnica de PCR <i>nested</i> com iniciadores WS146 para amostras de plâncton.....	55
Tabela 8: Resultado dos diagnósticos obtidos pela técnica de PCR <i>nested</i> com iniciadores IK para amostras de camarão.....	55
Tabela 9: Resultado dos diagnósticos obtidos pela técnica de PCR com iniciadores IK para amostras de sedimento	57
Tabela 10: Resultado dos diagnósticos obtidos pela técnica de <i>nested</i> PCR com iniciadores IK para amostras de plâncton	58
Tabela 11: Valores médios do número de cópias virais de WSSV por microlitro de amostras extraídas de camarão, plâncton e sedimento previamente diagnosticados por PCR <i>nested</i> para WSSV ...	60
Tabela 12: Limite de detecção do WSSV em PCR <i>first</i> e <i>nested</i> com iniciadores WS146 e IK	62
Tabela 13: Comparação entre os métodos de diagnóstico (PCR <i>nested</i> e PCR em Tempo Real) com relação à sua sensibilidade	62

LISTA DE ABREVIATURAS

ABCC – Associação Brasileira de Criadores de Camarão

CT - *Cycle threshold*

CTAB – brometo de cetil-trimetilamônio

dNTP – desoxirribonucleotídio trifosfatado

IHHNV - *Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus*
(Vírus da Infecção Hipodermal e Necrose Hematopoiética)

FAO - Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação

IMNV – *Infectious myonecrosis virus* (Vírus da Mionecrose Infecçiosa)

OIE – Organização internacional de Epizotias/Organização Mundial de Saúde Animal

PCR – *Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)

M – molar

mM – milimolar

MPA – Ministério da Pesca e Aquicultura

ng – nanograma

nm – nanômetro

pb – pares de bases

qPCR – PCR em Tempo Real

RuBisCO - Ribulose oxigenase-1,5-bisfosfato carboxilase

SDS –Dodecil Sulfato de Sódio

Taq – *Thermus aquaticus*

TE – tampão Tris/EDTA

TSV - *Taura syndrome virus* (Vírus da Síndrome de Taura)

WAHID - *World Animal Health Information Database*

WSSV – *White Spot Syndrome Virus* (Vírus da Síndrome da Mancha Branca)

YHV - *Yellow head virus* (Vírus da Cabeça Amarela)

µl – microlitro

µm – micrômetro

µM – micromolar

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	17
1. Breve histórico da carcinicultura	17
2. O vírus da Mancha Branca.....	20
3. Sinais clínicos e desenvolvimento da doença.....	25
4. Métodos de diagnóstico da doença.....	26
5. Reação em Cadeia da Polimerase – PCR.....	27
6. PCR em Tempo Real – <i>q</i> PCR.....	28
7. Controle da doença e prevenção.....	29
JUSTIFICATIVA	29
OBJETIVOS	30
1. Objetivo Geral.....	30
2. Objetivos Específicos.....	30
REVISTA ESCOLHIDA PARA SUBMISSÃO DO ARTIGO CIENTÍFICO	30
INTRODUÇÃO	31
MATERIAIS E MÉTODOS	34
1. Amostras e locais de coleta.....	34
1.1 Amostras de plâncton para padronização de extração de DNA.....	34
1.2 Amostras de plâncton para padronização de PCR.	34
1.3 Amostras de sedimento para padronização de PCR.....	35
1.4 Coleta de camarões para PCR.....	35
2. Obtenção de amostras.....	35
2.1 Amostragem de plâncton para padronização de extração de DNA.....	35
2.2 Amostragem de plâncton para PCR.....	36
2.3 Amostragem de sedimento para PCR.....	36
2.4 Amostragem de camarão para PCR.....	36
3. Identificação de microalgas.....	37
3.1 Análise.....	38

4. Extração do DNA genômico com CTAB e proteinase K	38
5. FTA <i>Gene Card</i>	39
6. Quantificação e eletroforese de DNA.....	40
7. Seleção dos genes constitutivos de plâncton.....	40
8. PCR para amplificação dos genes constitutivos Seleccionados	41
9. PCR <i>nested</i> para a detecção do WSSV.....	42
10. Eletroforese dos produtos da PCR.....	43
11. PCR em Tempo Real (<i>qPCR</i>) para a detecção do WSSV	44
RESULTADOS.....	46
1. Levantamento e identificação de algas nas amostras de plâncton.....	46
2. Integridade do DNA extraído de amostras de Camarão	47
3. Integridade do DNA extraído de amostras de Plâncton.....	48
3.1 DNA extraído de plâncton com protocolo CTAB e proteinase K	48
3.2 DNA extraído de plâncton imobilizado em FTA <i>Gene Card</i>	50
4. Integridade do DNA extraído de amostras de sedimento.....	51
5. Resultados das PCRs <i>nested</i> para a detecção do vírus da Mancha Branca	52
5.1. PCRs <i>nested</i> com iniciadores WS146.....	52
5.2. PCRs <i>nested</i> com iniciadores IK.....	55
6. Quantificação da carga viral por PCR em Tempo Real	59
7. Comparação entre PCR <i>nested</i> e PCR em Tempo Real.....	61
DISCUSSÃO.....	63
CONCLUSÕES.....	72
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	73
PERSPECTIVAS.....	74
BIBLIOGRAFIA.....	75

INTRODUÇÃO GERAL

1. Breve histórico da carcinicultura

Dentre os setores produtores de alimento, a aquicultura é, atualmente, o setor que apresenta o maior crescimento mundial (SUBASINGHE, 2005). Segundo levantamento estatístico divulgado pelo Ministério da Pesca e Aquicultura (2010), essa atividade apresentou significativo crescimento nos últimos anos, passando de 278 mil toneladas em 2003 para 415 mil em 2009, o que equivale a 35% de incremento em menos de uma década. Segundo a FAO (2008), em 1996 a pesca de captura representou 73% do total da produção pesqueira mundial, enquanto a aquicultura foi responsável por apenas 27%. Já em 2006, a pesca de captura representou 58% da produção mundial e a aquicultura contribuiu com 42%. A exploração indiscriminada do estoque pesqueiro natural e a crescente diferença entre a quantidade de pescado capturado e a demanda de consumo, tornaram a aquicultura uma das alternativas mais viáveis para a produção de alimento de alto valor protéico (CAMARGO; POUHEY, 2005). Atualmente o Brasil produz aproximadamente 1,25 milhões de toneladas de pescado, sendo 38% cultivados (MPA, 2010). O crescimento médio da produção brasileira de pescado entre os anos de 2008 e 2009 foi de 5,4% para a pesca extrativista e 43,8% para a aquicultura (MPA, 2010). Entre os diversos segmentos da aquicultura, o cultivo de camarão – a carcinicultura – vem ganhando cada vez mais destaque. Conforme dados da FAO (2008), em 1997 a produção mundial de camarões cultivados era de 3.364 toneladas, passando a 65.000 toneladas em 2007, contribuindo com 62% do total da produção mundial.

Em muitos países, o consumo de camarão tem crescido anualmente, mas os estoques naturais desses crustáceos decápodes têm sofrido intensa depleção. Em 1997 a produção de camarões de cultivo representava 27% da produção mundial e em 2007 passou para 51% tornando-se superior a produção extrativista em 94.452 toneladas (FAO, 2009).

A carcinicultura moderna nasceu na década de 30, quando cientistas japoneses iniciaram os trabalhos de larvicultura com *Penaeus japonicus*. No entanto, somente nas décadas de 70 e 80, quando pescadores e larvicultores começaram a abastecer os criadores com grande quantidade de juvenis, a produção de camarões cultivados começou a se desenvolver rapidamente (ANDREATTA; BELTRAME, 2004).

Em 1997 a principal espécie de camarão cultivada no mundo era a *Penaeus monodon* responsável 51,77% da produção. Entretanto devido à excelente qualidade de carne, grande potencial de adaptação e reprodutivo, curta duração dos cultivos e altos preços do produto no mercado mundial o camarão branco do Pacífico, *Litopenaeus vannamei*, dez anos depois tornou-se a espécie líder na produção mundial de camarão cultivado com 70,11% (FAO, 2009).

O camarão branco do Pacífico, *Litopenaeus vannamei*, (Figura 1) está naturalmente distribuído na costa leste do Oceano Pacífico, desde a província de Sonora no México até Tumbes no Peru. Foi introduzido no Brasil a partir da década de 80, porém somente a partir de 1992 é que os cultivos começaram a se popularizar, após ter sido constatado que os níveis de produtividade obtidos com essa espécie, bentônica e detritívora (PÉREZ-FARFANTE; KENSLEY, 1997), eram sistemática e significativamente superiores aos obtidos com qualquer uma das demais espécies cultivadas até então no país (BORGHETTI; OSTRENSKY; BORGHETTI, 2003).



Figura 1: Exemplos do camarão marinho, *Litopenaeus vannamei*

A utilização do *L. vannamei* em cultivos comerciais foi realmente um fator revolucionário para a carcinicultura brasileira; de 7.250 toneladas em 1998, a produção de camarões no Brasil passou a 15.000 toneladas em 1999, atingindo 60.128 toneladas em 2002. Nesse ano a produtividade média foi de 5.458 Kg/ha/ano, colocando o país como líder mundial em produtividade (ROCHA, 2002; BORGHETTI, N; OSTRENSKY; BORGHETTI, J., 2003). Os resultados satisfatórios

levaram a um período de expansão da atividade, que culminou com uma produção recorde de 90.180 toneladas em 2003 (ABCC, 2007).

Uma das contribuições de maior importância da carcinicultura brasileira para as condições socioeconômicas de suas zonas de intervenção é a sua capacidade de gerar emprego permanente, beneficiando as populações locais mais carentes do meio rural (GELINSKI, 2005). Ao longo da cadeia produtiva do camarão cultivado são gerados diversos empregos diretos e indiretos, seja nos laboratórios associados, nas fazendas propriamente ditas ou, ainda, no setor de processamento (ROCHA, 2003).

O volume de produção, produtividade e exportação, que vinham sendo observados desde 1996 na carcinicultura nacional, sofreram uma sensível queda, devido ao baixo valor de comercialização do camarão, dos elevados custos de produção, da ação antidumping promovida pelos EUA e principalmente ao surgimento de enfermidades nos cultivos (MADRID, 2005) - o vírus da Mionecrose Infecciosa (IMNV) no Nordeste e o vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV) no Sul (OSTRENSKY; BOEGER, 2008). Em 2004, a produção no Brasil caiu para 75.000 toneladas; queda que foi seguida pela produção de apenas 65.000 toneladas em 2005, o que levou o Brasil a ocupar apenas a oitava colocação em produção mundial (ABCC, 2007). De 2005 a 2009 a produção brasileira de camarão se manteve em 65.000 toneladas (ABCC, 2009) colocando o Brasil no 6º lugar do ranking mundial na produção de camarão cultivado (MPA, 2010).

O grande potencial reprodutivo, a curta duração dos cultivos e os preços competitivos do produto no mercado mundial constituem aspectos positivos para o investimento na criação de peneídeos. Porém, essa atividade tem se caracterizado como um negócio de alto risco, mesmo com os índices positivos registrados.

Em Santa Catarina, a introdução da espécie *L. vannamei* ocorreu no ano de 1998, e os excelentes resultados obtidos motivaram a elaboração do Programa Estadual de Cultivo de Camarões Marinhos, lançado no município de Laguna, em maio de 1999 (COSTA; ANDREATTA; GRUMANN, 1999). A produção passou de 50 toneladas em 1998 para 4.267 toneladas em 2004, com 106 produtores em operação.

Em Santa Catarina, a safra de camarões 2004/2005 prometia bater recordes de produção, produtividade, geração de empregos e receita. Incentivado pelo apoio do governo estadual, o setor especializava-se constantemente, deixando otimistas produtores, técnicos e as

comunidades adjacentes às fazendas. No entanto, em novembro de 2004 começaram a ocorrer às primeiras mortalidades, no sul do estado, na região do Complexo Lagunar, em fazendas da região da Pescaria Brava (Laguna) e Imaruí. Amostras coletadas na região e enviadas para diagnóstico realizado na Universidade do Arizona (UAZ), onde se encontra um dos laboratórios de referência da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), foram diagnosticadas como sendo positivas para o vírus da síndrome da mancha branca (*White Spot Syndrome Virus* - WSSV) em 11 de janeiro de 2005. A presença do vírus foi confirmada pela Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), no Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica, sendo o diagnóstico realizado em amostras recebidas em 15 de janeiro de 2005. As fazendas contaminadas foram interditadas e o vazio sanitário estabelecido até setembro de 2005 (SEIFFERT et. al., 2005). Foram adotadas medidas sanitárias e estratégias para evitar a doença, assim como um mecanismo de monitoramento e controle da área afetada (ABCC, 2005).

Desde então, com o surgimento da enfermidade conhecida por mancha branca, houve um decréscimo significativo na produção estadual. Em Santa Catarina, entre 2006 e 2007, apenas cerca de 100 toneladas foram produzidas. A ocorrência do WSSV provocou a diminuição súbita das atividades, gerando grandes prejuízos para a carcinicultura catarinense. Na safra 2006/2007, apenas três fazendas da região Sul obtiverem sucesso na produção de camarões, uma delas, inclusive, vitimada anteriormente pela Mancha Branca, mostrou sinais de recuperação, com ótimos resultados técnicos. No entanto, a produção da Região Sul ainda encontra-se bastante comprometida (MELLO; FARIAS, 2007). Em 2009 a produção estadual de camarões (*Litopenaeus vannamei*) cultivados atingiu 172 toneladas, com 19 produtores em operação (SANTOS et al., 2010).

2. O vírus da Mancha Branca

Os animais em sistemas de cultivo apresentam maior contato entre si, estão sujeitos muitas vezes à baixa qualidade de água, mudanças repentinas na salinidade, temperatura e oxigênio dissolvido, manipulação e transporte; fatores esses que promovem o estresse dos animais, podendo favorecer a ação de agentes patogênicos (MISCIATTELLI; JONES; LATCHFORD, 1999). Fazendas e viveiros são susceptíveis à invasão de protozoários, fungos e bactérias, mas as enfermidades causadas por vírus são as que provocam as maiores perdas

e prejuízos (PÁEZ-OSUNA, 2001). Desta forma, para assegurar-se a qualidade sanitária desses organismos, bem como da água em que são criados, tornam-se necessários o aumento do conhecimento em patologia de organismos aquáticos, a melhoria nas práticas de manejo e o incremento das técnicas de diagnóstico (MARQUES et al., 2006; SILVA-SOUZA, 2006).

O rápido aumento da produção mundial de camarões cultivados tem sido acompanhado por uma intensificação na ocorrência de doenças que estão prejudicando significativamente o ritmo do desenvolvimento mundial desta atividade (LIGHTNER; REDMAN, 1998; GESTEIRA, 2006). O WSSV causa forte impacto econômico na indústria camaroneira no mundo inteiro.

Entre os múltiplos problemas virais descritos para camarões, o vírus da síndrome da mancha branca (*White Spot Syndrome Virus* – WSSV) é o mais devastador e o mais difundido, tendo causado forte impacto econômico na indústria camaroneira no mundo inteiro. (LIGHTNER et al., 1998; WANG et al., 1999; TAPAY; NADALA; LOH, 1999; SOTO; LOTZ, 2001; JIANG et al., 2006; FLEGEL, 2006; SÁNCHEZ-MARTÍNEZ; AGUIRRE-GUSMÁN; MEJÍA-RUÍZ, 2007).

Desde 1992, a doença tem causado mortalidade em massa na Ásia. Em 1995, o vírus foi detectado nos Estados Unidos, em 1998, na América do Sul e em 1999 na América Central, onde causou consideráveis perdas sócio-econômicas (PÉREZ; VOLCKAERT; CALDERÓN, 2005). Um resumo cronológico dos primeiros relatos de surtos de WSSV em vários países produtores de camarão é apresentado na Tabela 1.

Inicialmente, pensou-se que diferentes agentes virais tivessem surgido simultaneamente em diferentes regiões, e a cada um foi dado um nome específico: *Hypodermal and Haematopoietic Necrosis Baculovirus* (HHNBV) (DURAND et al., 1996), *Penaeus monodon Non-occluded Baculovirus* (PmNOB III) (WANG et al., 1995; KARUNASAGAR; OTTA; KARUNASAGAR, 1997), *Rodshaped Nuclear Virus of Marsupenaeus japonicus* (RV-PJ) (INOUE et al., 1994; INOUE et al., 1996), *Penaeid Rod-shaped DNA Virus* (VENEGAS et al., 2000), *Systemic Ectodermal and Mesodermal Baculovirus* (WONGTEERASUPAYA et al., 1995; SAHUL HAMEED et al., 1998) ou *White Spot Baculovirus* (CHOU et al., 1995; LIGHTNER, 1996). Mais tarde, com base em estudos moleculares, genéticos e filogenéticos, foi reconhecido que um único agente viral era responsável pelos casos patológicos relatados. Finalmente, chegou-se a

um consenso de denominá-lo de *White Spot Syndrome Virus* (WSSV) - Vírus da Síndrome da Mancha Branca, ou ainda, *White Spot Vírus* (WSV) – Vírus da Mancha Branca.

Tabela 1: Cronologia dos primeiros relatos de surtos de WSSV em países produtores de camarão na Ásia, América e Europa.

Ano do primeiro relato	País	Referência
1992	Taiwan	Chou et al. 1995
1993	China, Japão, Coreia	Zhan et al. 1998; Inouye et al. 1994; Park et al. 1998
1994	Tailândia, Índia, Bangladesh	Lo et al., 1996a; Karunasagar; Otta; Karunasagar, 1997; Mazid; Banu, 2002
1995	Estados Unidos	Lightner, 1996; Wang, Y.G. et al., 1999
1996	Indonésia, Malásia, Sri Lanka	Durand et al., 1996; Kasornchandra; Boonyaratpalin; Itami, 1998; Rajan et al., 2000
1997	Vietnã	Bondad-Reantaso et AL., 2001
1998	Peru	Rosenberry, 2001
1999	Filipinas, Equador, Colômbia, Panamá, Honduras, Nicarágua, Guatemala, Belize	Magbanua et al., 2000; Bondad-Reantaso et al., 2001; Hossain et al., 2001; Wu et al., 2001
1999-2000	México	Bondad-Reantaso et AL., 2001
2002	França, Irã	Dieu et al., 2004
2005	Brasil	APHIS-USDA 2005
2006	Costa Rica	WAHID, 2006
2008	Hong Kong	WAHID, 2008
2009	Taipei (China), Myanmar	WAHID, 2009
2010	Cingapura	WAHID, 2010

Fonte: ESCOBEDO-BONILLA et al., 2008 com atualizações WAHID, 2010.

O vírus da mancha branca é envelopado, baciliforme, com nucleocapsídeo na forma de bastão e uma cauda ou extensão na forma de flagelo em uma das extremidades (CHOU *et al.*, 1995; WANG *et al.*, 1995) (Figura 2). O envelope viral é uma estrutura lipídica trilaminar que abriga o nucleocapsídeo, estrutura espiralada composta por subunidades de proteínas globulares (WONGTEERASUPAYA *et al.*, 1995; DURAND *et al.*, 1997; NADALA; LOH, 1998).

O seu material genético é composto por DNA de dupla fita (CHEN *et al.*, 2002b; VAN HULTEN *et al.*, 2001b; VASEEHARAN; JAYAKUMAR; RAMASAMY, 2003; YANG *et al.*, 2001), sendo encontradas várias linhagens e isolados do vírus, que são extremamente virulentas e patogênicas para várias espécies de peneídeos e outros crustáceos (DURAND *et al.*, 1997; MULLER, 2009).



Figura 2: Micrografias eletrônicas do vírus da síndrome da mancha branca - WSSV. As setas indicam o apêndice na forma de flagelo. Fonte: ESCOBEDO-BONILLA et al., 2008.

Inicialmente incluído na família *Baculoviridae* (WANG et al., 1995) e, mais tarde, reclassificado como pertencente a família *Nimaviridae*, gênero *Whispovirus* (VAN HULTEN et al., 2001b; MAYO, 2002; OIE, 2003). Infecta tecidos de origem ecto e mesodérmicas (CHANG et al., 1996), como epitélio cuticular, tecidos conectivos e tecidos hematopoiéticos (SHI et al., 2005), replicando no núcleo das células infectadas (LEU et al., 2007).

A morfologia, localização nuclear e a morfogênese são similares a vírus baciliformes de insetos (DURAND et al., 1997). No estágio final de infecção, o núcleo ou até a própria célula desintegram-se, levando a perda da arquitetura celular (LEU et al., 2007)

Sob condições de cultivo, esse vírus pode causar até 100% de mortalidade acumulada entre 2 e 10 dias após o início dos sintomas (CHOU et al., 1995; WANG et al., 1995; WONGTEERASUPAYA et al., 1995; LIGHTNER, 1996; LO et al., 1996b; CHEN, 1997; LIGHTNER et al., 1998; XU; HAN; ZHANG, 2006).

Além de infectar diversas espécies de camarões cultiváveis e silvestres suscetíveis, uma de suas particularidades é o elevado número de hospedeiros que apresenta, incluindo uma grande variedade de crustáceos tais como, caranguejos, lagostas (LO et al., 1996a, b; SUPAMATTAYA et al., 1998; PENG et al. 1998; WANG, Y. et al., 1998; CHEN et al. 2000; CHAKRABORTY et al., 2002; HOSSAIN et

al., 2004; LIGHTNER, 2005; MARQUES, 2007; ESCOBEDO-BONILLA et al., 2008), siris (CHANG et al., 2001) e copépodos (ZHANG et al., 2007).

Em peneídeos, já foi detectado em pós-larva, juvenil e adulto (CHANG; CHEN; WHANG, 1998a) e muitas das espécies desenvolvem tolerância ao vírus, após uma alta incidência de mortalidade inicial (SCHUUR, 2003).

Esta característica peculiar tem contribuído para o seu sucesso em uma ampla distribuição geográfica (LO et al., 1996a, b, 1997; PENG et al., 1998; CHOU et al., 1998; MAEDA et al., 1998; WANG et al., 1998; CHEN et al., 2000; SAHUL HAMEED et al., 2001, 2002, 2003; MUSTHAQ et al., 2006).

Sua transmissão pode ser vertical através de reprodutores infectados (SÁNCHEZ-MARTÍNEZ; AGUIRRE-GUSMÁN; MEJÍA-RÚÍZ, 2007) ou horizontal pela canibalização de camarões infectados (CHOU et al., 1995; WU et al., 2001; LOTZ; SOTO 2002), lotes de pós-larvas infectadas em um viveiro e posterior disseminação do patógeno para viveiros vizinhos ou mesmo para outras fazendas (WU et al., 2001; LIGHTNER, 2005).

Estudos recentes relatam ainda a detecção do WSSV em amostras de solo dos viveiros de cultivo, mesmo após 10 meses de estocagem (NATIVIDAD; NOMURA; MATSUMURA, 2008) e em microalgas como *Chlorella sp.* (LIU et al., 2007). Esta característica torna a erradicação do vírus muito difícil, pois mesmo eliminando os camarões infectados de um viveiro, o vírus pode continuar presente no ambiente.

Camarões em diferentes estágios de desenvolvimento alimentam-se, de forma direta ou indireta, de uma combinação de fitoplâncton e zooplâncton (MULLER-FEUGA, 2000). O plâncton é considerado um vetor passivo na transmissão do WSSV, pois possui a capacidade de transportar o vírus da mancha branca (LIU et al., 2007).

As maneiras pelas quais o WSSV é disseminado não foram completamente investigadas, entretanto, estudos têm demonstrado que a rápida dispersão de vírus exóticos pode ser atribuída à insetos aquáticos, aves marinhas (GARZA et al., 1997), ao transporte internacional de pós-larvas e adultos infectados (LIGHTNER et al., 1997) e ao uso de camarões infectados congelados, para utilização como isca para pesca desportiva (NUNAN; POULOS; LIGHTNER, 1998). A água provavelmente é um importante caminho para a entrada do WSSV em uma unidade de aquicultura (COHEN et al., 2005) uma vez que partículas virais podem estar presentes na água (ARTS et al., 2007) e

viáveis por pelo menos 30 dias na água do mar a 30°C em condições de laboratório (MOMOYAMA et al., 1998).

O vírus da síndrome da mancha branca pode se espalhar através da água de viveiros vizinhos ou fazendas, através da troca rotineira de água ou de despesas emergenciais, preservando o WSSV em áreas de cultivo de camarão (ESPARZA-LEAL et al., 2009).

Atualmente na carcinicultura, a água dos viveiros é rotineiramente lançada no meio adjacente (lagoas costeiras ou estuários), onde habitam outras espécies de crustáceos. Muitos destes potencialmente suscetíveis a infecção por WSSV (ESCOBEDO-BONILLA et al., 2008). A renovação de água é normalmente feita até mesmo em viveiros afetados por surtos de WSSV. Esta prática provavelmente aumenta o risco de transmissão WSSV para fazendas de camarão vizinhas e para o meio ambiente.

3. Sinais clínicos e desenvolvimento da doença

É de conhecimento geral de carcinicultores e pesquisadores que várias espécies de camarões peneídeos infectados com WSSV podem apresentar manchas brancas de 0,5 a 3 mm de diâmetro no exoesqueleto (LO et al., 1996b; WU et al., 2001) (Figura 3). Porém, o mecanismo exato da formação das manchas ainda não é conhecido. É possível que a infecção por WSSV provoque disfunção do epitélio subcuticular do animal, resultando no acúmulo de sais de cálcio na cutícula (WANG, et al., 1999).



Figura 3: Aspecto externo da carapaça de um indivíduo de *L. vannamei* infectado com o WSSV, mostrando as manchas brancas. Fonte: LIGHTNER, 1996.

Além da visualização de manchas brancas no exoesqueleto dos animais infectados com WSSV, outros sinais clínicos da doença incluem coloração avermelhada do corpo e apêndices (LIGHTNER et al., 1998), anorexia (CHOU et al., 1995; DURAND et al., 1996; FLEGEL, 1997), letargia (WONGTEERASUPAYA et al., 1995; DURAND et al., 1997), natação irregular ao redor das bordas do tanque de cultivo (PÉREZ; VOLCKAERT; CALDERÓN, 2005), fácil desprendimento da cutícula (LO, et al., 1996b), dilatação e coloração amarelada do hepatopâncreas (SAHUL HAMEED et al., 1998) e, ainda, diminuição e problemas de coagulação da hemolinfa (WANG; POULOS; LIGHTNER, 2000; KIATPATHOMCHAI et al., 2001).

Os animais geralmente apresentam os sinais clínicos um ou dois dias antes do surgimento da primeira mortalidade (KOU et al., 1998). A mortalidade em massa pode ocorrer dentro de até dez dias após o início da manifestação da doença (KARUNASAGAR; OTTA; KARUNASAGAR, 1997; LOTZ; SOTO, 2002), como mencionado anteriormente. Nos tanques de engorda, camarões de todas as idades e tamanhos são susceptíveis à doença, mas a mortalidade em massa normalmente ocorre um ou dois meses depois do povoamento (KASORNCHANDRA; BOONYARATPALIN; ITAMI, 1998). No entanto, a ausência dos sinais acima mencionados não exclui a possibilidade de o camarão estar infectado, uma vez que os animais podem ser assintomáticos. Assim, torna-se necessária a confirmação laboratorial da presença do vírus, através de métodos mais sensíveis e acurados.

4. Métodos de diagnóstico da doença

Estudos vêm sendo realizados e muitas técnicas de diagnóstico desenvolvidas com o intuito de compreender, prevenir e controlar, não só a Síndrome da Mancha Branca, como também outras viroses que infectam camarões (NUNAN; POULOS; LIGHTNER, 1998; WANG; TSAI; CHEN, 1998; WANG, C. et al., 2000; BACHÈRE, 2000; PÉREZ; VOLCKAERT; CALDERÓN, 2005; ROUT, 2005; WANG; ZHAN, 2006).

Os métodos de detecção utilizados para o diagnóstico de WSSV incluem identificação macroscópica de pontos cuticulares brancos, observações histológicas, hibridização *in situ* e *dot blot*, através de sondas específicas para o WSSV, amplificação *in vitro* de ácidos nucleicos, através da reação em cadeia da polimerase (PCR), PCR em Tempo Real (*qPCR*), testes imunocromatográficos e bioensaio (OIE, 2006).

O emprego de métodos moleculares de diagnóstico possibilita aumentar a sensibilidade e a especificidade do processo de detecção de patógenos, além de reduzir a subjetividade inerente à interpretação de dados biológicos e morfológicos. Dessa forma, esse conjunto de estratégias representa um forte aliado às outras metodologias mais clássicas de diagnóstico e detecção de patógenos. Os métodos moleculares estão voltados para o genoma do agente infeccioso, não apresentando limitações quanto ao seu estágio de desenvolvimento (MARQUES et al., 2006).

Nos primeiros trabalhos que relataram a detecção do WSSV com sucesso, por técnicas de biologia molecular, foi empregada a técnica de amplificação de regiões alvo do genoma viral por PCR, utilizando diferentes conjuntos de iniciadores (LO et al., 1996b; WONGTEERASUPAYA et al., 1996; KIM et al., 1998).

5. Reação em Cadeia da Polimerase – PCR

Em 1987, Mullis e Faloona descreveram um método revolucionário por eles desenvolvido – a Reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando uma DNA Polimerase termoestável, capaz de ser executada inteiramente *in vitro*, sem o uso de células. Empregando esta técnica, uma determinada sequência de nucleotídeos pode ser seletiva e rapidamente replicada em grandes quantidades a partir de qualquer DNA que a contenha.

A PCR é baseada no uso da DNA polimerase para copiar um molde de DNA em ciclos repetidos de replicação. Cada ciclo envolve três passos: denaturação, anelamento e extensão (DEGEN et al., 2006). Pequenos oligonucleotídeos iniciadores, que são hibridizados ao DNA molde no início e no final da sequência de DNA alvo, guiam a polimerase para a sequência a ser copiada. Guiada por estes iniciadores a DNA polimerase é, então, usada para produzir bilhões de cópias da sequência requerida, que poderá, após o processo, ser visualizada por coloração, após a separação por eletroforese em gel, possibilitando a detecção de infecções virais em estágios bastante precoces (ALBERTS et al., 1999).

A técnica de PCR de um ou dois passos, que emprega o princípio da amplificação de sequências selecionadas de DNA, ou seja, do genoma viral, é considerada um procedimento de alta confiabilidade em diagnóstico, não somente em aquicultura, como em análises clínicas de modo geral (HOSSAIN et al., 2004).

Na área de patologia de crustáceos, muitos pesquisadores têm feito uso da PCR para estudos acerca de diversos vírus que infectam camarões, caranguejos, siris e outros crustáceos (LO et al, 1996b; KIM et al, 1998; WANG, C. et al., 2000; PHROMJAI et al, 2002; CHAYABURAKUL et al, 2005; NATIVIDAD; NOMURA; MATSUMURA, 2008; MARQUES, 2007; SOUZA, 2008).

A utilização do segundo passo de PCR (PCR de dois passos ou *nested* PCR) aumenta a sensibilidade do método de detecção através da reamplificação do produto de PCR obtido no primeiro passo de PCR (*first*), utilizando-se iniciadores internos ao produto da primeira amplificação. Resultados positivos obtidos no primeiro passo indicam infecções severas por WSSV enquanto que, resultados positivos obtidos apenas a partir do segundo passo indicam latência ou baixas cargas virais podendo os animais infectados não apresentarem sinais clínicos detectáveis (LO et al., 1996, KIM et al., 1998; HSU et al., 1999).

HOSSAIN e outros autores (2004) testaram a sensibilidade de detecção do WSSV em amostras de água e camarão com os pares de iniciadores WS146 (LO et al., 1996) que geram um fragmento de 941 pares de base (pb) e IK (UMESHA et al., 2006) que produzem como produto da amplificação um fragmento de 310 pb. Eles observaram que a sensibilidade da PCR aumenta com a diminuição do tamanho do fragmento amplificado (gerado pelo par de iniciadores ou *primers*). Segundo os mesmos autores o conjunto de iniciadores IK de Karunasagar (UMESHA et al., 2006) apresentou melhor resultado quanto a sensibilidade de detecção do WSSV do que os iniciadores WS146 (LO et al., 1996) recomendados pela OIE para o diagnóstico deste vírus.

6. PCR em Tempo Real – *q*PCR

No fim da década de 90, um novo método quantitativo de diagnóstico, a PCR em Tempo Real (*q*PCR), passou a ser utilizado para a quantificação de muitos vírus humanos, como por exemplo, o da Hepatite B (CANE et al., 1999) e HIV (LEWIN et al., 1999). Esse método apresenta algumas vantagens em relação à PCR qualitativa, como a rápida análise dos resultados, maior sensibilidade, precisão e reprodutibilidade, facilidade na quantificação, melhor controle de qualidade no processo e menor risco de contaminação (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004; MARQUES et al., 2006).

Na PCR tradicional os produtos precisam ser separados por eletroforese e corados para a análise enquanto que na *q*PCR o acúmulo

dos produtos é detectado e monitorado diretamente pela leitura do aumento da fluorescência. Na *qPCR*, cada reação é caracterizada pelo ciclo no qual o sinal fluorescente do corante sinalizador atravessa uma linha arbitrária denominada *threshold*. A determinação da quantidade de cópias da sequência alvo em uma amostra é obtida pela medição do seu *cycle threshold* (CT), e pela utilização de uma curva padrão (DURAND; LIGHTNER, 2002).

Essa poderosa ferramenta de diagnóstico, assim como a PCR convencional, tem sido aplicada à área de virologia de camarões peneídeos, tanto em experimentos com WSSV e IHHNV (TANG; LIGHTNER, 2001; DURAND; LIGHTNER, 2002; DURAND et al., 2003; SOUZA 2008; MÜLLER, 2009), quanto com experimentos com TSV e YHV (MOUILLESSEAU; KLIMPEL; DHAR, 2003).

7. Controle da doença e prevenção

Para garantir o sucesso e a sustentabilidade do cultivo de camarões, a prevenção e o controle de doenças, é uma estratégia fundamental, devendo ser aliada à implantação de boas práticas de manejo (BONDAD-REANTASO et al., 2001). Atualmente, não existem tratamentos disponíveis para controlar a doença e a mortalidade. Uma alternativa é reduzir o risco da entrada do WSSV nas instalações de produção comercial de camarão através da implementação de medidas de biossegurança ou de exclusão, como a filtração e desinfecção (ABCC, 2005; LIGHTNER, 2005).

O monitoramento contínuo e rigoroso dos vários componentes da carcinicultura é necessário para reduzir a propagação da WSSV dentro de uma região e evitar a introdução do patógeno em uma nova área (SÁNCHEZ; RODRÍGUEZ, 2004). Entre estes componentes estão incluídos os tanques de larvicultura (HOSSAIN et al., 2004), a origem e qualidade das pós-larvas e do alimento vivo (PONGMANEERAT et al., 2001; SAHUL HAMEED et al., 2002), bem como a água de entrada e saída (CORSIN et al., 2005).

A água, o solo e as instalações agrícolas de cultivo de camarões são passíveis de contaminação com o WSSV. A falta de desinfecção adequada destas fontes é muitas vezes a causa de novos surtos da doença (CHANG; CHEN; WHANG, 1998b).

JUSTIFICATIVAS

- Além de hospedeiros e vetores como caranguejos, lagostas e siris estudos recentes relatam ainda a detecção do WSSV em amostras

de: água (ESPARZA-LEAL et al., 2009), fitoplâncton (LIU et al., 2007), zooplâncton (ZHANG et al., 2007) e sedimento (NATIVIDAD et al. 2006);

- Camarões em diferentes estágios de desenvolvimento alimentam-se, de forma direta ou indireta, de uma combinação de fitoplâncton e zooplâncton (MULLER-FEUGA, 2000);
- A água provavelmente é um importante caminho para a entrada do WSSV em uma unidade de aquicultura (COHEN et al., 2005) uma vez que partículas virais podem estar presentes na água (ARTS et al., 2007);
- O WSSV foi detectado em amostras de solo dos viveiros de cultivo de camarões (NATIVIDAD; NOMURA; MATSUMURA, 2008);
- Esta característica torna a erradicação do WSSV muito difícil, pois mesmo eliminando-se os camarões infectados de um determinado viveiro, o vírus pode continuar presente no ambiente.

OBJETIVOS

1. Objetivo Geral

Contribuir para a implantação de métodos moleculares de detecção do vírus da síndrome da mancha branca (WSSV), visando sua aplicação no monitoramento sanitário de áreas de cultivo de camarão no Brasil.

2. Objetivos Específicos

- Padronizar protocolos de extração de DNA em amostras de plâncton e sedimento, coletadas em viveiros de cultivo de camarões marinhos;
- Padronizar a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para a detecção do vírus da mancha branca nessas amostras;
- Comparar a sensibilidade da PCR *nested*, utilizando diferentes iniciadores, com a PCR em Tempo Real para a detecção do WSSV nessas amostras;

REVISTA ESCOLHIDA PARA SUBMISSÃO DO ARTIGO CIENTÍFICO

O trabalho final será encaminhado para publicação no periódico Aquaculture Research.

INTRODUÇÃO

A carcinicultura vem crescendo consideravelmente há mais de três décadas, graças ao desenvolvimento de novas tecnologias para a produção de camarões de alta qualidade. A produção brasileira está baseada no cultivo do camarão branco do Pacífico (*Litopenaeus vannamei*), espécie exótica introduzida no Brasil na década de 1980. Os resultados satisfatórios obtidos com esta espécie de camarão levaram a um período de expansão da atividade, que culminou com uma produção recorde de 90.190 toneladas em 2003 (ABCC, 2007). Porém, desde o seu surgimento em Taiwan no ano de 1992, a Síndrome da mancha branca (WSS) tem sido um grande obstáculo para o completo sucesso desse setor (LIGHTNER e REDMAN, 1998). No Brasil, o surgimento da enfermidade aliado a problemas de câmbio e comércio exterior, fez com que a atividade entrasse em crise a partir de 2004, embora, gradativamente, venha apresentando sinais de recuperação (CAVALLI, R.; FERREIRA, 2010).

O agente causador da doença, conhecido como Vírus da síndrome da mancha branca (WSSV), é um vírus baciliforme, envelopado, que possui como material genético um DNA de dupla fita (CHOU et al. 1995; WONGTEERASUPAYA et al. 1995) e mede entre 210 e 380 nm de comprimento e 70 a 167 nm de largura (WANG et al., 1995; CHANG; CHEN; WHANG, 1998a). Apesar de ter sido originalmente classificado como pertencente à família *Baculoviridae*, após o sequenciamento do seu genoma e análise filogenética foi verificado que o WSSV não apresentava homologia com as famílias de vírus existentes (VAN HULTEN et al., 2000), sendo então classificado em uma nova família, denominada *Nimaviridae* (VAN HULTEN et al., 2001; MAYO, 2002; OIE, 2003).

Além de infectar diversas espécies de camarão cultiváveis, outros crustáceos são hospedeiros do WSSV, tais como copépodos (ZHANG et al., 2007), caranguejos, lagostas (WANG et al., 1998; MAEDA et al., 1998; PENG et al., 1998; SAHUL HAMEED et al., 2003; MUSTHAQ et al. 2006; MARQUES, 2007) e siris (CHANG et al., 2001). Essa ampla variedade de hospedeiros, somada à sua alta patogenicidade e às características do sistema imunológico dos crustáceos que não possui mecanismo imune adaptativo, dificultam o controle da doença (ROCH, 1999). Todos os esforços são direcionados para o desenvolvimento de testes diagnósticos para detecção rápida e eficiente do WSSV de modo que possa ser detectado em estágios iniciais (SAHUL HAMEED et al., 2001).

Os sinais clínicos da doença incluem o surgimento de pontos brancos no exoesqueleto dos animais, letargia, coloração avermelhada do corpo, principalmente das extremidades, redução no consumo de alimento e natação de maneira irregular próximo às bordas do viveiro. A mortalidade em massa pode ocorrer dentro de até dez dias após o início da manifestação da doença (KARUNASAGAR; OTTA; KARUNASAGAR, 1997; LOTZ; SOTO, 2002).

Muitos métodos de diagnóstico molecular têm sido desenvolvidos para a detecção do WSSV, pois a análise apenas pelos sinais clínicos não é suficiente, uma vez que esses sinais podem ser resultados de alterações da qualidade da água. Técnicas originalmente utilizadas para o estudo e diagnóstico de doenças humanas, como a PCR e, mais recentemente, a PCR em Tempo Real, são empregadas com sucesso na detecção do WSSV (TAPAY; NADALA; LOH, 1999; LO et al., 1996; TANG; LIGHTNER, 2000; NATIVIDAD et al., 2006; TAKAHASHI et al., 1996). No entanto, como cada técnica apresenta vantagens e desvantagens em termos de sensibilidade, custos e demanda por equipamentos e pessoal treinado, é importante ter conhecimento de qual metodologia mostra-se mais adequada a cada situação.

Existem alguns trabalhos comparando a sensibilidade entre os métodos de diagnóstico mais empregados (DURAND et al, 2003; SHEKHAR; AZAD; RAVICHANDRAN, 2006; SRITUNYALUCKSANA et al., 2006). Porém, a grande maioria desses trabalhos faz uso de animais experimentalmente infectados, o que permite um maior controle sobre o experimento e sobre os dados gerados, mas não leva em consideração a interação entre o animal e os vários fatores abióticos, podendo gerar resultados que não reflitam a realidade dos cultivos (SOUZA, 2008). Recentemente, Souza (2008), comparou diferentes métodos moleculares para a detecção do WSSV em camarões de cultivo naturalmente infectados pelo vírus e coletados em diferentes intervalos de tempo após o surto inicial. Entre outros pontos, Souza (2008) destaca a importância da escolha e da aplicação correta do método de diagnóstico molecular a ser empregado, particularmente no caso de animais assintomáticos.

Recentemente, tanto o zooplâncton quanto o fitoplâncton, presentes nos sistemas de cultivos, têm sido considerados como vetores passivos de transmissão do WSSV (LIU et al., 2007; ZHANG et al., 2007). Segundo Esparza-Leal et al. (2009), a água dos viveiros é um veículo para a dispersão do WSSV, pois o vírus pode manter-se suspenso na água ou estar ligado a microalgas ou, ainda, ser transportado pelo zooplâncton.

Rotineiramente na carcinicultura, a água dos viveiros é lançada no meio adjacente (lagoas costeiras ou estuários), onde habitam outras espécies de crustáceos potencialmente suscetíveis a infecção pelo WSSV (ESCOBEDO-BONILLA et al., 2008). Trocas de água são normalmente feitas até mesmo em viveiros afetados por surtos de WSSV aumentando o risco de transmissão de WSSV para o meio ambiente e para fazendas de camarão vizinhas (ESPARZA-LEAL et al., 2009). Sabe-se que tanto a água quanto o solo podem atuar como reservatórios naturais de vírus e que estes podem permanecer latentes e viáveis por longos períodos de tempo, nestes ambientes, fornecendo um caminho possível para a transmissão e dispersão viral (NATIVIDAD et al. 2006; NATIVIDAD; NOMURA; MATSUMURA, 2008) constituindo um fator real de risco para as espécies endêmicas. Entretanto, poucos trabalhos têm sido feitos para determinar a presença do WSSV na água e no sedimento de viveiros de cultivo de camarões e poucos protocolos para a detecção WSSV nestas amostras foram descritos. O principal desafio relativo à extração de DNA presente no solo é a presença de ácidos húmicos e compostos fenólicos que são extraídos juntamente com o DNA de interesse e que inibem a enzima DNA polimerase utilizada na PCR (SANTOS; DIREITO; TEIXEIRA, 2002).

Desta forma, tornam-se importante a padronização e avaliação de métodos moleculares para a detecção do vírus da síndrome da mancha branca em amostras de água e sedimento possibilitando o reconhecimento de áreas infectadas pelo vírus e o acompanhamento da eficácia de medidas sanitárias eventualmente adotadas, complementando o resultado obtido por outros métodos rotineiros de diagnóstico. Atualmente, na ausência de um tratamento efetivo contra o WSSV, medidas preventivas e acompanhamento dos cultivos, são estratégias cruciais para o controle da propagação da doença (PRUDER, 2004).

Até onde é de nosso conhecimento, não há nenhum trabalho comparando diversas técnicas de detecção do WSSV em água e sedimento de viveiros de cultivo de camarões *Litopenaeus vannamei*. Assim sendo, nesse estudo foram comparados alguns métodos moleculares de diagnóstico, recomendados pela OIE, como a PCR *nested* e a PCR em Tempo Real (*qPCR*), levando-se em consideração a eficácia e a sensibilidade de cada método para detectar o WSSV em amostras de água e sedimento provenientes de fazendas de cultivo de *L. vannamei* no Sul do Brasil e em lagoas próximas as regiões de cultivo do litoral de Santa Catarina.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Amostras e locais de coleta

Amostras de plâncton e sedimentos foram coletadas em quatro fazendas de cultivo de camarões marinhos, *Litopenaeus vannamei*, situadas nos municípios de Tijucas e Laguna, Santa Catarina.

Como sítios representativos do ambiente natural (vide abaixo), foram coletadas amostras de plâncton em um rio e em quatro lagoas do Complexo Lagunar.

Além dessas coletas, foram obtidas amostras de plâncton junto ao Laboratório de Peixes Marinhos da Universidade Federal de Santa Catarina, município de Florianópolis.

Durante as coletas realizadas nas duas fazendas localizadas em Tijucas, foram ainda coletados espécimes de camarão, *L. vannamei*.

1.1. Amostras de plâncton para a padronização de protocolos de extração de DNA

Amostras de fitoplâncton e zooplâncton foram coletadas no Laboratório de Peixes Marinhos da Universidade Federal de Santa Catarina localizado na Barra da Lagoa, município de Florianópolis, a fim de determinar a forma mais eficiente de preservar amostras de plâncton até o momento da extração de DNA e o melhor método para a obtenção de DNA íntegro.

1.2. Amostras de plâncton para a padronização de protocolos de PCR para o WSSV

As amostras de plâncton para a padronização das condições de PCR para o WSSV foram coletadas em duas fazendas de cultivo de camarão, *L. vannamei*, denominadas neste trabalho como Fazenda 1 e Fazenda 2. Essas fazendas, localizadas no município de Tijucas, Santa Catarina, foram selecionadas para o estudo por possuírem diferentes pontos de captação de água para o abastecimento de seus viveiros, bem como históricos distintos na incidência da síndrome da mancha branca (vide abaixo). Para as coletas das amostras de plâncton no ambiente adjacente aos cultivos, foram selecionadas as Lagoas de Imaruí, Santa Marta Pequena, Santo Antônio, Camacho e o Rio Parobé. Amostras adicionais de plâncton foram também coletadas em outras duas fazendas de cultivo de camarões, *L. vannamei*, localizadas em Laguna, as quais foram denominadas neste trabalho como Fazenda 3 e Fazenda 4.

1.3. Amostras de sedimento para padronização de protocolos de PCR para o WSSV

Amostras de sedimento de viveiros para a padronização da PCR foram coletadas nas mesmas duas fazendas de cultivo de camarões, *L. vannamei*, mencionadas acima e aqui denominadas como Fazenda 1 e Fazenda 2, ambas localizadas no município de Tijucas, Santa Catarina. Essas fazendas foram selecionadas para a coleta das amostras de sedimento pelas mesmas razões apontadas acima. Da mesma forma, como mencionado acima, amostras adicionais de sedimento foram obtidas de outras duas fazendas de cultivo de camarões, *L. vannamei*, localizadas em Laguna, Santa Catarina, denominadas neste trabalho como Fazenda 3 e Fazenda 4.

1.4. Coleta de camarões para investigar a presença do WSSV por PCR

Amostras de camarão para a confrontação dos resultados da PCR foram coletadas em duas fazendas de cultivo de camarões, *Litopenaeus vannamei*, aqui denominadas como Fazenda 1 e Fazenda 2, ambas localizadas no município de Tijucas, Santa Catarina. Como mencionado anteriormente, estas fazendas foram selecionadas para o presente estudo por possuírem diferentes pontos de captação de água para o abastecimento de seus viveiros e diferentes históricos na incidência da WSS. Enquanto que para a primeira fazenda não haviam sido registrados relatos da doença da mancha branca e os animais apresentavam-se aparentemente sadios, na segunda, a presença do vírus havia sido relatada.

2. Obtenção das amostras

2.1. Amostragem de plâncton para padronização de protocolos para a extração de DNA

Para determinar a forma mais eficiente de preservar amostras de plâncton e o melhor método para a obtenção de DNA íntegro a partir das amostras de plâncton, doze amostras de fitoplâncton (n=12) e doze amostras de zooplâncton (n=12) foram coletadas no Laboratório de Peixes Marinhos/UFSC. Das doze amostras de fitoplâncton coletadas, seis foram armazenadas congeladas (duas em nitrogênio líquido, duas a -80°C e duas a -20°C), duas armazenadas sob refrigeração a 4°C e quatro preservadas em etanol (duas em etanol 95% e duas em etanol 70%). As doze amostras de zooplâncton coletadas no Laboratório de

Peixes Marinhos foram armazenadas nas mesmas condições descritas acima para as amostras de fitoplâncton. As amostras foram transportadas para o Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica, onde foram analisadas.

2.2. Amostragem de plâncton para PCR

Em cada uma das quatro fazendas de cultivo de camarões, denominadas neste estudo de Fazendas 1, 2, 3 e 4, foram coletadas cinco amostras de plâncton (n=5). O mesmo número de amostras foi coletado em cada uma das Lagoas: Imaruí, Santa Marta Pequena, Santo Antônio, Camacho e Rio Parobé. A coleta foi realizada com o auxílio de rede de plâncton, com malha de 30 μ , durante 30 minutos. Após a coleta, duas amostras foram imediatamente mantidas refrigeradas (em gelo e, posteriormente sob refrigeração a 4°C), enquanto outras duas foram conservadas em papel filtro, tratado com FTA (*Gene Card*, BIOAMERICA). Outra amostra foi preservada em formol 4% (1:1 v/v) para posterior identificação da comunidade planctônica. As amostras foram transportadas para o Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica, onde foram analisadas.

2.3. Amostragem de sedimento para PCR

Duas amostras de sedimento de viveiro foram coletadas em cada uma das quatro fazendas de cultivo de camarões, denominadas neste estudo de Fazendas 1, 2, 3 e 4. Em cada uma das quatro fazendas, uma das amostras foi obtida em um ponto central do viveiro selecionado, enquanto a outra amostra foi coletada em um ponto próximo a comporta de despesca. No total, foram coletadas oito amostras (n=8) (duas amostras por fazenda, n=2/fazenda). Cada amostra, com peso aproximado de 500 gramas, foi coletada com o auxílio de uma pequena draga. Após a coleta, as amostras foram imediatamente protegidas da luz e transportadas para o Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica, onde foram analisadas.

2.4. Amostragem de camarão para PCR

Foram coletados dez camarões da espécie *Litopenaeus vannamei*, em cada uma das duas fazendas de cultivo, denominadas neste estudo de Fazendas 1 e 2. Os animais foram coletados dos mesmos viveiros em que foram amostrados plâncton e sedimento. Na amostragem de camarões, foram coletados um total de 20 espécimes (n=10/fazenda). No momento da coleta, os animais da Fazenda 1, que

não possuía histórico de incidência de WSSV, apresentavam-se aparentemente sadios e estocados em uma densidade de 20 camarões/m² com 82 dias de cultivo, enquanto que os da Fazenda 2, na qual a presença do vírus havia sido detectada, estavam estocados em uma densidade de 15 camarões/m² com 68 dias de cultivo.

Coletados aleatoriamente com lances de tarrafa, nenhum dos animais apresentava manchas brancas pelo corpo. Por outro lado, na Fazenda 2), foi observada discreta coloração avermelhada do corpo e apêndices dos animais coletados. Outros sintomas característicos da doença, como anorexia e natação com padrão irregular pelo viveiro não haviam sido registrados e/ou não foram observados durante a coleta.

De cada animal foram retirados dois pleópodos, os quais foram congelados em nitrogênio líquido, imediatamente após a coleta e transportados para o Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica, onde foram armazenados a -80°C até a análise. Este material foi utilizado para PCR com diferentes iniciadores para o WSSV, a fim de comparar os resultados com aqueles obtidos através das análises do plâncton e sedimento.

3. Identificação de microalgas

Buscando estabelecer relações entre as comunidades planctônicas e bentônicas de microalgas e a ocorrência de WSSV nos viveiros de produção de camarão, amostras de plâncton foram analisadas, com o objetivo de se caracterizar o perfil de microalgas presentes. Para a identificação e quantificação das amostras de microalgas, foi utilizada câmara de Sedgewick-Rafter e microscópio óptico binocular.

Amostras de água dos viveiros de cultivos de camarões das Fazendas 1 e 2 foram analisadas quanto as densidades planctônicas, expressas em indivíduos por mililitro (ind/mL). As densidades foram estimadas de acordo com a metodologia representada pela seguinte fórmula:

$$DP = [(nm / nq) \times 1000] / F$$

Em que:

DP - Densidade planctônica;

nm - Número de microalgas encontradas na câmara;

nq - Número de quadrados percorridos na câmara;

F - Fator de correção de filtragem e diluição.

Como variável de avaliação da composição das comunidades de microalgas foram verificadas: a frequência absoluta (FA), a frequência relativa (FR) e a frequência de ocorrência (FO) dos grandes grupos encontrados nos diferentes viveiros.

A partir dos dados de frequência absoluta foram realizados os cálculos de frequência relativa (FR), que é a razão entre números de indivíduos de um determinado grupo (n) em relação ao número total de indivíduos da amostra (T) conforme a equação a seguir:

$$FR = \frac{n \times 100}{T}$$

Segundo Tinoco (1989), a frequência de ocorrência (FO) é a relação entre o número de amostras onde a espécie ocorreu (p), e o número total de amostras analisadas (P), sendo representada pela seguinte equação:

$$FO = \frac{p \times 100}{P}$$

Para a interpretação dos resultados foram adaptadas as escalas propostas por Dajoz (1983):

- Espécies principais: valores de F acima de 5%;
- Espécies acessórias: valores de F entre 4,9 e 1%;
- Espécies traços: valores de F inferiores a 1%.
- Espécies constantes: valores de FO acima de 50%;
- Espécies acessórias: valores de FO entre 25 e 50%;
- Espécies acidentais: valores de FO inferiores a 25%.

3.1. Análise

Os dados gerados foram submetidos ao método estatístico descritivo.

4. Extração do DNA genômico com CTAB e proteinase K

Os pleópodos dos camarões coletados tiveram a cutícula removida com o auxílio de uma lâmina de bisturi estéril, sendo o tecido, em seguida, submetido ao protocolo de extração de DNA mencionado abaixo.

O DNA genômico foi extraído segundo protocolo descrito por Lo et al. (1996) e Moser (2005), no qual os tecidos são inicialmente digeridos em solução de lise contendo SDS 1% em TE 1X e proteinase K (20 mg/mL), sendo em seguida, mantidos a 65°C por 1 hora e 20 minutos com maceração dos tecidos na metade da incubação. Uma segunda incubação foi realizada por 1 hora a 55°C, após a adição de NaCl 5M e CTAB 10%. Após a incubação, foi acrescentado clorofórmio:álcool isoamílico (24:1 v/v) e as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 8 min a 4°C para separar os ácidos nucléicos de outras moléculas. Ao sobrenadante, foi adicionado

isopropanol e o DNA precipitado foi lavado com etanol 70% e ressuspenso em TE 1X. O RNA foi degradado pela ação de RNase (1 mg/mL) e, após a adição de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1 v/v) e centrifugação de 14.000 rpm por 8 min a 4°C, foi adicionado ao sobrenadante acetato de sódio 3M (pH 5,2) e etanol 95%. O DNA precipitado por centrifugação a 2.500 rpm foi lavado com etanol 70% e ressuspenso em 30 µl de água de biologia molecular após a secagem.

As amostras de plâncton e sedimento foram inicialmente concentradas através de centrifugações a 4°C a 16.300 x g até a obtenção de 100-300 mg de material sólido. O protocolo de extração de DNA foi o mesmo utilizado para as amostras de camarão com algumas modificações. A primeira em relação à incubação, a qual foi realizada a 65°C por 2 horas. A segunda, em relação ao tratamento do sobrenadante. Ao sobrenadante, coletado após a primeira centrifugação a 14.000 rpm por 8 min a 4°C, foi adicionado isopropanol, o que foi seguido de incubação a -20°C por 12 horas. O DNA precipitado foi lavado com etanol 70% por no mínimo 3 vezes e ressuspenso em TE 1X depois de seco. O sobrenadante, coletado após a segunda centrifugação a 14.000 rpm por 8 min a 4°C e após a adição de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1 v/v), foi mantido a -20°C por 12 horas. O DNA precipitado foi lavado com etanol 70% por no mínimo 3 vezes e ressuspenso em 30 µl de água de biologia molecular, após a secagem.

5. FTA *Gene Card*

Amostras de plâncton foram armazenadas no cartão FTA (BIOAMERICA), produzido pela Whatman Inc., o qual consiste em matriz quimicamente tratada destinada à coleta, transporte, armazenagem e extração de ácidos nucleicos. Esta tecnologia patenteada permite que o DNA de diferentes tipos de amostras como sangue, células bucais, saliva, secreções entre outras seja imobilizada e conservada em temperatura ambiente por anos. O cartão FTA possui elementos químicos que lisam as células das amostras coletadas, imobilizando os DNAs presentes e protegendo-os contra a degradação resultante de agentes oxidativos. Um pequeno pedaço do filtro (cerca de 3mm) contendo a amostra foi retirado do cartão e colocado em um microtubo. O pedaço do filtro foi lavado com Reagente FTA por 3 vezes para eliminação dos inibidores e, em seguida, mais 2 lavagens foram feitas com tampão de EDTA. Para testar a eficiência desta técnica com

amostras de plâncton o pedaço de filtro tratado foi então utilizado em PCR com iniciadores específicos para genes constitutivos de fitoplâncton e zooplâncton.

6. Quantificação e eletroforese de DNA

A quantificação de DNA foi realizada em espectrofotômetro através da determinação das absorbâncias a 260 e 280 nm e o cálculo da razão entre elas, a integridade das amostras foi avaliada através de eletroforese em gel de agarose 1% diluído em TBE 1X (Tris 89 mM, Ácido Bórico 89 mM, EDTA 2 mM, pH 8,0), sendo o gel posteriormente corado com brometo de etídeo (0,5µg/mL). As amostras foram diluídas em tampão de amostra 10X (Sacarose 20%, Azul de Bromofenol 0,1% TBE 1X) (1:2 v/v), sendo em seguida aplicadas no gel. A eletroforese foi realizada a 100V, em tampão TBE 1X e a visualização a 280 nm em transluminador FWL DC 150 DOC. Os resultados foram fotodocumentados em câmera digital Olympus.

7. Seleção dos genes constitutivos de plâncton

Como genes constitutivos para as análises das amostras de plâncton por PCR foram selecionados o gene da enzima Ribulose 1,5 Bi-fosfato Carboxilase (RuBisCO) para as amostras de fitoplâncton e o gene do RNA ribossomal (rRNA) 18 S para as amostras de zooplâncton. Estes mesmos genes foram também utilizados para a amplificação das amostras de sedimento. Como gene constitutivo para as amostras de camarão, foi selecionado o gene que codifica o RNA ribossomal (rRNA) 18S de decápodes.

Os iniciadores para a amplificação dos respectivos genes foram desenhados com base nas sequências depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). *Cyanophyceae*, *Bacillariophyceae*, *Dinophyceae* e *Chlorophyceae* para RuBisCo e *Sarcocystis*, *Cnidaria*, *Nematoda*, *Bryozoa*, *Chaetognatha*, *Echinodermata*, *Chordata*, *Mollusca*, *Annelida* e *Crustacea* para zooplâncton.

O alinhamento destas sequências foi realizado pelo programa BioEdit (<http://bioedit.software.informer.com/download/>) que identificou as regiões mais bem conservadas do genoma plancônico. Os iniciadores para os genes constitutivos da RUBISCO e do rRNA18S foram desenhados com o auxílio dos programas Fast PCR (<http://primerdigital.com/fastpcr/>) e Primer Quest

(<http://www.idtdna.com/Scitools/Applications/Primerquest/>) que avaliaram o conjunto de iniciadores que apresentavam semelhante temperatura de anelamento, proporção entre C e G em torno de 50% e tamanho do produto da amplificação por PCR entre 200 e 300 pb.

8. PCR para a amplificação dos genes constitutivos selecionados

Para verificar a qualidade e a integridade do DNA extraído das amostras de plâncton, comprovar a presença de material genômico específico e, ainda verificar a presença de eventuais inibidores enzimáticos nas amostras, os quais poderiam acarretar resultados falsos negativos nos ensaios de PCR para a detecção do WSSV, foram realizadas reações de amplificação por PCR para os genes constitutivos selecionados. Para amostras de camarão, os iniciadores descritos por Lo et al. (1996) e de acordo com o protocolo recomendado pela OIE (2003), desenhados com base na sequência do gene que codifica o rRNA18S de decápodes foram os seguintes: 143F (5' TGC CTT ATC AGC TNT CGA TTG TAG 3') e 145R (5' TTC AGN TTT GCA ACC ATA CTT CCC 3'), onde N representa G, A, T ou C, sendo o tamanho do fragmento esperado de 848pb. As amostras de DNA extraídas de plâncton e sedimento foram amplificadas com base na sequência do gene que codifica a RuBisCO de fitoplâncton com o uso de iniciadores sintetizados: RUBF (5' TGC TTT ACG TTT AGA AGA TAT GCG TAT TCC 3') e RUBR (5' AGA AAC GTT CTC TCC AAC GCA 3'), gerando um fragmento de 244pb e, com base na sequência do gene que codifica o rRNA 18S de zooplâncton, a partir dos iniciadores sintetizados: ZOOF (5' GAG GTT CGA AGA CGA TTA GAT ACC GT 3') e ZOOR (5' GCA ACC ATA CTT CCC CCG G 3'), gerando um fragmento de 142pb. O volume final de reação foi de 25 µL e além das amostras de interesse foram incluídas, como controle, amostras negativas e positivas para RuBisCO de fitoplâncton e rRNA 18S de zooplâncton, provenientes da coleção do Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica, que atuaram como controle da reação. As reações de PCR foram realizadas em um termociclador (Biometra, UNISCIENCE) e as condições de amplificação das PCRs para genes constitutivos desenvolvidas neste estudo estão descritas na Tabela 2. A análise dos produtos de PCR foi realizada através de eletroforese em gel de agarose 2%, sendo a visualização dos fragmentos amplificados realizada como descrito abaixo (item 10).

Tabela 2: Condições dos ensaios de PCR padronizados no presente estudo para a amplificação dos genes constitutivos selecionados.

PCRs para genes constitutivos	Programas das PCRs
PCR Rubisco	94°C por 1 min e 30 s, seguido de 30 ciclos de 94°C por 15 s, 47°C por 30 s, 72°C por 30 s e uma extensão final de 5 min a 72°C.
PCR 18S zooplâncton	94°C por 1 min e 30 s, seguido de 30 ciclos de 94°C por 15 s, 48,5°C por 30 s, 72°C por 30 s e uma extensão final de 5 min a 72°C.

9. PCR de dois passos (PCR *nested*) para a detecção do WSSV

A detecção da sequência correspondente à parte do genoma do vírus da síndrome da mancha branca (WSSV) foi realizada através da reação em cadeia da polimerase (PCR) de dois passos (PCR *nested*), que consiste na detecção e amplificação do DNA do patógeno *in vitro* em duas etapas. Nestas condições, a amplificação da sequência específica do WSSV é realizada de forma sequencial em duas reações separadas, utilizando-se dois pares de iniciadores distintos para cada reação, aumentando a sensibilidade do método de detecção.

O WSSV foi identificado nas amostras através de PCR *nested* (NUNAN; POULOS; LIGHTNER, 1998) com os iniciadores descritos por Lo et al. (1996) e de acordo com o protocolo recomendado pela OIE (2003). Das amostras de DNA de camarão, plâncton ou sedimento, uma alíquota de 1µL foi submetida a reações de amplificação por PCR. Na primeira etapa (*first*), foram utilizados os iniciadores WS146F1 (5' ACT ACT AAC TTC AGC CTA TCT AG 3') e WS146R1 (5' TAA TGC GGG TGT AAT GTT CTT ACG A 3') que geram um fragmento de 1447pb quando o WSSV é detectado. Na segunda etapa (*nested*) foram utilizados os iniciadores WS146F2 (5' GTA ACT GCC CCT TCC ATC TCC A 3') e WS146R2 (5' TAC GGC AGC TGC TGC ACC TTG T 3'), os quais, a partir de 1µL do produto da primeira reação de PCR, geram um fragmento de 941pb, quando o WSSV é detectado.

Com os iniciadores IK, descritos por KARUNASAGAR, publicado por Umesha et al. (2006), as mesmas amostras de camarão, plâncton e sedimento utilizadas anteriormente com os iniciadores WS146 foram submetidas a reações de amplificação por PCR. Na primeira etapa (*first*), foram utilizados os iniciadores WSIK 1 (5' TGG

CAT GAC AAC GGC AGG AG 3'') e WSIK-2 (5' GGC TTC TGA GAT GAG GAC GG 3''), que geram um fragmento de 486pb quando o WSSV é detectado, enquanto que na segunda etapa (*nested*) foram utilizados os iniciadores WSIK-3 (5' TGT CAT CGC CAG CAC GTG TGC 3') e WSIK-4 (5' AGA GGT CGT CAG AGC CTA GTC 3') com 1µL do produto da primeira reação de amplificação da PCR com iniciadores IK, sendo o tamanho esperado do fragmento gerado, quando o WSSV é detectado, correspondente a 310pb.

O volume final de reação das reações de PCR foi de 25 µL e além das amostras de interesse foram incluídas, como controle, amostras negativas e positivas para WSSV, provenientes da coleção do Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica, que atuaram como controle da reação. As reações de PCR foram realizadas em um termociclador (Biometra, UNISCIENCE), utilizando as condições descritas na Tabela 3. A análise dos produtos de PCR foi realizada através de eletroforese em gel de agarose 2%, seguida da observação dos géis sob luz UV (item 10).

Tabela 3: Condições dos ensaios utilizados nas *nested* PCRs para WSSV no presente estudo.

Tipo de PCR	Programas das PCRs
<i>Nested</i> PCR WS146	Primeiro passo: 94°C por 2 min seguido de 39 ciclos de 94°C por 1 min, 55°C por 1 min 30 s, 72°C por 2 min e extensão final de 5 min a 72°C. Segundo passo: um ciclo a 94°C por 3 min seguido de 35 ciclos de 94°C por 1 min, 55°C por 1 min, 72°C por 1 min e extensão final de 5 min a 72°C.
<i>Nested</i> PCR WSIK	Primeiro e segundo passos: 94°C por 1,5 min seguido de 30 ciclos de 94°C por 15 s, 52°C por 30 s, 72°C por 30 s e extensão final de 5 min a 72°C.

10. Eletroforese dos produtos de PCR

Após as reações de amplificação da PCR, a presença de fragmentos de tamanhos específicos esperados foi avaliada através de eletroforese em gel de agarose 2% em TBE 1X (Tris 89 mM, Ácido Bórico 89 mM, EDTA 2 mM, pH 8,0), corado com brometo de etídeo

(0,5µg/mL). As amostras amplificadas foram diluídas em tampão de amostra 10X (Sacarose 20%, Azul de Bromofenol 0,1% TBE 1X) (1:2 v/v), sendo, em seguida, aplicadas no gel. A eletroforese foi realizada a 100V, utilizando-se o tampão TBE 1X e a visualização ocorreu a 280 nm em transluminador FWL DC 150 DOC. O tamanho dos fragmentos obtidos foi comparado com marcador de peso molecular conhecido (100pb ou 1Kb), incluído entre as amostras submetidas a eletroforese. Os resultados foram fotodocumentados em câmera digital Olympus.

11. PCR em Tempo Real (*qPCR*) para a detecção do WSSV

A quantificação da carga viral do WSSV nas amostras foi determinada através de PCR em Tempo Real (*qPCR*), no termociclador Rotor Gene, modelo 6000 (Corbett Lifesciences).

Para tanto, as reações foram realizadas na presença do corante SYBR[®] Green. À mistura da reação, com DNA Polimerase, tampão de reação, dNTPs, MgCl₂ 3M e SYBR Green I na concentração 1X, foi adicionado 1µL de amostra, contendo 100 ng de DNA, para um volume final de reação de 20 µL. A sequência dos iniciadores WS2F (5' TGC CTT GCC GGA AAT TAG TGT GTG 3') e WS2R (5' ACA ACA TCC AAC AAT GGT CCC GTG 3') e as condições de amplificação através de *qPCR* foram aquelas descritas por Müller (2009), sendo o tamanho do produto esperado de 81 pb. A reação de amplificação ocorreu conforme demonstrado na Tabela 4, e a especificidade do produto amplificado foi verificada através da curva de dissociação para a determinação da temperatura de *melting*, através do aumento de 1°C a cada 5 segundos, a faixa de 72°C a 95°C.

Tabela 4: Condições utilizadas nos ensaios de *qPCR* realizados no presente estudo.

Tipo de PCR	Programas das PCRs
PCR em Tempo Real	95°C por 15 min seguido de 40 ciclos de 95°C por 30 s, 55°C por 30 s, 72°C por 10 s.

As amostras foram testadas em duplicata e a curva padrão utilizada para a quantificação das amostras foi obtida através de diluições seriadas (10X) de um plasmídeo recombinante contendo uma sequência do genoma do WSSV (número de cópias/µL conhecido) (MÜLLER, 2009). Amostras positivas e negativas por PCR convencional foram incluídas nos ensaios e quantificadas através da comparação com esta curva. O *software* disponível no aparelho Rotor

Gene 6000 transformou os valores brutos de fluorescência em uma escala logarítmica e, assim, o *threshold* foi delimitado, baseando-se no coeficiente de correlação (R^2) e na eficiência da curva. O valor de CT (*cycle threshold*) foi determinado como o ciclo em que a amostra cruza o *threshold*. O CT é definido como o ciclo da reação de PCR no qual o sinal fluorescente do corante sinalizador atravessa uma linha arbitrária denominada *threshold*. O valor numérico do CT é inversamente proporcional à quantidade inicial do transcrito de interesse na reação (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008).

RESULTADOS

1. Levantamento e identificação dos grupos de algas presentes nas amostras de plâncton

As densidades planctônicas presentes nos viveiros de cultivo de camarões das Fazendas 1 e 2 foram respectivamente 77.000 e 109.000 indivíduos/mL. Em ambas as coletas predominaram as espécies pertencentes ao filo Chlorophyta, seguido do filo Chrysophyta ao qual pertencem as diatomáceas cêntricas e penadas. Nas amostras analisadas as principais representantes do filo Chrysophyta foram as diatomáceas bentônicas. As espécies de microalgas pertencentes ao filo Euglenophyta foram classificadas como espécies traço de acordo com a escala sugerida por Dajoz (1983), pois as suas frequências relativas foram inferiores a 1% em ambas as coletas. Entretanto as espécies de microalgas pertencentes ao filo Cyanophyta foram classificadas como espécies traço na Fazenda 1 e como espécies acessórias na Fazenda 2, sendo a frequência relativa inferior a 1% para a primeira fazenda e entre 4,9 e 1% para a segunda, como mostra a Figura 4.

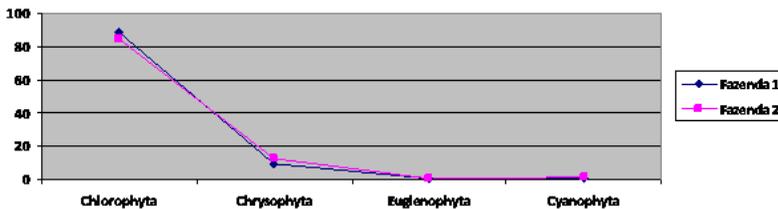


Figura 4: Frequência relativa de microalgas identificadas nas amostras de plâncton coletadas na Fazenda 1 e na Fazenda 2.

A frequência de ocorrência dos grandes grupos encontrados nos diferentes viveiros foi de 100%, sendo classificadas como constantes. A comparação entre os resultados obtidos demonstra, que nas amostras da Fazenda 2 o número de microalgas pertencentes aos filios Chrysophyta e Cyanophyta foram superiores aos apresentados pela Fazenda 1.

A identificação dos grupos de microalgas presentes nas amostras de plâncton foi realizada somente para as coletadas das Fazendas 1 e 2 por estas possuírem diferentes históricos quanto a presença do WSSV e serem as únicas a apresentar além de amostras de plâncton, amostras de camarão e sedimento para comparação dos resultados quanto a detecção do vírus.

2. Integridade do DNA genômico extraído de amostras de camarão

Como mostra o perfil eletroforético representativo (Figura 5), o DNA genômico extraído de todas as amostras de camarão mostrou integridade e qualidade compatíveis para ser utilizado posteriormente nas reações de PCR.

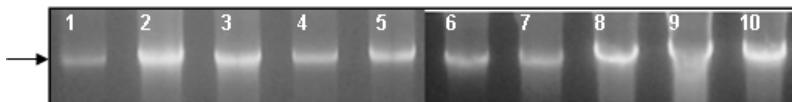


Figura 5: Eletroforese representativa em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio, mostrando a integridade e a qualidade do material genômico obtido a partir de amostras de camarão. **1-5)** DNA extraído de animais coletados na Fazenda 1. **6-10)** DNA extraído de animais coletados na Fazenda 2.

Este resultado foi confirmado pela amplificação do gene que codifica o rRNA 18S de decápodes, como demonstrado mostrado na Figura 6 (A e B).

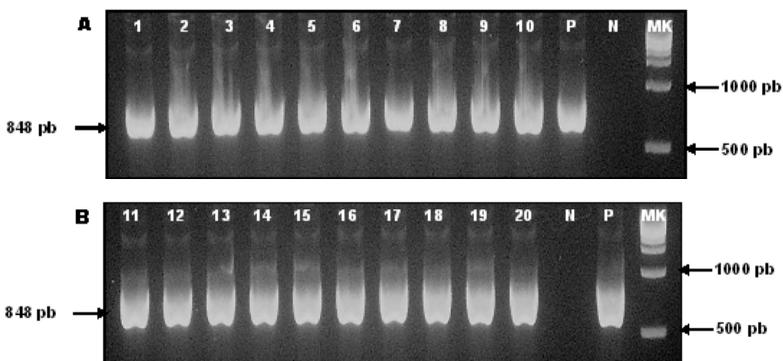


Figura 6: Eletroforese em gel de agarose 2% representativa dos produtos de PCR resultantes da amplificação do gene constitutivo rRNA 18S de decápodes. **(A) 1-10)** Amostras de DNA extraído de animais coletados na Fazenda 1. **(B) 11-20)** Amostras de DNA extraído de animais coletados na Fazenda 2. **P)** Controle positivo (848pb). **N)** Controle negativo. **MK)** Marcador de peso molecular 1 kb.

O tamanho do fragmento amplificado foi de 848 pb, como esperado. Este resultado indicou ainda a ausência de inibidores enzimáticos nas amostras, cuja presença poderia inibir a reação de amplificação para a detecção do WSSV.

3. Integridade do DNA extraído de amostras de plâncton

A integridade do DNA extraído das amostras de plâncton foi avaliada e comparada, conforme descrito por Lo et al. (1996) e Moser (2005), com as modificações citadas anteriormente (item 4) e imobilizado no FTA *gene card* (item 5).

3.1. DNA extraído de plâncton através do protocolo contendo CTAB e proteinase K

As amostras de plâncton submetidas ao protocolo de extração de DNA genômico baseado em Lo et al. (1996) e Moser (2005), com modificações, foram avaliadas quanto a sua integridade (Figura 7) para posteriormente serem utilizadas nas reações de PCR.

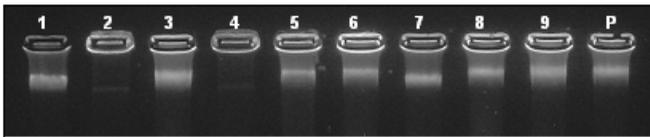


Figura 7: Eletroforese representativa em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio, mostrando a integridade e a qualidade do material genômico extraído das amostras de plâncton. **1-4)** Amostras de DNA extraído de plâncton coletados nas Fazendas 1, 2, 3 e 4 respectivamente. **5-9)** Amostras de DNA extraído de amostras de plâncton coletadas nas Lagoas Imarui, Santa Marta Pequena, Santo Antônio, Camacho e Rio Parobé respectivamente. **P)** Controle positivo da extração de DNA.

Este resultado foi confirmado por PCR pela amplificação do gene que codifica a sequência da enzima RuBisCO, gerando um fragmento de 244pb, como mostra a Figura 8 (A e B).

Além de comprovar a presença de DNA de fitoplâncton íntegro este resultado indica ainda a ausência de inibidores enzimáticos nas amostras cuja presença poderia inibir a reação de amplificação para a detecção do WSSV por PCR.

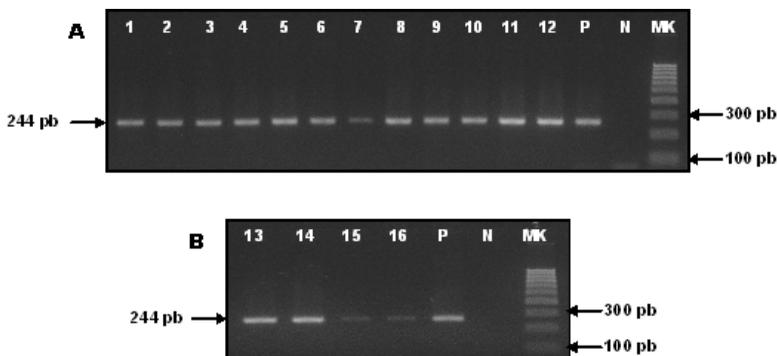


Figura 8: Eletroforese em gel de agarose 2% representativa dos produtos de PCR resultantes da amplificação do gene constitutivo da enzima RUBISCO em amostras de DNA extraído de plâncton. **(A) 1-12)** Amostras de DNA extraído de plâncton coletados em Laguna. **(B) 13-16)** Amostras de DNA extraído de plâncton coletados em Tijucas. **P)** Controle positivo. **N)** Controle negativo. **MK)** Marcador de peso molecular 100 pb.

Paralelamente, a confirmação destes resultados ainda realizada pela amplificação por PCR do gene que codifica o rRNA 18S, gerando fragmentos de 142pb, como mostra a Figura 9 (A e B).

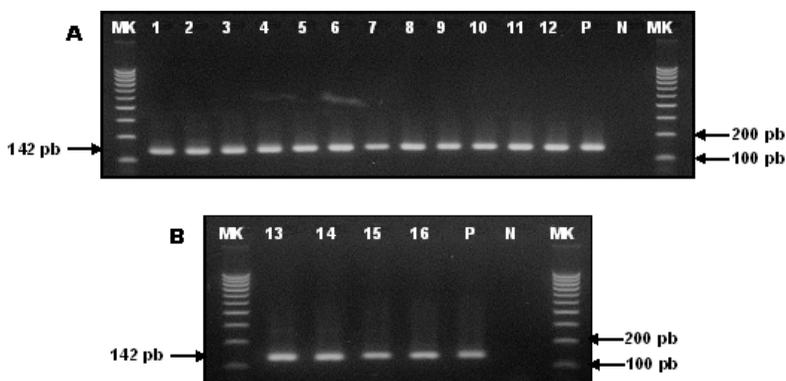


Figura 9: Eletroforese em gel de agarose 2% representativa dos produtos de PCR resultantes da amplificação do gene constitutivo rRNA 18S em amostras de DNA extraído de plâncton. **(A) 1-12)** Amostras de plâncton coletadas em Laguna. **(B) 13-16)** Amostras de plâncton coletadas em Tijucas. **P)** Controle positivo. **N)** Controle negativo. **MK)** Marcador de peso molecular 100 pb.

Estes resultados indicaram ainda a ausência de inibidores enzimáticos nas amostras, cuja presença poderia inibir a reação de amplificação para a detecção do WSSV.

3.2. DNA extraído de plâncton imobilizado em FTA *gene card*

As amostras de plâncton imobilizadas no cartão FTA foram avaliadas quanto a sua integridade, através de PCR para genes os mesmos genes constitutivos. A amplificação do gene que codifica a RuBisCO nas amostras de plâncton confirmou a qualidade das amostras como pode ser verificado na Figura 10 (A e B), através da amplificação de um único fragmento de 244pb.

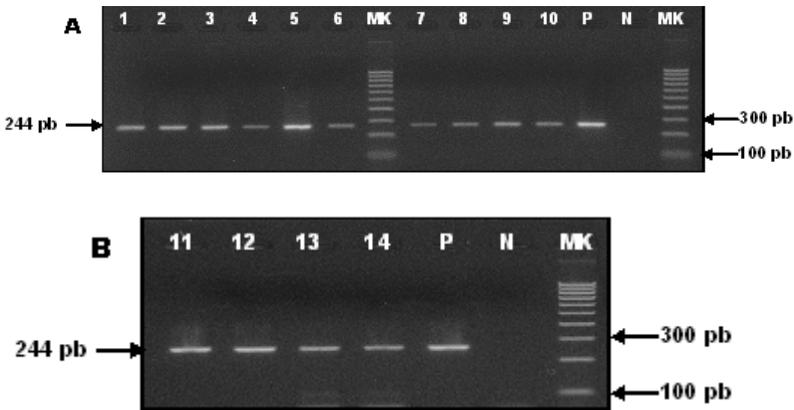


Figura 10: Eletroforese em gel de agarose 2% representativa dos produtos de PCR resultantes da amplificação do gene constitutivo RuBisCO de amostras de plâncton imobilizadas no FTA *gene card*. (A) 1-10 Amostras de DNA extraído de plâncton coletados em Laguna. (B) 11-14 Amostras de DNA extraído de plâncton coletados em Tijucas. P) Controle positivo. N) Controle negativo. MK) Marcador de peso molecular 100 pb.

Da mesma forma, como descrito para as amostras de DNA genômico obtidas diretamente sem imobilização no FTA *gene card*, foi realizada, através de PCR, a amplificação do gene que codifica o rRNA 18S. Como mostra a Figura 11 (A e B), a obtenção de um único fragmento de tamanho esperado (142 pb), confirmou a qualidade e a integridade das amostras imobilizadas.

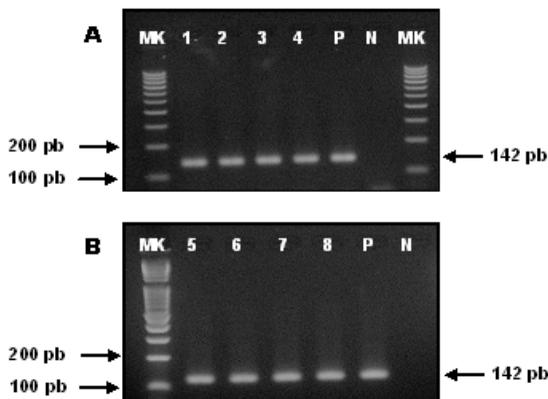


Figura 11: Eletroforese em gel de agarose 2% representativa dos produtos de PCR resultantes da amplificação do gene constitutivo rRNA 18S de amostras de plâncton imobilizadas no FTA *gene card*. **(A) 1-4** Amostras de DNA de plâncton coletados em Laguna. **(B) 5-8** Amostras de DNA de plâncton coletados em Tijucas. **P**) Controle positivo. **N**) Controle negativo. **MK**) Marcador de peso molecular 100 pb.

Estes resultados indicaram, não somente a integridade do DNA genômico de interesse, como a ausência de inibidores enzimáticos potenciais nas amostras, cuja presença poderia inibir a reação de amplificação para a detecção do WSSV.

4. Integridade do DNA extraído de amostras de sedimento

Como mostra o perfil eletroforético representativo (Figura 12), o DNA genômico extraído de todas as amostras de sedimento mostrou integridade e qualidade compatíveis para ser utilizado posteriormente nas reações de PCR.

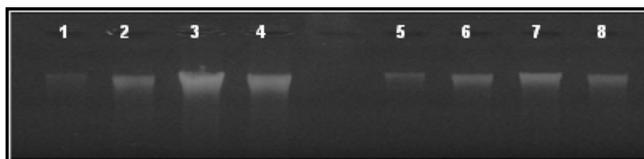


Figura 12: Eletroforese representativa em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio, apresentando a integridade e a qualidade do material genômico extraído das amostras de sedimento. **1-4**) Amostras de DNA extraído de sedimento coletados nas Fazenda 1 e 2 em Tijucas. **5-6**) Amostras de DNA extraído de sedimento coletados nas Fazendas 3 e 4 em Laguna.

Este resultado foi confirmado através da amplificação de genes considerados como genes constitutivos, a RuBisCO e o rRNA 18S, presentes nas amostras de sedimento, como pode ser visto nas Figuras 13 e 14. Os fragmentos amplificados para RuBisCO e para o rRNA 18S apresentaram o tamanho esperado de 244 e 142pb, respectivamente. De forma similar ao destacado acima, este resultado indicou ainda a ausência de inibidores enzimáticos nas amostras, cuja presença poderia inibir a reação de amplificação para a detecção do WSSV.

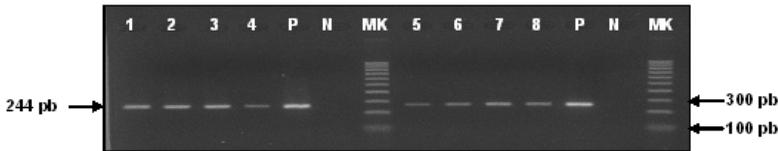


Figura 13: Eletroforese em gel de agarose 2% representativa dos produtos de PCR resultantes da amplificação do gene constitutivo RuBisCO. **1-4)** DNA extraído de amostras de sedimento coletado nas Fazendas 1 e 2 em Tijucas. **5-8)** DNA extraído de amostras de sedimento coletado nas Fazendas 3 e 4 em Laguna. **P)** Controle positivo. **N)** Controle negativo. **MK)** Marcador de peso molecular 100 pb.

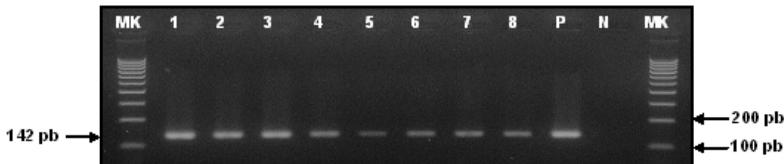


Figura 14: Eletroforese em gel de agarose 2% representativa dos produtos de PCR resultantes da amplificação do gene constitutivo rRNA18S. **1-4)** DNA extraído de amostras de sedimento coletado nas Fazendas 1 e 2 em Tijucas. **5-8)** DNA extraído de amostras de sedimento coletado nas Fazendas 3 e 4 em Laguna. **P)** Controle positivo. **N)** Controle negativo. **MK)** Marcador de peso molecular 100 pb.

5. Resultados das PCRs *nested* para a detecção do vírus da Mancha Branca

5.1. PCR *nested* com iniciadores WS146

A técnica de PCR *nested* foi utilizada para detectar o vírus da mancha branca (WSSV), tendo sido realizada com os iniciadores descritos por Lo et al. (1996): o par de iniciadores WS146F1 e WS146R1 para o primeiro passo (*first*) e o par de iniciadores WS146F2 e WS146R2 para o segundo (*nested*).

Os vinte animais coletados nas Fazendas 1 e 2 de Tijucas foram analisados para a detecção do WSSV. A técnica de PCR *nested* foi utilizada para detectar portadores do vírus, uma vez que praticamente todos se apresentavam como animais assintomáticos no momento da coleta.

Dos 20 animais analisados, cinco apresentaram reação positiva para o WSSV com os iniciadores descritos por Lo et al, 1996, o que representa 25% de animais infectados (Tabela 5 e Figura 15).

Tabela 5: Resultado dos diagnósticos obtidos pela técnica de PCR *nested* com iniciadores WS146 para amostras de camarão.

Fazenda	Localidade	Animais analisados	Animais com reação positiva para WSSV	Animais com reação negativa para WSSV
Fazenda 1	Tijucas	10	0	10
Fazenda 2	Tijucas	10	5	5
Total		20	5	15

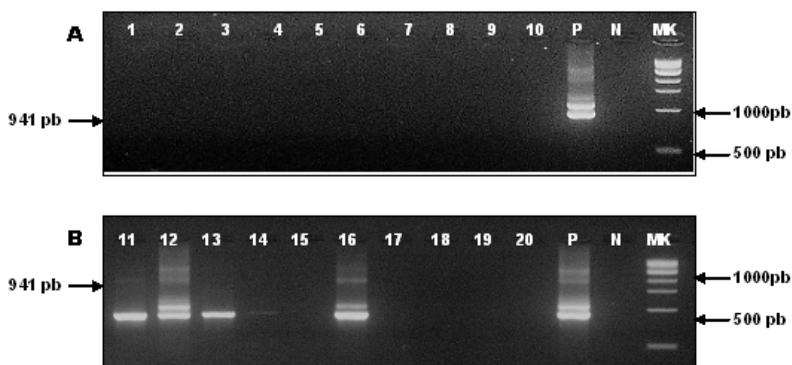


Figura 15: Eletroforese em gel de agarose 2% apresentando o resultado da *nested* PCR para a detecção do WSSV nas amostras de camarão das Fazendas de Tijucas. (A) 1–10) Fazenda 1 e (B) 11–20) Fazenda 2. P) Controle positivo. N) Controle negativo. MK) Marcador de peso molecular 1 Kb.

Como pode ser visto na Tabela acima (Tabela 5) e na Figura 15 (A e B), em cinco dos dez animais coletados na Fazenda 2 houve amplificação da sequência específica do vírus, enquanto nos animais da Fazenda 1 não foi verificada reação positiva. Foram consideradas

positivas para WSSV amostras de camarão que apresentaram a banda de 941 pb na PCR *nested* com iniciadores WS146.

As quatro amostras de sedimento coletadas nas Fazendas 1 e 2 de Tijucas e as 4 coletadas nas Fazendas 3 e 4 de Laguna foram analisadas para a detecção do WSSV com os mesmos iniciadores WS146.

Tabela 6: Resultado dos diagnósticos obtidos pela técnica de PCR *nested* com os iniciadores WS146 para as amostras de sedimento.

Fazenda	Localidade	Amostras de sedimento analisadas	Amostras de sedimento com reação positiva para WSSV	Amostras de sedimento com reação negativa para WSSV
Fazenda 1	Tijucas	2	0	2
Fazenda 2	Tijucas	2	0	2
Fazenda 3	Laguna	2	0	2
Fazenda 4	Laguna	2	0	2
Total		8	0	8

Pode ser visto na Tabela 6 e na Figura 16 que das oito amostras de sedimento analisadas nenhuma apresentou reação positiva para a mancha branca, o que representa 0% de amostras contaminadas.



Figura 16: Eletroforese em gel de agarose 2% apresentando o resultado da *nested* PCR para detecção do WSSV com iniciadores WS146 nas amostras de sedimento das Fazendas de Tijucas e Laguna. **1-2)** Fazenda 1. **3-4)** Fazenda 2. **5-6)** Fazenda 3. **7-8)** Fazenda 4. **P)** Controle positivo. **N)** Controle negativo. **MK)** Marcador de peso molecular 1 Kb.

As quatro amostras de plâncton coletadas nas fazendas de Tijucas e as dez coletadas nas lagoas de Laguna, juntamente com as quatro coletadas em fazenda de Laguna também foram analisadas para a detecção do WSSV, utilizando-se os iniciadores WS146.

Pode ser visto na Tabela 7 e na Figura 17 (A e B) que das dezoito amostras de plâncton analisadas nenhuma apresentou reação positiva para mancha branca com os iniciadores WS146.

Tabela 7: Resultado dos diagnósticos obtidos pela técnica de PCR *nested* com iniciadores WS146 para amostras de plâncton.

Lagoa/Fazenda	Localidade	Amostras de plâncton analisadas	Amostras de plâncton com reação positiva para WSSV	Amostras de plâncton com reação negativa para WSSV
Fazenda 1	Tijucas	2	0	2
Fazenda 2	Tijucas	2	0	2
Fazenda 3	Laguna	2	0	2
Fazenda 4	Laguna	2	0	2
Imaruí	Laguna	2	0	2
Santa Marta Pequena	Laguna	2	0	2
Santo Antônio	Laguna	2	0	2
Camacho	Laguna	2	0	2
Rio Parobé	Laguna	2	0	2
Total		18	0	18

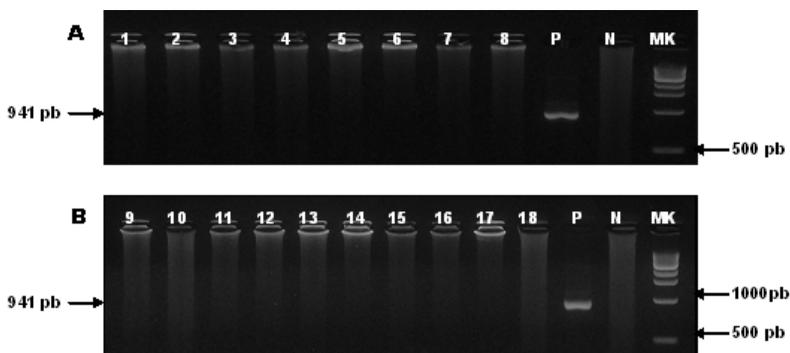


Figura 17: Eletroforese em gel de agarose 2% apresentando o resultado da *nested* PCR para a detecção do WSSV com iniciadores WS146 em amostras de plâncton das Fazendas de Tijucas e Laguna e das Lagoas de Laguna. (A) Fazendas de Tijucas e Laguna. 1-2) Fazenda 1. 3-4) Fazenda 2. 5-6) Fazenda 3. 7-8) Fazenda 4. (B) Lagoas de Laguna 9-10) Imaruí. 11-12) Santa Marta Pequena. 13-14) Santo Antônio. 15-16) Camacho. 17-18) Rio Parobé. P) Controle positivo. N) Controle negativo. MK) Marcador de peso molecular 1 Kb.

5.2. PCRs *nested* com iniciadores IK

Após terem sido analisados para a detecção do WSSV com os iniciadores WS146 descritos por LO et al., 1996, as mesmas amostras foram analisados com os iniciadores IK descritos por Karunasagar, publicado por UMESHA et al., 2006.

A PCR *nested* com estes iniciadores foi utilizada inicialmente para detectar os animais portadores do vírus.

Dos vinte animais analisados, nove apresentaram reação positiva para a mancha branca com os iniciadores IK, representando 45% de animais infectados (Tabela 8 e Figura 18).

Tabela 8: Resultado dos diagnósticos obtidos pela técnica de PCR *nested* com iniciadores IK para amostras de camarão.

Fazenda	Localidade	Animais analisados	Animais com reação positiva para WSSV	Animais com reação negativa para WSSV
Fazenda 1	Tijucas	10	4	6
Fazenda 2	Tijucas	10	5	5
Total		20	9	11

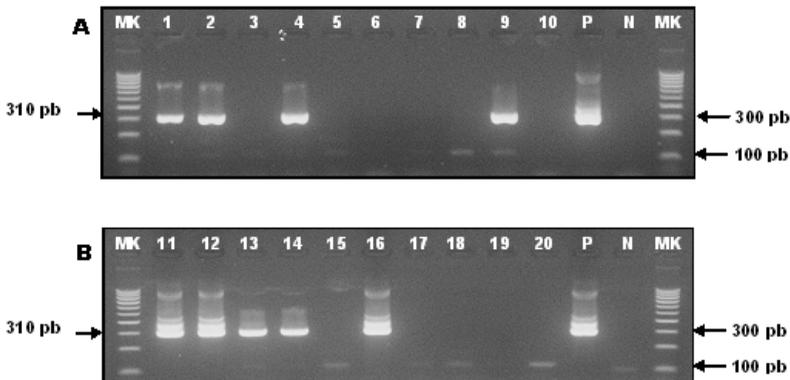


Figura 18: Eletroforese em gel de agarose 2% apresentando o resultado da *nested* PCR para a detecção do WSSV com iniciadores IK em amostras de camarão das Fazendas de Tijucas. (A) Fazenda 1 **1–10**) Amostras de camarão analisadas da Fazenda 1. (B) Fazenda 2. **11–20**) Amostras de camarão analisadas da Fazenda 2. **P**) Controle positivo. **N**) Controle negativo. **MK**) Marcador de peso molecular 100 pb.

Pode ser visto na Tabela acima e na Figura 18 (A e B), que em quatro, dos dez animais coletados na Fazenda 1, houve amplificação da sequência específica do vírus, enquanto que nos animais da Fazenda 2 foram observadas cinco reações positivas. As amostras de camarão que apresentaram a banda de 310 pb na PCR *nested* com iniciadores IK foram consideradas positivas para WSSV.

As quatro amostras de sedimento coletadas nas fazendas de Tijucas e as quatro coletadas nas fazendas de Laguna foram analisadas para a detecção do WSSV. A PCR *nested* foi utilizada para detectar o vírus, tendo sido realizada com os iniciadores IK-1 e IK-2 para a *first* e IK-3 e IK-4 para a *nested*.

Das oito amostras de sedimento analisadas quatro apresentaram reação positiva para a mancha branca, o que representou 50% de amostras contaminadas (Tabela 9 e Figura 19).

Tabela 9: Resultado dos diagnósticos obtidos pela técnica de PCR com iniciadores IK para amostras de sedimento.

Fazenda	Localidade	Amostras de sedimento analisadas	Amostras de sedimento com reação positiva para WSSV	Amostras de sedimento com reação negativa para WSSV
Fazenda 1	Tijucas	2	2	0
Fazenda 2	Tijucas	2	2	0
Fazenda 3	Laguna	2	0	2
Fazenda 4	Laguna	2	0	2
Total		8	4	4

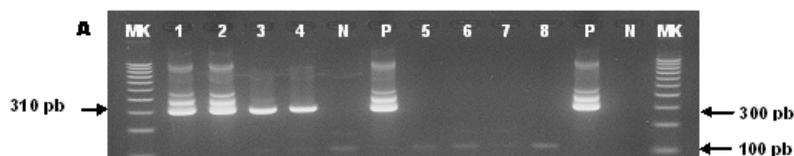


Figura 19: Eletroforese em gel de agarose 2% apresentando o resultado da *nested* PCR para detecção do WSSV com iniciadores IK em amostras de sedimento das Fazendas de Tijucas e Laguna. **1-2)** Sedimento Fazenda 1. **3-4)** Sedimento Fazenda 2. **5-6)** Sedimento Fazenda 3. **7-8)** Sedimento Fazenda 4. **P)** Controle positivo. **N)** Controle negativo. **MK)** Marcador de peso molecular 100 pb.

Pode ser visto na Tabela 9 e na Figura 19, que em todas as quatro amostras de sedimento coletadas em Tijucas houve amplificação da sequência específica do vírus, enquanto que das quatro amostras de sedimento coletadas em Laguna nenhuma apresentou reação positiva com os iniciadores IK. As amostras de sedimento que apresentaram a banda de 310 pb na PCR *nested* com iniciadores IK foram consideradas positivas para WSSV.

As quatro amostras de plâncton coletadas nas fazendas de Tijucas e as dez coletadas nas lagoas de Laguna, juntamente com as quatro coletadas nas fazenda de Laguna, foram analisadas para a detecção do WSSV. A PCR *nested* foi utilizada para detectar o vírus com os iniciadores IK-1 e IK-2 para a *first* e IK-3 e IK-4 para a *nested*.

Das dezoito amostras de plâncton analisadas três apresentaram reação positiva para a mancha branca. (Tabela 10).

Tabela 10: Resultado dos diagnósticos obtidos pela técnica de *nested* PCR com iniciadores IK para amostras de plâncton.

Lagoa/Fazenda	Localidade	Amostras de plâncton analisadas	Amostras de plâncton com reação positiva para WSSV	Amostras de plâncton com reação negativa para WSSV
Fazenda 1	Tijucas	2	2	0
Fazenda 2	Tijucas	2	1	1
Fazenda 3	Laguna	2	0	2
Fazenda 4	Laguna	2	0	2
Imaruí	Laguna	2	0	2
Santa Marta Pequena	Laguna	2	0	2
Santo Antônio	Laguna	2	0	2
Camacho	Laguna	2	0	2
Rio Parobé	Laguna	2	0	2
Total		18	3	15

Pode ser visto na Tabela 10 e na Figura 20, que em três das quatro amostras de plâncton coletadas nas Fazendas 1 e 2 em Tijucas houve amplificação da sequência específica do vírus, enquanto que nas quatorze amostras de plâncton coletadas em Laguna nenhuma apresentou reação positiva com os iniciadores IK. As amostras de plâncton que apresentaram a banda de 310 pb na PCR *nested* com iniciadores IK foram consideradas positivas para WSSV.

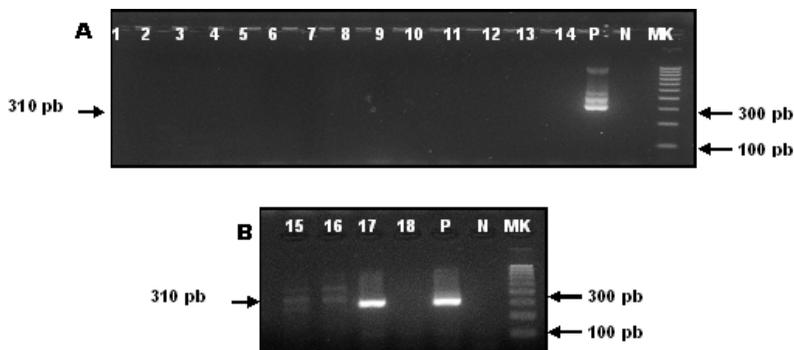


Figura 20: Eletroforese em gel de agarose 2% apresentando o resultado da *nested* PCR para detecção do WSSV com iniciadores IK em amostras de plâncton de Laguna e Tijucas. (A) Fazendas e Lagoas de Laguna 1-2) Fazenda 3. 3-4) Fazenda 4. 5-6) Imaruí. 7-8) Santa Marta Pequena. 9-10) Santo Antônio 11-12) Camacho 13-14) Rio Parobé. (B) Fazendas de Tijucas. 15-16) Fazenda 1. 17-18) Fazenda 2. P) Controle positivo. N) Controle negativo. MK) Marcador de peso molecular 1 Kb.

6. Quantificação da carga viral por PCR em Tempo Real (*qPCR*)

Para a curva padrão da PCR em Tempo Real foram utilizadas concentrações de $1,0 \times 10^{10}$ até $1,0 \times 10^0$ cópias virais/ μL para a quantificação da carga viral das amostras analisadas.

Algumas amostras com $100 \text{ ng}/\mu\text{L}$ foram quantificadas por *qPCR* com o objetivo de realizar uma análise comparativa da sensibilidade dos métodos de detecção utilizados neste trabalho, ou seja, PCR *nested* com diferentes iniciadores e *qPCR*. O número de cópias virais foi calculado pela interpolação do *Cycle threshold* (CT) determinado experimentalmente através da curva padrão. A partir desse número de cópias, os resultados finais foram expressos como a média do número de cópias de WSSV por microlitro de amostra, já que cada amostra foi analisada em duplicata (Tabela 1). As amostras das Fazendas 1 e 2 são provenientes de viveiros de cultivo de camarões localizadas no município de Tijucas/SC, enquanto a amostra de plâncton Santa Marta, é proveniente de Lagoa Santa Marta Pequena do complexo Lagunar e as amostras Fazendas 3 e 4 são provenientes da coleta realizada em viveiros de cultivo de camarões de Laguna/SC.

Tabela 11: Valores médios do número de cópias virais de WSSV por microlitro de amostras extraídas de camarão, plâncton e sedimento previamente diagnosticados por PCR *nested* para WSSV.

Amostra	Local	Média do Ct	Média do número de cópias de WSSV/µL
Camarão	Fazenda 1	23,31	$1,08 \times 10^2$
	Fazenda 2	14,99	$9,08 \times 10^4$
Plâncton	Fazenda 1	33,60	$4,96 \times 10$
	Fazenda 2	29,16	$7,3 \times 10^2$
	Fazenda 3	-	-
	Lagoas	-	-
Sedimento	Fazenda 1	33,57	$5,1 \times 10$
	Fazenda 2	35,40	6,8
	Fazenda 3	-	-
	Fazenda 4	37,54	1,7

A especificidade do produto amplificado foi verificada pela análise da curva de *melting*, ou seja, pela análise da temperatura de dissociação de cada produto da PCR, sendo que as temperaturas utilizadas para a construção do respectivo gráfico variaram de 72°C a 95°C (Figura 21).

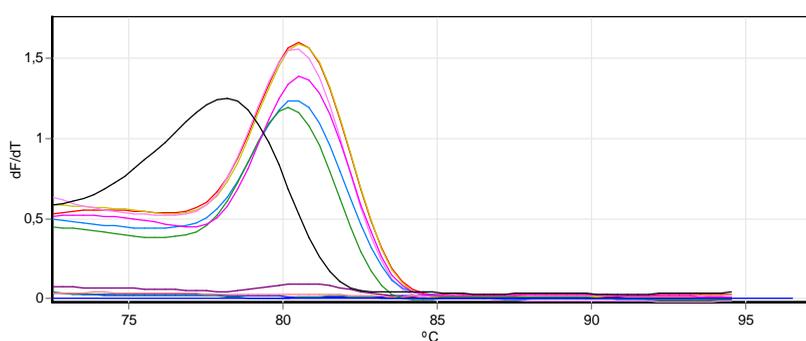


Figura 21: Curva de dissociação para verificar a especificidade dos produtos obtidos pela PCR em Tempo Real.

As amostras de camarão, plâncton e sedimento da Fazenda 1 foram consideradas com carga viral baixa. A mesma classificação, decorrente no número de cópias, receberam as amostras de sedimento das Fazendas 2 e 4. Amostras de camarão da Fazenda 2 foram consideradas com carga viral moderada (SOUZA, 2008).

Como já se esperava os camarões e o plâncton coletados na Fazenda 2 apresentaram maior número de cópias do vírus quando comparados com os coletados na Fazenda 1. Entretanto, os sedimentos coletados em ambas as localidades não seguiram a mesma tendência. O sedimento de viveiro das Fazendas 1 e 2, de Tijucas, apresentaram respectivamente $5,1 \times 10$ e $6,8$ cópias/ μL , enquanto que a Fazenda 4, de Laguna, apresentou $1,7$ cópias virais/ μL (Tabela 11).

7. Comparação entre PCR *nested* e *qPCR*

Para a análise da sensibilidade da técnica de PCR *first* e *nested* com iniciadores WS146 descritos por LO et al., (1996) e IK por UMESHA et al., (2006), algumas concentrações utilizadas para a curva padrão do *qPCR* foram utilizadas. Partindo-se de uma concentração de $1,0 \times 10^{10}$ foram realizadas diluições seriadas até $1,0 \times 10^{-1}$ cópias de WSSV/ μL . Reações positivas foram observadas até o limite de 10^5 cópias virais para PCR *first* e 10 cópias virais para PCR *nested* com iniciadores IK, como pode ser visto na Figura 22 (A e B), enquanto que, com iniciadores WS146 não foi detectada nenhuma reação positiva na PCR *first*. Na PCR *nested* foram observadas reações positivas até o limite de 10^4 cópias virais. Estes resultados estão mostrados na Figura 23 (A e B) e na Tabela 12.

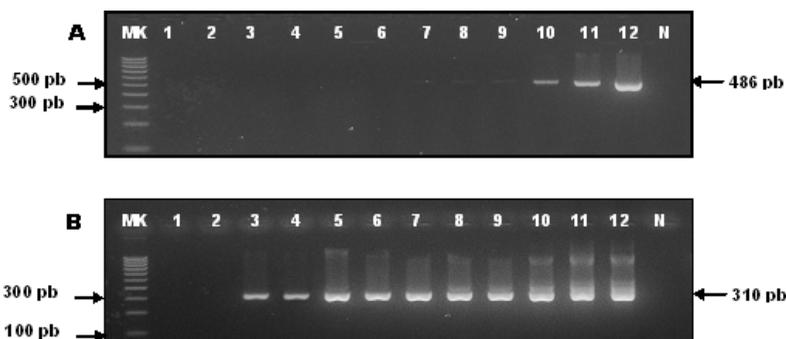


Figura 22: Análise de sensibilidade de PCR com iniciadores IK para a detecção do WSSV, utilizando como molde um plasmídeo recombinante em diluição seriada. (A) PCR *First* (B) PCR *Nested*. 1-12) 10^{-1} , 1, 10, 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} cópias virais, respectivamente. N) controle negativo. MK) Marcador de peso molecular 100pb.

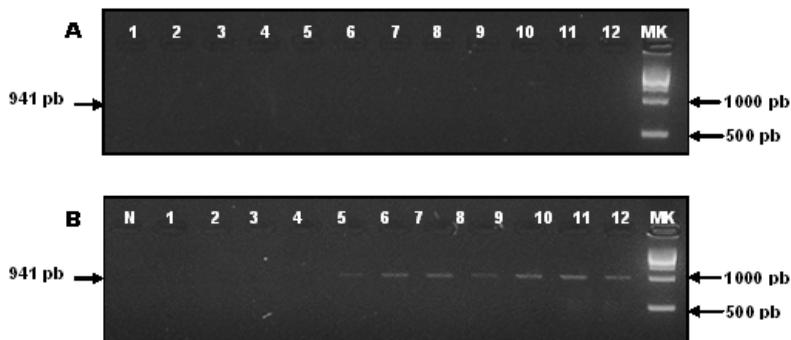


Figura 23: Análise de sensibilidade de PCR com iniciadores descritos WS146 para a detecção do WSSV, utilizando como molde um plasmídeo recombinante em diluição seriada. (A) PCR *First* (B) PCR *Nested*. 1-12) 10^{-1} , 1, 10, 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} cópias virais, respectivamente. N) controle negativo. MK) Marcador de peso molecular 1Kb.

Tabela 12: Limite de detecção do WSSV em PCR *first* e *nested* com iniciadores WS146 e IK.

Iniciador	PCR <i>first</i>	PCR <i>nested</i>
WS146	$>10^{10}$	10^4
IK	10^9	10

O método de PCR em Tempo Real mostrou alta sensibilidade a detecção do WSSV sendo capaz de identificar a presença de até uma cópia viral. A PCR *nested* com iniciadores IK mostrou sensibilidade moderada, detectando até 10 cópias virais enquanto que com os iniciadores WS146 o vírus só foi detectado com a presença de 10.000 cópias (Tabela 13).

Tabela 13: Comparação entre os métodos de diagnóstico (PCR *nested* e PCR em Tempo Real) com relação à sensibilidade.

Método diagnóstico	Limite de detecção (cópias virais)	Sensibilidade
PCR <i>nested</i> LO et al. 1996 (WS146)	10^4	+
PCR <i>nested</i> KARUNASAGAR et al. 2006 (IK)	10	++
PCR em Tempo Real (WS2)	1	+++

+ sensibilidade baixa, ++ sensibilidade moderada, +++ sensibilidade alta

DISCUSSÃO

Diversos trabalhos têm sido publicados, comparando diferentes métodos de diagnóstico para a detecção de vírus em diversas espécies de camarão (CHAPMAN et al., 2004; DURAND et al., 2003; SHEKHAR; AZAD; RAVICHANDRAN, 2006). Porém, até onde temos conhecimento, não há nenhum trabalho comparando PCR *nested* e PCR em Tempo Real (*qPCR*), para a detecção do WSSV em água e sedimento em viveiros de *Litopenaeus vannamei* cultivados. A grande maioria desses trabalhos utiliza animais experimentalmente infectados. Isso permite um maior controle sobre o experimento e sobre os dados gerados, mas algumas vezes os resultados não refletem o que realmente ocorre nos cultivos, uma vez que nos mesmos existe a interação entre o animal e os vários fatores abióticos, associados às condições de manejo.

No presente trabalho, alguns métodos de diagnóstico recomendados pela OIE, e que são aqueles mais utilizados em pesquisas e em laboratórios de diagnóstico para a detecção do WSSV, foram avaliados com relação à sua sensibilidade.

Através da comparação das duas técnicas de extração de DNA avaliadas neste estudo podemos constatar que o FTA *gene card* (BIOAMERICA) mostra-se como uma boa alternativa para coleta e armazenamento de amostras de água com o objetivo de detecção viral por PCR.

Os conjuntos de iniciadores desenvolvidos neste estudo visando a amplificação de genes constitutivos, ou seja, para a amplificação dos genes da RuBisCO e do rRNA18S em amostras de fitoplâncton e zooplâncton, mostraram-se eficientes e essenciais para as análises realizadas, mostrando a qualidade e a integridade do DNA extraído das amostras de água e sedimento, além de comprovar a presença de material genômico específico e analisar a existência ou não de inibidores enzimáticos para reações de amplificação por PCR.

Genes constitutivos são responsáveis por codificar proteínas necessárias para a manutenção do metabolismo celular. São transcritos com expressão contínua e uniforme em todas as células de um organismo ou entre espécies, bem como durante várias fases do desenvolvimento e sob diferentes condições ambientais. Na Biologia Molecular, a amplificação de genes constitutivos é utilizada para comprovar a presença de material genômico específico e avaliar a sua integridade, para monitorar a presença de eventuais inibidores nas

reações de PCR e, ainda, avaliar comparativamente a expressão de genes induzidos, entre outros objetivos.

A Ribulose oxigenase-1,5-bisfosfato carboxilase, mais conhecido pelo nome RuBisCO, é uma proteína altamente conservada, presente nos cloroplastos de plantas, algas e cianobactérias e que participa do processo de fotossíntese (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2005). O rRNA 18S é parte do núcleo funcional do ribossomo, componente básico de todas as células eucarióticas. O gene do rRNA 18S possui regiões altamente conservadas e seu arranjo repetitivo no genoma fornece quantidade suficiente de material para a PCR, mesmo em organismos pequenos (ALBERTS, 1999; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2005).

A qualidade do DNA genômico de amostras de água avaliada através de PCRs com iniciadores para os genes da RuBisCO e do rRNA 18S foram muito semelhantes entre ambas as técnicas de extração testadas. No entanto, o tempo necessário para completar cada um dos protocolos de extração mostrou-se bastante diferente. Enquanto a extração de DNA com CTAB e proteinase K necessita de aproximadamente 30 horas, a extração a partir do FTA *gene card* apresentou a mesma eficiência em apenas 30 minutos.

Vale salientar que neste estudo, não foi possível determinar se a presença de DNA viral está relacionada apenas à água, ou se é proveniente do plâncton presente na água do viveiro. As amplificações de genes constitutivos comprovaram a presença tanto de fitoplâncton quanto de zooplâncton nas amostras de água analisadas por PCR e excluem a possibilidade de que falsos resultados negativos sejam decorrentes da degradação da amostra.

Diferentes componentes do plâncton, como microalgas, rotíferos e copépodes foram mencionados como potenciais portadores de WSSV. Em ambas as coletas de plâncton realizadas neste estudo, em que o WSSV foi detectado, as espécies pertencentes ao filo das Chlorophyta representaram mais de 88% da amostra. Experimentos feitos com microalgas marinhas, com espécies de microalgas pertencentes a este mesmo filo expostas a camarões infectados, mostraram que as mesmas tornaram-se positivas para o WSSV e induziram a infecção em camarões sadios, mostrando que o plâncton é capaz de servir como transportador do vírus (LIU et al., 2007).

Outros estudos mostraram que rotíferos podem ser portadores de WSSV, atuando como um reservatório (YAN et al., 2004, 2007a). YAN et al. (2004) detectaram a presença do WSSV em ovos de resistência de rotíferos no sedimento do viveiro de cultivo de camarão, bem como

como nos rotíferos que eclodiram destes ovos. Além disso, foi demonstrado que a membrana celular de rotíferos, *Brachionus urceus*, tem receptores que permitem a interação entre o vírus e os receptores da célula hospedeira (YAN et al., 2007b). Rotíferos podem ser portadores de WSSV através da ingestão de fitoplâncton infectado com o vírus tornando-se vetores de transmissão do vírus para larvas de camarões peneídeos (ZHANG et al., 2006). Da mesma forma, copépodos *Nitocra* sp. tornaram-se vetores de WSSV através da ingestão de fitoplâncton positivo para WSSV. Animais expostos à copépodos *Nitocra* sp positivos para WSSV foram infectados, conforme detectado por PCR *nested* (ZHANG et al., 2008). Estes dados comprovam que tanto fitoplâncton quanto zooplâncton podem ser portadores do WSSV, funcionando como vetores passivos.

Os iniciadores IK mostraram-se mais sensíveis à detecção do WSSV para amostras de camarão, plâncton e sedimento, quando comparados com os iniciadores WS146, recomendados pela OIE, para o diagnóstico deste vírus. Enquanto nenhuma reação positiva por PCR *nested* foi detectada com os iniciadores WS146 em amostras de plâncton e sedimento, sete foram amplificadas com os iniciadores IK. Estes resultados foram comprovados com a PCR em Tempo Real, através da qual foi possível quantificar o número de cópias virais e verificar que os iniciadores IK conseguiram detectar a presença de até 6,8 cópias virais por reação, uma sensibilidade de detecção ainda maior do que a de 10 cópias virais, estabelecida anteriormente neste trabalho. Isso se explica devido ao fato dos testes de sensibilidade da PCR *nested* terem sido desenvolvidos tendo como amostras positivas diluições seriadas na base 10 para o número de cópias virais. A PCR *nested* com iniciadores IK é capaz de detectar infecções leves de WSSV, enquanto que com iniciadores WS146 a detecção do WSSV só é possível a partir de infecções moderadas. Estes resultados corroboram aqueles os obtidos por Hossain et. al., (2004) que testaram a sensibilidade dos iniciadores WS146 (LO et al., 1996) e IK (UMESHA et al., 2006) na detecção do WSSV em amostras de água e camarão e observaram que a sensibilidade da PCR aumenta com a diminuição do tamanho do fragmento amplificado.

A diferença na sensibilidade entre PCR *nested* com diferentes iniciadores e PCR em Tempo Real pode ser evidenciada com base na análise de algumas amostras com diferentes cargas virais, realizadas pelos três métodos mencionados. Enquanto as amostras de plâncton e sedimento da Fazenda 3 de Laguna apresentaram reações negativas para

WSSV pelas três técnicas, outras amostras como as de camarão da Fazenda 1 apresentaram reações negativas para WSSV com iniciadores WS146 e positivas com iniciadores IK para a PCR *nested* e PCR em Tempo Real. Amostras, como as de sedimento da Fazenda 4, apresentaram resultados conflitantes para as técnicas de PCR *nested* e PCR em Tempo Real, explicados pela sensibilidade dos métodos. Na PCR *nested* com os iniciadores WS146, o vírus da Mancha Branca não foi detectado em nenhuma das amostras de plâncton e sedimento coletados das fazendas de Tijucas, pois, as cópias virais apresentavam-se em número inferior ao limite de detecção determinado neste estudo, enquanto que na PCR *nested* com os iniciadores IK a presença do vírus foi detectada nas amostras de plâncton e sedimento coletadas em Tijucas. Na PCR em Tempo Real houve amplificação da sequência alvo das amostras de sedimento das fazendas de Tijucas e em uma das fazendas de Laguna (Fazenda 4), esta última com média de 1,7 cópias virais/ μL . Por outro lado, em amostras com mais de 10^4 cópias virais/ μL , como as de camarão da Fazenda 2, foi possível observar reações positivas para WSSV pelas três metodologias utilizadas. A PCR *nested* mostrou ser menos sensível à detecção do WSSV quando realizada com iniciadores WS146, em comparação com iniciadores IK.

Os resultados mostraram que a PCR em Tempo Real detectou até 1,7 cópias virais por reação. Diluições abaixo deste limite, contendo, por exemplo, uma cópia por reação (ou uma cópia/ μL) algumas vezes podem gerar resultados positivos e outras vezes não. Esta observação deve-se, provavelmente, ao fato de que uma diluição contendo precisamente uma cópia/ μL é difícil de ser obtida.

No presente estudo, os camarões coletados na Fazenda 1, diferentemente dos coletados na Fazenda 2, não apresentavam sinais clínicos da doença ou mortalidade e na fazenda de cultivo não havia histórico da incidência deste vírus. Entretanto os animais foram diagnosticados como infectados com o WSSV por PCR *nested*. Uma explicação poderia ser a co-infecção com IHHNV, que é capaz de induzir certa resistência à infecção por WSSV (TANG *et al.* 2003). No entanto, não foram detectadas reações positivas para IHHNV nestes animais (dados não mostrados). Outra possibilidade seria a acomodação viral (FLEGEL; PASHARAWIPAS 1998; FLEGEL 2007), onde o animal é capaz de adquirir tolerância específica a patógenos virais, podendo estar infectado sem manifestar a doença.

Baixas doses infecciosas de WSSV podem estar abaixo dos limites de detecção dos métodos de PCR utilizados. A ocorrência de infecção persistente e duradoura de WSSV tem sido relatada (TSAI et al., 1999). Sabe-se que infecção persistente pode apresentar cargas virais extremamente baixas e potencialmente indetectáveis por qualquer teste de diagnóstico disponível (OIE, 2006).

Esta situação tem sido observada em outros estudos. Esparza-Leal et al., 2009 verificou que o WSSV pode estar presente em diferentes frações da água de um viveiro e que quando a temperatura média diária de 31,5°C baixava para 27°C havia potencial para a infecção do camarão e de ocorrer um surto de WSSV. Este achado corrobora a hipótese de que baixas doses infecciosas podem não ser detectadas por estarem abaixo do limite de detecção destes ensaios de PCR. Os autores também mostraram que o filtro de água de 0,20 µm efetivamente exclui o WSSV. Essa pequena dimensão dos poros do filtro retém partículas de WSSV ainda livres, que apresentam tamanho médio de 0,27 µm (FLEGEL; ALDAY E-SANZ, 1998; PARK et al., 1998; ESCOBEDO BONILLA et al., 2008).

Resultados obtidos por RAHMAN et al., 2006 demonstram que todos os tanques com plâncton positivo para WSSV também tinham camarão positivo, mas nem todos com camarões positivos para WSSV tinham necessariamente plâncton positivo para WSSV. É sabido que a água a 32 ° C inibe a replicação do WSSV devido à proteção parcial por hipertermia, reduzindo a replicação viral em alguns viveiros, o que poderia explicar a presença de camarões positivos para WSSV e plânctons negativos para WSSV. Este resultado está de acordo com os dados experimentais de Rahman et al., (2007) em que os animais expostos por 6 horas a condições de hipertermia apresentaram redução da mortalidade e inibição da replicação do WSSV.

Esparza-Leal et al., 2009 detectaram em seu estudo o WSSV associado a várias partículas e frações líquidas, sendo capaz de causar infecção em camarões sadios quando submetidos a 27°C. Ambas as frações de plâncton e água servem como veículos de transmissão do WSSV de diferentes maneiras, tais como: (1) vírus livre lançado na água por animais infectados com WSSV e (2) vírus associado à fitoplâncton ou com diferentes espécies de zooplâncton. É possível que o WSSV se mova através da cadeia alimentar do plâncton na alimentação de zooplâncton.

O WSSV recebe proteção térmica do ambiente natural pois, a temperatura da água raramente é superior a 35°C. Momoyama et al.,

(1998) relataram a presença de WSSV viável por pelo menos 30 dias na água do mar a 30°C em condições de laboratório. Zhu et al., (2009) observaram que o WSSV mantém seu potencial de infecção mesmo quando exposto a 37°C por 24 horas ou 30 minutos a 50°C.

Trocas de água de rotina e despescas emergências representam um risco para a propagação do WSSV no ambiente entre fazendas e viveiros. Quando se descartam efluentes com alta carga viral em um corpo de água durante um surto, as chances de contaminação aumentam significativamente (FEGAN; CLIFFORD, 2001). Vaseeharan, Jayakumar, Ramasamy (2003) e Cavalli, L. (2009) demonstraram maior prevalência de animais selvagens infectados próximos aos cultivos e que o maior grau de infecção de animais nativos pelo WSSV provavelmente está associado a liberação de efluentes com grande carga viral pelas fazendas de cultivo, ou, ainda, pelo descarte de resíduos de camarões infectados pelas indústrias de beneficiamento de pescado.

Quang et al.,(2009) acompanharam a presença do WSSV em viveiros de camarões totalmente dizimados e abandonados após um surto da doença. Eles constataram a detecção do genoma viral na água dos viveiros e dos canais circundantes, mesmo 20 meses após o surto do WSSV. O WSSV pode ter permanecido no plâncton e ter sido transmitido ao ambiente circundante através de movimentos de água, atividades humanas, e por canibalismo de camarões mortos (SANCHEZ-MARTINEZ et al., 2007). Deve-se reconhecer que o WSSV tem uma ampla gama de hospedeiros como caranguejos, copépodes e poliquetas (ESCOBEDO- BONILLA et al. 2008). Por este motivo, sua presença no ambiente aquático não significa necessariamente que o mesmo esteja sobrevivendo na água do mar, mas persistindo mesmo na ausência de camarões (QUANG et al., 2009).

O solo representa um importante reservatório para muitos vírus que infectam invertebrados, influenciando diretamente a sobrevivência de agentes patogênicos. Alguns vírus quando eliminados para o ambiente têm potencial para sobreviver, persistir e ser transportados por várias vias até atingir novamente outro hospedeiro. No entanto, nem todos são bem sucedidos em sobreviver e alcançar novos hospedeiros suscetíveis (SOBSEY; MESCHKE, 2003). Os Baculovírus, que são na sua maioria patógenos de insetos, bem como crustáceos e aracnídeos (WOOD; GRANADOS, 1991), podem permanecer viáveis por vários anos fora do hospedeiro, com o solo, sendo o principal reservatório destes vírus no ambiente em longo prazo (DE MORAES et al., 1999). O WSSV tem semelhanças morfológicas com o baculovírus, podendo

eventualmente compartilhar o mesmo destino no solo e podendo permanecer viável fora do hospedeiro por um dado período de tempo. Persistência viral, sobrevivência e transporte podem variar muito com o tipo de vírus e com as condições ambientais. O WSSV apresenta capsídeo e proteína de envelope que podem ajudar em sua possível persistência no solo. Atualmente, não existem dados disponíveis sobre o papel do solo como vetor para o WSSV.

O monitoramento do WSSV deve ser feito com métodos de detecção específicos e muito sensíveis como é o caso da PCR, que tem sido amplamente utilizado para detectar WSSV em camarões, hospedeiros, água e sedimentos (HOSSAIN et al., 2001, 2004; NATIVIDAD; NOMURA; MATSUMURA, 2008). Infecções leves com WSSV são uma das maiores causas de epidemias em camarões, já que estresses ambientais podem levar à evolução de infecções leves para agudas, e assim levar a incidência da doença nos cultivos (HE et al., 2000; HSU et al., 1999; PENG et al., 1998). O acompanhamento rigoroso da saúde do camarão e outras medidas preventivas, como a desinfecção e filtração do afluente de água também devem ser adotadas para reduzir o impacto da doença diminuindo a propagação da WSSV dentro de uma região e evitando a introdução do patógeno em uma área nova.

Atualmente, não existem tratamentos disponíveis para controlar a doença e a mortalidade. Uma alternativa é reduzir o risco da entrada do WSSV nas instalações de produção comercial de camarão, através da implementação de medidas de biossegurança (PRUDER, 2004; ABCC, 2005; LIGHTNER, 2005).

O atual processo de filtração usado nas entradas de viveiros (malha de 300 μm) não é suficiente para impedir a entrada do WSSV em viveiros de cultivo de camarão.

Com o desenvolvimento de um protocolo para extração de DNA de amostras de água e sedimento e PCR *nested*, este estudo foi capaz de detectar o WSSV com uma sensibilidade de 6,8 cópias virais. Apesar de a PCR *nested* ser altamente sensível, específica e permitir a detecção do WSSV no plâncton e no sedimento é importante ressaltar que a detecção de DNA de WSSV não estabelece viabilidade de infecção viral. A persistência do DNA viral no solo é questionável devido ao elevado potencial de produção de nucleases pela atividade de microorganismos do solo. No entanto a persistência relativa de alguns DNAs pode ser devido a adsorção em minerais de argila e substâncias húmicas do solo (BLAGODATSKAYA et al., 2007) ou pode estar associada à presença

de hospedeiros que os mantém viáveis por mais tempo neste ambiente. Neste estudo, não foi possível determinar se a presença de DNA viral está relacionada apenas ao sedimento, ou se é proveniente de hospedeiros de WSSV presentes no solo do viveiro. Por outro lado, as ampliações de genes constitutivos comprovaram a presença tanto de fitoplâncton quanto de zooplâncton nas amostras de sedimento analisadas por PCR.

A fim de distinguir partículas virais de partículas virais infecciosas, outros estudos são necessários para avaliar o risco da presença de WSSV no solo e o papel do mesmo como um reservatório e vetor de transmissão do vírus.

Boa parte da biologia molecular do WSSV está focada em aspectos estruturais da partícula viral, levando à caracterização de alguns dos principais componentes do nucleocapsídeo e do envelope (CHEN et al., 2002a; LEU et al., 2005; VAN HULTEN et al., 2000a, b, 2002; ZHANG et al., 2002a, b). Uma série de proteínas do envelope do WSSV, incluindo a VP28, têm sido propostas por estarem envolvidas na infectividade viral (WITTEVELDT et al., 2004; ROBALINO et al., 2006; MUSTHAQ et al., 2009). A VP28, uma das principais e mais importantes proteínas do envelope do WSSV (VAN HULTEN et al., 2001b; ZHANG et al., 2002; WANG, Y. et al., 2008) está envolvida na infecção sistêmica de camarão ao vírus pois, promove a ligação do WSSV às células alvo como as do camarão permitindo o início da infecção viral (VAN HULTEN et al., 2001; YI et al., 2004; MUSTHAQ et al., 2006; LI et al., 2010). Agentes químicos e métodos físicos têm sido estudados na inativação de WSSV BALASUBRAMANIAN et al., 2006 NORIHISA et al., 2006). Zhu et al., (2009) demonstraram que a proteína do envelope do WSSV VP28 é danificada com a inativação do vírus por alguns agentes químicos e métodos físicos.

O monitoramento da presença de WSSV na água e no solo dos viveiros pode representar uma importante ferramenta de avaliação do potencial de infecção de um viveiro, antes do povoamento deste com pós-larvas bem como a identificação da presença de partículas virais nos efluentes dos cultivos pode evitar a disseminação da doença para corpos de água adjacentes.

O monitoramento de outras fontes de contaminação de viveiros, como água e sedimento também deve ser lembrado. Dentre as medidas profiláticas para água e solo podemos sugerir as recomendadas pelo manual de Biossegurança para Fazendas de Camarão Marinho (ABCC, 2005) que entre outras medidas indica o uso de substâncias que alterem

o pH do solo com o objetivo de inativar o vírus e hipoclorito de cálcio com 20 ppm de cloro ativo para desinfecção da água. O hipoclorito de sódio a 100 ppm também parecem ser eficiente na desinfecção de viveiros de cultivo e eliminação de larvas infectadas e hospedeiros em potencial deste vírus (CHANG; CHEN; WHANG, 1998b; FEGAN; CLIFFORD 2001). Tendo em vista que a presença do vírus deve estar associada à presença de hospedeiros na água ou sedimento, as medidas profiláticas para eliminar os vírus presentes na água e no sedimento devem ser acompanhadas de ações para se eliminar possíveis vetores presente nesses meios.

De um modo geral, os resultados desse estudo geraram um aperfeiçoamento das técnicas de detecção da presença de vírus em sedimento e água colaborando com um monitoramento efetivo das condições ambientais, propiciando uma ferramenta para a avaliação da eficiência dos métodos de desinfecção no que se refere ao WSSV a fim de evitar futuros surto da doença.

Neste sentido, devem-se destacar ainda algumas perspectivas de continuidade do presente trabalho. Uma delas seria desenvolver experimentos, inicialmente em condições controladas de laboratório, para avaliar a eficiência de diferentes métodos de desinfecção de amostras de água e de sedimento contaminados com o WSSV. Além disso, seria interessante investigar em que medida a presença do WSSV em amostras submetidas ou não à desinfecção tem potencial de infecção do hospedeiro. Neste sentido, poder-se-ia propor distinguir partículas virais infecciosas e não-infecciosas, através de PCR com iniciadores específicos para uma proteína do envelope viral, a proteína VP28, cuja importância na adesão do vírus à célula hospedeira já foi demonstrada. Além destes experimentos, poder-se-ia ainda realizar experimentos de exposição de camarões a amostras de água e sedimento contaminados com o WSSV, em condições de laboratório de forma a se avaliar o real potencial destes meios como vetores passivos do vírus e a eficiência de métodos para a sua desinfecção.

CONCLUSÕES

- O FTA *gene card* (BIOAMERICA) pode ser considerado como uma boa alternativa para a coleta e o armazenamento de amostras de água com o objetivo de detecção viral por PCR;
- Os iniciadores IK mostraram-se mais sensíveis para a detecção do WSSV, quando comparados com os iniciadores WS146, tanto para amostras de camarão, quanto de plâncton e sedimento. No entanto, como esperado, mostraram menor sensibilidade na detecção do WSSV quando comparados aos ensaios de *q*PCR;
- Os conjuntos de iniciadores desenhados para a RuBisCO de fitoplâncton e para o rRNA 18S de zooplâncton mostraram-se eficientes e essenciais para a verificação da qualidade e integridade do DNA extraído das amostras de água e sedimento, além de comprovar a presença de material genômico específico e analisar a existência ou não de inibidores enzimáticos nas reações de amplificação por PCR, evitando, assim, possíveis resultados falso-negativos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Não foi detectada a presença do WSSV em nenhuma das amostras de plâncton coletadas em 2009 em Laguna, sejam as provenientes das lagoas, ou aquelas oriundas das fazendas de cultivo;
- A presença do WSSV foi detectada nas amostras de sedimento coletadas em 2009 nas duas fazendas de cultivo de camarões de Laguna;
- A presença do WSSV foi detectada nas amostras de plâncton, camarão e sedimento coletados em 2009 nas duas fazendas de cultivo de camarões de Tijucas;
- Trocas de água de rotina e despescas emergências representam um risco para a propagação do WSSV no ambiente, entre fazendas e viveiros;
- O acompanhamento rigoroso do estado de saúde e do estado sanitário do camarão de cultivo e a adoção de medidas profiláticas para a água e o solo, bem como a desinfecção e filtração, devem ser incorporadas à rotina de manejo para reduzir o impacto da doença da mancha branca (WSD), diminuindo, assim, a propagação da mesma dentro de uma dada região e evitando, ainda, a introdução do patógeno em uma área nova;
- O monitoramento da presença de WSSV na água e no solo dos viveiros pode representar uma importante ferramenta de avaliação do potencial de infecção de um viveiro, antes do povoamento deste com pós-larvas certificadas.
- A detecção da presença de partículas virais nos efluentes dos cultivos pode evitar a disseminação da doença para corpos de água adjacentes, de modo a minimizar ou evitar a contaminação do ambiente e o risco potencial para a fauna nativa.
- A implantação de medidas de biossegurança, assim como boas práticas de manejo, são fortes aliados à prevenção e ao controle do WSSV.

PERSPECTIVAS

- Avaliar, em condições de laboratório, a possível infecção de camarões *Litopenaeus vannamei*, juvenis e adultos, após exposição a sedimento contaminado com o WSSV (contaminado naturalmente e experimentalmente);
- Caracterizar a possível infecção pelo WSSV decorrente da exposição a amostras de sedimento contaminado. Com este objetivo poder-se-ia tentar distinguir a presença de partículas virais infecciosas e não infecciosas entre os animais positivos para o vírus, através de PCR com iniciadores específicos para uma proteína do envelope viral (VP28), cuja importância na adesão do vírus à célula hospedeira já foi demonstrada (ROBALINO et. al., 2006), bem como determinar a carga viral nos animais infectados por qPCR;
- Avaliar e comparar os resultados da amplificação da sequência correspondente a VP28, utilizando tecido muscular dos animais expostos a sedimento contaminado como fonte de inóculo para a infecção experimental de camarões em condições controladas de laboratório;
- Avaliar, em termos de eficiência e facilidade de uso, métodos distintos de desinfecção de amostras de água e de sedimento contaminados com o WSSV.

BIBLIOGRAFIA

ABCC. **Associação Brasileira dos Criadores de Camarão**. Programa de Biossegurança para Fazendas de Camarão Marinho. 2005. Disponível em: <<http://www.abccam.com.br>>. Acesso em: setembro de 2010.

ABCC. **Associação Brasileira dos Criadores de Camarão**. Evolução do Desempenho da Carcinicultura Brasileira. 2007. Disponível em: <<http://www.abccam.com.br>>. Acesso em: setembro de 2010.

ABCC. **Associação Brasileira dos Criadores de Camarão**. Estatísticas internacionais: Principais países produtores de camarão cultivado. 2009. Disponível em: <<http://www.abccam.com.br>>. Acesso em: setembro de 2010.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Fundamentos da Biologia Celular: uma introdução à biologia molecular da célula**. Porto Alegre: Artes Médicas, 1999. 757 p.

ANDREATTA, E. R.; BELTRAME, E. Cultivo de camarões marinhos. In: POLI, C. R.; POLI, A. T. B.; ANDREATTA, E.; BELTRAME, E. **Aquicultura: experiências brasileiras**. Florianópolis: Multitarefa, 2004. p. 199-220.

ARTS, J. A. J.; TAVERNE-THIELE, A. J.; SAVELKOUL, H. F. J.; ROMBOUT, J. H. W. M. Haemocyte reactions in WSSV immersion infected *Penaeus monodon*. **Fish & Shellfish Immunology** **23**: 164-170, 2007.

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

BALASUBRAMANIAN, G.; SUDHAKARAN, R.; MUSTHAQ, S.; SARATHI, M.; SAHUL HAMEED, A. S. Studies on the inactivation of white spot syndrome virus (WSSV) of shrimp by physical and chemical treatment, and seaweed extracts tested in marine and freshwater animal models. **Journal of Fish Diseases**, **29**:569-72, 2006.

BIOAMERICA. **Biologia Molecular do Brasil Ltda**. Disponível em: <<http://www.bioamerica-inc.com>>. Acesso em: setembro de 2007.

BLAGODATSKAYA, E.; BLAGODATSKY, S.; ANDERSON, T.H.; KUZUYAKOV, Y. Extracellular DNA: content and persistence in native soils. **Geophysical Research Abstracts**, **9**: 00620, 2007.

BONDAD-REANTASO, M.G.; MACGLADDERY, S. E.; EAST, I.; SUBASINGHE, R. P. **Asia Diagnostic Guide to Aquatic Animal Diseases**. Fao Fisheries Technical Paper, FAO, Rome. 178-182, 2001.

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

CAMARGO, S. G. O.; POUHEY, J. L. O. Aqüicultura - Um Mercado em Expansão. **Revista Brasileira de Agrociência**, **11** (4): 393-396, 2005.

CANE, P. A.; COOK, P.; RATCLIFFE, D.; MUTIMER, D.; PILLAY, D. Use of real time PCR and fluorimetry to detect lamivudine resistance-associated mutations in hepatitis B virus. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **43**: 1600-1608, 1999.

CAVALLI, L. S. **White spot syndrome vírus (WSSV) em camarões peneídeos cultivados e selvagens em águas estuarinas e costeiras do sul do Brasil**. 2009. 137f. Tese (Dotourado em Oceanografia Biológica) – Curso de Pós-Graduação em Oceanografia Biológica, Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS.

CAVALLI, R. O.; FERREIRA, J. F. O futuro da Pesca e da Aqüicultura Marinha na Brasil: A Maricultura. **Ciência e Cultura**, **62**: 3, 2010.

CHAKRABORTY, A.; OTTA, S.K.; JOSEPH, B.; KUMAR, S.; HOSSAIN, M. S.; KARUNASAGAR, I.; VENUGOPAL, M. N.; KARUNSAGAR, I. Prevalence of white spot syndrome virus in wild crustaceans along the coast of India. **Current Science**, **82**: 1392–1397, 2002.

CHANG, P. S., LO, C. F., WANG, Y. C., KOU, G. H. Identification of white spot syndrome associated baculovirus (WSBV) target organs in the *Penaeus monodon* by in situ hybridization. **Diseases of Aquatic Organisms**, **27**: 131-139, 1996.

CHANG, P. S.; CHEN, H.C.; WANG, Y.C. Detection of white spot syndrome associated baculovirus in experimentally infected wild shrimp, crab and lobsters by *in situ* hybridization. ***Aquaculture***, **164**: 233–242, 1998.

CHANG, P.S.; CHEN, L.J.; WANG, Y.C. The effect of ultraviolet irradiation, heat, pH, ozone, salinity and chemical disinfectants on the infectivity of white spot syndrome baculovirus. ***Aquaculture***, **166**: 1–17, 1998.

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. 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, 2001.

CHAPMAN, R. W.; BROWDY, C. L.; SAVIN, S.; PRIOR, S.; WENNER, E. Sampling and evaluation of white spot syndrome virus in commercially important Atlantic penaeid shrimp stocks. ***Diseases of Aquatic Organisms***, **59**: 179-185, 2004.

CHAYABURAKUL, K.; LIGHTNER, D. V.; SRIURAIRATTANA, S.; NELSON, K. T.; WITHYACHUMNARNKUL, B. Different responses to infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) in *Penaeus monodon* and *P. vannamei*. ***Diseases of Aquatic Organisms***, **67**: 191-200, 2005.

CHEN, L. L.; LO, C. F.; CHIU, Y. L.; CHANG, C. F.; KOU, G. H. Natural and experimental infection of white spot syndrome virus (WSSV) in benthic larvae of mud crab *Scylla serrata*. ***Diseases of Aquatic Organisms***, **40**: 157–161, 2000.

CHEN, L. L.; LEU, J. H.; HUANG, C. J.; CHOU, C. M.; CHEN, S. M.; WANG, C. H.; LO, C. F.; KOU, G. H. Identification of a nucleocapsid protein (VP35) gene of shrimp white spot syndrome virus and characterization of the motif important for targeting VP35 to the nuclei of transfected insect cells. ***Virology*** **293**: 44-53, 2002a.

CHEN, L. L.; WANG, H. C.; HUANG, C. J.; PENG, S. E.; CHEN, Y. G.; LIN, S. J.; CHEN, W. Y.; DAI, C. F.; YU, H. T.; WANG, C. H.; LO, C. F.; KOU, G. H. Transcriptional analysis of the DNA polymerase

gene of shrimp white spots syndrome virus. **Virology**, **301**: 136-147, 2002b.

CHEN, X. F.; CHEN, P. C.; WU, D. H.; HUAI, H.; CHI, X. C. A new baculovirus of cultured shrimp. **Science in China Series C: Life Sciences**, **40**: 630–635, 1997.

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

CHOU, H. Y.; HUANG, C. Y.; LO, C. F.; KOU, G. H. Studies on transmission of white spot syndrome associated baculovirus (WSBV) in *Penaeus monodon* and *P. japonicus* via waterborne contact and oral ingestion. **Aquaculture**, **164**: 263–276, 1998.

COHEN, J. M.; SAMOCHA, T. M.; FOX, J. M.; GANDY, R. L.; LAWRENCE, A. L. Characterization of water quality factors during intensive raceway production of juvenile *Litopenaeus vannamei* using limited discharge and biosecure management tools. **Aquacultural Engineering**, **32**: 425–442, 2005.

CORSIN, F.; TURNBULL, J. F.; MOHAN, C. V.; HAO, N. V.; MORGAN, K. L. Pond-level risk factors for white spot disease outbreaks. In: WALKER, P.; LESTER, R.; BONDAD-REANTASO, M. G. **Diseases in Asian Aquaculture V**, Fish Health Section, Asian Fisheries Society. Manila. 2005. p. 75-92.

COSTA, S. W.; ANDREATTA, E. R.; GRUMANN, A. **Programa Estadual para o Desenvolvimento do Cultivo de Camarões Marinhos**. Secretaria de Desenvolvimento Rural e Agricultura. Epagri, 1999. 37p.

DAJOZ, R. **Ecologia geral**. 4. ed. Petrópolis: Vozes, 1983. 472p.

DEGEN, H.; DEUFEL, A.; EISEL, D.; GRÜNEWALD-JANHO, S.; KEESEY, J. **PCR Applications Manual**. 3. ed. Germany: Roche Diagnostics GmbH, 2006. 338 p.

DE MORAES, R. R.; MARUNIAK, J. E.; FUNDERBURK, J. E. **Methods for detection of *Anticarsia gemmatalis***

Nucleopolyhedrosisvirus DNA in soil. Applied and Environmental Microbiology, 65: 2307–2311, 1999.

DURAND, S.; LIGHTNER, D. V.; NUNAN, L. M.; REDMAN, R. M.; MARI, J.; BONAMI, J. Application of gene probes as diagnostic tools for white spot baculovirus (WSBV) of penaeid shrimp. **Diseases of Aquatic Organisms**, 27: 59-66, 1996.

DURAND, S.; LIGHTNER, D. V.; REDMAN, R. M.; BONAMI, J. Ultrastructure and morphogenesis of White Spot Syndrome Baculovirus (WSSV). **Diseases of Aquatic Organisms**, 29 (3): 205-211, 1997.

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

DURAND, S. V.; REDMAN, R. M.; MOHNEY, L. L.; TANGNELSON, K.; BONAMI, J. R.; LIGHTNER, D. V. Qualitative and quantitative studies on the relative virus load of tails and heads of shrimp acutely infected with WSSV. **Aquaculture**, 216: 9-18, 2003.

ESCOBEDO-BONILLA, C. M.; ALDAY-SANZ, V.; WILLE, M.; SORGELOS, P.; PENSAERT, M. B.; NAUWYNCK, H. J. A review on the morphology, molecular characterization, morphogenesis and pathogenesis of white spot syndrome virus. **Journal of Fish Diseases**, 31: 1–18, 2008.

ESPARZA-LEAL, H. M.; ESCOBEDO-BONILLA, C. M., CASILLAS-HERNÁNDEZ, R.; ÁLVAREZ-RUIZ, P.; PORTILLO-CLARK, G.; VALERIO-GARCÍA, R. C.; HERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; MÉNDEZ-LOZANO, J.; VIBANCO-PÉREZ, N.; MAGALLÓN-BARAJAS, F. J. Detection of white spot syndrome virus in filtered shrimp-farm water fractions and experimental evaluation of its infectivity in *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. **Aquaculture**, 292: 16–22, 2009.

FAO. **Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação**. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: setembro de 2010.

FEGAN, D. F.; CLIFFORD, H. C. Health management for viral diseases in shrimp farms. In: BROWDY, C. L. AND JORY, D. E. **The new Wave, Proceedings of the special session on sustainable shrimp**

culture, Aquaculture. The World Aquaculture society, Baton Rouge, LA. USA, 2001. p. 105-135.

FLEGEL, T. W. Special topic review: major viral diseases of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, **13**: 433-442, 1997.

FLEGEL, T. W.; ALDAY-SANZ, V. The crisis in Asian shrimp aquaculture: current status and future needs. **Journal of Applied Ichthyology**, **14**: 269-273, 1998.

FLEGEL, T. W.; PASHARAWIPAS, T. Active viral accommodation: a new concept for crustacean response to viral pathogens. In: FLEGEL, T.W. **Advances in shrimp biotechnology**. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, 1998. p. 245-250.

FLEGEL, T. W. Detection of major penaeid shrimp viruses in Asia, a historical perspective with emphasis on Thailand. **Aquaculture**, **258**: 1-33, 2006.

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

GARZA, J. R.; HASSON, K. W.; POULOS, B. T. ; REDMAN, R. M. ; WHITE, B. L.; LIGHTNER, D. V. Demonstration of infectious Taura Syndrome virus in the feces of sea gulls collected during an epizootic in Texas. **Journal of Aquatic Animal Health**, **9 (2)**: 156-159, 1997.

GELINSKI NETO, F. **Carcinicultura e meio ambiente: abalando mitos**. 2005. Tese (Doutorado em Engenharia de Produção) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Produção. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, SC.

GENBANK. **National Center for Biotechnological Information**. NCBI. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/GenbankSearch.html>>. Acesso em: setembro de 2008.

GESTEIRA, T. C. V. **Sanidade de organismos aquáticos no Brasil**. In: ABRAPOA, 2006, Maringá. P. 137-158.

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

HOSSAIN, M. S.; OTTA, S. K.; CHAKRABORTY, A.; KUMAR, H. S.; KARUNASAGAR, I.; KARUNASAGAR, I. Detection of WSSV in cultured shrimp, captured brooders, shrimp postlarvae and water samples in Bangladesh by PCR using different primers. **Aquaculture**, **237**: 59-71, 2004.

HSU, H. C.; LO, C. F.; KIN, S. C.; LIU, K. F.; PENG, S. E.; CHANG, Y. S.; CHEN, L. L.; LIU, W. L.; KOU, G. H. Studies on effective PCR screening strategies for white spot syndrome virus (WSSV) detection in *Penaeus monodon* brooders. **Diseases of Aquatic Organisms**. **39**: 13–19, 1999.

INOUE, K. et al. Mass mortalities of cultured kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, in Japan in 1993: electron microscopic evidence of the causative virus. **Fish Pathology**, **29**: 149-158, 1994.

INOUE, K.; YAMANO, K.; IKEDA, N.; KIMURA, T.; NAKANO, H.; MOMOYAMA, K.; KOBAYASHI, J.; MIYAJIMA, S. The penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV), which causes penaeid acute viremia (PAV). **Fish Pathology**, **31**: 39-45, 1996.

JIANG, Y. S.; ZHAN, W. B.; WANG, S. B.; XING, J. Development of primary shrimp hemocyte cultures of *Penaeus chinensis* to study white spot syndrome virus (WSSV) infection. **Aquaculture**, **253**: 114–119, 2006.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Biologia Celular e Molecular**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. 322 p.

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**, **153**: 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**, **164**: 243-251, 1998.

KIATPATHOMCHAI, W.; BOONSAENG, V.; TASSANAKAJON, A.; WONGTEERASUPAYA, C.; JITRAPAKDEE, S.; PANYIM, S. A non-stop, single-tube, semi-nested PCR technique for grading the severity of white spot syndrome virus infections in *Penaeus monodon*. **Diseases of Aquatic Organisms**, **47**(3): 235-239, 2001.

KIM, C. K.; KIM, P. K.; KIM, S. G.; SOHN, D. S.; SIM, M. A.; PARK, M. S.; HEO, T. H.; LEE, J. D.; LEE, H. K.; JUN, K. L. Development of a polymerase chain reaction (PCR) procedure for the detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimp. **Journal of Fish Diseases**, **21**: 11-17, 1998.

KOU, G. H.; PENG, S.; CHIU, Y.; LO, C. Tissue distribution of white spot syndrome virus (WSSV) in shrimp and crabs. In: FLEGEL, T.W. **Advances in Shrimp Biotechnology**. Bangkok: National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, 1998. p. 267-271.

LEU, J. H.; TSAI, J. M.; WANG, H. C.; WANG, A. H.; WANG, C. H.; KOU, G. H.; LO, C. F. 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. **Journal of Virology** **79**: 140-149, 2005.

LEU, J. H.; CHANG, C. C.; WU, J. L.; HSU, C. W.; HIRONO, I.; AOKI, T.; JUAN, H. F.; LO, C. F.; KOU, G. H.; HUANG, H. C. Comparative analysis of differentially expressed genes in normal and White spot syndrome virus infected *Penaeus monodon*. **BMC Genomics**, **8**: 120, 2007.

LEWIN, S. R.; VESANEN, M.; KOSTRIKIS, L.; HURLEY, A.; DURAN, M.; ZHANG, L.; HO, D. D.; MARKOWITZ, M.; GIBSON, U. E.; HEID, C. A. Use of real time PCR and molecular beacons to detect virus replication in human immunodeficiency virus type 1-infected individuals on prolonged effective antiretroviral therapy. **Journal of Virology**, **73**: 6099-6103, 1999.

LI, X.; LIU, Q.; HOU, L.; HUANG, J. Effect of VP28 DNA vaccine on white spot syndrome virus in *Litopenaeus vannamei*. **Aquacult Int.** DOI 10.1007/s10499-010-9321-z, 2010.

LIGHTNER, D. V. **A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp.** World Aquaculture Society. Baton Rouge, LO, USA. 1996.

LIGHTNER, D. V.; REDMAN, R. M.; POULOS, B. T.; NUNAN, L. M.; MARI, J. L.; HASSON, K. W. Risk of spread of penaeid shrimp viruses in the Americas by the international movement of live and frozen shrimp. **Rev. Sci. Off. Int. Epiz., 16** (1): 146-160, 1997.

LIGHTNER, D. V.; REDMAN, R. M. Shrimp diseases and current diagnostic methods. **Aquaculture, 64**: 201-220, 1998.

LIGHTNER, D.; HASSON, K.; WHITE, B.; REDMAN, R. Experimental infection of western hemisphere penaeid shrimps with Asian white spot syndrome virus and Asian yellow head virus. **Journal of Aquatic Animal Health, 10**: 271-281, 1998.

LIGHTNER, D. V. Biosecurity in shrimp farming: pathogen exclusion through use of SPF stock and routine surveillance. **Journal of the World Aquaculture Society, 36**: 229-248, 2005.

LIU, B.; YU, Z.; SONG, X.; GUAN, Y. Studies on transmission of WSSV (white spot syndrome virus) in juvenile *Marsupenaeus japonicus* via marine microalgae. **Journal of Invertebrate Pathology, 95**: 87-92, 2007.

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

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. White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and

captured shrimp, crabs and other arthropods. **Diseases of Aquatic Organisms**, **27**: 215–225, 1996b.

LOTZ, J. M.; SOTO, M. A. Model of white spot syndrome virus (WSSV) epidemics in *Litopenaeus vannamei*. **Disease of Aquatic Organisms**, **50**: 199–209, 2002.

MADRID, R. M. Análise das exportações da carcinicultura brasileira de 1999 a 2003: cinco anos de sucesso e, 2004, o início de uma nova fase. **Revista da ABCC**, **1**: 76-84, 2005.

MAEDA, M.; ITAMI, T.; FURUMOTO, A.; HENNIG, O.; IMAMURA, T.; KONDO, M.; HIRONO, I.; AOKI, T.; TAKAHASHI, Y. Detection of penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV) in wild-caught shrimp and other crustaceans. **Fish Pathology**, **33**: 373–380, 1998.

MARQUES, J. S. **Contribuição para o monitoramento do vírus da Síndrome da Mancha Branca na carcinicultura de Santa Catarina**. 2007. 51f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC.

MARQUES, M. R. F.; MOSER, J. R.; MÜLLER, I. C. **Sanidade de organismos aquáticos no Brasil**. Abrapoa. Maringá, PR, p 159-185, 2006.

MAYO, M. A summary of taxonomic changes recently approved by ICTV. **Archives of Virology**, **147**: 1655-1656, 2002.

MELLO, G. L.; FARIAS, A. P. Policultivo de tilápias e camarões marinhos - Os resultados das primeiras experiências em Laguna - SC. **Panorama da Aqüicultura**, **17** (102): 42-47, 2007.

MISCIATTELLI, N.; JONES, D. A., LATCHFORD, J. W. **Potencial of several different methods of combating bacterial disease in shrimp aquaculture with special emphasis on quorum sensing**. V Congresso Ecuatoriano de Acuicultura, Ecuador, Guayaquil. 1999.

MOMOYAMA, K.; HIRAOKA, M.; NAKANO, H.; SAMESHIMA, M. Cryopreservation of penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV) and its

survival in sea water at different temperatures. **Fish Pathology**, **33** (2): 95–96, 1998.

MOSER, J. R. **Respostas bioquímicas do camarão-branco, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931), exposto ao inseticida carbofuran e determinação da prevalência natural do vírus da necrose hipodermal e hematopoiética – IHNNV.** 2005. 78 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC.

MOUILLESSEAU, K.P.; KLIMPEL, K.R.; DHAR, A.K. Improvement in the specificity and sensitivity of detection for the Taura syndrome virus and yellow head virus of penaeid shrimp by increasing the amplicon size in SYBR Green real-time RT-PCR. **Journal of Virological Methods**, **111**: 121-127, 2003.

MPA. **Ministério da Pesca e Aquicultura.** Disponível em: <<http://www.mpa.gov.br>>. Acesso em: dezembro de 2010.

MÜLLER, I. C. **Genes diferencialmente expressos em camarões de cultivo *Litopenaeus vannamei* infectados pelo vírus da mancha branca e genotipagem de isolados geográficos brasileiros do vírus.** 2009. 146f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC.

MULLER-FEUGA. The role of microalgae in aquaculture: situation and trends. **Journal of Applied Phycology** **12**: 527-534, 2000.

MULLIS, K.B.; FALLONA, F.A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalysed chain reaction. **Methods in Enzymology**, **155**: 335-351, 1987.

MUSTHAQ, S. S.; SUDHAKARAN, R.; BALASUBRAMANIAN, G.; SAHUL HAMEED, A. S. Experimental transmission and tissue tropism of white spot syndrome virus (WSSV) in two species of lobsters, *Panulirus homarus* and *Panulirus ornatus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, **93**: 75–80, 2006.

MUSTHAQ, S. S.; MADHAN, S.; SAHUL HAMEED, A. S.; KWANG, J. Localization of VP28 on the baculovirus envelope and its immunogenicity against white spot syndrome virus in *Penaeus monodon*. **Virology**, **391**(2): 315-324, 2009.

NADALA, E. C. B.; LOH, P. C. A comparative study of three different isolates of white spot virus. **Diseases of Aquatic Organisms**, **33**: 231–234, 1998.

NATIVIDAD, K.D.T.; MIGO, M.V.; ALBALADEJO, J.D.; MAGBANUA, J.P.V.; NOMURA, N.; MATSUMURA, M. Simultaneous PCR Detection of Two Shrimp Viruses (WSSV and MBV) in Postlarvae of *P. monodon* in the Philippines. **Aquaculture** **257**: 142–149, 2006.

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

NORIHISA, O.; THYE, T. C.; YUKIO, M.; CHU, B. K.; PALANISAMY, V. Examination for viral inactivation of WSSV (White Spot Syndrome Virus) isolated in Malaysia using black tiger prawn (*Penaeus monodon*). **Japan Agricultural Research Quarterly**, **40**: 93-7, 2006.

NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M. PCR em Tempo Real: Uma inovação tecnológica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, **33**: 10-13, 2004.

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**, **160**:19-30, 1998.

OIE - **World organisation for animal health**. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals. 2003. Disponível em: <http://www.oie.int/eng/en_index.htm>. Acesso em: julho 2009.

OIE. **World organisation for animal health**. Diagnostic Manual for Aquatic Animals. 2006. Disponível em: <http://www.oie.int/eng/normes/fmanual/A_00049.htm>. Acesso em: setembro de 2008.

OSTRENSKY, A.; BOEGER, W. A. Principais problemas enfrentados pela aqüicultura brasileira. In: OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J. R.; SOTO, D. **Aquicultura no Brasil: o desafio é crescer**. Brasília, 2008.

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

PARK, J. H.; LEE, Y. S.; LEE, S.; LEE, Y. An infectious viral disease of penaeid shrimp newly found in Korea. **Diseases of Aquatic Organisms**, **34**: 71-75, 1998.

PENG, S. E.; LO, C. F.; HO, C. H.; CHANG, C. F.; KOU, G. H. Detection of white spot baculovirus (WSBV) in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, using polymerase chain reaction, **Aquaculture** **164**: 253-262, 1998.

PÉREZ-FARFANTE, I.; KENSLEY, B. F. Penaeoid and Sergestoid shrimps and prawns of the world: Keys and diagnosis for the families and genera. *Mémoires du Muséum National D'Histoire Naturelle*, Paris, **175**: 1-233. 1997

PÉREZ, F.; VOLCKAERT, F. A. M. & CALDERÓN, J. Pathogenicity of white spot syndrome virus on postlarvae and juveniles of *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. **Aquaculture** **250**: 586-591, 2005.

PHROMJAI, J.; BOONSAENG, V.; WITHYACHUMNARNKUL, B.; FLEGEL, T. W. Detection of hepatopancreatic parvovirus in Thai shrimp *Penaeus monodon* by *in situ* hybridization, dot blot hybridization and PCR amplification. **Diseases of Aquatic Organisms**, **51**: 227-232, 2002.

PONGMANEERAT, J.; KASORNCHANDRA, J.; BOONYARATPALIN, S.; BOONYARATPALIN, M. Effect of dietary shrimp head meal contaminated with white spot syndrome virus (WSSV) on detection of WSSV in black tiger shrimp (*Penaeus monodon Fabricius*). **Aquaculture Research**, **32**: 383-387, 2001.

PRUDER, G. D. Biosecurity: application in aquaculture. **Aquacultural Engineering**, **32**: 3-10, 2004.

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

RAHMAN, M. M.; ESCOBEDO-BONILLA, C. M.; DANTAS-LIMA, J. J.; WILLE, M.; ALDAY-SANZ, V.; PENSAERT, M. B.; SORGELOOS, P.; NAUWYNCK, H. J. 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**, **261**: 842-849, 2006.

RAHMAN, M. M.; CORTEEL, M.; DANTAS-LIMA, J. J.; WILLE, M.; ALDAY-SANZ, V.; PENSAERT, M. B.; SORGELOOS, P.; NAUWYNCK, H. J. 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**, **269**: 107-113, 2007a.

RAHMAN, M. M.; CORTEEL, M.; WILLE, M.; ALDAY-SANZ, V.; PENSAERT, M. B.; SORGELOOS P.; NAUWYNCK, H. J. The effect of raising water temperature to 33 °C in *Penaeus vannamei* juveniles at different stages of infection with white spot syndrome virus (WSSV). **Aquaculture**, **272**: 240-245, 2007b.

ROBALINO, J.; PAYNE, C.; PARNELL, P.; SHEPARD, E.; GRIMES, A. C.; METZ, A.; PRIOR, S.; WITTEVELDT, J.; VLAK, J. M.; GROSS, P. S.; WARR, G.; BROWDY, C. L. 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 Research**, **118**: 55-61, 2006.

ROCHA, I. P. **A Indústria Brasileira do Camarão Cultivado**. 2002. Disponível em: <<http://www.mcraquacultura.com.br/publicacoes.php>>. Acesso em: setembro 2008.

ROCHA, I. P. **A Indústria Brasileira do Camarão Cultivado**. World Aquaculture Society. 2003. Disponível em:

<<http://www.mcraquacultura.com.br/arquivos/>>. Acesso em: 09 novembro 2008.

ROUT, N. Transcriptional and translational expression profile of a white spot syndrome viral (WSSV) gene in different organs of infected shrimp. **Aquaculture**, **245**: 31-38, 2005.

SAHUL HAMEED, A. S.; ANILKUMAR, M.; STEPHEN RAJ, M. L.; JAYARAMAN, K. Studies on the pathogenicity of systemic ectodermal and mesodermal baculovirus and its detection in shrimp by immunological methods. **Aquaculture**, **160**: 31-45, 1998.

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

SAHUL HAMEED, A. S.; MURTHI, B. L. M.; RASHEED, M.; SATHISH, S.; YOGANANDHAN, K.; MURUGAN, V.; JAYARAMAN, K. An investigation of *Artemia* as a possible vector for white spot syndrome virus (WSSV) transmission to *Penaeus indicus*. **Aquaculture**, **204**: 1–10, 2002.

SAHUL HAMEED, A. S.; BALASUBRAMANIAN, G.; MUSTHAQ, S. S.; YOGANANDHAN, K. Experimental infection of twenty species of Indian marine crabs with white spot syndrome virus (WSSV). **Diseases of Aquatic Organisms**, **57**: 157–161, 2003.

SÁNCHEZ, M. C. RODRÍGUEZ, L. Medidas de Bioseguridad para evitar La Introducción y Dispersión de Enfermedades Virales em Granjas Camaronícolas. In: CRUZ S. L.; RICQUE, M. D.; NIETO, L. M.; VILLAREAL, D.; SCHOLZ, U.; GONZÁLVEZ, M. **Avances em Nutrición Acuícola VII. Memorias del VII Simposium International de Nutrición Acuícola**, 2004.

SÁNCHEZ-MARTÍNEZ, J. G.; AGUIRRE-GUSMÁN, G.; MEJÍA-RUIZ, H. White Spot Syndrome Virus in cultured shrimp: A review. **Aquaculture Research**, **38**: 1339-1354, 2007.

SANTOS, S. T.; DIREITO, C. N.; TEIXEIRA, R. S. **Isolamento e amplificação de DNA de amostras de solo como ferramenta para avaliar a diversidade das populações de bactéria em solos Agrícolas.** Seropédica. Embrapa. Agrobiologia. 36p, 2002.

SANTOS, A. A.; NOVAES, A. L. T.; SILVA, F. M.; RUPP, G. S.; VENTURA, R.; MELLO, G. L.; WINCKLER, S. Síntese Informativa da Maricultura. **Maricultura Mexilhões, Ostras e Vieiras.** EPAGRI. CEDAP, 2010.

SCHMITTGEN, T.; LIVAK, K. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. **Nature Protocols**, **3**(6): 1101-1108, 2008.

SCHUUR, A. M. Evaluation of biosecurity applications for intensive shrimp farming. **Aquacultural Engineering**, **28**: 3-20, 2003.

SEIFFERT, W. A mancha branca em Santa Catarina. **Revista da ABCC**, **1**: 34-36, 2005.

SEIFFERT, W. Q.; WINCKLER, S.; MAGGIONI, D. S. A Mancha Branca em Santa Catarina. **Revista Panorama da Aqüicultura**, **87**, 2005.

SHEKHAR, M.S.; AZAD, I.S.; RAVICHANDRAN, P. Comparison of dot blot and PCR diagnostic techniques for detection of white spot syndrome virus in different tissues of *Penaeus monodon*. **Aquaculture**, **261**: 1122–1127, 2006.

SHI, Z.; WANG, H.; ZHANG, J.; XIE, Y.; LI, L.; CHEN, X.; EDGERTON, B. F.; BONAMI, J. R. Response of crayfish, *Procambarus clarkia*, haemocytes infected by white spot syndrome virus. **Journal of Fish Diseases**, **28**: 151-156, 2005.

SILVA-SOUZA, A. T. **Sanidade de organismos aquáticos no Brasil.** 2006. Associação Brasileira de Patologia de Organismos Aquáticos (Abrapoa), Maringá, PR.

SOBSEY, M.D.; MESCHKE, J.S. Virus survival in the environment with special attention to survival in sewage droplets and other environmental media of fecal or respiratory origin. **Draft**, **4**: 1–87, 2003.

SOTO, M. A.; LOTZ, J. M. Epidemiological parameter of white spot syndrome virus infections in *Litopenaeus vannamei* and *L. setiferus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, 78: 9–15, 2001.

SOUZA, T. M. **Detecção do vírus da mancha branca (WSV) em *Litopenaeus vannamei* por métodos moleculares de diagnóstico: Hibridização in situ e PCR em Tempo Real**. 2008. 46f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura). Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, SC.

SRITUNYALUCKSANA, K.; SRISALA, J.; MCCOLL, K.; NIELSEN, L.; FLEGEL, T. W. Comparison of PCR testing methods for white spot syndrome virus (WSSV) infections in penaeid shrimp. **Aquaculture**, 255: 95–104, 2006.

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

SUPAMATTAYA, K.; HOFFMANN, R. W.; BOONYARATPALIN, S.; KANCHANAPHUM, P. 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, 1998.

TAKAHASHI, Y.; ITAMI, T.; MAEDA, M.; SUZUKI, N.; KASORNCHANDRA, J.; SUPAMATTAYA, K.; KHONGPRADIT, R.; BOONYARATPALIN, S.; KONDO, M.; KAWAI, K.; KUSUDA, R.; HIRONO, I.; AOKI, T. Polymerase chain reaction (PCR) amplification of bacilliform virus (RV-PJ)DNA in *Penaeus japonicus* Bate and systemic ectodermal and mesodermal baculovirus (SEMBV) DNA in *Penaeus monodon* Fabricius. **Journal of Fish Diseases** 19: 399–403, 1996.

TANG, K. F. J.; LIGHTNER, D. V. Quantification of white spot syndrome virus DNA through a competitive polymerase chain reaction. **Aquaculture**, 189: 11–21, 2000.

TANG, K. F. J.; LIGHTNER, D. V. Detection and quantification of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in penaeid

shrimp by real-time PCR. **Diseases of Aquatic Organisms**, **44**: 79- 85, 2001.

TANG, K. F. J.; DURAND, S. V.; WHITE, B. L.; REDMAN, R. M.; MOHNEY, L. L.; LIGHTNER, D. V. Induced resistance to white spot syndrome virus infection in *Penaeus stylirostris* through pre-infection with infections hypodermal and hematopoietic necrosis virus – a preliminary study. **Aquaculture**, **216**: 19-29, 2003.

TAPAY, L.; NADALA, C.; LOH, P. A polymerase chain reaction protocol for the detection of various geographical isolates of white spot virus. **Journal of Virological Methods**, **82**: 39-43, 1999.

TINOCO, I. M. **Introdução ao estudo dos componentes bióticos dos sedimentos marinhos recentes**. Recife: Editora Universitária da UFPE, 1989. 219 p.

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

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

VAN HULTEN, M. C.; GOLDBACH, R. W.; VLAK, J. M. Three functionally diverged major structural proteins of white spot syndrome virus evolved by gene duplication. **Journal of General Virology**, **81**: 2525-2529, 2000a.

VAN HULTEN, M. C.; WESTENBERG, M; GOODALL, S. D.; VLAK, J. M. Identification of two major virion protein genes of white spot syndrome virus of shrimp. **Virology** **266**: 227–236, 2000b.

VAN HULTEN, M. C.; WITTEYELDT, J.; SNIPPE, M.; VLAK, J. M. White spot syndrome virus envelope protein VP28 is involved in the systemic infection of shrimp. **Virology** **285**: 228–233, 2001a.

VAN HULTEN, M. C.; WITTEYELDT, J.; PETERS, S.; KLOOSTERBOER, N.; TARCHINI, R.; FIERIS, M.; SANDBRINK, H.; LANKHORST, R. K.; VLAK, J. M. The White spot syndrome virus DNA genome sequence. **Virology**, **286**: 7–22, 2001b.

VAN HULTEN, M. C.; REIJNS, M.; VERMEESCH, A. M.; ZANDBERGEN, F.; VLAK, J. M. Identification of VP19 and VP15 of White Spot Syndrome Virus (WSSV) and glycosylation status of the WSSV major structural proteins. **Journal of General Virology**, **83**: 257-265, 2002.

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

VENEGAS, C. A.; NONAKA, L.; MUSHIAKE, K.; NISHIZAWA, T.; MUROG, K. Quasi-immune response of *Penaeus japonicus* to penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV). **Diseases of Aquatic Organisms**, **42**: 83-89, 2000.

WAHID. **World Animal Health Information Database**. Disponível em: <<http://www.oie.int/wahid/public.php>>. Acesso em: outubro de 2010.

WANG, C. H.; LO, C. F.; LEU, J. H.; CHOU, C. M.; YEH, P. Y.; CHOU, H. Y.; TUNG, M. C. ; CHANG, C. F. ; SU, M. S. ; KOU, G. H. Purification and genomic analysis of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) of *Penaeus monodon*. **Diseases of Aquatic Organisms**, **23**: 239-242, 1995.

WANG, C. H.; YANG, H. N.; LIU, H. C.; KOU, G. H.; LO, C. F. Nested polymerase chain reaction and *in situ* hybridization for detection of nucleopolyhedrosis. **Journal of Virological Methods**, **84**(1): 65–75, 2000.

WANG, C. S.; TSAI, Y. J. & CHEN, S. N. Detection of white spot disease virus (WSDV) infection in shrimp using *in situ* hybridization. **Journal of Invertebrate Pathology**, **72**: 170-173, 1998.

WANG, Q.; WHITE, B.; REDMAN, R. & LIGHTNER, D. Per os challenge of *Litopenaeus vannamei* postlarvae and *Farfantepenaeus*

duorarum juveniles with six geographic isolates of white spot syndrome virus. **Aquaculture**, **170**: 179-194, 1999.

WANG, Q.; POULOS, B. T.; LIGHTNER, D. V. Protein analysis of geographic isolates of shrimp white spot syndrome virus. **Archives of Virology**, **145**: 263-274, 2000a.

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

WANG, Y. G.; HASSAN, M. D.; SHARIFF, M.; ZAMRI, S. M.; CHEN, X. Histopathology and cytopathology of white spot syndrome virus (WSSV) in cultured *Penaeus monodon* from peninsular Malaysia with emphasis on pathogenesis and the mechanism of white spot formation. **Diseases of Aquatic Organisms**, **39**: 1-11, 1999.

WANG, Y.; ZHANG, X.; YUAN, L.; XU, T.; RAO, Y.; LI, J.; DAI, H. Generation of recombinant monoclonal antibodies to study structure–function of envelope protein VP28 of white spot syndrome virus from shrimp. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, **372**: 902-906, 2008.

WANG, X.; ZHAN, W. Development of an immunochromatographic test to detect White Spot Syndrome Virus of shrimp. **Aquaculture**, **255**: 196-200, 2006.

WINCKLER, S. Comunicação pessoal. 2009. Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural **EPAGRI**. Florianópolis, SC.

WITTEVELDT, J.; CIFUENTES, C. C.; VLAK, J. M.; VAN HULTEN, M. C. Protection of *Penaeus monodon* against White Spot Syndrome Virus by oral vaccination. **Journal of Virology**, **78**: 2057-2061, 2004.

WONGTEERASUPAYA, C.; VICKERS, J. E.; SRIURAIRATANA, S.; NASH, G. L.; AKARAJAMORN, A.; BOONSAENG, V.; PANYIM, S.; 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**, **21**: 69–77, 1995.

WONGTEERASUPAYA, C.; WONGWISANSRI, S.; BOONSAENG, V.; PANYIM, S.; PRATANPIPAT, P.; NASH, G. L.; WITHYACHUMNARNKUL, B.; FLEGELT, W. DNA fragment of *Penaeus monodon* baculovirus PmNoBII gives positive *in situ* hybridization with white spot viral infection in six penaeid shrimp species. **Aquaculture**, **143**: 23-32, 1996.

WOOD, A.W.; GRANADOS, R.R. Genetically engineered baculovirus as agents for pest control. **Annual Review of Microbiology**, **45**: 69-87, 1991.

WU, J. L.; NAMIKOSHI, A.; NISHIZAWA, T.; MUSHIAKE, K.; TERRUYA, K.; MUROGA, K. Effects of shrimp density on transmission of penaeid acute viremia in *Penaeus japonicus* by cannibalism and the waterborne route. **Disease of Aquatic Organisms**, **47**: 129-135, 2001.

XU, J.; HAN, F., ZHANG, X. Silencing shrimp white spot syndrome virus (WSSV) genes by siRNA. **Antiviral Research**, **73**: 126-131, 2006.

YAN, D. C.; DONG, S. L.; HUANG, J.; YU, X. M.; FENG, M. Y.; LIU, X. Y. White spot syndrome virus (WSSV) detected by PCR in rotifers and rotifer resting eggs from shrimp pond sediments. **Disease of Aquatic Organisms**, **59**: 69-73, 2004.

YAN, D. C.; DONG, S. L.; HUANG, J.; ZHANG, J. S. White spot syndrome virus (WSSV) transmission from rotifer inoculum to crayfish. **Journal of Invertebrate Pathology**, **94**: 144-148, 2007a.

YAN, D. C.; FENG, S. Y.; HUANG, J.; DONG, S. L. Rotifer cellular membranes bind to white spot syndrome virus (WSSV). **Aquaculture**, **273**: 423-426, 2007b.

YANG, F.; HE, J.; LIN, X.; PAN, D.; ZHANG, X.; XU, X. Complete genome sequence of the shrimp white spot bacilliform virus. **Journal of Virology**, **75**: 11811-11812, 2001.

YI, G.; WANG, Z.; QI, Y.; YAO, L.; QIAN, J.; HU, L. Vp28 of shrimp white spot syndrome virus is involved in the attachment and penetration

into shrimp cells. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, **37**: 726-734, 2004.

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

ZHANG, J.S.; DONG, S.L.; DONG, Y.W.; TIAN, X.L.; HOU, C.Q. Bioassay evidence for the transmission of WSSV by the harpacticoid copepod *Nitocra* sp. **Journal of Invertebrate Pathology**, **97**: 33–39, 2007.

ZHANG, J. S.; DONG, S. L.; DONG, Y. W.; TIAN, X. L.; HOU, C. Q. Bioassay evidence for the transmission of WSSV by the harpacticoid copepod *Nitocra* sp. **Journal of Invertebrate Pathology**, **97**: 33–39, 2008.

ZHANG, X.; HUANG, C. XU, X.; HEW, C. L. Identification and localization of a prawn white spot syndrome virus gene that encodes an envelope protein. **Journal General Virology**, **83**: 1069–1074, 2002a.

ZHANG, X.; HUANG, C. XU, X.; HEW, C. L. Transcription and identification of an envelope protein gene (p22) from shrimp White Spot Syndrome Virus. **Journal General Virology**, **83**: 471-477, 2002b.

ZHU, F.; DU, H.; MIAO, Z.; QUAN, H.; XU, Z. Protection of *Procambarus clarkii* against white spot syndrome virus using inactivated WSSV. **Fish & Shellfish Immunology**, **26**: 685-690, 2009.