

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DO MAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MARINHAS TROPICAIS**

**INVESTIGAÇÃO DA OCORRÊNCIA DOS VÍRUS DA SÍNDROME
DA MANCHA BRANCA (WSSV) E DA INFECÇÃO HIPODERMAL
E NECROSE HEMATOPOIÉTICA (IHHNV) EM CAMARÕES
COLETADOS EM ÁREA SOB INFLUÊNCIA DE EFLUENTES DA
CARCINICULTURA**

JOÃO MAFALDO DE OLIVEIRA NETO

FORTALEZA-CE

2006

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DO MAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MARINHAS TROPICAIS**

INVESTIGAÇÃO DA OCORRÊNCIA DOS VÍRUS DA SÍNDROME DA MANCHA BRANCA (WSSV) E DA INFECÇÃO HIPODERMAL E NECROSE HEMATOPOIÉTICA (IHHNV) EM CAMARÕES COLETADOS EM ÁREA SOB INFLUÊNCIA DE EFLUENTES DA CARCINICULTURA



Orientadora:
Tereza Cristina Vasconcelos Gesteira, Ph.D

FORTALEZA-CE

2006

6. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

O encontro de indivíduos da espécie exótica *L. vannamei* no Estuário do Rio Jaguaribe na localidade de Canavieiras do Município de Aracati-CE indicou seu escape para o ambiente de entorno das fazendas de carcinicultura.

As espécies nativas *F. subtilis*, *F. brasiliensis* e *L. schmitti* são suscetíveis ao Vírus da Infecção Hipodermal de Necrose Hematopoiética (IHHNV).

Não ficou estabelecida a origem da infecção das espécies nativas *F. brasiliensis* e *L. schmitti*, a despeito da captura, em ambiente natural, de exemplares da espécie exótica *L. vannamei* contaminados com IHHNV.

Quanto à infecção da espécie *F. subtilis*, a pesquisa sugere que a enfermidade pode ter se estabelecido através de efluentes de fazendas de carcinicultura ou de *L. vannamei* infectado, visto ter sido realizado em junho de 2005 um rastreamento pelo Centro de Diagnóstico de Enfermidades do Camarão Marinho do LABOMAR - UFC, que não detectou o vírus em populações naturais dessa espécie capturadas em áreas sem influência de efluentes de fazendas de carcinicultura.

A detecção do IHHNV nas espécies nativas se constitui no primeiro registro desse vírus em populações silvestres do Atlântico Sul-americano.

Considerando as conclusões acima, sugere-se um monitoramento permanente das enfermidades virais nos cultivos de camarão e suas áreas de entorno, tendo em vista o controle da disseminação de enfermidades.

5. DISCUSSÃO

5.1. Dos parâmetros físico-químicos da água

Os parâmetros físico-químicos pH, salinidade, temperatura e oxigênio dissolvido são monitorados com maior frequência para avaliar a qualidade da água, sendo o último considerado como um dos mais importantes para a aqüicultura (VINATEA, 2004).

Em condições experimentais de avaliação da tolerância a baixas concentrações de oxigênio dissolvido pelo camarão *P. monodon*, foi verificado que a concentração de 0,9 mg/L provocou mortalidade em 50% dos indivíduos submetidos a esse tratamento (ALLAN & MARGUIRRE, 1991).

De acordo com estudos desenvolvidos por Seidman & Lawrence (1985) variações da concentração de oxigênio dissolvido de 1,9 a 4,9 mg/L não afetam o crescimento dos camarões *L. vannamei* e *P. monodon*. No entanto, também em condições experimentais, foi observada mortalidade da espécie *P. semisulcatus* submetidos a níveis constantes de 2,0 mg/OD/L (CLARK, 1998). Exposição continuada de camarões a concentrações entre a faixa 1,0 a 5,0 mg/L ocasiona crescimento lento, lembrando ainda que as concentrações de oxigênio dissolvido decrescem com o aumento da temperatura e da salinidade (BOYD, 1989).

O pH, por estar relacionado com o metabolismo de todos os organismos aquáticos, é também um importante parâmetro a ser considerado. Os limites de acidez pH 4,0 e alcalinidade pH 11,0 têm sido referidos como letais (VINATEA, 2004).

As águas estuarinas, de acordo com a resolução CONAMA nº 357, de 17 de março de 2005 que dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais e estabelece condições e padrões de lançamento de efluentes, são classificadas como águas salobras, tendo como limites de pH e oxigênio dissolvido (as de classificação I e II destinadas à preservação do equilíbrio natural das comunidades aquáticas e proteção das comunidades aquáticas respectivamente) valores que variam de 5,0 a 8,5 para o pH e valores não inferiores a 4,0 mg/L para o oxigênio dissolvido.

Considerando que as estações A, B e C representam o conjunto da área de estudo da presente pesquisa, os valores de pH mensurados por ocasião de cada coleta encontram-se dentro dos padrões estabelecidos pela referida resolução. Para o oxigênio dissolvido foram observados

valores abaixo do limite inferior estabelecido. Contudo, deve-se salientar que estas foram medições pontuais, não podendo portanto, caracterizar as reais condições das estações de coleta.

A ampla faixa de variação do parâmetro salinidade observada para as estações A (8,0 a 15,0‰), B (7,0 a 18,0‰) e C (6,0 a 14,0‰) durante as coletas 1, 2 e 3, realizadas nos meses de março, abril e maio de 2006 pode ser atribuída ao aporte de água doce decorrente da variação das precipitações pluviométricas durante este período e às variações de maré.

Dos parâmetros aqui discutidos, a salinidade e o oxigênio dissolvido apresentaram uma maior amplitude de variação, contudo estiveram dentro da faixa de tolerância dos peneídeos e de outros organismos aquáticos que habitam o ambiente estuarino (BOYD, 1989).

5.2. Dos animais coletados

Segundo Holthuis (1980) e Pérez-Farfante & Kensley (1997) o litoral brasileiro consta entre outras áreas da América do Sul e o Nordeste do Brasil (FAUSTO-FILHO, 1966) como áreas de distribuição das espécies de peneídeos *F. subtilis*, *F. brasiliensis*, *L. schmitti* coletadas nas Estações A, B e C no Estuário do Rio Jaguaribe, na localidade de Canaveiras do Município de Aracati-CE, durante o presente estudo. Capturas realizadas por Braga (2000) no litoral do Município de Fortaleza registraram entre outros peneídeos, a ocorrência dessas espécies.

As espécies *L. vannamei* e *Macrobrachium sp.* também constaram entre os camarões capturados na área referida. O gênero *Macrobrachium*, pertencente à Infraordem Caridea, é representado no Brasil por 19 espécies. Dentre essas, 7 ocorrem no Estado do Ceará (CORREA, 1977).

A presença de *Macrobrachium sp.* em águas estuarinas, justifica-se pelo fato das espécies deste gênero que habitam as águas doces próximas ao litoral, migrarem para águas salobras onde encontram condições mais adequadas para a eclosão e desenvolvimento de suas larvas (BOND-BUCKUP & BUCKUP, 1999). Essa afirmativa pode ser comprovada pelo estágio gonadal da fêmea capturada, que exibia a presença de restos de ovócitos maduros nos ovários, detectada durante a análise histológica (Figura 26).

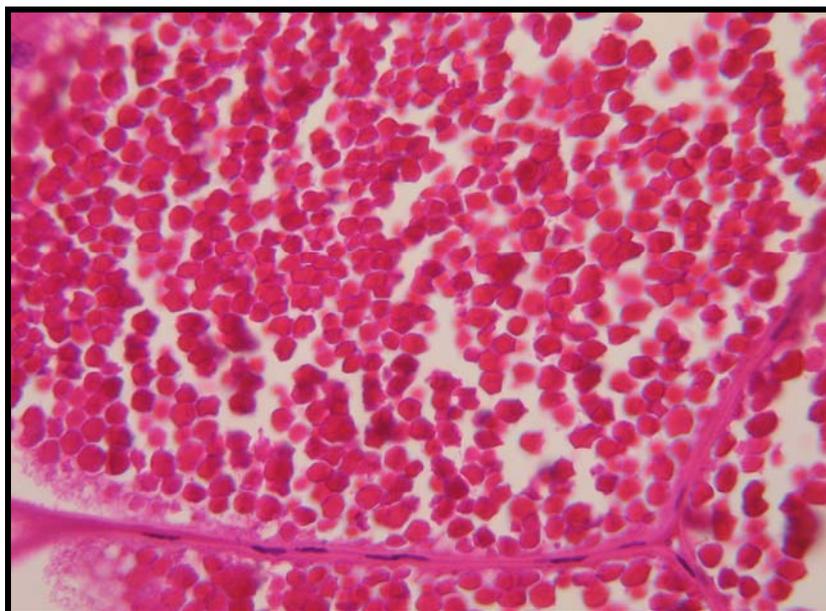


Figura 26 – Gônada feminina de *Macrobrachium sp.* mostrando ovócitos maduros. Coloração H&E (400x)

A ocorrência do *L. vannamei* entre os animais coletados foi atribuída a escapes dos cultivos das fazendas do entorno. Esta espécie distribui-se do Leste do Pacífico (Sonora, México) ao Sul do Peru (PÉREZ-FARFANTE & KENSLEY, 1997). Os cultivos comerciais brasileiros de camarão marinho baseiam-se na exploração exclusiva de *L. vannamei* (BORGHETTI, 2003).

A introdução de espécies exóticas na aqüicultura de determinado país pressupõe a possibilidade da ocorrência de escapes para o ambiente natural (BOYD, 2001; PÁEZ-OSUNA, 2001; NACA/FAO, 2004)

Nos Estados Unidos, país onde *L. vannamei* predomina nos cultivos de camarões marinhos, há referências de escapes para o meio ambiente. Na atualidade, há normas estritas que determinam a filtragem dos efluentes de despesca por duas a três vezes como medida preventiva de escape para a natureza (USDA, 2002).

Pantoja *et. al.* (1998) em estudos da prevalência e distribuição geográfica da Infecção Hipodermal e Necrose Hematopoiética em populações naturais de *P. stylirostris*, capturou acidentalmente *L. vannamei* no Golfo da Califórnia, México.

De acordo com Rodriguez & Suarez (2001) e Briggs *et al.* (2004) os efeitos da dispersão antropogênica de animais aquáticos sobre as populações silvestres são pouco conhecidos.

No Brasil, as investigações e informações sobre a dispersão de crustáceos decápodos exóticos nos ecossistemas naturais são escassas. Santos (2005) constatou a captura de *L. vannamei* através da pesca artesanal em ambiente marinho nos estados do Rio Grande do Norte, Pernambuco e Sergipe e em ambiente estuarino no Estado do Rio Grande do Norte.

O comprimento do cefalotórax dos camarões capturados nas coletas foi um parâmetro destinado a avaliar o tamanho das espécies encontradas na área pesquisada. Entre os peneídeos nativos os valores médios observados foram muito próximos.

Observando-se o valor máximo de comprimento do cefalotórax da espécie *L. vannamei*, nota-se uma elevação abrupta para 34,2 mm, sendo que o menor indivíduo mediu 19,5 mm. Este valor mínimo foi bem próximo ao maior observado em um camarão peneídeo nativo, que foi de um *F. brasiliensis* com 20,8 mm. Esse fato corrobora os registros de tamanho maior para essa espécie, quando comparada com as espécies nativas, de acordo com estimativa de comprimento mínimo e máximo apresentada por Pérez-Farfante & Kensley (1997).

Tamanhos tão díspares observados entre as espécies nativas capturadas tomadas em conjunto e a espécie *L. vannamei*, sugerem que essa espécie não tenha alcançado esse desenvolvimento apenas no ambiente natural, mas que tenha ocorrido escape recente já com razoável grau de desenvolvimento em ambiente de cultivo, onde normalmente recebe alimentação artificial em abundância.

A estação A é o ponto mais próximo de uma das fazendas da área de estudo. Foi nessa estação onde ocorreu a maior captura de indivíduos *L. vannamei* em todas as coletas. Esse achado também é sugestivo de escape da espécie cultivada para o ambiente de entorno.

As análises do desenvolvimento gonadal de alguns indivíduos das espécies nativas e de exemplares da espécie *L. vannamei*, detectaram estágios de maturação mais avançados na espécie exótica. Em condições naturais, os peneídeos nesses estágios deveriam estar em rota de migração para reprodução em águas oceânicas (Figuras 27 e 28). Esse fato reforça a possibilidade de escape recente da espécie *L. vannamei* para o ambiente de entorno dos cultivos.

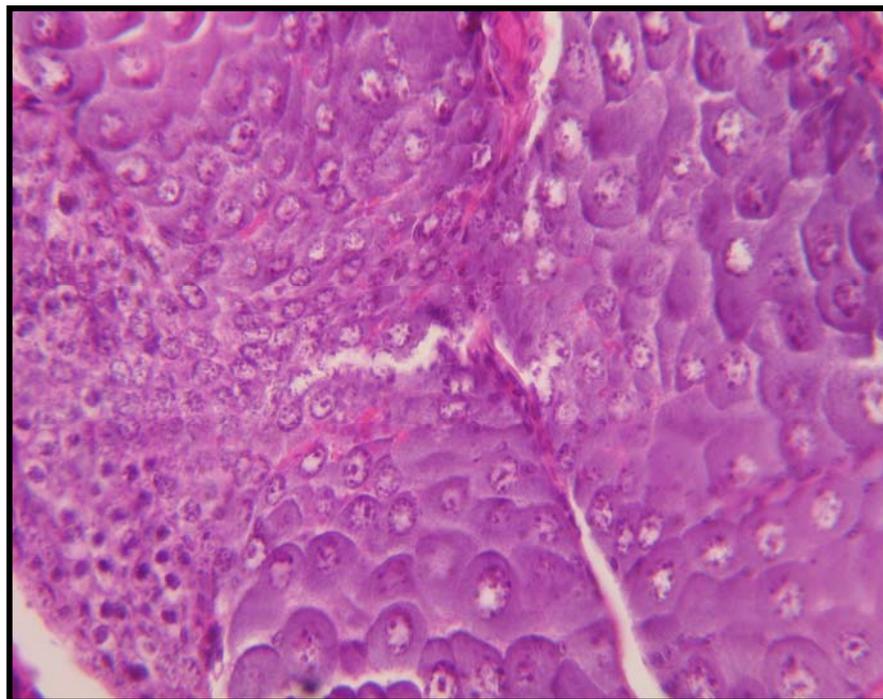


Figura 27 – Gônada feminina de *L. vannamei* em estágio II.
Coloração H&E (400x).

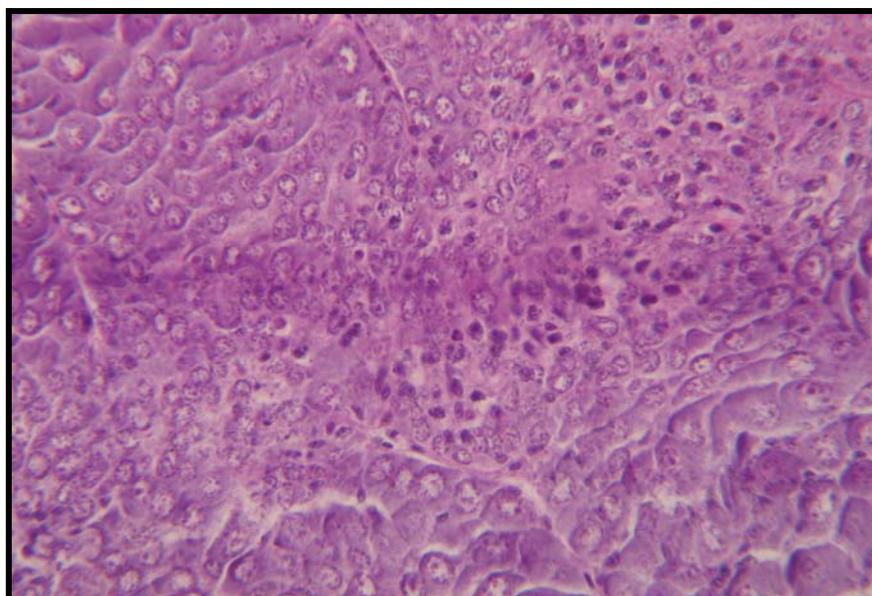


Figura 28 – Gônada masculina de *L. vannamei* em estágio II de maturação.
Coloração H&E (400x).

As figuras 29 e 30 mostram gônadas das espécies *F. subtilis* e *L. schmitti* em estágios iniciais de maturação.

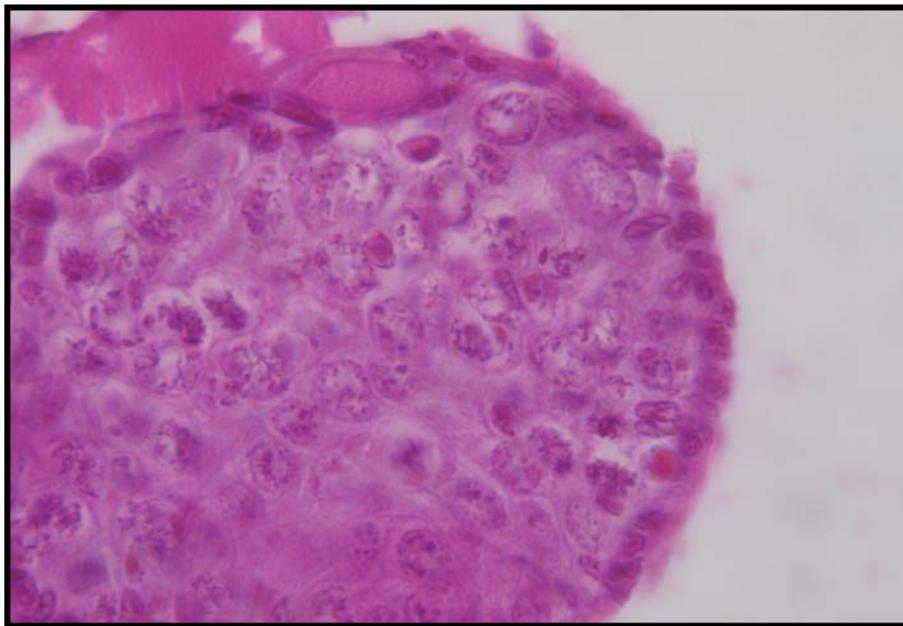


Figura 29 – Gônada masculina de *L. schmitti* em estágio inicial de maturação.
Coloração H&E (1000x).

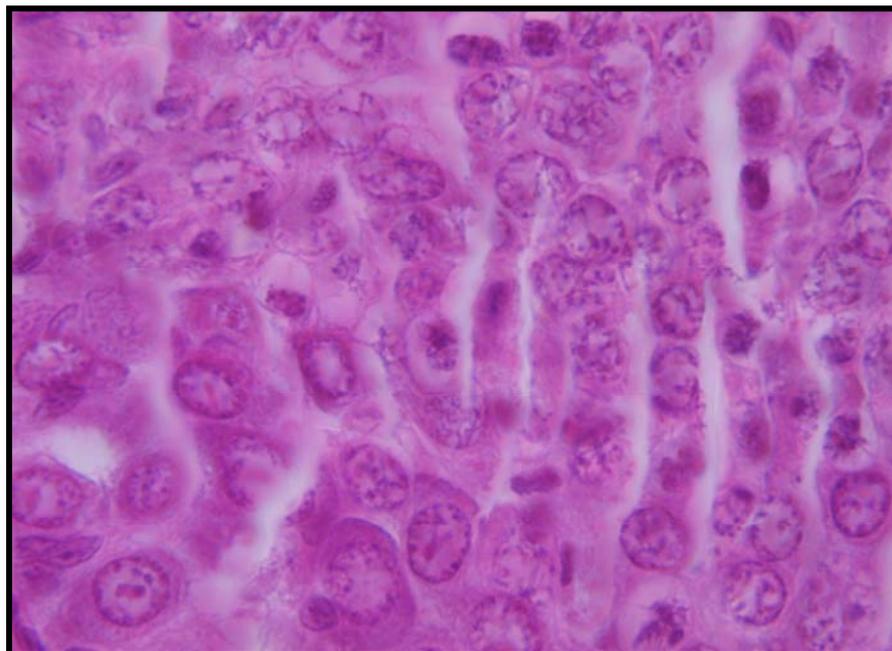


Figura 30 – Gônada masculina de *F. subtilis* em estágio inicial de maturação.
Coloração H&E (1000x).

5.3. Dos resultados das Reações em Cadeia da Polimerase (PCR) para a detecção do WSSV e IHHNV

A detecção do vírus da Síndrome da Mancha Branca no Estado do Ceará ocorreu no ano de 2005, tendo sido notificado ao Departamento de Saúde Animal (DAS) do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, que por sua vez comunicou ao Escritório Internacional de Epizootias – OIE (NUNES, 2005). Posteriores registros não foram feitos, levando a crer que as temperaturas elevadas, características do Estado, se constituem em fator negativo para a sobrevivência e proliferação desse vírus. Estudos desenvolvidos pela OIE (2003) relatam que esse vírus em estado livre perde sua infectividade na água do mar estéril entre de 4-5 dias, numa temperatura de 28 °C. Flegel *et al.*(1997) sugeriu que WSSV permanece efetivo, na água dos viveiros, por apenas 3 a 4 dias. Descobertas recentes indicaram que o risco da água ser uma fonte de contaminação é bem menor do que se acreditava antes, exceto quando existe uma elevada carga viral (FEGAN & CLIFFORD, 2001).

A investigação do WSSV em populações naturais de camarões na área de abrangência do presente estudo não detectou este agente etiológico através de diagnóstico molecular – PCR, bem como através de análises histopatológicas. Esses resultados são indicativos de que o WSSV não acometeu os camarões nativos da região compreendida pela área de cobertura da presente pesquisa, considerando que o tamanho amostral da população investigada permite a detecção do vírus com grau de confiança de 95% e prevalência da enfermidade de 2 % (LIGHTNER, 2005).

De acordo com Lightner (1996) e OIE (2003) não havia registro da Infecção Hipodermal e Necrose Hematopoiética em populações de peneídeos silvestres no lado atlântico das Américas até os anos demarcados pelas datas de publicação das obras referenciadas.

No entanto, trabalho desenvolvido por Pantoja *et al.* (1998) registra a ocorrência do IHHNV em populações silvestres de *Penaeus stylirostris* provenientes do Golfo da Califórnia, México analisadas no ano de 1997.

Lightner (2005) realizou uma revisão sobre investigações da ocorrência do WSSV e IHHNV em populações silvestres de peneídeos e não encontrou referências da ocorrência do IHHNV em populações silvestres após o ano de 1997. Contudo, no decorrer da presente

investigação, 17 amostras foram PCR positivas para o IHHNV, sendo 6 ocorrências referentes à espécie exótica *L. vannamei*; 8 amostras a *F. subtilis*, uma a *F. brasiliensis* e duas referentes a *L. schimitti*. Esses achados corroboram o trabalho de Coelho (2006) quanto à susceptibilidade da espécie *F. subtilis* ao IHHNV.

5.4. Dos resultados das análises histopatológicas para a detecção do WSSV e IHHNV

Os achados histopatológicos compatíveis com IHHNV foram observados em 10 indivíduos, corroborando os resultados PCR positivos para esse vírus.

Considerando que a técnica de PCR é mais sensível e que detecta precocemente a presença da infecção (CARR *et al.*, 1996; DHAR *et al.*, 2001) a ausência de alterações teciduais nos demais indivíduos PCR positivos pode ser atribuída aos níveis baixos de infecção ou início do curso da enfermidade nos indivíduos pesquisados.

Métodos histológicos clássicos têm sido utilizados para o diagnóstico de enfermidades virais presentes na carcinicultura mundial (BROCK & MAIN, 1994; LIGHTNER, 1996; LIGHTNER & REDMAN, 1998; LIGHTNER, 2005).

A histologia é utilizada como método diagnóstico confirmatório para sete enfermidades virais notificáveis à Organização Mundial de Saúde Animal (OIE, 2003). Técnicas de histologia de rotina estão disponíveis em manuais de reconhecimento internacional, como o *Diagnostic Guide to Aquatic Diseases* (NACA/FAO, 2001) e *Diagnostic Manual for Aquatic Animal Diseases* (OIE, 2003), que as utilizam para detecção e diagnóstico em camarões.

A técnica diagnóstica de biologia molecular Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) tem como fundamento a amplificação de fragmentos únicos do genoma do patógeno detectáveis através da utilização de *primers* específicos. Comparativamente aos métodos diagnósticos clássicos de histologia, a técnica de PCR proporciona alto grau de sensibilidade na detecção de patógenos (OIE, 2003; NACA/FAO, 2001; LIGHTNER, 1996; 2005; LIGHTNER & REDMAN, 1998). Investigações realizadas por Tang & Lightner (2001) com o vírus de IHHNV demonstraram que nem sempre os achados histológicos confirmam os resultados encontrados através de outras técnicas mais sensíveis como a PCR.

Os diagnósticos histológicos de rotina usando a coloração H & E baseiam-se na observação em microscópio ótico de alterações teciduais causadas pela ação do patógeno (BROCK & MAIN, 1994; LIGHTNER, 1996). Segundo Fegan & Clifford (2001), os métodos histológicos de rotina podem não ser capazes de detectar infecções brandas. Carr *et al.* (1996), em estudos sobre a sensibilidade de sonda genética para uso em rastreamentos do IHHNV, em campo, verificou baixos limites de detecção desse vírus por métodos tradicionais não baseados em amplificação.

Após a finalização dos trabalhos da Defesa de Dissertação de Mestrado de JOÃO MAFALDO DE OLIVEIRA NETO, intitulada “Investigação da Ocorrência dos Vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV) e da Infecção Hipodermal e Necrose Hematopoiética (IHHNV) em Camarões Coletados em Áreas sob Influência de Efluentes da Carcinicultura”, a Banca Examinadora, concebendo o conteúdo do trabalho e a apresentação realizada, considera a Dissertação aprovada.

Tereza Cristina Vasconcelos Gesteira, PhD.: _____
(Orientadora)

Pedro Carlos Cunha Martins, Dr.: _____

Rodrigo Maggioni, PhD.: _____

Fortaleza, 29 de setembro de 2006.

*“A mente humana, expandida por uma idéia nova,
jamais retorna à sua dimensão original”.*

Oliver Wendell Holmes

*Aos meus pais Francisco Solon Dantas e
Helena Mafaldo Dantas (in memorium),
à Lúcia Helena, companheira de todos os momentos,
e aos meus filhos Amanda, Marcel e Júlia*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Professora Tereza Cristina Vasconcelos Gesteira, grande pesquisadora, pela afável acolhida, incentivo, dedicação, orientação e conhecimentos repassados.

Às amigas do PCR Cândida Vila Nova e Graça Coelho, pelo apoio e estímulo. Especialmente à “Candide” pela inestimável ajuda nas análises moleculares das amostras.

Ao amigo Rubens Galdino Feijó, pela ajuda laboriosa e constante nas coletas, identificação dos animais e processamento histológico.

Aos amigos Pedro Alexandre e Antônio Carlos, pela troca de idéias, cooperação na organização e revisão dos dados.

Ao Professor Aduino pelas orientações no âmbito da estatística.

À Cecília Gomes, Diego Felismino, Camila e Flaviano do Centro de Diagnóstico de Enfermidades de Camarão Marinho (CEDECAM) pela organização do material coletado.

À Raquel Sabry e Max Dantas do Grupo de Estudos de Moluscos Bivalves (GEMB) pela pronta colaboração.

Ao Miguel Braga, Paulo, Raul Madrid, Oscarina e Marcos Miranda pela ajuda prestada.

Ao Eduardo pela confecção do mapa.

Ao Hudson (Compescal) pelas sugestões de localização das estações de coleta.

Aos pescadores do povoado de Canavieiras, Aracati-CE, pela captura dos camarões.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação, pela dedicação, seriedade e pelo convívio agradável durante as atividades do mestrado.

A todos aqueles que fazem o LABOMAR e que direta e indiretamente contribuíram na realização dessa pesquisa.

SUMÁRIO

TABELAS

FIGURAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. Aspectos gerais dos camarões peneídeos e carídeos.	4
2.1.1. Caracterização da Subordem Dendrobranchiata.	4
2.1.2. Caracterização da Subordem Stenopodidea.	5
2.1.3. Caracterização da Infraordem Caridea.	5
2.2. Camarões peneídeos e carídeos capturados nas coletas: subsídios para identificação.	5
2.2.1. <i>Farfantepenaeus subtilis</i> (PÉREZ-FARFANTE, 1967).	9
2.2.2. <i>Farfantepenaeus brasiliensis</i> (LATREILLE, 1817).	10
2.2.3. <i>Litopenaeus schmitti</i> (BURKENROAD, 1938).	11
2.2.3. <i>Litopenaeus vannamei</i> (BOONE, 1931).	13
2.2.4. <i>Macrobrachium sp.</i>	14
2.3. As enfermidades virais nos cultivos de camarões marinhos.	15
2.3.1. A Infecção Hipodermal e Necrose Hematopoiética (IHHN).	15
2.3.2. A Síndrome da Mancha Branca (WSS).	18
2.4. IHHNV e WSSV em populações silvestres.	20
2.4.1. IHHNV em populações silvestres.	20
2.4.2. WSSV em populações silvestres.	21
2.5. Introdução de espécies exóticas: risco de disseminação de enfermidades.	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1. Área de Estudo.	24

3.2. Material Biológico.	25
3.3. Identificação dos camarões.	26
3.4. Preparação das amostras no campo.	27
3.5. Processamento do Material Biológico no Laboratório.	27
3.5.1. Biometria e Processamento histológico.	28
3.5.2. Processamento das amostras para as análises moleculares: Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), para a detecção dos Vírus da Infecção Hipodermal e Necrose Hematopoiética (IHHNV) e Vírus da Mancha Branca (WSSV).	28
3.5.2.1. Extração do DNA.	29
3.5.2.2. Qualificação e quantificação do DNA.	29
3.5.2.3. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para detecção do IHHNV e WSSV.	30
4. RESULTADOS	33
4.1. Variáveis Ambientais.	33
4.2. Das espécies coletadas	34
4.3. Da quantificação e qualificação do DNA obtido dos <i>pools/amostras individuais</i> das Coletas nas Estações A, B e C.	35
4.4. Resultados das Reações em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizadas para a Detecção do Vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV) e Vírus da Infecção Hipodermal e Necrose Hematopoiética (IHHNV).	35
4.4.1. Investigação do vírus da Mancha Branca (WSSV) por PCR.	36
4.4.1.1. Coleta 1 nas Estações A,B, e C.	36
4.4.1.2. Coleta 2 nas Estações A, B e C.	36
4.4.1.3. Coleta 3 nas Estações A, B e C.	37
4.4.2. Investigação do Vírus da Infecção Hipodermal e Necrose Hematopoiética (IHHNV) por PCR.	39
4.4.2.1. Coleta 1 - Estações A, B e C.	40
4.4.2.2. Coleta 2 - Estações A, B e C.	41
4.4.2.3. Coleta 3 - Estações A, B e C.	44
4.5. Análises Histológicas.	45
5. DISCUSSÃO	47

5.1. Dos parâmetros físico-químicos da água.	47
5.2. Dos animais coletados.	48
5.3. Dos resultados das Reações em Cadeia da Polimerase (PCR) para a detecção do WSSV e IHHNV.	53
5.4. Dos resultados das investigações histológicas para a detecção do WSSV e IHHNV	54
6. CONCLUSÕES E SUGESTÕES	56
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

TABELAS

Tabela I	Composição do <i>master mix</i> empregado na detecção de IHHNV e WSSV nas amostras.	31
Tabela II	<i>Primers</i> usados na PCR para detecção do IHHNV e WSSV em camarões.	32
Tabela III	Parâmetros de termociclagem para detecção do IHHNV e WSSV	32
Tabela IV	Valores dos parâmetros ambientais aferidos durante as coletas nas três estações selecionadas para a presente pesquisa.	33
Tabela V	Relação das espécies capturadas nas três coletas realizadas no Estuário do Rio Jaguaribe, expressas em valores absolutos e relativos.	34
Tabela VI	Valores mínimos, máximos, médios e desvio padrão do comprimento do cefalotórax (mm) das diversas espécies capturadas nas três estações de coleta.	35
Tabela VII	Número de camarões PCR positivos para o IHHNV distribuídos por espécie, amostra, coleta e estação de coleta. Cálculo da prevalência intra-específica (a) e em relação ao total de indivíduos capturados (b).	39

FIGURAS

- Figura 1** Vista lateral (A) e dorsal (B) do cefalotórax de um peneídeo mostrando caracteres utilizados na sua taxonomia. Fonte: adaptado de Pérez-Farfante & Kensley (1997). 6
- Figura 2** Alguns caracteres externos de machos e fêmeas utilizados em taxonomia de peneídeos. A. Téliico; B. Petasma. Fonte: adaptado de Pérez-Farfante & Kensley (1997). 7
- Figura 3** Diferenciação morfológica entre camarões carídeos e peneídeos. a = escama antenal; b = pleura do segundo somito; c = segundo par de pereiópodos. Fonte: Bliss (1990). 8
- Figura 4a** *Farfantepenaeus subtilis* (PÉREZ-FARFANTE, 1967). 9
- Figura 4b** *F. subtilis*. A e B. Vista dorsal da Carapaça; C. Vista lateral do petasma direito; D. Téliico. Fonte: Pérez-Farfante (1988) modificado. 10
- Figura 5a** *Farfantepenaeus brasiliensis* Latreille, 1817 Fonte: Braga (2000). 11
- Figura 5b** *Farfantepenaeus brasiliensis*, 1988. A. Vista dorsal da carapaça; B. Vista lateral do petasma direito. C. Téliico. Fonte: Pérez-Farfante (1988) modificado. 11
- Figura 6a** *Litopenaeus schmitti* (BURKENROAD, 1938) Fonte: Braga (2000). 12
- Figura 6b** *L. schmitti* A. Vista dorsal da carapaça. B. Vista ventral do petasma. C. Téliico. Fonte: Pérez-Farfante (1988) modificado. 12
- Figura 7a** *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931) 13
- Figura 7b** A. Vista antero-lateral da carapaça. B. Vista dorsal do petasma. C. Téliico. Fonte: Pérez-Farfante (1988) modificado. 14
- Figura 8** *Macrobrachium sp* 14
- Figura 9** Mapa mostrando a localização da área de estudo. 24
- Figura 10** Visão das três estações de coleta localizadas no Estuário do Rio Jaguaribe. 25

Figura 11	Métodos de coleta dos camarões usados na pesquisa: A - Tarrafeamento; B - Arrasto.	25
Figura 12	Gel de agarose de PCR para detecção do WSSV nos <i>pools</i> das espécies de camarão capturadas na Coleta 1.	36
Figura 13	Gel de agarose de PCR para detecção do WSSV nos <i>pools</i> das espécies de camarões capturadas na Coleta 2.	37
Figura 14	Gel de agarose de PCR para detecção do WSSV nos <i>pools</i> das espécies de camarões capturadas na Coleta 3	38
Figura 15	Gel de agarose da análise de PCR para detecção do WSSV de um camarão da Coleta 3.	38
Figura 16	Corrida em gel de agarose - PCR para detecção do IHHNV nos <i>pools</i> das espécies de camarões capturadas na Coleta 1.	40
Figura 17	Corrida em gel de agarose - PCR para detecção do IHHNV nos <i>pools</i> das espécies de camarões capturadas na Coleta 2.	41
Figuras 18A e 18B	Corrida em gel de agarose - PCR para detecção do IHHNV nos camarões 1 a 50 (exceto camarões 15A2, 22A2 e 35A2) que compuseram os <i>pools</i> 1A, 2A, 3A e 5A da Estação A, Coleta 2.	42
Figura 19	Gel de agarose das análises de PCR para detecção do IHHNV referente abertura do <i>pool</i> 4A.	43
Figura 20	Gel de agarose de PCR para detecção de IHHNV na abertura do <i>pool</i> 11B Coleta 2 Estação B.	43
Figura 21	Gel de Agarose das análises de PCR para detecção do IHHNV nos <i>pools</i> dos camarões capturados na Coleta 3.	44
Figura 22	Corrida em gel de agarose - PCR para detecção do IHHNV na amostra 18B ₃ , Coleta 3.	44

- Figura 23** Brânquias de *L. vannamei* mostrando corpos de inclusão do tipo *Cowdry* A (setas). Coloração H&E (1000x). 45
- Figura 24** Ceco de *F. subtilis* mostrando corpos de inclusão tipo *Cowdry* A (setas). Coloração H&E (1000x). 46
- Figura 25** Gônada de macho *L. schmitti* mostrando corpos de inclusão do tipo *Cowdry* A (setas). Coloração H&E (1000x). 46
- Figura 26** Gônada feminina de *Macrobrachium sp.* mostrando ovócitos maduros. Coloração H&E (400x). 49
- Figura 27** Gônada fêmea de *L.vannamei* em estágio II. Coloração H&E (400x). 51
- Figura 28** Gônada masculina de *L. vannamei* em estágio II de maturação. Coloração H&E (400x). 51
- Figura 29** Gônada masculina de *L. schmitti* em estágio inicial de maturação. Coloração H&E (1000x). 52
- Figura 30** Gônada masculina de *F. subtilis* em estágio inicial de maturação. Coloração H&E (1000x). 52

RESUMO

As principais enfermidades virais detectadas na carcinicultura mundial são a Síndrome da Mancha Branca (WSSV), Infecção Hipodermal e Necrose Hematopoiética (IHHNV), Síndrome de Taura (TSV) e a Síndrome da Cabeça Amarela (YHV), esta última sem registro nos cultivos brasileiros. As doenças virais acima relacionadas não estão restritas ao ambiente de cultivo. O WSSV foi detectado em várias espécies de peneídeos e em outros grupos de crustáceos silvestres. O IHHNV parece ser restrito aos peneídeos, tendo também sido detectado em populações silvestres. O presente estudo teve como área de investigação uma gamboa do Estuário do Rio Juagaribe, localizada na comunidade de Canavieiras, Aracati-CE, que recebe efluentes de fazendas de carcinicultura. A pesquisa objetivou verificar possíveis escapes da espécie *Litopenaeus vannamei* para o ambiente de entorno e a ocorrência do WSSV e IHHNV em populações de camarões silvestres. Foram capturados 450 camarões por meio de arrastos e tarrafeamentos em três estações durante três coletas realizadas nos meses de março, abril e maio de 2006. Para a pesquisa viral foram utilizadas a ferramenta diagnóstica de biologia molecular, reação em cadeia da polimerase (PCR) e histologia clássica. A identificação dos animais demonstrou o escape da espécie exótica. Não foi detectada a presença do WSSV nas amostras analisadas. Contudo, foi detectado o IHHNV em 17 indivíduos, sendo seis *L. vannamei*, oito *Farfantepenaeus subtilis*, um *Farfantepenaeus brasiliensis* e dois *Litopenaeus schmitti*, ficando demonstrada a suscetibilidade dessas espécies nativas ao IHHNV.

Palavras chaves: Camarão, WSSV, IHHNV, Histopatologia e PCR.

ABSTRACT

The main viral diseases detected in the world shrimp culture are White Spot Syndrome Virus (WSSV), Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus (IHHNV), Taura Syndrome Virus (TSV) and Yellow Head Virus (YHV), this last one without records in Brazilian shrimp cultures. The viral diseases above described are not restricted to the culture environment. WSSV was detected in many penaeid species, as well as in other groups of wild crustaceans. IHHNV seems to be restricted to penaeids, being also detected in wild populations. This study had investigated, a watercourse in the Jaguaribe River estuary, close to Canavieiras community in Aracati, Ceará State, which receives effluents from shrimp farms. This research aimed to verify possible escapes of the species *Litopenaeus vannamei* to the surrounding environment and occurrence of WSSV and IHHNV in populations of wild shrimps. With this objective, 450 shrimps were caught by drawing and fishing net in three stations during three collections carried out on March, April and May 2006. For viral research, molecular biology tools (Polymerase Chain Reaction - PCR) and classical histology procedures were used. Animal's identification showed escape of the exotic species. It was not detected WSSV presence in the analyzed samples. Nevertheless, it was detected IHHNV presence in 17 individuals, it being six *L. vannamei*, eight *Farfantepenaeus subtilis*, one *F. brasiliensis* and two *L. schmitti*, showing the susceptibility of these native species to IHHNV.

Key words: Shrimp, WSSV, IHHNV, Histopathology, PCR.

1. INTRODUÇÃO

A carcinicultura mundial apresentou nestas últimas três décadas rápido e significativo crescimento. Aproximadamente metade do suprimento global de camarões marinhos é proveniente das fazendas de carcinicultura (LIGHTNER, 2005).

As mais recentes estatísticas da FAO (2006) divulgam dados comparativos das produções de camarões marinhos e de água doce nos anos de 1984, 1994 e 2004 que apresentaram valores crescentes de 172.175, 881.959 e 2.476.023 toneladas, respectivamente.

O número de pessoas empregadas e o montante de receita gerada pela carcinicultura refletem a importância econômica desta atividade para muitos países tropicais e subtropicais dos continentes asiático e sul-americano (LIGHTNER, 2005, FAO, 2006).

O cultivo de camarões marinhos despontou comercialmente no Brasil no final da década de 70 e princípio dos anos 80, iniciando-se com a importação e domesticação pouco satisfatória da espécie exótica *Marsupenaeus japonicus*, seguida de posterior domesticação e produção comercial das espécies nativas *Farfantepenaeus subtilis*, *Farfantepenaeus paulensis* e *Litopenaeus schmitti*, as quais não se mostraram lucrativas face aos custos de produção praticados naquela época (MAPA, 2001).

O Nordeste do Brasil detém 93,1% da produção nacional com os Estados do Rio Grande do Norte e Ceará ocupando a liderança em número de fazendas e níveis de produtividade. A atividade no Brasil vinha crescendo de forma surpreendente, alcançando o total de 40.000 t no ano de 2001, 60.128 em 2002 e 90.190 no ano de 2003. Contudo, a partir do ano de 2004 vem se observando uma queda de produção, ao atingir apenas 75.904 toneladas e o mesmo se repetindo em 2005, quando foram produzidas apenas 65.000 toneladas. Esse decréscimo de produção é atribuído aos efeitos do Vírus da Mionecrose Infecciosa (IMNV) e a ação *antidumping* movida pelos Estados Unidos, entre outros (ROCHA, 2005; RODRIGUES, 2005).

Segundo Borghetti (2003), a produção mundial de camarão marinho cultivado, que nos últimos cinco anos da década de 80 registrou índice de crescimento superior a 20%, passou entre os anos de 1990 a 1996 a sofrer uma retração de 10%, face, principalmente, a ocorrência de doenças virais.

As principais enfermidades de etiologia viral que acometem o camarão marinho cultivado são a WSS (Síndrome da Mancha Branca), responsável por perdas na ordem de 4 a 6 bilhões de dólares na Ásia em 1992 e cifra de aproximadamente 1 bilhão nas Américas, no

ano de 1999; TS (Síndrome de Taura) causa do colapso da carcinicultura no Equador em 1993 e prejuízos de 1 a 2 bilhões de dólares; YH (Cabeça Amarela) e IHHN (Infecção Hipodermal e Necrose Hematopoiética). Estes dois últimos vírus são considerados de menor impacto econômico, sendo, contudo responsáveis por perdas estimadas em 0,2 a 1,0 bilhão de dólares (LIGHTNER, 2005).

Há registros da ocorrência dos vírus IHHN e TS nos cultivos do Brasil (GESTEIRA & ANDRADE, 2002; MARTINS, 2003); quanto ao YH não há relatos de sua presença no território nacional (NUNES, 2002).

Mais recentemente, a divulgação do isolamento do IMNV por Lightner *et al.* (2004) nos cultivos do Nordeste do Brasil e do WSSV em fazendas do Estado de Santa Catarina em 2005 (SEIFFERT *et al.*, 2005) veio aumentar o elenco dos agentes virais que acometem os camarões cultivados no País.

A família Penaeidae agrupa 110 espécies, das quais 25 são exploradas em cultivos comerciais, sendo que aproximadamente 7 espécies sustentam o cultivo mundial com destaque para o camarão Tigre Asiático, *Penaeus monodon* no Oriente e o camarão cinza *Litopenaeus vannamei* no Hemisfério Ocidental (HOLTHUIS, 1980; MAPA, 2001).

A exploração de camarão marinho cultivado no Brasil é baseada em uma única espécie, o *Litopenaeus vannamei*, oriunda da costa sul-americana do Pacífico, que apresentou um bom desempenho reprodutivo e ótima adaptação às condições ambientais do Brasil (MAPA, 2001).

O estudo da biologia dos peneídeos e outros crustáceos revela a utilização de ecossistemas estuarinos (áreas de influência da carcinicultura) pelas fases de pós-larva e juvenil desses animais (ISAAC *et al.*, 1992; LEITÃO, 1995; D'INCAO, 1999). Sendo assim, o ciclo de vida das populações naturais implica em aproximação das populações cultivadas (exóticas) e nativas (selvagens), abrindo, dessa forma, a possibilidade de transmissão de enfermidades entre as mesmas. A contaminação por TSV e IHHNV de populações de espécies cultivadas no Estado do Ceará foi comprovada por registros do Centro de Diagnóstico de Enfermidade do Camarão Marinho - CEDECAM, Instituto de Ciências do Mar da Universidade Federal do Ceará (GESTEIRA & ANDRADE, 2002; MARTINS, 2003).

Segundo Briggs *et al.* (2004), a introdução da espécie *L. vannamei* no Brasil ocorreu de forma criteriosa e em obediência aos códigos e práticas internacionais pertinentes. Contudo, ameaças e riscos decorrentes da introdução de uma espécie exótica devem ser monitorados, tendo em vista a possibilidade de sobreposição do nicho ecológico dessa espécie

ao de uma espécie nativa, podendo ocorrer competição pelo mesmo espaço, alimento e interferência no comportamento reprodutivo de espécies silvestres.

Enfermidades endêmicas aos cultivos do *L. vannamei*, como WSSV, IHHNV, YHV e TSV foram detectadas em populações naturais de algumas espécies de camarões. Todavia, pouco se sabe sobre os efeitos dessas patologias nas populações selvagens (LIGHTNER, 1996; LO *et. al.*, 1996; PANTOJA *et al.*, 1998; BRIGGS *et al.*, 2004).

A sustentabilidade econômica e ecológica da produção de camarões marinhos implica, necessariamente, na adoção de medidas de biossegurança que previnam o surgimento e disseminação de patógenos nos cultivos, o que, por consequência, se refletirá na sanidade dos estoques naturais. Segundo Bachère (2000), o controle das enfermidades nos ambientes de cultivo torna-se uma prioridade para que essa atividade seja econômica e ecologicamente sustentável.

A presente pesquisa tem por objetivo investigar a possibilidade de escapes da espécie *L. vannamei* do ambiente de cultivo para o ambiente natural e a ocorrência dos vírus WSS e IHHN em populações silvestres de camarões peneídeos em áreas do Estuário do Rio Jaguaribe sob influência de efluentes de fazendas de carcinicultura.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Área de Estudo

A área de coleta selecionada para a presente pesquisa situa-se em um braço (gamboa) do Estuário do Rio Jaguaribe, localidade de Canavieiras do Município de Aracati, Ceará e que se encontra sob influência de efluentes de um grupo de fazendas de carcinicultura (Figura 9). Nessa região foram realizadas nos meses de março, abril e maio de 2006 campanhas mensais em três pontos denominados: Estação A ($04^{\circ} 30,129'S / 37^{\circ} 46,762'W$) Estação B ($S 04^{\circ} 30,758'S / 37^{\circ} 46,683'W$) e Estação C ($4^{\circ} 30,478'S / 37^{\circ}, 46, 917'W$) (Fig. 10). A Estação A dista 1.423m da Estação B, que por sua vez, dista 696m da Estação C. A foz do Rio Jaguaribe encontra-se a 11.535m do último ponto de coleta e são vários os pontos de lançamento de descarga dos efluentes das fazendas na gamboa em estudo.



Figura 9 – Mapa mostrando a localização da área de estudo.

Durante as campanhas foram medidos o pH, a Temperatura e Oxigênio Dissolvido da água de cada estação.



Estação A



Estação B



Estação C

Figura 10 - Visão das três estações de coleta localizadas no Estuário do Rio Jaguaribe

3.2. Material Biológico

Camarões peneídeos e exemplares de *Macrobrachium sp.* foram capturados por meio de tarrafa de monofilamento de polietileno com malha de 10mm entre nós (Figura 11A) e redes de arrasto de filamento de poliamida com calão de 5m e malha de 10mm entre nós (Figura 11B) em transectos de 20m x 50m demarcados nas margens da gamboa nas Estações A, B e C. A captura dos animais foi realizada nos meses de março, abril e maio do ano 2006, totalizando 450 indivíduos. Em cada campanha foram capturados 150 indivíduos (50 por estação). O número de animais capturados por campanha obedeceu ao tamanho amostral utilizado por Lightner (2005), que se baseia em uma prevalência presumida de 2% da enfermidade pesquisada em população estimada ≥ 100.000 animais.



Figura 11 - Métodos de coleta dos camarões usados na pesquisa: A-Tarrafeamento; B-Arrasto

Após a realização das coletas em cada estação, os animais foram acondicionados em recipientes plásticos de 50L e mantidos sob aeração até a conclusão dos trabalhos de identificação das espécies.

3.3. Identificação dos camarões

A identificação foi realizada em condições de campo com camarões vivos e em laboratório após fixação com os animais imersos em álcool a 70% utilizando uma Lupa zoom 2000 Leica® e tomando como base as chaves propostas por Fausto - Filho (1966), Pérez-Farfante (1988), Pérez-Farfante & Kensley (1997), D’Incao (1999) e *Costa et al.* (2003).

Para se chegar aos resultados da identificação das espécies coletadas foram observados os caracteres identificadores da Subordem, Superfamília, Família, Gênero e Espécie, através da utilização das chaves de identificação acima referidas.

Na sua grande maioria os animais foram classificados como pertencentes à Subordem Dendrobranchiata, por exibirem o primeiro, segundo e terceiro par de pereiópodos com tamanho uniforme, machos com petasma; a inclusão dos animais na Superfamília Penaeoidea e família penaeidae, foi baseada no fato desses camarões possuírem quelas nos primeiro, segundo e terceiro pares de pereiópodos e a carapaça sem espinho pós-orbital (D’INCAO, 1999).

Para se chegar ao gênero e espécie dos animais do presente estudo, foram utilizadas chaves de identificação acima referidas, bem como descrições das espécies, de acordo com Pérez-Farfante (1997). Para essa finalidade, os caracteres observados foram: a presença de dentes rostrais e ventrais, presença ou ausência dos sulcos ad-rostrais, carenas, bem como largura e comprimento dessas últimas estruturas e ainda diferenças morfológicas de estruturas sexuais.

Os camarões peneídeos com sulco ad-rostral enlarguando progressivamente na proporção que iam atingindo a porção posterior da carapaça (FAUSTO-FILHO, 1966) e que exibiam mancha escura na junção do terceiro e quarto somitos abdominais (COSTA *et al.*, 2003) foram classificados como *Farfantepenaeus brasiliensis*.

Aqueles indivíduos que apresentaram sulcos ad-rostrais largos na parte mediana da carapaça, afinando progressivamente a partir desse ponto em direção à margem posterior da carapaça (FAUSTO-FILHO, 1966) foram identificados como *Farfantepenaeus subtilis*.

O gênero *Litopenaeus* foi identificado como aqueles indivíduos que apresentaram sulcos ad-rostrais curtos, terminando na altura do dente epigástrico (COSTA *et al.*, 2003).

A distinção entre *L. vannamei* e *L. schmitti* foi realizada através da visualização das diferenças morfológicas de caracteres sexuais, como tégico das fêmeas e petasma nos machos, de acordo com descrição proposta por Pérez-Farfante (1997) para essas espécies.

É característico do gênero *Macrobrachium* a expansão da pleura do segundo segmento abdominal recobrando o primeiro e o terceiro, ausência de quela no terceiro pereiópodo, presença de palpos triarticulados na mandíbula, presença de espinho hepático e escama antenal alargada (PINHEIRO & HEBLING, 1998). A identificação da Infraordem Caridea (DANA 1852), a qual pertencem os indivíduos *Macrobrachium sp.* foi baseada em descrição referida por Bond-Buckup & Buckup (1999).

3.4. Preparação das amostras no campo

Concluída a identificação de cada animal, os pleópodos foram retirados e acondicionados em microtubos de 2,0ml contendo etanol a 95%, devidamente etiquetados, para posterior análise molecular através da técnica de PCR para detecção dos vírus IHHN e WSS. Visando as análises histológicas para pesquisa de alterações teciduais e celulares compatíveis com a ação dos referidos vírus, os indivíduos foram fixados por meio de injeções de solução de Davidson e imersos em recipientes plásticos individuais com capacidade de 200ml contendo o mesmo fixador, em uma proporção de 9:1 (volume do fixador: peso da amostra). Os recipientes e os microtubos receberam a mesma identificação de cada camarão amostrado, o que permitiu correlacionar os resultados obtidos nas duas técnicas de diagnóstico empregadas.

3.5. Processamento do Material Biológico no Laboratório

O processamento das amostras nos laboratórios do Centro de Diagnóstico de Enfermidades do Camarão Marinho – CEDECAM, do Instituto de Ciências do Mar – LABOMAR constou da biometria dos animais capturados seguida dos procedimentos para detecção do Vírus da Infecção Hipodermal e Necrose Hematopoiética (IHHNV) e do Vírus da Mancha Branca (WSSV) por métodos histopatológicos e pela ferramenta de diagnóstico molecular PCR.

3.5.1. Biometria e Processamento histológico

Após a chegada dos camarões fixados em solução de Davidson ao laboratório, cada indivíduo teve o comprimento do cefalotórax (a partir do entalhe da base do espinho rostral até a extremidade do cefalotórax) medido com um paquímetro de aço com precisão de 0,05mm. A seguir, foram iniciados os procedimentos histológicos de acordo com Bell & Lightner (1988), que consistiram de desidratação em uma série gradual etílica, diafanização em xilol, impregnação em parafina em estufa a 60° C e emblocamento. Cortes de 5µm em três níveis de profundidade foram realizados em micrótomo manual (Leica®) e corados pelo método Hematoxilina e Eosina (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004).

Visando detectar possíveis alterações teciduais causadas pela ação dos vírus pesquisados, as lâminas foram observadas em microscópio de luz (Leica®) utilizando-se como base literatura clássica de patologia de crustáceos (BROCK & LIGHTNER, 1990; LIGHTNER, 1996).

3.5.2. Processamento das amostras para as análises moleculares: Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), para a detecção dos Vírus da Infecção Hipodermal e Necrose Hematopoiética (IHHNV) e Vírus da Mancha Branca (WSSV).

Para a detecção do Vírus da Infecção Hipodermal e Necrose Hematopoiética (IHHNV) na população silvestre de camarões investigados nessa pesquisa, foi adotado o protocolo empregado pelo Escritório Internacional de Epizootias da Organização Mundial de Saúde (OIE, 2003) e Vanpatten (2004). Para a detecção do Vírus da Síndrome da Mancha Branca seguiu-se protocolo de Lo, *et al.* (1996) modificado.

As amostras acondicionadas em tubos estéreis, tipo *ependorf*, contendo etanol 95% foram armazenadas sob refrigeração (4 a 8° C) até o processamento em laboratório, que compreendeu a extração do DNA total por método que utiliza o reagente DNAZOL®, a quantificação e avaliação da qualidade das amostras de DNA e, finalmente, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

3.5.2.1 – Extração do DNA

A extração de DNA total das amostras seguiu protocolo estabelecido pela *Invitrogen Life Technologies* para o DNAZOL[®]. Inicialmente foi extraído o DNA dos *pools*, os quais correspondem a macerados formados por pleópodos de animais da mesma espécie, estação e coleta. Posteriormente, as amostras formadas pelos indivíduos que compunham esses *pools* com resultados positivos para o IHHNV. O procedimento de extração envolveu a lise mecânica e química de aproximadamente 0,05g de tecido por amostra, através da maceração com pistilo em tubos de 2,0 ml contendo 1,0 ml de DNAZOL[®]. Após essa maceração, as amostras foram fortemente agitadas e deixadas em repouso em temperatura ambiente por 30 minutos para homogeneização. O lisado foi então centrifugado a 10.000g por 10 minutos e o sobrenadante recuperado em outro tubo de 2,0ml, ao qual se adicionou 500µl de álcool absoluto para promover a precipitação do DNA, através de mistura manual suave dos tubos, repouso por 3 minutos e nova centrifugação a 10.000g por 5 minutos. O sobrenadante resultante desse procedimento foi descartado e o DNA aderido às paredes do tubo foi ressuspensão adicionando-se etanol 95%, misturando-se suavemente por seis inversões dos tubos e repouso por 1 minuto, seguido de centrifugação breve para sedimentação do DNA. Após esses procedimentos, o sobrenadante resultante foi descartado e o DNA deixado em repouso por 10 minutos para secagem. O processo de extração foi finalizado pela solubilização do DNA com a adição nos tubos de 200µl de Hidróxido de Sódio (NaOH) 8mM e 20µl do tampão Hepes (0,1M).

3.5.2.2 – Qualificação e quantificação do DNA

Antes da utilização do DNA na Reação em Cadeia da Polimerase, a qualidade do mesmo foi avaliada observando-se suas bandas em gel de agarose a 1%, contendo brometo de etídio por corrida de eletroforese em cuba (*Electrophoresis Systems FB-SB-1316 FisherBiotech[®]*) contendo o tampão Tris-HCl - Ácido Acético - EDTA (TAE 1X), por 30 minutos/60volts. Nesse procedimento, utilizou-se alíquota de 5µl do DNA solubilizado e 1µl do corante *blue juice 10x (Gel Loading Buffer Invitrogen[®])* misturados para alimentar os “poços” do gel. A visualização foi feita em aparelho *UV Transluminator SPECTROLINE[®]*.

A quantificação foi realizada por espectrofotometria (THERMO[®] BIOMATE 3), utilizando-se 10µl da amostra e 990µl de diluente e absorbância UV 260nm. A faixa da

relação A260/A280 considerada satisfatória para a utilização com êxito das PCRs realizadas nesse estudo foi de 1,6 a 1,9 (estabelecida pela *Invitrogen Life Technology* para o reagente DNAZOL[®]).

3.5.2.3. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para detecção do IHHNV e WSSV

O volume da reação para a PCR destinada à detecção do IHHNV foi de 25µl. O *master mix* utilizado continha água Ultra Pura; Tampão 10X [20mM Tris-HCl(pH 8,4) 50mM KCl](1X), dNTPs (200mM cada), *primers* 389F/389R (0,4µM), Cloreto de Magnésio (2mM), Taq DNA Polymerase (0,04 U/µl). Para cada reação foi adicionado 1µl do DNA extraído a 24µl do *master mix* (Tabela I).

A detecção do WSSV foi realizada com PCR de dois passos, com o mesmo volume total (25µl) nas reações do primeiro e segundo passos. A variação da concentração final de reagentes em relação ao *master mix* utilizado para a detecção do IHHNV foi o da enzima Taq DNA Polymerase (0,15U/µl) e volume da amostra no segundo passo, que foi 2,5µl de produto de PCR do primeiro passo (Tabela I). Todos os reagentes utilizados foram da *Invitrogen Life Technology*[®].

Tabela I - Composição do *Master mix* empregado na detecção de IHHNV e WSSV nas amostras analisadas.

Reagentes da PCR	Volume da Reação(µl)/Concentração final					
	IHHNV		WSSV (1ºPasso)		WSSV (2ºPasso)	
	Vol. (µl)	Conc.	Vol. (µl)	Conc.	Vol. (µl)	Conc.
H2O ultra pura	16,30	-	15,75	-	14,25	-
Tampão 10X	2,50	1X	2,50	1X	2,50	1X
dNTPs	2,00	200mM	2,00	200mM	2,00	200mM
<i>Primer</i> 389F	1,00	0,4µM	-	-	-	-
<i>Primer</i> 389R	1,00	0,4µM	-	-	-	-
<i>Primer</i> 1447F	-	-	1,00	0,4µM	-	-
<i>Primer</i> 1447R	-	-	1,00	0,4µM	-	-
<i>Primer</i> 941F	-	-	-	-	1,00	0,4µM
<i>Primer</i> 941R	-	-	-	-	1,00	0,4µM
MgCl ₂	1,00	2,0mM	1,00	2,0mM	1,00	2,0mM
Enzima	0,20	0,04U/µl	0,75	0,15U/µl	0,75	0,15U/µl
Amostra	1,00	-	1,00	-	2,50	-
Total	25,00	-	25,00	-	25,00	-

Concentração dos reagentes adquiridos da *Invitrogen Life Technology*[®]: dNTPs (2,5mM), MgCl₂ (50mM); *Primers* (10pmol/µl); Tampão 10X: [TrisHCl(200mM) (pH 8.4)KCl(500mM)]; Taq DNA Polimerase: 5U/µl

Nas reações foram sempre utilizados controles negativo e positivo. Para o IHHNV o controle positivo foi obtido de camarões infectados com a enfermidade investigada e para o WSSV, o controle positivo foi obtido de *kit* comercial (*DiagXotics, Inc.*[®]).

Os *primers* utilizados na reação foram adquiridos da *Invitrogen Life Technology*[®] e produzem *amplicon* de 389pb (pares de bases) para o IHHNV. Os *amplicons* produzidos na reação de detecção do WSSV são de 1.447pb no primeiro passo e 941pb no segundo (Tabela II).

Tabela II - Primers usados na PCR para detecção do IHHNV e WSSV em camarões.

Vírus	Primer (5'-3')	Amplicon (pb)
IHHNV	5'-CGGAACACAACCCGACTTTA-3'	389
	5'-GGCCAAGACCAAAAATACGAA-3'	
WSSV 1º Passo	5'-ACTACTAACTTCAGCCTATCTAG-3'	1447
	5'- AATGCGGGTGTAATGTTTCCTTACGA-3'	
WSSV 2º Passo	5'-GTAAGTGGCCCTTCCATCTCCA-3'	941
	5'-TACGGCAGCTGCCTGCACCTTTA-3'	

Fonte: OIE (2003); Vanpatten *et al.*, (2004); Lo *et al.*, (1996).

A amplificação do DNA foi realizada de acordo com os parâmetros de termociclagem descritos na Tabela III, utilizando-se termociclador Flexygene[®].

Tabela III - Parâmetros de termociclagem para detecção do IHHNV e WSSV

Primers	Tempo	Temperatura (°C)	Nº de ciclos
1447 F/R e 941 F/R(WSSV)	2 min	94	1
	30s, 30s, 1min	94, 55, 72	35
	7 min	72	1
389 F/R IHHNV	5 min	95	1
	30s, 30s, 1min	95, 55, 72	35
	7 min	72	1

Fonte: OIE (2003); Vanpatten *et al.* (2004); Lo *et al.* (1996).

Para a eletroforese do produto da PCR, foi preparado com o tampão de corrida (TAE), um gel de agarose a 2% com 1-2µl de brometo de etídio (10mg/ml). Os poços do gel foram alimentados com 9µl do DNA amplificado de cada amostra adicionado de 1µl do corante 10x *Blue juice* (Invitrogen Life Technology[®]). O marcador de pares de base utilizado foi o 1kb DNA Plus Ladder (Invitrogen Life Technology[®]). Foram estabelecidas duas condições para a corrida, uma com o parâmetro 60volts/70cm² com duração de 60 minutos e outra com 120volts/208 cm² com duração de 60 minutos.

A visualização da corrida dos produtos da PCR foi realizada em transluminador de UV (SPECTROLINE[®]) e posteriormente documentado em sistema de fotodocumentação EDAS 290 Kodak[®].

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLAN, G.; MAGUIRRE, G. Lethal levels of low dissolved oxygen and effects of short-term oxygen stress on subsequent growth of juvenile *P. monodon*. **Aquaculture**, v.94, p.27-34, 1991.

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

BELL, T.A. & LIGHTNER, D.V. **A Handbook of Normal Penaeid Shrimp Histology**. World Aquaculture Society, Botton Rouge, USA, 1988.

BLISS, D. E. **Shrimps, lobsters and crabs. Their Fascinating Life Story**. Columbia University Press, New York, 1990, 242p.

BONAMI, J.R.; TRUMPER, B.; BRECHÉCLIN, M.; LIGHTNER, D. V. Purification and characterization of infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus of penaeid shrimps. **Journal General. Virology**, v.71, p.2637-2664, 1990.

BOND-BUCKUP, G.; BUCKUP, L. CARIDEA (pítus, camarões de água doce e marinhos). In: BOND-BUCKUP, G.; BUCKUP, L. (Org.). **Os Crustáceos do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Ed. Universidade/UFRGS, 1999, p. 300-318.

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

BOYD, C. **Water quality management and aeration in shrimp farming. Fisheries and Allied Aquacultures**. Departmental Series. n 2, Auburn University, 1989.

BOYD, C.E.; HARGREAVES, J. A; CLAY, J. W. Codes of conduct for marine shrimp aquaculture. In: PROCEEDINGS OF THE SPECIAL SESSION ON SUSTAINABLE SHRIMP CULTURE, AQUACULTURE, 2001. Word Aquaculture Society, USA. p.303-321.

BRAGA, M. S. C. **A Pesca de Arrasto de Camarões na Zona Costeira do Município de Fortaleza, Estado do Ceará**. Fortaleza-CE, Dissertação de Mestrado - UFC, 2000.

BRASIL/CONAMA. Resolução n. 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências.

BRIGGS, M.; FUNGE-SMITH, S.; SUBASINGHE, R.; PHILLIPS, M. **Introductions and movement of *Penaeus vannamei* and *Penaeus stylirostris* in Asia and the Pacific**. FAO, RAP Publication, 2004/10.

BROCK, J. A & MAIN, K. L. **A Guide to the Common Problems and Diseases of Cultured *Penaeus vannamei***. World aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 1994.

BROCK, J. A. & LIGHTNER, D. V. Disease of Crustacea: diseases caused by microorganisms. In: Okinne (ed), **Disease of Marine Animals**. Vol. III Biologish Anstal (Helgoland, Hamburg, Germany), 1990, p. 245-249.

CARR, W. W.; SWEENEY, J. N.; NUNAN, L.; LIGHTNER, D. V.; HIRSCH, H. H.; REDDINGTON, J. J. The use of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus gene probe serodiagnostic field kit for the screening of candidat specific pathogen-free *Penaeus vannamei* broodstock. **Aquaculture** v.147, p. 1-8, 1996.

CLARK, J. Inhibition of moulting in *Penaeus semisulcatus* (De Haan) by long-term hypoxia, **Aquaculture**, v. 52, p. 253-254, 1986.

COELHO, G. L. **Suscetibilidade do camarão rosa *Farfantepenaeus subtilis* (Pérez-Farfante, 1967) ao vírus da Infecção Hipodermal e Necrose Hematopoiética (IHHNV)**. Fortaleza-CE, 2006. Dissertação de Mestrado: UFC, 2006.

COELHO, P. A.; PORTO, M. R.; KOENING, M. L. Biogeografia e Bionomia dos Crustáceos do Litoral Equatorial Brasileiro. **Trab. Oceanogr. Univ. Fed. PE**. Recife-PE n.15, p.7-138, 1980

CORREA, M.M.G. **Palemonídeos do Brasil**. Rio de Janeiro, 1977. Dissertação de Mestrado. Pós-Graduação em Zoologia. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1977.

COSTA, C. R; FRANSOZO, A.; MELO, G. A. S.; MORAIS, F. A. **Chave Ilustrada para identificação dos camarões dendrobranchiata do litoral norte do estado de São Paulo, Brasil**. BiotaNeotropica, v.3, n.1 2003. Disponível em: <http://biotaneotropica.org.br/v3n1/pt>
Acesso em: 06.02.2006

D'INCAO, F. Subordem DENDROBRANCHIATA (camarões marinhos). In: BUCKUP, L.; BOND-BUCKUP, G. (Org.) **Os crustáceos do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Ed. Universidade/UFRGS, 1999, p.275-299.

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

FAO - Global Aquaculture Production. Diponível em: <http://www.fao.org>. Acesso em: 15.07.2006.

FAUSTO - FILHO, J. Sobre os Peneídeos do Nordeste Brasileiro. **Arquivos da Estação de Biologia Marinha da Universidade Federal do Ceará**, v. 6, n.1, p. 47-50, junho, 1966 – Fortaleza, Ceará, Brasil.

FAUSTO-FILHO, J. Quinta contribuição ao inventário dos crustáceos decápodos marinhos do nordeste brasileiro. **Arquivos de Ciências do Mar**. Fortaleza-CE, v. 15 n.2, p. 79-84, 1975.

FAUSTO-FILHO, J. Observações sobre alguns crustáceos estomatópodos e decápodos do Norte do Brasil. **Arquivos de Ciências do Mar**. Fortaleza-CE. v.15, n.2, p. 65-71, 1976.

FEGAN D.F.; CLIFORD, H.C. Health management for viral diseases in shrimp farms. In: THE NEW WAVE, PROCEEDINGS OF THE SPECIAL SESSION ON SUSTAINABLE SHRIMP CULTURE, AQUACULTURE, 2001, BROWDY C.L & JORY, D.E (eds.), World Aquaculture Society. Baton Rouge LA, 2001, p.168-169.

FLEGEL, T.W.; BOONYARATPALIN, S.; WITHYACHUMNAMKUL, B. Progress in research on yellow-head virus and white spot virus in Thailand. In: DISEASES IN ASIAN AQUACULTURE III. FLEGEL T.W & MACRAE, I.H (eds.), Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, 1997, p. 285-295.

GESTEIRA T.C.V.; ANDRADE, T.P. Registro de ocorrência de algumas enfermidades em um cultivo do camarão *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931) no Estado do Ceará. In: II CONGRESSO BRASILEIRO SOBRE CRUSTÁCEOS, 2002, São Pedro - São Paulo. Livro de Resumos. Sociedade Brasileira de Carcinologia, 2002, p.34.

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

HOLTHUIS L. B. **FAO Species Catalogue**. Shrimps and prawns of the world. An annotated catalogue of species of interest to fisheries, v.1, n. 125, 1980. ISBN 92-5-1000896-5.

HOROWITZ, A & HOROWITZ, S. Diseases control in shrimp Aquaculture from a microbial ecology perspective. In: **Proceedings of the Special Session on Sustainable Shrimp Farming**. World Aquaculture Society, 2001, p. 199-218.

HOSSAIN, S. M.; 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**, v. 198, p. 1-11, 2001.

ISAAC, V.J.; DIAS-NETO, J.; DAMASCENO, F.G. **Camarão Rosa da Costa Norte: biologia, Dinâmica e Administração Pesqueira**. Brasília: IBAMA, 1992. (Coleção Meio Ambiente – Série Estudos – Pesca n.1).

JAHNCKE, M.L; BROWDY, C.L; SCHWARZ, M.H; AL SEGARRS; SILVA, J.L.; SMITH, D.C.; STOKES, A.D. Preliminary application of Hazard analysis critical control point (HACCP) principles as a risk management tool to control exotic viruses at shrimp production and processing facilities. In: PROCEEDINGS OF THE SPECIAL SESSION ON SUSTAINABLE SHRIMP FARMING. World Aquaculture Society, 2001, p. 279-284.

JUNQUEIRA, L. C. & CARNEIRO, J. **Histologia Básica**, Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 10 ed., 2004.

KASORNCHANDRA, J.; BOONYARATPALIN, S.; ITAMI, T. Detection of white-spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Asia: Microscopic observation and polymerase chain reaction. **Aquaculture**, v.164, p.243-251, 1998.

LEITÃO, S. N. A Fauna do Manguezal. In: SCHAEFFER-NOVELLI, Y. (Org.) **Manguezal Ecosistema entre a terra e o mar**. Caribbean Ecological Research, São Paulo, 1995, p. 23-27.

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

LIGHTNER, D.V.; REDMAN, R. M.; BEL, T.A. Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis, a newly recognized virus disease of penaeid shrimp. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.42, p.62 – 80, 1983. LIGHTNER, D.V & REDMAN, R.M. Shrimp diseases and current diagnostic methods. **Aquaculture**, v.164, p.201-220, 1998.

LIGHTNER, D.V.; PANTOJA, C.R; POULOS, B. T.; TANG, K.F.J, REDMAN, R. M.; ANDREAS, T.; BONAMI, J. R. Infectious Myonecrosis (IMN): a new virus disease of *Litopenaeus vannamei*. In: WORLD AQUACULTURE, 2004, Honolulu, Hawaii, EUA. Abstracts. World Aquaculture Society, 2004.

LIGHTNER, V. D. Biosecurity in Shrimp Farming: Pathogen Exclusion through use of SPF Stock and Routine Surveillance. **Journal of The World Aquaculture Society**, v.36, n.3, 2005.

LO, C.F.; HO, C.H.; PENG, S.E.; CHENC.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 shrimps, crabs and other arthropods. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.27, p. 215-225, 1996.

LOTZ, J.M. Special Topic Review: Viruses, biosecurity and specific pathogen-free stocks in shrimp aquaculture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.13, p. 405-413, 1997.

MAPA/SARC/DPA – MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. DEPARTAMENTO DE PESCA E AQUICULTURA. Plataforma Tecnológica do Camarão Marinho Cultivado: seguimento de mercado. Brasília, 2001.

MARTINS, P. C. C. **Influência das condições ambientais e técnicas de produção sobre a incidência de enfermidades no cultivo de camarão marinho, *Litopenaeus vannamei*, no estado do Ceará.** São Carlos-SP, 2003. Tese de Doutorado: UFSCar, 2003.

MELO, S.G & BROSSI-GARCIA. Desenvolvimento larval de *Macrobrachium birai* Lobão, Melo & Fernandes (Crustácea, Decapoda, Caridae, Palaemonidae) em laboratório. **Revista Brasileira de Zoologia** 22 (I): 131-152, 2005.

NACA/FAO – NETWORK OF AQUACULTURE CENTRES IN ASIA-PACIFIC – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Asia Diagnostic Guide to Aquatic Animal Diseases** BONDAD-REANTASO, M.G; McGLADDERY, S. E.; EAST, I.; SUBASINGHE, R.P (eds). FAO - Fisheries Technical Paper, n 402, Suplemento 2, Rome, FAO, 2001.

NUNES, A. J. P.; MARTINS, P. C. Avaliando o Estado de Saúde de Camarões Marinhos na Engorda. **Panorama da Aqüicultura**, jul/ago., p. 23-33, 2002.

NUNES, A. J. P; MARTINS, P. C. C; GESTEIRA, T.C.V. Carcinicultura Ameaçada. **Panorama da Aqüicultura**, p.37-51, mai/jun., 2004.

NUNES, A. J. P. Um ano de mudanças, perdas e ganhos. **Panorama da Aqüicultura**, v. 15, n.92, p. 26-33, nov/dez., 2005.

OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (OIE). Diagnostic Manual for Aquatic Animal Diseases (6th. ed.), Paris. Disponível em: <http://www.priberam.pt/dipo>. Acesso em: 01.08.2006.

PÁEZ-OSUNA, F. The Environmental Impact of Shrimp Aquaculture: Causes, Effects and Mitigating Alternatives. **Environmental Management**, v. 28, n.1, p. 131-140, 2001.

PANTOJA, C.R; LIGHTNER, D.V; HOLTSCHMIT, K. H. Prevalence and Geographic Distribution of Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus in Wild Blue Shrimps from the Gulf of California, Mexico. **Journal of Aquaculture Health**, v. 11, p. 23-34, 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**, v.164, p. 253- 262, 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**, v. 164, p. 253-262, 1998.

PÉREZ-FARFANTE, I. **Illustrated Key to Penaeoid Shrimps of Commerce in the Americas**. NOAA Technical Report NMFS 64. 1988.

PÉREZ FARFANTE, I; KENSLEY, B. **Penaeoid and Sergestoid Shrimps and Prawns of the World: Keys and Diagnoses for the Families and Genera**. Edition du Muséum national d'Histoire naturelle, Paris, 1997.

PEREZ, J. E., ALFONSI, C., NIRCHIO, M. *et al.* The introduction of exotic species in aquaculture: a solution or part of the problem? **INCI**, v. 28, n 4, p. 234-238, abr. 2003.

PINHEIRO, M. A. A. & HEBLING, N. J. Biologia de *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879). In: VALENTI, W. C. (Org.). **Carcinicultura de água Doce: Tecnologia para a produção de camarões**. Brasília: IBAMA, 1998.

ROCHA, I. P. Uma análise da produção, demanda e preços do camarão no mercado internacional. **Revista da ABCC** – Associação Brasileira de Criadores de Camarão. Ano 7, n.2, p. 24-34, jun. 2005.

RODRIGUES, J. Carcinicultura Marinha – Desempenho em 2004. **Revista da Associação Brasileira de Criadores de Camarão – ABCC**, Ano 7, n. 2, p. 38-44, jun. 2005.

RODRIGUEZ, G.; SUÁREZ, H. Anthropogenic dispersal of decapods crustaceans in aquatic environments, **INCE**, v. 26, n. 7, p.282-288, jun. 2001. ISSN 0378-1844.

SANTOS, M.C.F. A prática da carcinicultura de *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931) (CRUSTACEA, PENAEIDAE) e suas implicações no Nordeste do Brasil. **Boletim Técnico Científico do CEPENE**, Tamandaré-PE, v. 13, n. 12, p. 129-141, 2005.

SEIDMAN, E.; LAWRENCE, A. Growth, feed digestibility, and proximate body composition of juvenile *Penaeus vannamei* and *Penaeus monodon* grown at different dissolved oxygen levels. **J. World Maricult. Soc.**, v.16, p. 333-346, 1985.

SEIFFERT, W.Q.; WIIINCKLER, S.; MAGGIONI, D. A mancha Branca em Santa Catarina. **Panorama da Aqüicultura**, p. 51-53, jan/fev., 2005.

SUN, Z.F.; HU, C.Q.; REN, C.H.; SHEN, Q. Sensitive and rapid detection of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) in shrimps by loop-mediated isothermal amplification. **Journal of Virological Methods**, v. 232, p. 41-46, 2006.

TANG, K.F.J & LIGHTNER, D.V. Detection and Quantification of Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus in shrimp by real-time PCR. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 44, p. 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 stylirostri* through pre-infection with infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus – a preliminary study. **Aquaculture**, n. 216, p. 19-29, 2003.

USDA – UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **An Evaluation of Potential Shrimp Virus Impacts on Cultured Shrimp and Wild Shrimp Population in Gulf of Mexico and Southeastern U.S. Atlantic Coastal Waters**. National Marine Fisheries Service, U.S. Department of Commerce Animal and Plant Health Inspection Service, U.S. Department of Agriculture National Center for Environmental Assessment, U.S. Environmental Protection Agency Fish and Wildlife Service, U.S. Department of Interior, 1997, p. 77. Disponível em: <http://www.nmfs.noaa.gov> Acesso em: 13.07.2006

VAN HULTEN, M.C.W.; REIJNS, M.; VERMEESCH, A. M. G.; 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 General Virology**, v.83, p. 257-265, 2002.

VAN HULTEN, M.C.W.; VLAK, J.M. Identification and phylogeny of protein kinase gene of white spot syndrome. **Virus Genes** v.22, p. 201-207, 2001.

VANPATTEN, K.A.; NUNAN, L. M & LIGHTNER, D. V. Seabirds as potential vectors of penaeid shrimp viruses and the development of a surrogate laboratory model utilizing domestic chickens. **Aquaculture**, v.241, p.31-46, 2004.

VINATEA ARANA, L. **Princípios Químicos de Qualidade da Água em Aquicultura: uma revisão para peixes e camarões**. 2ª ed. Florianópolis, Ed. Da UFSC, 2004.

WANG, C.H, LO, C.F.; LEU, J. H.; CHOU, C. M.; YEH, P.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 Aquatic Organisms**, v.23, p. 239-242, 1995.

WANG, C.S.; TSAI Y.J.; KOU, G.H.; CHEN, S.N. Detection of white spot disease virus infection in wild-caught greasy back shrimp, *Metapenaeus ensis* (de Haan) in Taiwan. **Fish Pathology**, v. 32, n.1, p. 35-41, 1997.

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**, n. 72, p. 170-173, 1998.

4. RESULTADOS

4.1. Variáveis Ambientais

Os valores das variáveis ambientais medidas durante as coletas nas três estações estão apresentados na Tabela IV.

Tabela IV - Valores dos parâmetros ambientais aferidos durante as coletas nas três estações selecionadas para a presente pesquisa.

ESTAÇÕES	COLETAS	PARÂMETROS			
		Salinidade (‰)	OD (mg/l)	T (°C)	pH
A	1	15,0	3,61	30,0	8,55
	2	8,0	5,46	30,2	7,80
	3	9,0	6,10	32,2	7,52
B	1	18,0	2,89	29,4	8,41
	2	12,0	5,40	30,1	7,50
	3	7,0	7,20	30,8	7,76
C	1	14,0	3,10	30,8	7,69
	2	10,0	4,33	31,0	7,69
	3	6,0	4,55	29,0	7,60

Na estação A, considerando-se o conjunto das coletas, o parâmetro salinidade variou de 8,0 a 15,0 ‰; o oxigênio dissolvido de 3,61 a 6,10 mg/l; a temperatura de 30,0 a 32,2° C e o pH de 7,52 a 8,55.

Em relação à estação de coleta B, a variação desses parâmetros foi de 7,0 a 18,0‰ para a salinidade; de 2,89 a 7,20 mg/l para o oxigênio dissolvido; de 29,4 a 30,1° C para temperatura e de 7,50 a 8,41 para o pH.

Na estação C, foram registradas variações de 6,0 a 14,0 ‰ para a salinidade; 3,10 a 4,55 mg/l, para o parâmetro oxigênio dissolvido; 29,0 a 31,0° C para temperatura e de 7,60 a 7,69 para o pH.

4.2. Das espécies coletadas:

De cada uma das estações, foram capturados 50 camarões perfazendo 150 animais por coleta e um total final de 450 indivíduos, dos quais 135 indivíduos foram da espécie *Farfantepenaeus subtilis*, correspondendo a 30%; 176 indivíduos da espécie *F. brasiliensis* equivalendo a 39,11%; 85 representantes da espécie *Litopenaeus schmitti*, correspondendo a 18,88%; 50 indivíduos da espécie *L. vannamei*, correspondendo a 11,11% e 4 indivíduos do gênero *Macrobrachium*, que corresponderam a 0,9% do total capturado (Tabela V).

A espécie exótica *L. vannamei* foi capturada em todas as coletas, tendo sido registrada sua ocorrência em todas as estações na coleta 1, repetindo-se o mesmo na coleta 2. Na coleta 3, não houve captura dessa espécie na estação C. O número de camarões *L. vannamei* capturados por coleta mostrou-se decrescente a medida que os pontos de coleta se distanciavam da fazenda mais próxima da área de estudo.

Tabela V - Relação das espécies capturadas nas três coletas realizadas no Estuário do Rio Jaguaribe, expressas em valores absolutos e relativos.

Espécies	Coleta 1				Coleta 2				Coleta 3				Total	(%)
	ESTAÇÕES				ESTAÇÕES				ESTAÇÕES					
	A	B	C	t*	A	B	C	t*	A	B	C	t*		
<i>F. subtilis</i>	2	18	17	37	23	24	17	64	13	6	15	34	135	30,00
<i>F. brasiliensis</i>	3	2	26	31	12	20	25	57	24	41	23	88	176	39,00
<i>L. schmitti</i>	30	22	5	57	3	3	5	11	7	1	9	17	85	18,88
<i>L. vannamei</i>	15	8	2	25	12	3	3	18	6	1	0	7	50	11,11
<i>Macrobrachium sp.</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	4	4	0,90
Total	50	50	50	150	50	50	50	150	50	50	50	150	450	100,00

t* = subtotal de espécie por coleta

Os valores de comprimento mínimo, máximo, médio e desvio padrão do cefalotórax são apresentados na Tabela VI. Para a espécie *F. subtilis*, o comprimento do cefalotórax variou de 10,30mm a 19,60mm; a espécie *F. brasiliensis* variou de 9,0mm a 20,8mm; *L. schmitti* de 7,6mm a 18,4mm; para a espécie *L. vannamei* essa variação foi de 19,5mm a 34,2mm; e nos indivíduos do gênero *Macrobrachium* a variação foi de 13,3mm a 23,0mm.

O menor indivíduo capturado foi representado por um exemplar pertencente à espécie *L. schmitti* com carapaça de 7,6mm de comprimento e o maior, representado por indivíduo da espécie *L. vannamei*, com 34,2mm de cefalotórax.

Tabela VI – Valores mínimos, máximos, médios e desvio padrão (s) do comprimento (mm) do cefalotórax das diversas espécies capturadas nas três estações de coleta.

Espécies Capturadas	Número de camarões	Máximo (mm)	Mínimo (mm)	Média (mm)	s
<i>Farfantepenaeus subtilis</i>	135	19,60	10,30	15,30	1,89
<i>Farfantepenaeus brasiliensis</i>	176	20,80	9,00	15,10	2,25
<i>Litopenaeus schmitti</i>	85	18,40	7,60	14,47	2,04
<i>Litopenaeus vannamei</i>	50	34,20	19,50	22,55	2,90
<i>Macrobrachium sp.</i>	4	23,00	13,30	17,70	4,31
Total	450	-	-	-	-

4.3. Da quantificação e qualificação do DNA obtido dos *pools/amostras individuais* das Coletas nas Estações A, B e C.

Os resultados finais obtidos da quantificação e qualificação do DNA extraído dos *pools* e das amostras individuais, decorrentes da abertura dos mesmos se encontraram dentro do padrão ($A_{260}/A_{280} = 1,6 - 1,9$) estabelecido pela *Invitrogen Life Technologies®*.

4.4. Resultados das Reações em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizadas para a Detecção do Vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV) e Vírus da Infecção Hipodermal e Necrose Hematopoiética (IHHNV)

Os resultados da técnica de PCR empregada para detecção dos vírus da WSS e vírus da IHHN nos *pools* dos indivíduos de uma mesma espécie, estação e coleta encontram-se ilustrados pelas fotografias das corridas por eletroforese em gel de agarose.

4.4.1. Investigação do vírus da Mancha Branca (WSSV) por PCR

4.4.1.1. - Coleta 1 nas Estações A, B, e C

A eletroforese dos produtos de PCR dos 16 *pools* dos camarões capturados na Coleta 1 nas Estações A, B e C não mostrou a presença do Vírus da Síndrome da Mancha Branca em nenhuma das amostras (Figura 12).

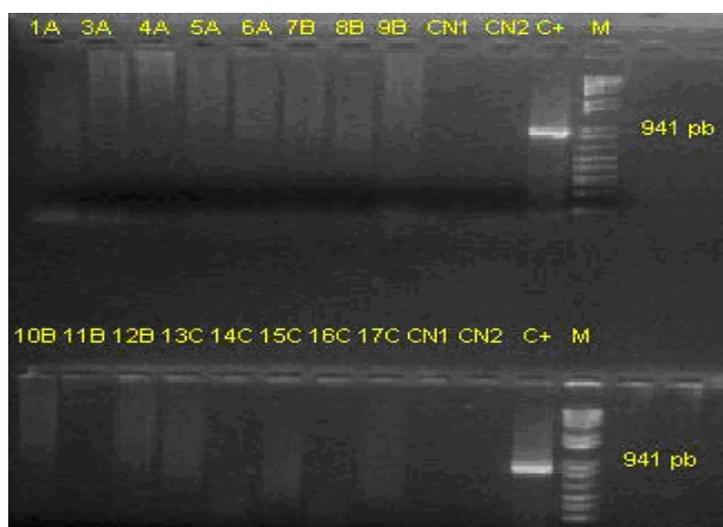


Figura 12 - Gel de agarose de PCR para detecção do WSSV nos *pools* das espécies de camarão capturadas na Coleta 1 : **Estação A**: 1A = *pool* de 15 camarões da espécie *L. vannamei*; 3A = *pool* de 2 camarões da espécie *F. subtilis*, 4A = *pool* de 3 camarões da espécie *F. brasiliensis*; 5 A e 6 A = *pools* de 30 camarões (15 animais por amostra) da espécie *L. schmitti*. **Estação B**: 7B = *pool* de 8 camarões da espécie *L. vannamei*; 8B = *pool* de 2 camarões da espécie *F. brasiliensis*; 9B e 10B = *pools* que totalizam 18 animais da espécie *F. subtilis* (9 por cada amostra); 11B e 12B = *pools* de 22 indivíduos da espécies *L. schmitti* (11 por amostra). **Estação C**: 13C = *pool* de 2 indivíduos da espécie *L. vannamei*; 14C e 15C = *pools* que totalizam 26 animais (13 por amostra) da espécie *F. brasiliensis*; 16C = *pool* de 17 indivíduos da espécie *F. subtilis*; 17C = *pool* de 5 indivíduos da espécie *L. schmitti*. CN1 = controle negativo do primeiro passo da reação (*primers F1R1*); CN2 = controle negativo do segundo passo da reação (*primers F2R2*); C+ = controle positivo; M = marcador (1Kb plus DNA Ladder, Invitrogen®).

4.4.1.2. Coleta 1 nas Estações A, B, e C

A reprodução do gel de agarose apresentada na Figura 13 mostra a corrida por eletroforese dos produtos de PCR dos 17 *pools* dos camarões capturados nas Estações A, B e

C, durante a Coleta 2. Não foi detectada a presença do Vírus da WSS em nenhuma das amostras. As amostras 8B, 9B e 10B apresentaram bandas “inespecíficas” claramente distintas do *amplicon* de 941pb, referente à amplificação do fragmento do vírus da WSS, portanto o vírus pesquisado também não foi detectado nessas amostras.

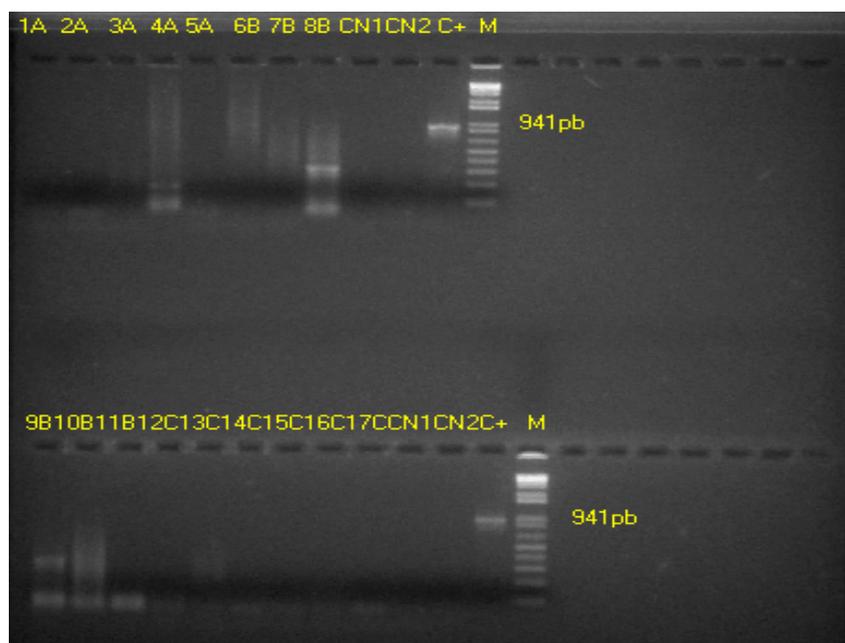


Figura 13 - Gel de agarose de PCR para detecção do WSSV nos pools das espécies de camarões capturadas na Coleta 2: **Estação A:** 1A e 2A = *pools* de 12 e 11 indivíduos da espécie *F. subtilis* respectivamente; 3A = *pool* de 12 indivíduos da espécie *F. brasiliensis*; 4A = *pool* de 3 indivíduos da espécie *L. schmitti*; 5A = *pool* de 12 indivíduos da espécie *L. vannamei*. **Estação B:** 6B e 7B = *pools* que totalizam 24 indivíduos da espécie *F. subtilis* (12 animais por *pool*); 8B e 9B = *pools* que totalizam 20 animais (10 indivíduos por *pool*) da espécie *F. brasiliensis*; 10B = *pool* de 3 indivíduos da espécie *L. schmitti*; 11B = *pool* de 3 indivíduos da espécie *L. vannamei*. **Estação C:** 12C e 13C = *pools* que totalizam 17 indivíduos da espécie *F. subtilis* (9 e 8 indivíduos, respectivamente); 14C e 15C = *pools* que totalizam 25 indivíduos da espécie *F. brasiliensis* (12 e 13 indivíduos, respectivamente); 16C = *pool* de 5 indivíduos da espécie *L. schmitti*; 17C = *pool* de 3 indivíduos da espécie *L. vannamei*; CN1= controle negativo do primeiro passo da reação (*primers* F1R1); CN2= controle negativo do segundo passo da reação (*primers* F2R2); C+ = controle positivo; M = marcador (1Kb plus DNA Ladder, Invitrogen®).

4.4.1.3. Coleta 3 nas Estações A, B e C

A reprodução do gel de agarose apresentada nas Figuras 14 e 15 mostra a corrida de eletroforese dos produtos de PCR dos 17 *pools* dos camarões capturados por ocasião da Coleta 3 nas Estações A, B e C. Não foi detectada a presença do Vírus da WSS em nenhuma das amostras. As amostras 5A e 6A apresentaram bandas inespecíficas, claramente distintas do *amplicon* de 941pb. Portanto, esse resultado também foi negativo para o WSSV.

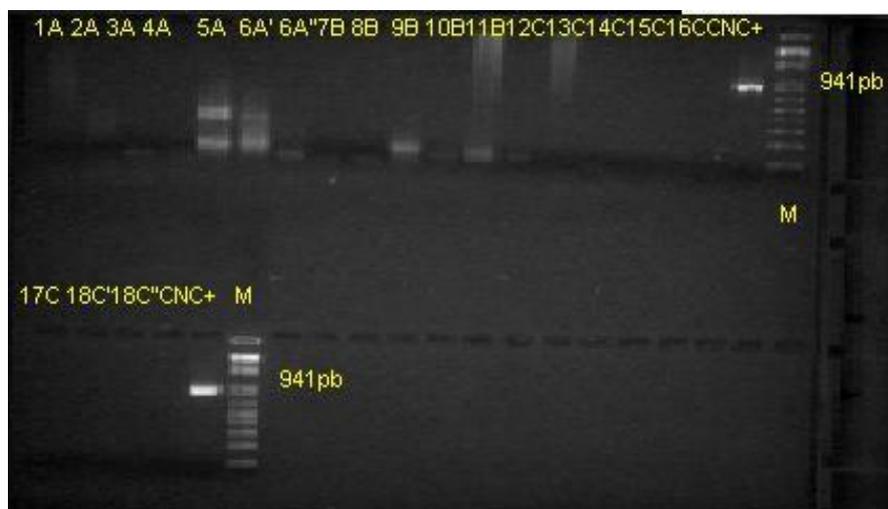


Figura 14 - Gel de agarose de PCR para detecção do WSSV nos pools das espécies de camarões capturadas na Coleta 3: **Estação A:** 1A = *pool* de 6 indivíduos da espécie *L. vannamei*; 2A e 3A = *pools* que totalizam 13 indivíduos da espécie *F. subtilis* (6 e 7 animais, respectivamente); 4A e 5A = *pools* que totalizam 24 indivíduos (12 animais por *pool*) da espécie *F. brasiliensis*; 6A' e 6A'' mesmo *pool* constituído por 7 indivíduos da espécie *L. schmitti*. **Estação B:** 7B e 8B: *pools* que totalizam 41 indivíduos da espécie *F. brasiliensis* (20 e 21 animais, respectivamente); 9B = *pool* de 6 indivíduos da espécie *F. subtilis*; 10B = 1 exemplar de *Macrobrachium sp.*; 11B = 1 exemplar da espécie *L. schmitti*. **Estação C:** 12C e 13C = *pools* que totalizam 15 indivíduos (8 e 7 animais, respectivamente) da espécie *F. subtilis*; 14C e 15C = *pools* que totalizam 23 indivíduos da espécie *F. Brasiliensis* (11 e 12 animais, respectivamente); 16C = *pool* de 9 indivíduos da espécie *L. schmitti*, 17C = *pool* de 3 indivíduos *Macrobrachium sp.* Amostras 18C' e 18C'' = repetição do camarão 7C3 (camarão de número 7 da Estação C – Coleta 3); CN = controle negativo; C+ = controle positivo; M = marcador (1Kb plus DNA Ladder, Invitrogen®);

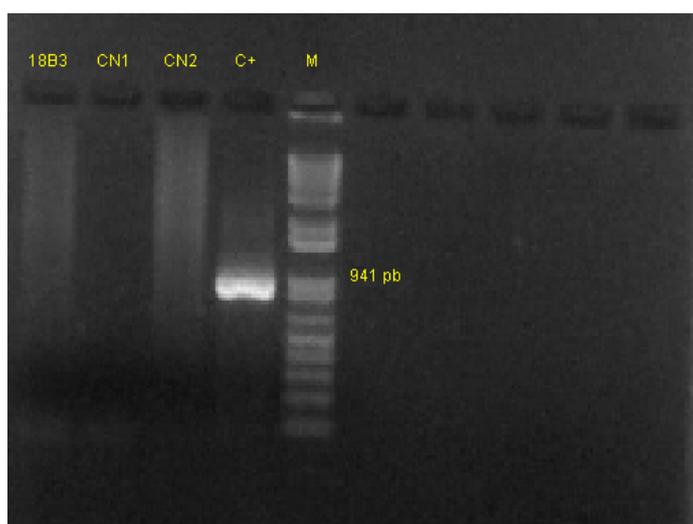


Figura 15 - Gel de agarose da análise de PCR para detecção do WSSV de um camarão da Coleta 3, Estação B: 18B3= camarão da espécie *L. vannamei*; CN1= controle negativo do primeiro passo da reação (*primers* F1R1); CN2= controle negativo do segundo passo da reação (*Primers* F2R2); C+ = controle positivo; M + = marcador (1Kb plus DNA Ladder, Invitrogen®).

4.4.2. Investigação do Vírus da Infecção Hipodermal e Necrose Hematopoiética (IHHNV) por PCR

O vírus da IHHN não foi detectado nas amostras pesquisadas provenientes das Estações A, B e C na Coleta1. Nas amostras originadas da Coleta 2, a detecção por PCR foi positiva para os *pools* 1A, 2A, 3A, 4A, 5A e 11B, referentes às espécies *F. subtilis* (1A e 2A); *F. brasiliensis* (3A); *L. schmitti* (4A) e *L. vannamei* (5A e 11B). Na Coleta 3, apenas uma amostra (18B₃) de um indivíduo da espécie *L. vannamei* foi PCR positivo para o IHHNV.

A abertura dos *pools*, nos quais foi detectada a presença do IHHNV, demonstrou que dezessete camarões peneídeos eram IHHNV positivos, correspondendo a 3,77% do total de 450 animais capturados. A maior prevalência intra-específica foi registrada para a espécie *L. vannamei* (12,0 %) e a menor para a espécie *F. brasiliensis* (0,56 %) (Tabela VII).

Tabela VII - Número de camarões PCR positivos (n) para o IHHNV distribuídos por espécie, amostra, coleta e estação de coleta. Cálculo da prevalência intra-específica (a) e em relação ao total de indivíduos capturados (b).

Espécie	n	Identificação/Amostras	Coleta	Estação	Prevalência (%)	
					a	b
<i>F. subtilis</i>	8	7A ₂ ;9A ₂ ;13A ₂ ;17A ₂ ;18A ₂ ; 21A ₂ ; 42A ₂ e 44A ₂	2	A	5,92	1,77
<i>L. vannamei</i>	6	18B ₃ , 43A ₂ ; 45A ₂ ; 46A ₂ 47A ₂ e 50B ₂	2 e 3	A e B	12,00	1,33
<i>L. schmitti</i>	2	15A ₂ e 22A ₂	2	A	2,35	0,44
<i>F. brasiliensis</i>	1	14A ₂	2	A	0,56	0,23
Total	17	-	-	-	-	3,77

4.4.2.1 – Coleta 1 - Estações A, B e C

A reprodução da fotografia (Figura 16) do gel de agarose mostra a corrida de eletroforese dos produtos de PCR dos 16 *pools* dos camarões capturados na Coleta 1, nas Estações A, B e C, como pode ser observado não foi detectada a presença do IHHNV em nenhuma das amostras pesquisadas na referida coleta.

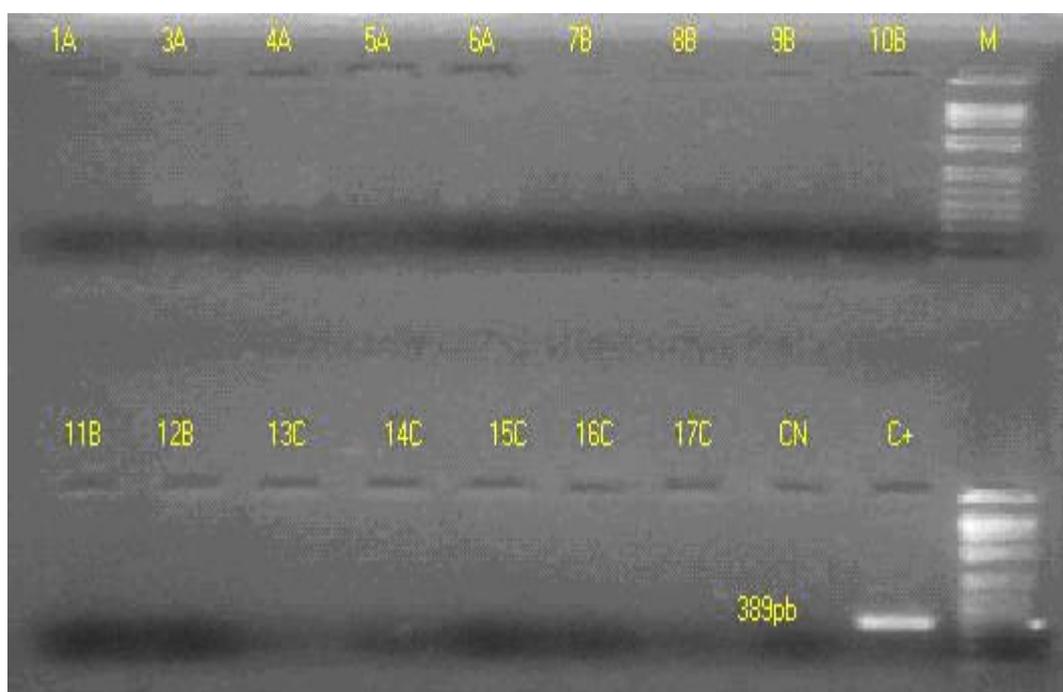


Figura 16 – Corrida em gel de agarose - PCR para detecção do IHHNV nos *pools* das espécies de camarões capturadas na Coleta 1: **Estação A:** 1A= *pool* de 15 indivíduos da espécie *L. vannamei*; 3A= *pool* de 2 indivíduos da espécie *F. subtilis*; 4A= 3 indivíduos da espécie *F. brasiliensis*; 5A e 6A = *pools* de 15 indivíduos por amostra da espécie *L. schmitti*. **Estação B:** 7B= *pool* de 8 indivíduos da espécie *L. vannamei*; 8B= *pool* de 2 indivíduos da espécie *F. brasiliensis*; 9B e 10B = *pools* contendo, em cada, 9 indivíduos da espécie *F. subtilis*; 11B e 12B= ambos os *pools* de 11 indivíduos da espécie *L. schmitti*. **Estação C:** 13C = *pool* de 2 indivíduos da espécie *L. vannamei*; 14C e 15C = ambos os *pools* de 13 indivíduos da espécie *F. brasiliensis*; 16C= *pool* de 17 indivíduos da espécie *F. subtilis*; 17C= *pool* de 5 indivíduos da espécie *L. schmitti*; CN = controle negativo; C+ = controle positivo; M = marcador (1kb plus DNA Ladder Invitrogen®)

4.4.2.2. – Coleta 2 - Estações A, B e C

A reprodução do gel de agarose, abaixo apresentada, mostra a corrida de eletroforese dos produtos das análises de PCR em 17 *pools* dos camarões capturados na Coleta 2, Estações A, B e C. Foi detectada a presença do IHHNV nos *pools* 1A , 2A , 3A , 4A, 5A e 11B (Figura 17).

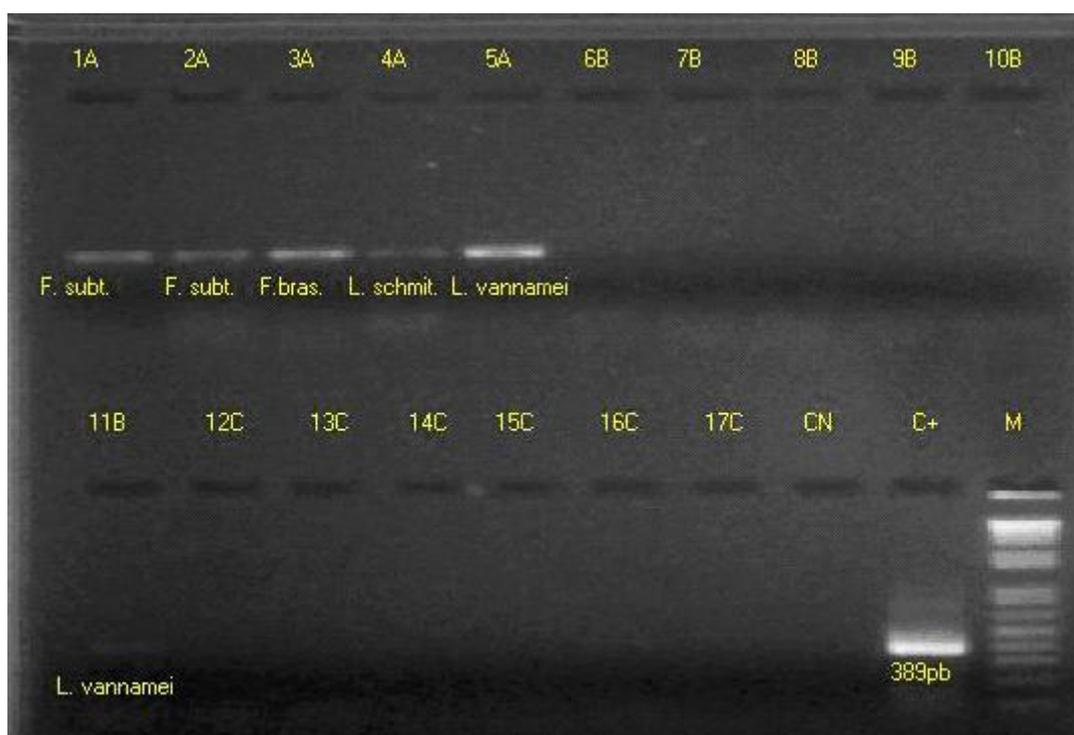
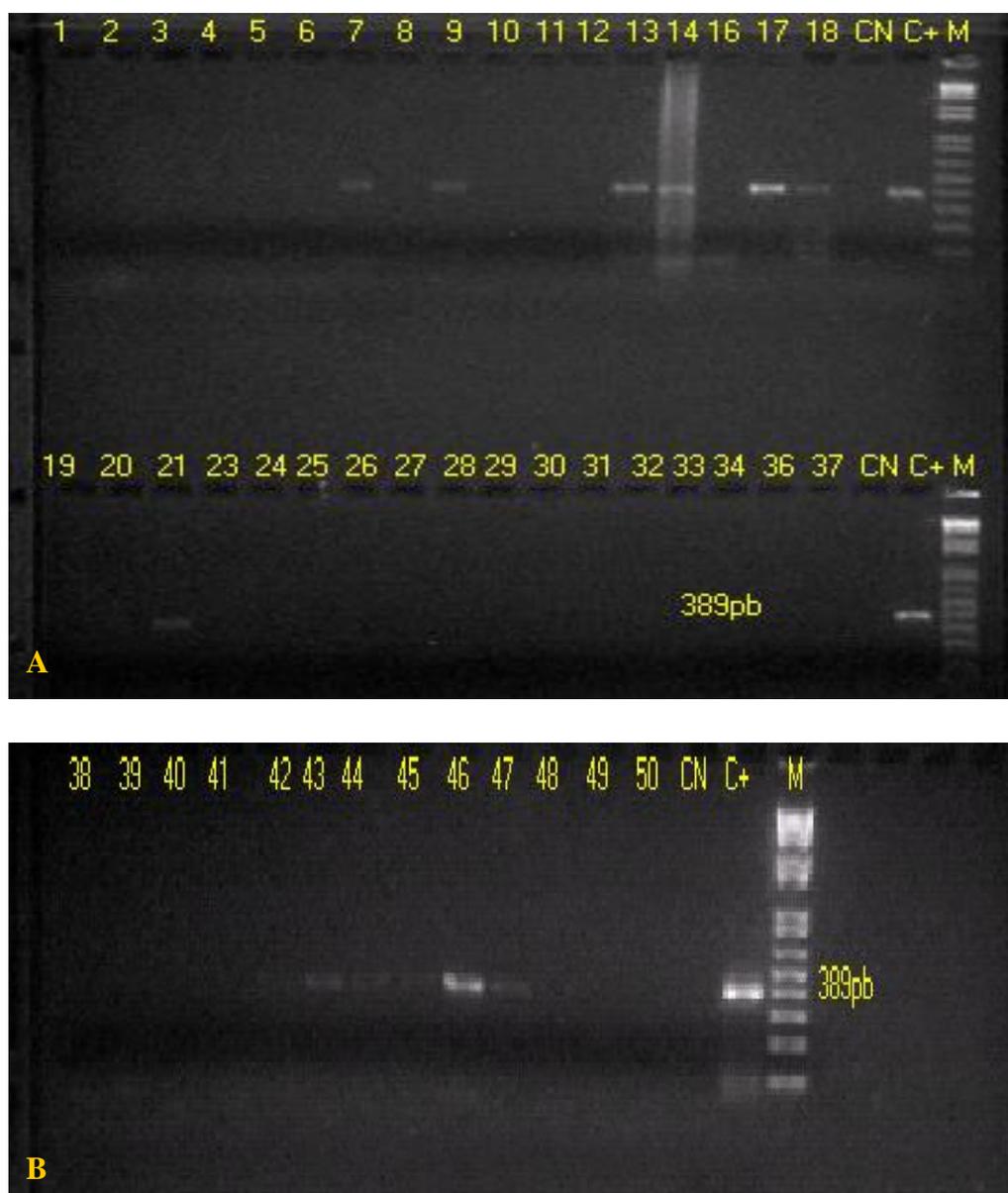


Figura 17 – Corrida em gel de agarose - PCR para detecção do IHHNV nos *pools* das espécies de camarões capturadas na Coleta 2: **Estação A:** 1A= *pool* de 12 camarões da espécie *F. subtilis*; 2A= *pool* de 11 camarões *F. subtilis*; 3A= *pool* de 12 indivíduos da espécie *F. brasiliensis*; 4A= *pool* de 3 camarões da espécie *L. schmitti*; 5A= *pool* de 12 indivíduos da espécie *L. vannamei*. **Estação B:** 6B e 7B= *pools* de 12 indivíduos (cada) de camarões da espécie *F. subtilis*; 8B e 9B= *pools* de 10 indivíduos (cada) da espécie *F. brasiliensis*; 10B= *pool* de 3 indivíduos da espécie *L. schmitti*; 11B= *pool* de 3 indivíduos da espécie *L. vannamei*. **Estação C:** 12C e 13C= *pools* de 9 e 8 indivíduos respectivamente, da espécie *F. subtilis*; 14C e 15C= *pools* de 12 e 13 indivíduos, em cada, da espécie *F. brasiliensis*; 16C= *pool* de 5 indivíduos da espécie *L. schmitti*; 17C= *pool* de 3 indivíduos da espécie *L. vannamei*; CN= controle negativo; C+ = controle positivo; M= marcador (1Kb Plus DNA Ladder Invitrogen®).

À medida que as reações de PCR detectavam o IHHNV nos *pools*, estes eram abertos com a finalidade de se estabelecer a prevalência da enfermidade pesquisada e identificar o animal para análise histopatológica.

A reprodução das fotografias dos géis de agarose da abertura dos *pools* 1A, 2A, 3A, 5A IHHNV positivos, da Coleta 2 na Estação A encontram-se nas Figuras 18A e 18B.



Figuras 18A e 18B – Corrida em gel de agarose - PCR para detecção do IHHNV nos camarões 1 a 50 (exceto camarões 15A2, 22A2 e 35A2) que compuseram os *pools* 1A, 2A, 3A e 5A da Estação A, Coleta 2 - Amostras: 1; 3; 7; 8; 9; 11; 12; 13; 16; 17; 18; 21; 23; 24; 28; 30; 32, 33, 38, 39, 41, 42 e 44= amostras individuais de camarões da espécie *F. subtilis* (referente abertura dos *pools* 1A e 2A); Amostras: 5; 6; 10; 14; 19; 20; 25; 26; 27; 29; 34 e 37 = amostras individuais de camarões da espécie *F. brasiliensis*; Amostras: 2; 4; 31; 36; 40; 43; 45; 46; 47; 48; 49 e 50 = amostras individuais de camarões da espécie *L. vannamei* (referente abertura do pool 5A); Amostras positivas: 7; 9; 13; 14; 17; 18; 21; 42; 43; 44; 45; 46 e 47; CN= controle negativo; C+= controle positivo; M= marcador (1Kb Plus DNA Ladder Invitrogen®).

A Figura 19 corresponde às corridas em gel de agarose dos produtos das análises de PCR das amostras de abertura dos *pools* 4A (espécie *L. schmitti*, Coleta 2, Estação A, camarões 15A2, 22A2 e 35A2) e a Figura 20 é relativa ao *pool* 11B (espécie *L. vannamei*, Coleta 2, Estação B), não incluídos nas corridas anteriores.

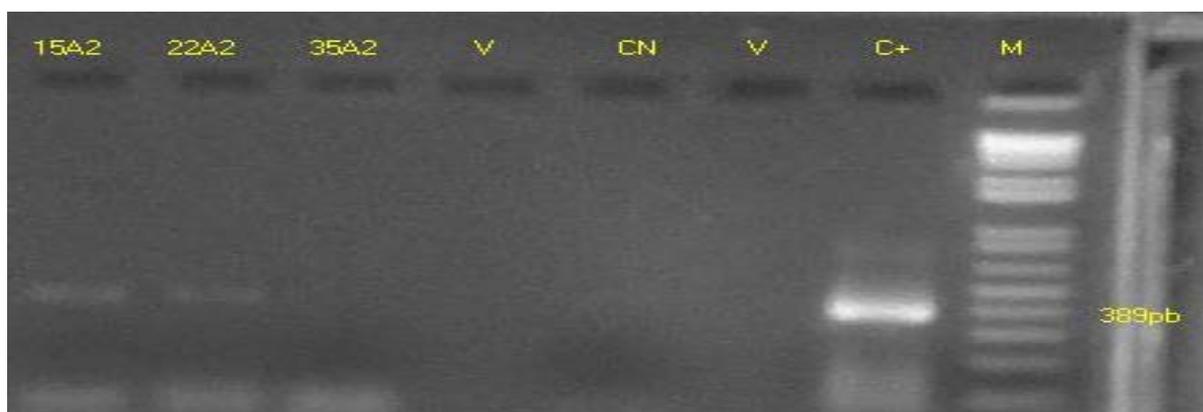


Figura 19 - Gel de agarose das análises de PCR para detecção do IHHNV referente abertura do *pool* 4A - Amostras 15A2; 22A2; 35A2 = amostras individuais de camarões da espécie *L. schmitti*, provenientes da Estação A, Coleta 2 que compuseram a amostra/pool 4A. Os camarões 15A2 e 22A2 são positivos para o IHHNV; CN= controle negativo; C+= controle positivo; M= marcador (1Kb Plus DNA Ladder Invitrogen®).



Figura 20 – Gel de agarose de PCR para detecção de IHHNV na abertura do *pool* 11B Coleta 2 Estação B: Amostras: 38B2, 45B2 e 50B2 = um indivíduo por amostra de camarões da espécie *L. vannamei*. Na amostra 50B2 foi detectado o IHHNV; CN= controle negativo; C+= controle positivo; M= marcador (1Kb Plus DNA Ladder Invitrogen®).

4.4.2.3. Coleta 3 - Estações A, B e C

As reproduções de gel de agarose apresentadas nas Figuras 21 e 22 mostram, respectivamente, as corridas de eletroforese dos produtos das análises de PCR em 17 *pools* de camarões e de um camarão da espécie *L.vannamei* capturados na Coleta 3, Estações A, B e C.

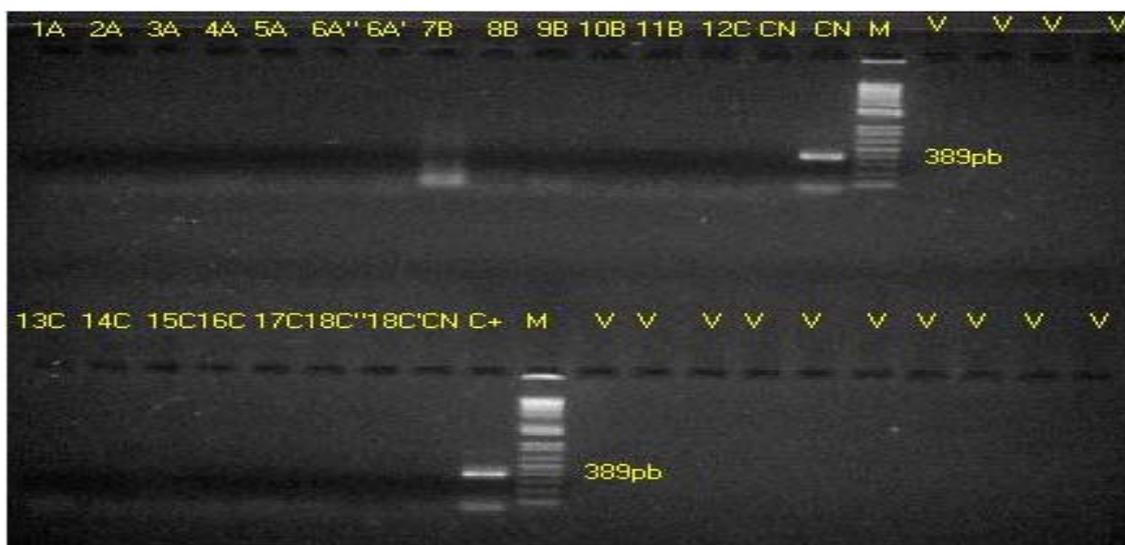


Figura 21 - Gel de Agarose das análises de PCR para detecção do IHHNV nos *pools* dos camarões capturados na Coleta 3. **Estação A:** 1A= *pool* de 6 indivíduos da espécie *L.vannamei*; 2A e 3A= *pools* que totalizam 13 indivíduos da espécie *F. subtilis* (6 e 7 animais respectivamente); 4A e 5A= *pools* que totalizam 24 indivíduos (12 animais por *pool*) da espécie *F. brasiliensis*; 6A' e 6A'' mesmo *pool* constituído por 7 indivíduos da espécie *L. schmitti*. **Estação B:** 7B e 8B= *pools* que totalizam 41 indivíduos da espécie *F. brasiliensis* (20 e 21 animais respectivamente); 9B = *pool* de 6 indivíduos da espécie *F. subtilis*; 10B= um exemplar *Macrobrachium sp.*; 11B= um exemplar da espécie *L. schmitti*; **Estação C:** 12C e 13C= *pools* que totalizam 15 indivíduos (8 e 7 animais respectivamente) da espécie *F. subtilis*; 14C e 15C= *pools* que totalizam 23 indivíduos da espécie *F. brasiliensis* (11 e 12 animais, respectivamente); 16C= *pool* de 9 indivíduos da espécie *L. schmitti*, 17C= *pool* de 3 indivíduos *Macrobrachium sp.* Amostras 18C' e 18C''= repetição do camarão 7C3; CN= controle negativo; C+= controle positivo M= marcador (1Kb plus DNA Ladder Invitrogen®).

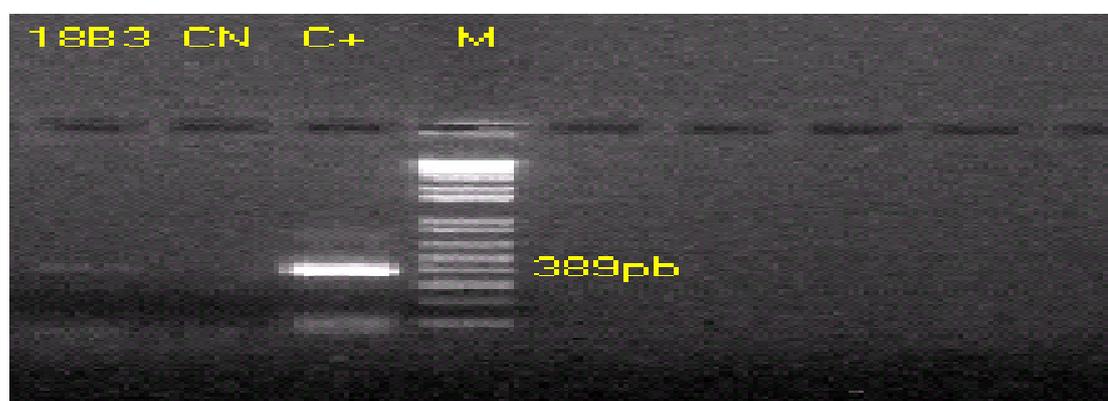


Figura 22 – Corrida em gel de agarose - PCR para detecção do IHHNV na amostra 18B₃, Coleta 3, Estação B: 18B₃= camarão da espécie *L. vannamei* (amostra positiva); CN= controle negativo; C+= controle positivo; M= marcador (1Kb plus DNA Ladder, Invitrogen®).

4.5. Análises Histológicas

A pesquisa dos achados histopatológicos relativos às investigações do WSSV e IHNV foi baseada em Lightner (1996).

Nas análises relativas ao WSSV foram observados brânquias, células do tecido epitelial sub-cuticular, células do tecido conjuntivo, epitélio da glândula antenal, células do revestimento do órgão linfóide, tecido hematopoiético e fagócitos do coração.

Nos tecidos investigados não foram observadas lesões histológicas características da Síndrome da Mancha Branca (WSS), corroborando os resultados da investigação através da técnica diagnóstica Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

A pesquisa histopatológica para o IHNV foi baseada na mesma literatura e constou, principalmente, da inspeção das brânquias, cordão nervoso, tecido hematopoiético, epitélio cuticular, gônadas, órgão linfóide e glândula antenal.

Dos 17 indivíduos IHNV positivos detectados pela técnica PCR, em apenas 10 foram observadas alterações teciduais compatíveis com as lesões características da enfermidade.

As figuras 23, 24 e 25 mostram corpos de inclusão tipo Cowdry A em indivíduos das espécies *L. vannamei*, *F. subtilis*, e *L. schmitti*.

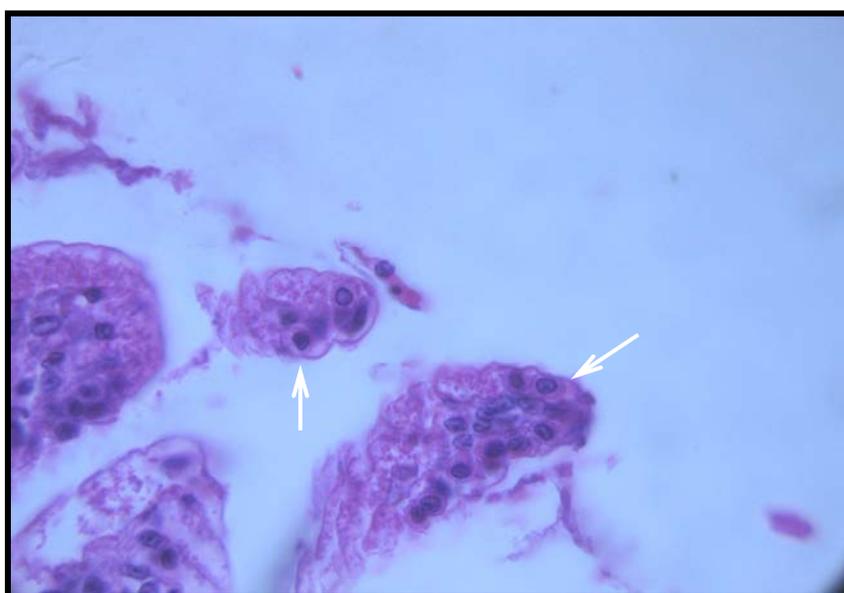


Figura 23 – Brânquias de *L. vannamei* mostrando corpos de inclusão do tipo Cowdry A (setas). Coloração H&E (1000x)

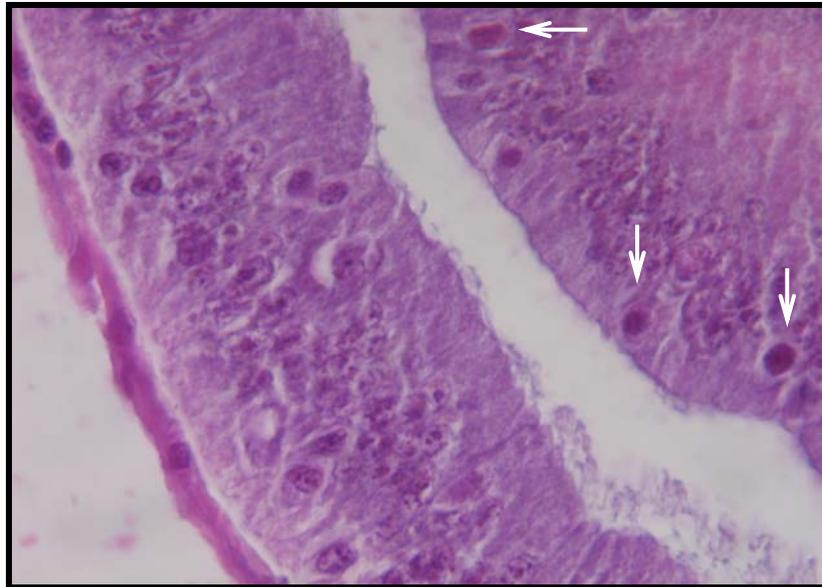


Figura 24 – Ceco de *F. subtilis* mostrando corpos de inclusão tipo *Cowdry A* (setas).
Coloração H&E (1000x).



Figura 25 – Gônada de macho *L. schmitti* mostrando corpos de inclusão do tipo *Cowdry A*
(setas). Coloração H&E (1000x).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Aspectos gerais dos camarões peneídeos e carídeos

Existem três grandes grupos de camarões: a Subordem Dendrobranchiata, a Subordem Stenopodidea e a Infraordem Caridae (COSTA *et al.*, 2003).

A Subordem Dendrobranchiata é constituída por sete famílias, cinquenta e seis gêneros e quinhentas espécies aproximadamente (PÉREZ-FARFANTE & KENSLEY, 1997).

Segundo os autores acima referidos, essa Subordem inclui duas superfamílias: Penaeoidea e Sergestoidea. A primeira superfamília abriga cinco famílias: Aristeidae, Benthesicymidae, Penaeidae (a qual inclui os gêneros *Farfantepenaeus* e *Litopenaeus* entre outros de importância econômica), Sicyoniidae e Solenoceridae. A superfamília Sergestoidea compreende as famílias Luciferidae e Sergestidae sendo constituída por sete famílias, cinquenta e seis gêneros e quinhentas espécies aproximadamente.

Sobre os peneídeos da costa brasileira, Costa *et al.* (2003) registram a ocorrência de 26 gêneros e 61 espécies.

A Infraordem Caridea é constituída pelas superfamílias: Atyoidea, Palaemonoidea e Alpheioidea. A superfamília Palaemonoidea compreende a família Palaemonidae que abriga o gênero *Macrobrachium*, entre outros (BOND-BUCKUP & BUCKUP, 1999).

2.1.1. Caracterização da Subordem Dendrobranchiata

Os indivíduos pertencentes a essa subordem caracterizam-se por apresentar os três primeiros pares de pereiópodos quelados com forma e tamanhos similares, pleura do segundo somito abdominal sobrepondo apenas o terceiro. O petasma localiza-se no primeiro somito abdominal. O téllico situa-se ventralmente na fêmea entre o quarto e quinto pares de pereiópodos, podendo ser aberto ou fechado. As fêmeas liberam os ovócitos maduros diretamente na água (PÉREZ-FARFANTE & KENSLEY, 1997; COSTA *et al.*, 2003). A denominação Dendrobranchiata foi dada por Bate (1888 apud PEREZ-FARFANTE & KENSLEY, 1997) baseada na estrutura das brânquias que são ramificadas (*dendro* = árvore).

2.1.2. Caracterização da Subordem Stenopodidea

As pleuras abdominais dos indivíduos desse grupo são similares as do grupo Dendrobranchiata. Características como brânquias do tipo tricobrânquias, ausência de petasma nos machos, terceiro par de pereiópodos quelados, consideravelmente longos e fêmeas que carregam ovos nos pleópodos, diferenciam este grupo do grupo anterior (COSTA *et al.*, 2003).

2.1.3. Caracterização da Infraordem Caridea

A Infraordem Caridae é caracterizada por não apresentar o terceiro par de pereiópodos quelados, as brânquias são do tipo filobrânquia, os machos não possuem petasma e as fêmeas carregam os ovos nos pleópodos (COSTA *et al.*, 2003). Os indivíduos deste grupo apresentam expansão da pleura do segundo segmento abdominal recobrimdo a pleura do primeiro e terceiro. Não apresentam quilhas destacadas e sulcos na carapaça, comuns nos camarões peneídeos. As espécies que se encontram em água doce, próximas ao litoral, migram para águas salobras dos estuários, para eclosão dos ovos e criação das larvas (BOND-BUCKUP & BUCKUP, 1999).

2.2. Camarões peneídeos e carídeos capturados nas coletas: subsídios para identificação

A identificação correta das espécies é ferramenta fundamental para o êxito de estudos básicos da biologia, seja investigação ecológica, dinâmica populacional ou impactos da sobrepesca (COSTA *et al.*, 2003).

A revisão da literatura sobre identificação e inventário de camarões da costa brasileira revelou serem escassas as publicações sobre o tema. Todavia, podem ser assinaladas, entre elas, as pesquisas de Fausto-Filho (1966, 1975 e 1976) sobre os camarões peneídeos do Nordeste do Brasil e decápodos marinhos em geral; Coelho *et al.* (1980) sobre a biogeografia dos crustáceos do litoral equatorial brasileiro; Costa *et al.* (2003) sobre os Dendrobranchiata do litoral norte do Estado de São Paulo; D’Incao (1999) sobre os

Dendrobranchiata do Estado do Rio Grande do Sul e Bond-Buckup & Buckup (1999) sobre os carídeos desse Estado.

A referência clássica para a identificação de peneídeos são as chaves propostas por Pérez-Farfante (1988) e Pérez-Farfante & Kensley (1997).

A seguir são reproduzidos desenhos esquemáticos dos caracteres utilizados para a identificação de camarões peneídeos e carídeos (Figuras 1, 2 e 3).

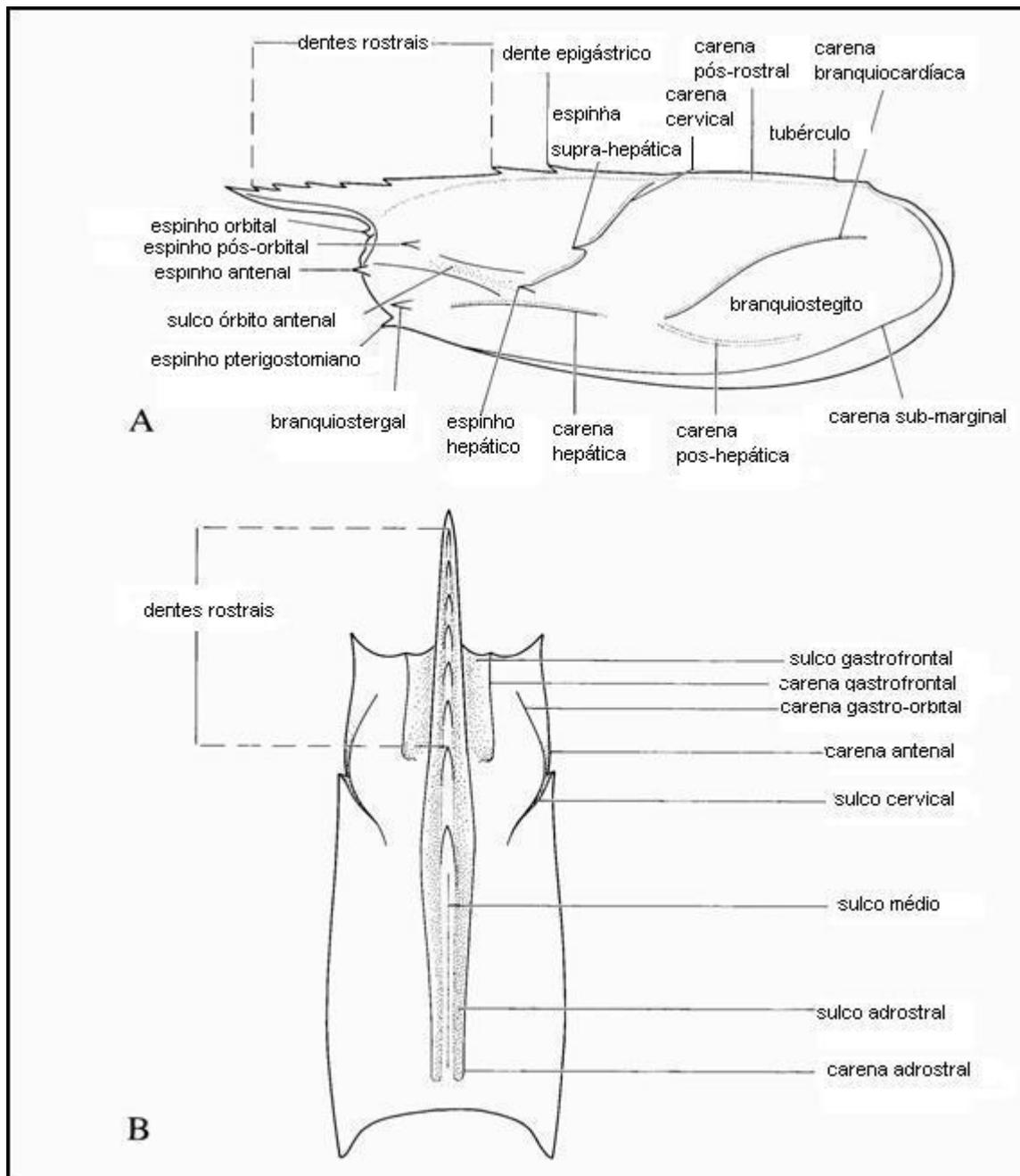


Figura 1 – Vista lateral (A) e dorsal (B) do cefalotórax de um peneídeo mostrando caracteres utilizados na sua taxonomia. Fonte: adaptado de Pérez-Farfante & Kensley (1997)

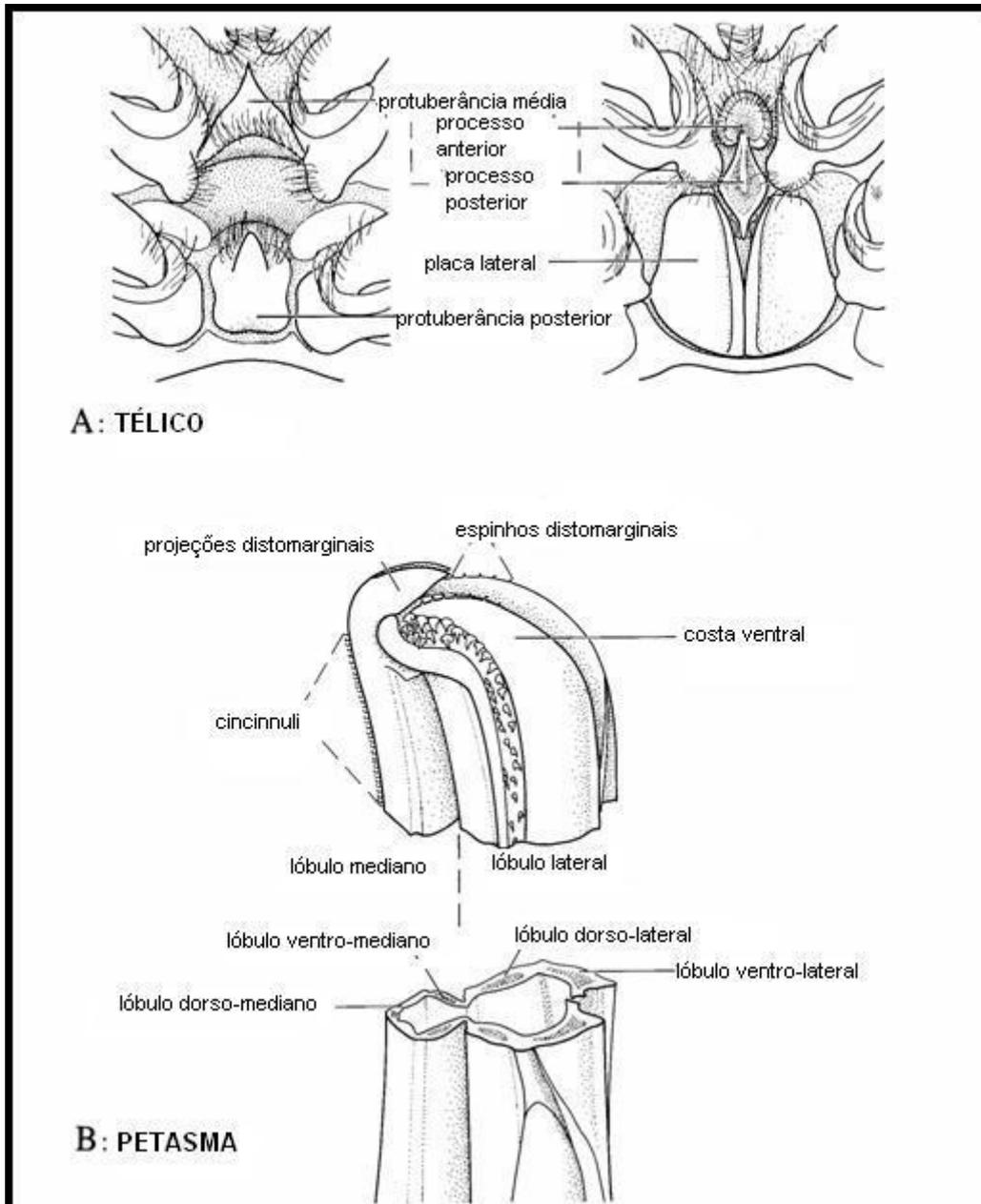


Figura 2 – Alguns caracteres externos de machos e fêmeas utilizados em taxonomia de peneídeos. A. Télico; B. Petasma. Fonte: adaptado de Pérez-Farfante & Kensley (1997).

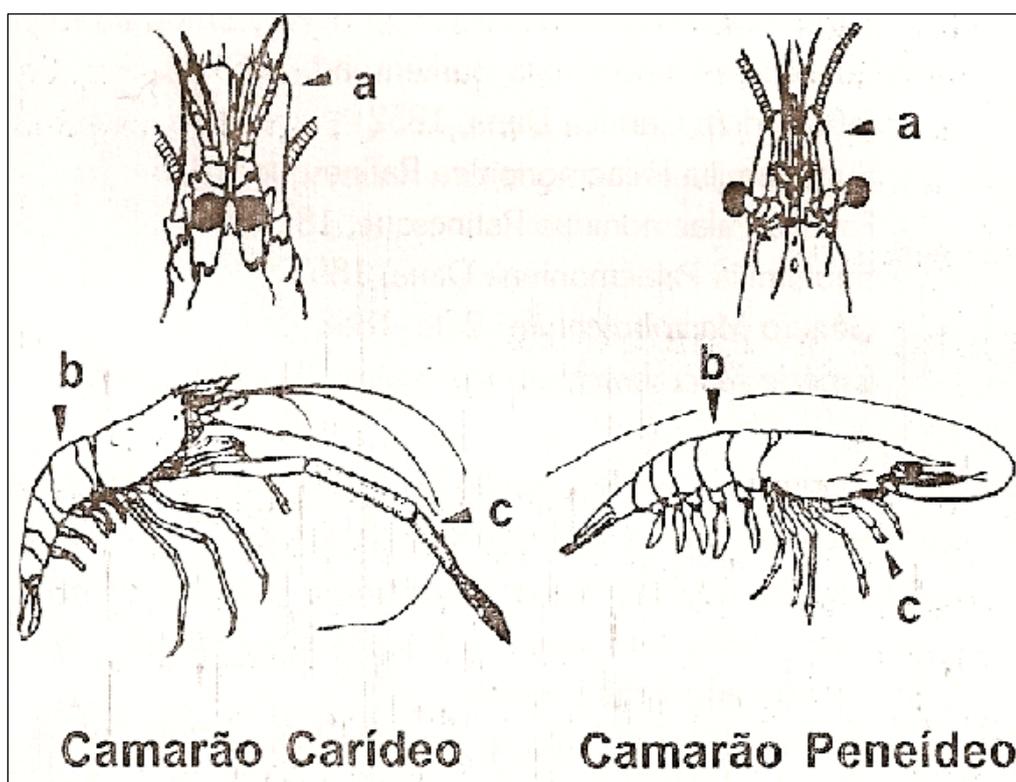


Figura 3 - Diferenciação morfológica entre camarões carídeos e peneídeos. a = escama antenal; b = pleura do segundo somito; c = segundo par de pereiópodos. Fonte: Bliss (1990).

A distribuição dos carídeos *Macrobrachium acanthurus*, *M. amazonicum*, *M. birai*, *M. carcinus*, *M. jelskii*, *M. nattererri* e *M. olferssi* inclui o Estado do Ceará (CORREA, 1977).

Os peneídeos *Xiphopenaeus kroyeri* (HELLER, 1862); *Trachypenaeus constrictus* (STIMPSON, 1874); *Penaeus schmitti* Burkenroad, 1938; *Penaeus aztecus* Ives; *Sicyonia typica* (Boeck); *Siicyonia dorsalis* Kingsley; *Sicyonia parri* Burkenroad; *Sicyonia laevigata* (STIMPSON, 1874) e *Penaeus brasiliensis* Latreille, 1817 são assinalados por Fausto-Filho (1966) como de ocorrência no Nordeste do Brasil.

Braga (2000), ao avaliar o ciclo vital do estoque de peneídeos na costa do Município de Fortaleza, Ceará, relata a ocorrência das espécies dos camarões peneídeos *Penaeus brasiliensis* Latreille, 1817; *Penaeus subtilis* Pérez-Farfante, 1967; *Penaeus schmitti* Burkenroad, 1938; *Xiphopenaeus kroyeri* (HELLER, 1862) e *Trachypenaeus constrictus* (STIMPSON, 1874).

Pérez-Farfante & Kensley (1997) fizeram uma revisão taxonômica dos camarões penaeoideos e sergestoideos, modificando, entre outros, os gêneros das espécies: *P. subtilis* e *P. brasiliensis* para *Farfantepenaeus* e *P. schmitti* para *Litopenaeus*.

A seguir são descritas algumas espécies de camarões de ocorrência no Estado do Ceará e cultivada no Brasil.

2.2.1. *Farfantepenaeus subtilis* (PÉREZ-FARFANTE, 1967)

Esta espécie é conhecida no Brasil como camarão rosa, camarão lixo, camarão vermelho, cabeçudo (Figura 4a). É capturada nos EUA (Flórida), México, Nicarágua, Venezuela, Guianas, Brasil (Baía de Marajó, Estados do Nordeste e Rio de Janeiro). Tem como habitat a costa continental do litoral até profundidade de 365m, sendo mais encontrado em fundos relativamente firmes de lama e areia entre profundidades de 45 a 65m. Os juvenis são mais facilmente encontrados em fundos moles de lama dos estuários. A espécie tem hábitos noturnos (ISAAC *et al.*,1992).

Descrição Diagnóstica: rostro geralmente dotado de 8 ou 9 dentes dorsais e 2 dentes na margem ventral; cristas e sulcos adrostrais relativamente curtos, nunca alcançando a margem posterior da carapaça, aprofundando-se e estreitando-se posteriormente, sendo 1/5 a 3/4 a largura da carena pós-rostral. O petasma apresenta projeções distomedianas curtas. O télico é fechado e apresenta placas laterais com ângulos divergentes (Figura 4b). Estes animais são geralmente marrons, podendo ser acinzentados ou amarelados. Não apresenta mancha lateral escura entre o terceiro e quarto segmentos abdominais. Os machos apresentam tamanho máximo de 152mm e as fêmeas de 205mm (D'INCAO, 1999; PÉREZ-FARFANTE, 1988; PÉREZ-FARFANTE & KENSLEY, 1997).



Figura 4a - *Farfantepenaeus subtilis* (PÉREZ-FARFANTE, 1967).

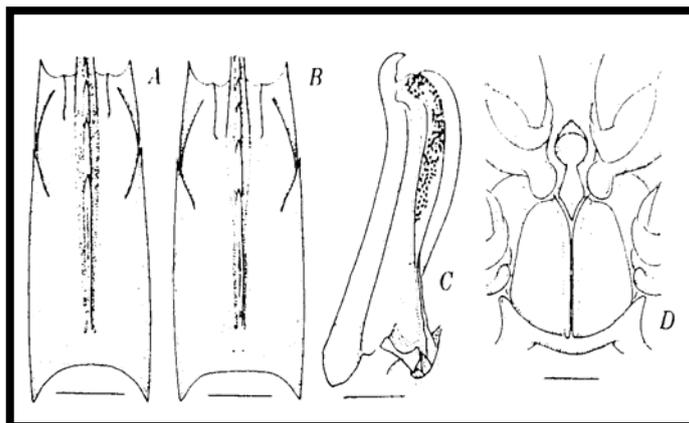


Figura 4b - *Farfantepenaeus subtilis*. A e B. Vista dorsal da Carapaça; C. Vista lateral do petasma direito; D. Télico. Fonte: Pérez-Farfante (1988) modificado.

2.2.2. *Farfantepenaeus brasiliensis* (LATREILLE, 1817)

Esta espécie é conhecida pelos nomes vulgares de camarão rosado com mancha, camarão vermelho com mancha, camarão rosa e camarão lixo (Figura 5a). Distribui-se ao longo da costa dos EUA: Nova Jersey, Carolina do Norte, Carolina do Sul, Litoral leste da Flórida, México, Costa caribenha da América Central e Sul, costa do Atlântico da América do Sul até o Rio Grande do Sul. (D'INCAO, 1999; PÉREZ-FARFANTE, 1988; HOLTHUIS, 1980).

Descrição diagnóstica: carena e sulcos adrostrais longos, sulcos largos posteriormente, quase atingindo a margem posterior da carapaça. Carena e sulcos gastrofrontais presentes. Sulco mediano longo, terminando de forma imediatamente anterior ao final do sulco adrostral, profundo em todo o comprimento. A porção distal da costa ventral do petasma incrementa-se gradualmente em largura, curvada em arco. O téllico com as bordas das placas anteromedianas formam duas pequenas projeções cobrindo o processo anterior (Figura 5b). Comprimento máximo total: machos 191mm; fêmeas 250mm. A espécie apresenta coloração rosada ou vermelho-amarronzada. Geralmente exhibe uma mancha lateral escura marrom ou vermelho-amarronzado na junção entre o terceiro e quarto segmentos abdominais (D'INCAO, 1999; PÉREZ-FARFANTE, 1988).



Figura 5a - *Farfantepenaeus brasiliensis*
Latreille, 1817. Fonte: Braga (2000).

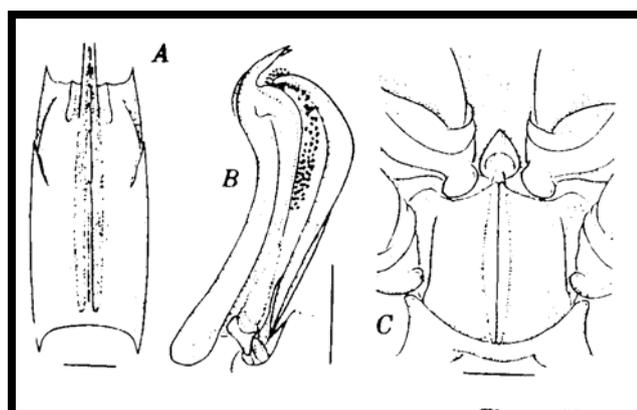


Figura 5b - *Farfantepenaeus brasiliensis*, 1988. A. Vista dorsal da carapaça; B. Vista lateral do petasma direito. C. Téliço. Fonte: Pérez-Farfante (1988) modificado.

2.2.3. *Litopenaeus schmitti* (BURKENROAD, 1938)

No Brasil esta espécie é conhecida pelos nomes de camarão legítimo, camarão verdadeiro, camarão branco, camarão lixo, camarão vila franca e camarão caboclo (Figura 6a). Distribui-se ao longo da costa das Antilhas (de Cuba às Ilhas Virgens); costa atlântica da América Central, de Honduras ao Sul do Brasil. Habita profundidades de 2 a 47m, em substratos lamosos, areia e lama ou argila (HOLTHUIS, 1980).

Descrição diagnóstica: carena e sulcos adrostrais pequenos, terminando na altura do dente epigástrico. Carena e sulcos gastrofrontais ausentes. Sulco mediano raso, pouco definido. Antenas longas, 1,5 a 2,75 vezes o comprimento do corpo. Petasma apresentando a superfície interna da porção distal dos lobos laterais lisa, sem carena diagonal ou dobra e com a lapela interna submediana alcançando em profundidade a emarginação distal. Télico com par de carenas antero-laterais retas seguidas posteriormente por um par amplo de protuberâncias no esternito XIV (Figura 6b). Comprimento máximo total: machos 175mm; fêmeas 235mm (FAO, 1977; PÉREZ-FARFANTE, 1988; D'INCAO, 1999).



Figura 6a - *Litopenaeus schmitti* (BURKENROAD, 1938). Fonte: Braga (2000).

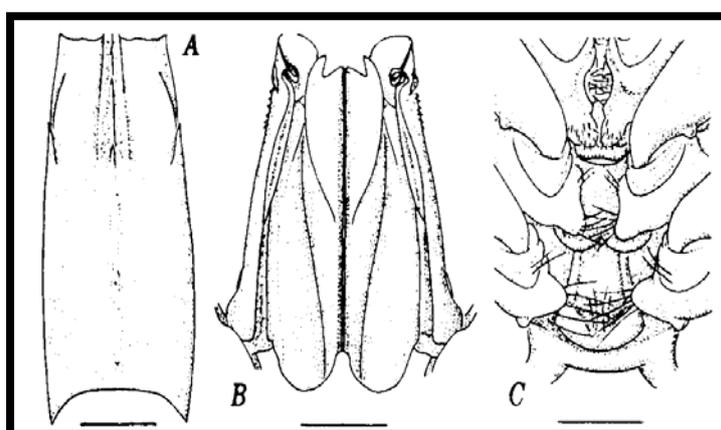


Figura 6b - *L. schmitti* A. Vista dorsal da carapaça. B. Vista ventral do petasma. C. Télico Fonte: Pérez-Farfante (1988) modificado.

2.2.3. *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931)

Conhecido internacionalmente por camarão branco, distribui-se do Leste do Pacífico (Sonora, México) ao Sul do Peru. Os adultos habitam águas oceânicas de até 72m de profundidade e na fase juvenil habitam águas estuarinas (Figura 7a).

Descrição diagnóstica: rostró com 1 ou 2 dentes ventrais, dente posterior situado ao nível do dente dorsal anterior, fórmula dos dentes rostrais, 8-9/1-2 adiante do dente epigástrico. Carapaça com espinhos hepáticos e antenais pronunciados, ausência do espinho orbital e pterogostomiano, sulco pós-ocular ausente, carena pós-rostral de tamanho variável quase alcançando, por vezes, a margem posterior da carapaça, sulco e carena adrostral curtos estendendo-se até o dente epigástrico, carena gastrofrontal ausente, carena gastro-orbital relativamente curta, geralmente estendendo-se anteriormente aproximadamente 2-3 vezes a distância compreendida entre espinho hepático e margem orbital. Sulcos orbito-antenas bem marcados, carenas cervical e hepática pontiagudas, acompanhando a profundidade dos sulcos, ausência da carena branquicárdica, ausência de suturas longitudinais e transversas. Petasma simétrico, semi-aberto, descoberto sem projeções distomedianas, borda ventral curta com a parte distal do lobo lateral livre, longa e sub-elíptica estendendo-se além do lobo mediano. Télico aberto com um par de carenas pontiagudas curvas na parte anterior do esternito XIV; esternito XIII torna-se grande, protuberância mediana semicircular a sub-retangular (Figura7b). Comprimento máximo: machos 187mm; fêmeas 230mm (PÉREZ-FARFANTE, 1988; PÉREZ-FARFANTE & KENSLEY, 1997).



Figura 7a - *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931)

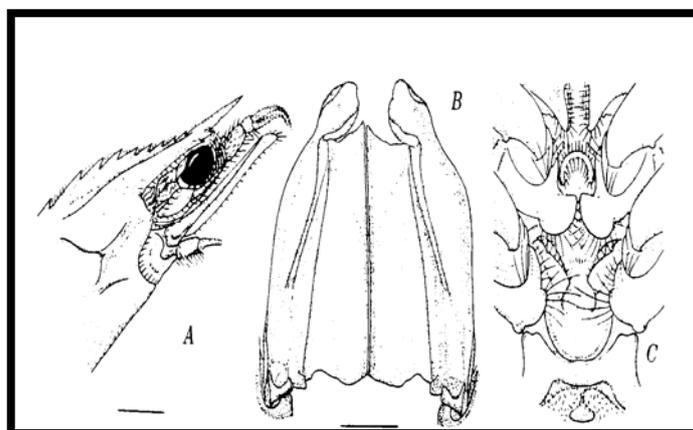


Figura 7b - A vista antero-lateral da carapaça. B. Vista dorsal do petasma. C. Télico. Fonte: Pérez-Farfante (1988) modificado.

2.2.4. *Macrobrachium sp.*

As espécies de camarões do gênero *Macrobrachium* (BATE, 1868) encontram-se amplamente distribuídas por rios e estuários em regiões tropicais e subtropicais do mundo (Figura 8). No Brasil o gênero está representado por 18 espécies distribuídas nas bacias amazônicas, interiores e litoral (MELO & BROSSI-GARCIA, 2005).

Ausência de espinhos supraorbital e branquiostegal, presença do espinho hepático e palpo mandibular, e dátilo dos últimos três pereiópodos do tipo simples são caracteres diagnóstico do gênero (HOLTHUIS, 1950, 1980).

Os carídeos podem ser diferenciados dos camarões peneídeos pela presença da pleura do segundo somito recobrimdo parte das pleuras do primeiro e terceiro segmentos abdominais, escama antenal mais alargada, segundo par de pereiópodos mais espesso e desenvolvido que os demais, e corpo com certa angulação Bliss (1990 apud PINHEIRO & HEBLING, 1998).



Figura 8 - *Macrobrachium sp.*

2. 3. As enfermidades virais nos cultivos de camarões marinhos

As enfermidades fazem parte do processo de qualquer exploração animal. A cada ano novas epizootias de natureza viral são detectadas na carcinicultura, face à expansão dessa atividade e ao desenvolvimento de ferramentas diagnósticas (NUNES *et al.*, 2004). Os vírus estão entre os mais importantes patógenos que afetam crustáceos, especialmente camarões (WANG *et al.*, 1998).

Segundo Lightner (2005), as principais enfermidades de etiologia viral que afetam a carcinicultura de peneídeos na Ásia e Américas são a Síndrome da Mancha Branca (WWS), Síndrome de Taura (TS), Síndrome da Cabeça Amarela (YH), Infecção Hipodermal e Necrose Hematopoiética (IHHN) e a Mionecrose Infecçiosa (IMN).

O WSSV e IHHNV são listados como importantes patógenos que afetam os camarões peneídeos no Hemisfério Ocidental (DHAR *et al.*, 2001; LIGHTNER, 2005), constituindo-se os vírus mais prevalentes e disseminados na carcinicultura mundial (TANG *et al.*, 2003).

Considera-se que esses vírus tenham sido introduzidos nas Américas através do movimento de camarões vivos e congelados vindos da Ásia. A introdução desses patógenos nos estoques nativos de camarões tem mudado substancialmente as práticas dos carcinicultores. Em decorrência dessa realidade, a utilização de reprodutores e pós-larvas coletados do ambiente natural trazem sempre a preocupação, de que estes sejam portadores de enfermidades (LIGHTNER, 2005).

2.3.1. A Infecção Hipodermal e Necrose Hematopoiética (IHHN)

Essa enfermidade foi observada pela primeira vez em camarões *Litopenaeus stylirostris* no Havaí (LIGHTNER, 1983) e caracterizou-se por causar epizootias agudas e mortalidade massiva, podendo chegar a 90% dos indivíduos afetados. Por outro lado, em *L. vannamei*, a enfermidade se apresenta de maneira crônica, caracterizando-se principalmente por crescimento irregular e deformidades cuticulares como efeitos mais marcantes, sendo por este motivo, também denominada de Síndrome da Deformidade e do Nanismo (RDS). O IHHNV é transmitido vertical e horizontalmente (OIE, 2003).

Distribuição

O IHNV tem ampla distribuição entre os países que cultivam camarões peneídeos, sendo comumente encontrado no Pacífico Oriental, distribuindo-se do Peru ao México, tanto em populações cultivadas como nas silvestres. Na costa ocidental das Américas, há registro da enfermidade em populações cultivadas de *L. vannamei* e *L. stylirostris*. No lado atlântico das Américas (Golfo da Califórnia, México) este vírus foi detectado em populações silvestres do camarão azul *L. stylirostris* no ano de 1997 (PANTOJA *et al.*, 1998).

De acordo com a OIE (2003), esse vírus é também encontrado no Indo-Pacífico, com registros de ocorrência em populações cultivadas no Leste e Sudeste Asiático e Oriente Médio.

O agente etiológico

O agente da Infecção Hipodermal e Necrose Hematopoiética é um vírus não envelopado, icosaédrico com aproximadamente 22nm de diâmetro, contendo fita simples de DNA com 4,1Kb (kilobases) e um capsídeo de 4 polipeptídeos com peso molecular de 74, 47, 39 e 27,5 Kd (Kilodalton). Por essas características é classificado como membro da família Parvoviridae, sendo o menor de seus representantes (BONAMI *et al.*, 1990; NACA/FAO, 2001).

Hospedeiros

A infecção foi observada em *L. stylirostris*, *L. vannamei*, *L. occidentalis*, *Farfantepenaeus californiensis*, *Penaeus monodon*, *P. semisulcatus* e *Marsupenaeus japonicus*. Infecções naturais provavelmente ocorrem em outras espécies. *Fenneropenaeus indicus* e *Fenneropenaeus merguensis* parecem ser refratários a essa enfermidade. Outras espécies foram infectadas experimentalmente, como o *Litopenaeus setiferus*, *F. duorarum* e *F. aztecus* (LIGHTNER, 1996; OIE, 2003; NACA/FAO, 2001).

Recente trabalho desenvolvido no Centro de Diagnóstico de Enfermidades do Camarão Marinho do Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará,

demonstrou, através de infecção experimental, a susceptibilidade da espécie *F. subtilis* ao IHHNV (COELHO, 2006).

Sintomatologia

Os sinais clínicos do IHHNV na espécie *L. vannamei* caracterizam-se por rostro deformado, antenas enrugadas, cutícula áspera e outras deformidades cuticulares. Os indivíduos das populações de juvenis portadoras do vírus mostram-se menores que o esperado em uma população sem a infecção e apresentam crescimento irregular (LIGHTNER, 1996).

O vírus infecta as células dos tecidos de origem ectodermal e mesodermal, como células epiteliais da mucosa do intestino médio, ceco e hepatopâncreas (OIE, 2003).

Segundo Lightner (1996), a histopatologia para o IHHNV demonstra proeminentes corpos de inclusão intranucleares, denominados *Cowdry* tipo A, eosinofílicos com cromatina marginada, em células de tecidos de origem ectodermal (brânquias, epiderme, epitélio do trato digestório anterior e posterior e cordão nervoso) e mesodermal (tecido hematopoiético, glândula antenal, gônadas, órgão linfóide, tecido conectivo e músculo estriado).

Métodos de Diagnóstico

Vários são os procedimentos diagnósticos para a detecção do IHHNV. A OIE (2003) recomenda como métodos diagnósticos confirmatórios os baseados em técnicas moleculares e histologia.

De acordo com Lightner (1996; 1998), o diagnóstico definitivo é alcançado através dos seguintes métodos: histopatologia; desafios utilizando animais da espécie *L. stylirostris* SPF (*specific pathogen free*); sondas de genes em hibridização *dot blot*, hibridização *in situ* e PCR (Reação em Cadeia da Polimerase).

Uma metodologia considerada mais rápida e sensível do que a técnica de PCR tradicional na detecção do IHHNV é a reação em cadeia da polimerase em tempo real (*Real Time PCR*) que usa um corante fluorescente e sistema de detecção de seqüências de bases (DHAR *et. al.*, 2001).

Recente metodologia desenvolvida por Sun *et al.* (2006), igualmente rápida e sensível na amplificação de ácidos nucleicos, baseia-se em amplificação isotérmica e foi aplicada no diagnóstico do IHHNV com sucesso.

2.3.2. A Síndrome da Mancha Branca (WSS)

A OIE (2003) define a Síndrome da Mancha Branca (*White Spot Syndrome Disease*) como enfermidade de avanço rápido, podendo causar altas taxas de mortalidade a partir do surgimento dos primeiros sintomas.

Distribuição

A enfermidade foi detectada no Japão entre os anos de 1992 e 1993, com os primeiros relatos de ocorrência na espécie *Marsupenaeus japonicus* (*Penaeus japonicus*). Há referências indicativas de que o WSSV foi introduzido no Japão através de animais importados da China, em 1991 (FAO/NACA, 2001). Posteriormente, enfermidade com sinais similares foi registrada em outras regiões da Ásia, República Popular da China, Taipei, China, Tailândia, Coreia, Filipinas e USA. A doença apresentava sintomatologia semelhante, contudo, recebeu denominações diferenciadas. Dada a similaridade dos sinais clínicos da enfermidade registrados nesses países após estudos de ultraestrutura e biologia molecular do seu agente etiológico, a enfermidade foi unificada num complexo denominado Síndrome da Mancha Branca, tendo sigla WSS em língua inglesa (OIE, 2003).

Na América Central, o vírus foi registrado pela primeira vez no início de 1999, com relatos de sua presença na Nicarágua, Guatemala e Honduras (HOSSAIN, 2001; FAO/NACA, 2001). Em abril de 1999 foi confirmada a presença do vírus no Panamá, tendo se disseminado para a América do Sul, em poucos meses, chegando ao Equador, Peru e costa do Pacífico da Colômbia (SEIFFERT *et al.*, 2005).

No Brasil, a enfermidade teve seu diagnóstico e notificação à Organização Internacional de Epizootias em janeiro de 2005. O surto foi registrado no Estado de Santa Catarina em fazendas localizadas na Lagoa de Imaruí/Laguna/SC (SEIFFERT *et al.*, 2005).

No Estado do Ceará, a enfermidade foi relatada em maio de 2005. A notificação oficial a OIE ocorreu em agosto de 2005 (NUNES, 2005).

O agente etiológico

O agente causador da Síndrome da Mancha Branca é um vírus dsDNA, de início classificado como pertencente a família Nimaviridae. Após revisão sistemática foi transferido para a família Baculoviridae (WANG *et al.*, 1995). Mais recentemente, passou a fazer parte gênero Whispovirus, família Whispoviridae (VAN HULTEN *et al.*, 2001; 2002). A forma varia de baciliforme a elíptico, trata-se de vírus envelopado, grande (80-120 x 250-380nm). Os vírions são gerados em núcleos hipertrofiados de células infectadas, sem produção de corpos de oclusão (OIE, 2003).

Hospedeiros

A infecção foi observada nas espécies *P. monodon*, *M. japonicus*, *Fenneropenaeus chinensis*, *F. indicus*, *F. merguensis* e *L. setiferus*. Estudos em laboratório evidenciaram a letalidade da infecção para as espécies *L. vannamei*, *L. stylirostris*, *Farfantepenaeus aztecus*, *F. duorarum* e *L. setiferus* (LIGHTNER, 1996).

Investigações desenvolvidas por Lo *et al.* (1996); Hossain *et al.* (2001); Peng *et al.* (1998); Hameed (2001) detectaram esse vírus em outros crustáceos.

O camarão de água-doce *Macrobrachium rosenbergii*, que até 1998 era considerado não afetado pelo WSSV, passou à categoria de espécie tolerante ao vírus, face à sua detecção realizada por Peng *et al.* (1998).

De acordo com a NACA/FAO (2001) as espécies cultivadas *M. japonicus*, *P. monodon*, *Fenneropenaeus penicillatus*, *F. merguensis*, *L. vannamei*, *L. stylirostris*, *Metapenaeus ensis*, *Macrobrachium rosenbergii* e várias espécies de caranguejos são suscetíveis ao WSSV.

Sintomatologia

Inicialmente observa-se progressiva queda no consumo do alimento até sua parada total. Dentro de poucos dias, os animais apresentam-se moribundos e nadam na superfície das bordas dos viveiros. Manchas brancas circulares variam de pequenos pontos a discos de vários milímetros, podendo coalescer em placas maiores cobrindo a cutícula, principalmente a região do cefalotórax. Os indivíduos moribundos também podem apresentar cor avermelhada.

Diagnósticos baseados apenas em sinais clínicos podem confundir essa enfermidade com outras doenças, pois manchas cuticulares semelhantes podem ser produzidas por alcalinidade excessiva e outras condições ambientais desfavoráveis, bem como uma síndrome bacteriana da mancha branca, que produz sinais similares na cutícula (OIE, 2003).

Conforme Lightner (1996) os achados histopatológicos da Síndrome da Mancha Branca caracterizam-se por destruição generalizada dos tecidos ectodérmicos e mesodérmicos. As células mostram núcleos hipertrofiados com inclusões centrais claras e profundamente basofílicas circundadas por cromatina marginada.

Métodos de Diagnóstico

Para o Escritório Internacional de Epizootias (OIE, 2003) existem dois métodos principais de detecção do vírus do WSS, o primeiro consiste na análise histológica por microscopia ótica de cortes de tecidos corados por H & E e o segundo consiste na técnica de biologia molecular reação em cadeia da polimerase (PCR). Este último procedimento diagnóstico é recomendado como ferramenta para certificação e diagnóstico definitivo do WSSV. Outros diagnósticos baseados em sondas de DNA e microscopia eletrônica de transmissão são também considerados definitivos.

Lightner (1998; 2005) lista os diagnósticos baseados em sondas de DNA, anticorpos, bioensaios, e análises histológicas como diagnósticos confirmatórios da presença do WSSV.

A metodologia de diagnóstico PCR em tempo real tem sido aplicada na detecção do WSSV (DHAR *et al.*, 2001).

2.4. IHHNV e WSSV em populações silvestres

2.4.1. IHHNV em populações silvestres

O IHHNV tem ampla distribuição e afeta várias espécies de camarões penéideos.

Há registros de infecções naturais nas espécies *Penaeus stylirostris*, *P. vannamei*, *P. occidentalis*, *P. californiensis*, *P. monodon*, *P. semisulcatus*, *P. japonicus* e *P. chinensis*. O vírus é presumivelmente endêmico em populações selvagens do Indo-Pacífico (LIGHTNER, 1996).

Nas Américas, esse vírus tem sido detectado em populações selvagens de *L. vannamei* e *L. stylirostris* do Pacífico oriental, do Peru ao México. Apesar de sua detecção em camarão cultivado, nas populações nativas da costa Atlântica não havia sido detectado até 1997, quando foi diagnosticado por Pantoja *et al.* (1997) no Golfo da Califórnia.

Lightner (1996) reporta-se a infecções experimentais nas espécies *P. aztecus*, *P. setiferus* e *P. duorarum*. Para esse pesquisador, a infecção natural nessas espécies é provável.

Segundo dados publicados pelo Escritório de Epizootias (OIE, 2003), apesar da existência dos registros dessa infecção em populações de peneídeos silvestres, há pobreza de dados quanto à sua distribuição. Contudo, afirma este escritório, ter o IHHNV potencial de infectar várias espécies de peneídeos nos hemisférios ocidental e oriental. A infecção tem se disseminado significativamente desde a sua descoberta no início da década de oitenta.

2.4.2. WSSV em populações silvestres

A Síndrome da Mancha Branca (WSS) é descrita em uma ampla faixa de crustáceos cultivados e silvestres, marinhos e de água doce, entre camarões peneídeos e não peneídeos e caranguejos (LIGHTNER, 1996; LO *et al.*, 1996; HOSSAIN, 2001; KASORCHANDRA, 1998).

Hameed *et al.* (2001) referem-se a 43 espécies incluindo, camarões peneídeos e não peneídeos, caranguejos, copépodos e outros artrópodes suscetíveis à infecção natural ou experimental do WSSV.

O vírus infecta naturalmente os camarões peneídeos *Penaeus monodon*, *P. japonicus*, *P. chinensis*, *P. indicus*, *P. merguensis* e *P. setiferus* (Lightner, 1996). A infecção natural e experimental em camarões carídeos cultivados é relatada por Wang *et al.* (1997), Peng *et al.* (1998) e Hameed *et al.* (2001).

2.5. Introdução de espécies exóticas: risco de disseminação de enfermidades

A espécie *L. vannamei*, originária da costa sul-americana do Pacífico, é cultivada em todos os países produtores do mundo ocidental (MAPA, 2001). Essa espécie foi introduzida no Brasil na década de 80, mas só a partir de 1992 é que seus cultivos começaram

a se popularizar, sendo na atualidade praticamente exclusividade na carcinicultura brasileira (BORGHETTI *et al.*, 2003).

A degradação da qualidade da água, o surgimento e a disseminação de doenças virais afetam seriamente a produção de camarões. Esse fato tem se agravado com a intensificação dos sistemas de produção das fazendas. A descarga de efluentes que possam conter antibióticos ou patógenos se constitui em ameaça ao ambiente de entorno e ao futuro dos empreendimentos de carcinicultura, tornando-se sério obstáculo à produção de camarões marinhos cultivados em muitos países tropicais e subtropicais. A solução desse problema ecológico e sanitário ganha caráter de alta prioridade para esses países (LOTZ, 1997; LIGHTNER, 1998; HOROWITZ & HOROWITZ, 2001).

Briggs *et al.* (2004) ao documentar o movimento do *L. vannamei* como consequência de sua introdução em vários países produtores de camarão marinho cultivado no mundo, inclui o Brasil como país que se esforçou ativamente para introduzir essa espécie em seus cultivos, observando os códigos e práticas internacionais a esse respeito, considerando o potencial risco de introdução de enfermidades, tais como a Síndrome da Mancha Branca (WSS) e a Síndrome da Cabeça Amarela (YH). Esta última ainda sem registro no país (NUNES *et al.*, 2004).

Segundo Horowitz & Horowitz (2001), entre os vírus mais prevalentes na carcinicultura mundial estão o WSSV, o IHHNV, o TSV e o YHV. Os dois primeiros além de sua detecção em cultivos, já foram detectados em populações silvestres (LIGHTNER, 1996).

Muitos episódios de doenças ocorrem em conjunção com a introdução de espécies exóticas. A emergência da Síndrome de Taura, da Cabeça Amarela, Mancha Branca e da Infecção Hipodermal e Necrose Hematopoiética nas fazendas de camarão marinho cultivado está relacionada com esse fato (JAHNCKE *et al.*, 2001).

A potencial ameaça desses vírus aos cultivos de camarão marinho é conhecida, porém, pouco se sabe sobre os efeitos dessas viroses na populações silvestres (USDA, 1997).

O receio da introdução de espécies exóticas nos cultivos de um determinado país não está relacionado apenas ao risco de instalação e disseminação de enfermidades, mas que a espécie introduzida possa escapar e ocupar nichos ecológicos vazios, competir pelo mesmo nicho ecológico, deslocando as populações nativas, hibridizar-se com estas ou matá-las por meio de patógenos letais (vírus, por exemplo) aos quais seja suscetível (USDA, 1997; BRIGGS *et al.*, 2004).

Para Pérez (2003), apesar dos benefícios que possa gerar a introdução de uma espécie exótica, os governos e demais organizações envolvidas nessa questão deveriam apoiar o desenvolvimento de tecnologias que possam promover o cultivo de espécies nativas com potencial para a aquíicultura.

Ainda segundo USDA (1997) e Briggs *et al.* (2004), as vias de exposição das populações silvestres aos patógenos que possam estar presentes nos cultivos são o escape por ocasião das despescas, inundações, descarga de efluentes e sedimentos que possam chegar às áreas em volta das fazendas. O potencial dos impactos das enfermidades virais nas populações cultivadas e silvestres de camarões está relacionado ao fato dos estoques silvestres, em determinada fase do seu ciclo de vida, migrarem para as zonas estuarinas. Desta forma, ocorre uma aproximação entre essas populações, o que se configura em meio de exposição a enfermidades.

De acordo com Páez-Osuna (2001), dentre os impactos ambientais da carcinicultura estão as descargas de efluentes, o escape de estoques cultivados e a possível liberação e disseminação de doenças, cujos efeitos estão relacionados, respectivamente com deterioração da qualidade de água (depleção de oxigênio, turbidez, mudanças na macrofauna bentônica e eutrofização); poluição biológica das populações nativas; e, surtos de doenças infecciosas nas populações selvagens.

Esses efeitos, segundo o autor acima referido, podem ser mitigados através de medidas como a recirculação de água, adoção de policultivos e bacias de sedimentação aplicáveis ao tratamento dos efluentes; otimização do gerenciamento e a introdução de novas tecnologias voltadas para evitar o escape de camarões do cultivo. Quanto à disseminação de doenças, a manutenção da qualidade da água, o controle ambiental, uso de reprodutores e pós-larvas livres de determinados patógenos e uso de agentes profiláticos, como probióticos, são medidas que minimizam o problema.

A carcinicultura traz, em termos sócio-econômicos, benefícios ao complementar a produção pesqueira e criar oportunidades de emprego na zona rural. Todavia, a falta de um bom planejamento e gerenciamento por parte dos produtores somados à inexistência ou não aplicação de códigos de boas práticas e legislação pertinente resultam em declínio de produção e impactos observados em vários países. Todavia, quando bem praticado, este agronegócio, pode ser menos destrutivo ao ambiente que atividades como a agricultura intensiva, indústria ou turismo (BOYD, 2001; PÁEZ-OSUNA, 2001).