



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO ANIMAL**

**INVESTIGAÇÃO DO VÍRUS DA SÍNDROME DA MANCHA
BRANCA (WSSV) EM FAZENDAS DO ESTADO DO RIO
GRANDE DO NORTE**

LILIANE ELZI MEDEIROS DE SALES

**MOSSORÓ/RN-BRASIL
JULHO-2013**

LILIANE ELZI MEDEIROS DE SALES

**INVESTIGAÇÃO DO VÍRUS DA SÍNDROME DA MANCHA
BRANCA (WSSV) EM FAZENDAS DO ESTADO DO RIO
GRANDE DO NORTE**

Dissertação Apresentada à Universidade Federal
Rural do Semi-Árido – UFRPA, Campus de
Mossoró, como parte das exigências para a obtenção
do título de Mestre em Produção Animal.

Orientador: Prof. Dr. José Ticiano Arruda Ximenes de Lima
Co-orientadora: Profa. Dra Ioná Santos Araújo

MOSSORÓ-RN-BRASIL
JULHO-2013

**Ficha catalográfica preparada pelo setor de classificação e
catalogação da Biblioteca “Orlando Teixeira” da UFERSA**

S163i Sales, Liliane Elzi Medeiros de.
Investigação do vírus da síndrome da mancha branca
(WSSV) em fazendas do Estado do Rio Grande do Norte. /
Liliane Elzi Medeiros de Sales. -- Mossoró, 2013.

46f.: il.

Dissertação (Mestrado em Produção Animal) –
Universidade Federal Rural do Semi-Árido.
Orientador: Prof. Dr. José Ticiano Arruda Ximenes de
Lima.
Co-Orientadora: Prof. Dr. Ioná Santos Araújo.

1.*Litopenaeus vannamei*. 2.Vírus da mancha branca.
I.Título.

CDD: 639.5

Bibliotecária: Keina Cristina Santos Sousa e Silva
CRB 15 120

LILIANE ELZI MEDEIROS DE SALES

**INVESTIGAÇÃO DO VÍRUS DA SÍNDROME DA MANCHA
BRANCA (WSSV) EM FAZENDAS DO ESTADO DO RIO
GRANDE DO NORTE**

Dissertação Apresentada à Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA, Campus de Mossoró, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Produção Animal.

APROVADA EM ____/____/____

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. José Ticiano Arruda Ximenes de Lima (UFERSA)
Orientador

Prof. Dra. Ioná Santos Araújo (UFERSA)
Primeiro Membro

Prof. Dr. Jean Berg Alves da Silva (UFERSA)
Segundo Membro

A Tia Marlene por sempre acreditar nos meus projetos, pelo amor a mim sempre dado. E por ter sido um exemplo de mulher, guerreira que semeava o amor (*in memoriam*).

DEDICO

Não importa onde você parou;
em que momento da vida você
cansou; o importante é que é
possível e necessário,
recomeçar.

Paulo Roberto Gaefke



AGRADECIMENTOS

A Deus pelo Dom da vida, por ser a luz que me ilumina e por está presente em todos os momentos, concedendo-me pela sua infinita misericórdia mais uma vitória.

Aos meus pais: Luiz Umberto de Sales e Eliete Maria de Medeiros Sales pelo apoio, amor incondicional a mim. Sempre mostrando o valor da vida, me ensinando a ser uma pessoa digna. A vocês o meu muito obrigado, vocês são a razão do meu viver.

Ao meu irmão Nacle e todos meus familiares que de perto ou de longe me incentivam e mandam energias positivas sempre para que eu continue a caminhar e conquistar mais um obstáculo.

A minha tia Marlene Pereira de Medeiros Vieira (*in memoriam*) que partiu tão cedo para o Reino dos céus, deixando um lindo legado: que na vida devemos Amar; amar uns aos outros e conviver sempre em família e também com amigos.

A meu namorado Abraão Azevedo Lopes Segundo pela paciência, compreensão, amor, ajuda em todos os momentos. Você é o presente de Deus para mim.

Ao meu Orientador Professor José Ticiano Arruda Ximenes de Lima pelos ensinamentos e por ter me encaminhado para uma nova área a ser seguida na minha profissão.

A Professora Ioná Santos Araújo por ter aceitado ser minha Co-orientadora e assim contribuído enormemente para a realização desse trabalho. Por suas conversas sempre incentivadoras, me apoiando no trabalho e pessoalmente.

Ao Professor Jean Berg Alves da Silva por me acompanhar desde a graduação com seus ensinamentos e amizade. Sempre contribuindo para a construção de um trabalho melhor.

Ao Professor Paulo Eduardo Brandão por contribuir diretamente na conclusão desse trabalho de forma tão profissional e solidária.

A todos os colegas de mestrado, juntos dividimos as alegrias, aflições, vitórias, durante o período de mais um passo da nossa caminhada.

Aos colegas de laboratório Hailton, Leidiane, Carol, Anânkia, Manuella, Euriann, pelas conversas, ensinamentos, madrugadões. Com vocês o trabalho ficou mais prazeroso. Muito obrigado por tudo!

A amiga Luciana Verás, colega de mestrado, de profissão, amiga para toda hora que eu quero levar para toda vida.

As minhas amigas-irmãs Leíse Fernandes, Isadora Karolina, Ana Paula Rodrigues, pelas conversas, palavras de apoio, sei que com vocês posso sempre contar.

A CAPES pela ajuda financeira através da bolsa concedida durante o período do mestrado.

Agradecer a todos os Professores do curso de Pós-Graduação de Produção Animal pelos ensinamentos durante a realização e conclusão desse curso.

A UFERSA e todos que a ela compõem por fazer parte de uma importante parcela da minha vida, contribuindo na minha vida profissional e pessoal.

Aos donos de fazendas de camarão por conceder os camarões para a realização da pesquisa.

A todos que direta e indiretamente contribuíram para conclusão desse trabalho.

SUMÁRIO

	Páginas
1. REFERENCIAL TEÓRICO.....	14
1.1 AQUICULTURA.....	14
1.2 CARCINICULTURA MUNDIAL.....	14
1.3 CARCINICULTURA BRASILEIRA.....	14
1.4 CARCINICULTURA NO ESTADO DO RIO GRANDE DO NORTE	16
1.5 ANATOMIA E SISTEMA IMUNE.....	17
1.6 DOENÇAS EM CULTIVO DE CAMARÃO.....	18
1.7 VÍRUS DA SÍNDROME DA MANCHA BRANCA (WSSV).....	19
1.7.1 Distribuição geográfica.....	19
1.7.2 Etiologia.....	20
1.7.3 Proteínas Estruturais do WSSV.....	21
1.7.4 Mecanismo molecular da infecção do WSSV.....	21
1.7.5 Hospedeiros, vetores e transmissão.....	21
1.7.6 Sinais clínicos.....	22
1.7.7 Métodos de Diagnóstico do WSSV.....	22
1.7.8 Medidas de controle para o WSSV.....	23
1.8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	25
2. INVESTIGAÇÃO DO VÍRUS DA SÍNDROME DA MANCHA BRANCA (WSSV) EM FAZENDAS DO ESTADO DO RIO GRANDE DO NORTE	32
RESUMO.....	33
INTRODUÇÃO.....	33

MATERIAIS E MÉTODOS	35
Coleta de Amostras.....	35
Amostra Biológica.....	37
Extração DNA Genômico.....	37
Nested-PCR.....	38
Eletroforese em Gel de Agarose.....	38
Sequenciamento.....	39
RESULTADOS	39
Nested-PCR.....	39
Sequenciamento.....	40
DISCUSSÃO	41
CONCLUSÃO	43
REFERÊNCIAS	43

..

INVESTIGAÇÃO DO VÍRUS DA SÍNDROME DA MANCHA BRANCA (WSSV) EM FAZENDAS DO ESTADO DO RIO GRANDE DO NORTE

SALES, Liliane Elzi Medeiros. **Investigação do Vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV) em Fazendas do Estado do Rio Grande do Norte. 2013.** 47f. Dissertação. (Mestrado em Produção Animal: Zootecnia e Recursos Pesqueiros)- Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró- RN, 2013.

RESUMO: O Vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV) é um patógeno de camarão marinho que já devastou fazendas de camarão em todo o mundo. Atualmente no estado do Rio Grande do Norte não se sabe a situação atual do WSSV, devido à ausência de estudos comprovando ou não a presença desse patógeno no estado. A Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) recomenda para o diagnóstico confirmatório do WSSV a reação em cadeia da polimerase em dois passos (PCR-nested), seguindo a metodologia e a sequência de primers descritos por Lo et al (1996). Essa técnica consiste na utilização do produto do primeiro passo como molde para o segundo passo da nested-PCR, aumentando a sensibilidade do teste, detectando partículas virais em pequenas quantidades também em indivíduos assintomáticos. O objetivo deste trabalho foi investigar a ocorrência do Vírus da Síndrome da Mancha Branca, a partir do diagnóstico molecular (nested-PCR), em fazendas do estado do Rio Grande do Norte. Foram amostrados 150 camarões da espécie *Litopenaeus vannamei* por fazenda de forma aleatória durante o período de outubro a dezembro de 2012, totalizando 900 animais durante o estudo. Dos animais amostrados nenhum apresentava sinais clínicos da doença da mancha branca, no entanto, entre as fazendas analisadas duas registraram positividade para a presença do WSSV por PCR-nested. Este estudo identificou a ocorrência de focos do WSSV em fazendas dos polos norte e sul da carcinicultura do estado do RN. Faz-se necessário intensificar o monitoramento preventivo do WSSV em camarões com uso da PCR em dois passos devido à presença do referido vírus em animais assintomáticos.

Palavras chave: *Litopenaeus vannamei*, Brasil, vírus da mancha branca.

INVESTIGATION OF THE WHITE SPOT SYNDROME VIRUS (WSSV) IN FARMS OF THE STATE OF RIO GRANDE DO NORTE

SALES, Liliane Elzi Medeiros. **Investigation of the White Spot Syndrome Virus (WSSV) in Farms of The State of Rio Grande do Norte. 2013.** 47f. Dissertation (Master's degree in Animal Production: Animal Husbandry and Fisheries) - Federal Rural University of Semi-Arid (UFERSA), Mossoró-RN, 2013.

ABSTRACT: The Virus of White Spot Syndrome (WSSV) is a pathogen of marine shrimp that has already devastated shrimp farms worldwide. Currently in the state of Rio Grande do Norte do not know the current status of the WSSV, because of the absence of studies showing the presence or absence of these pathogens in state. The World Organization for Animal Health (OIE) recommends for the confirmatory diagnosis of WSSV polymerase chain reaction in two steps (nested-PCR), following the methodology and sequence of primers described by Lo et al (1996). This technique consists in using the product of the first step as a template for the second step of the nested-PCR, increasing the test sensitivity, detecting viral particles in small amounts also in asymptomatic individuals. The aim of this study was to investigate the occurrence of the virus White Spot Syndrome, from the molecular diagnosis (nested-PCR) in farms of Rio Grande do Norte. We sampled 150 species *Litopenaeus vannamei* shrimp farm by randomly during the period October to December 2012, totaling 900 animals during the study. Animals sampled showed no clinical signs of white spot disease, however, between the two farms analyzed reported positive for the presence of WSSV by nested-PCR. This study identified the occurrence of outbreaks of WSSV in farms of north and south poles of shrimp farming in the state of RN. It is necessary to intensify the preventive monitoring of WSSV in shrimps with PCR in two steps because of the presence of this virus in asymptomatic animals.

Key words: *Litopenaeus vannamei*, Brazil, white spot virus.

LISTA DE FIGURA

Capítulo I	Página
Figura 1: <i>Litopenaeus vannamei</i> com informações da anatomia externa	17
Capítulo II	
Figura 1: Regiões de coletas das amostras de camarão no RN	36
Figura 2: Gel de agarose (1%) dos produtos amplificados por PCR das fazendas analisadas.	40
Figura 3: Gel de agarose (1%) dos produtos amplificados por PCR das fazendas do Polo Norte	40
Figura 4: Gel de agarose(1%) dos produtos amplificados por PCR das fazendas do Polo Sul	40

1. REFERÊNCIAL TEÓRICO

1.1 AQUICULTURA

A aquicultura é uma atividade relacionada à produção de organismos aquáticos, dentre os setores produtores de alimento, é a que apresenta maior crescimento econômico. É um setor que está em ascensão, entre os anos de 1999 a 2010 praticamente dobrou a produção, ocorrendo um aumento de (99,33%), enquanto o pescado de origem extrativa mostrou tendência a declínio (-3,47%) de acordo com a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura – FAO (2012). É esperado que a aquicultura forneça mais de 50% do pescado para a alimentação humana consumida no ano de 2012 (FAO, 2010).

O continente asiático se destaca de forma quase absoluta na produção mundial de pescado via aquicultura, que inclui em proporção apreciável peixes, plantas aquáticas, moluscos e crustáceos. A China é o maior produtor nesse segmento da aquicultura, cuja participação foi de 60,59% (47, 829,610t) na produção mundial no ano de 2010, seguido da Indonésia, Índia, Vietnã como os quatro maiores produtores na esfera mundial (FAO, 2012).

1.2 CARCINICULTURA MUNDIAL

Na aquicultura existem vários segmentos e um deles é a carcinicultura, que é caracterizada pelo cultivo de camarão, sendo um ramo que produz competitividade no mercado econômico. No plano social a carcinicultura é um segmento que gera emprego direto e indireto, sendo uma ferramenta eficaz no combate a pobreza rural refletindo a importância econômica dessa atividade para muitos países (SUBASINGHE, 2005; MAGALHÃES, 2007).

No cultivo de camarão, a Ásia representada pela China, Tailândia, Vietnã e Indonésia, participam quase que de forma hegemônica da produção setorial, enquanto Equador, México e Brasil se destacam pelo lado do Continente Americano (FAO, 2012).

1.3 CARCINICULTURA BRASILEIRA

De acordo com a Associação Brasileira de Criadores de Camarões (2005), a carcinicultura no Brasil teve início na década de 70, com estudos realizados em espécies de camarões pertencentes à família Penaeidae. A espécie que se saiu melhor nesses testes foi *Litopenaeus vannamei*, mas como era uma espécie exótica não podia haver a captura de reprodutores na natureza, dificultando o seu cultivo. Em seguida optou-se pelo cultivo de outra espécie denominada *Penaeus japonicus* não tendo êxito devido a não adaptação dessa espécie para o cultivo. Ao final da década de 80 inícios dos anos 90, a criação de camarão

consolidou-se no Brasil, através da reintrodução do camarão branco do Pacífico, *L. vannamei* espécie que havia apresentado grande sucesso no Equador. Uma nova fase da carcinicultura iniciava-se com o cultivo dessa espécie e com o domínio das técnicas de larvicultura e reprodução.

O *L. vannamei* é proveniente da Costa Leste do Pacífico, desde o extremo Norte do Golfo da Califórnia até Tumbes no México (BARBIERI JUNIOR; OSTRENSKY NETO, 2001). Essa espécie apresenta várias vantagens que explica o aumento da preferência para o cultivo. A introdução e utilização dessa espécie no cultivo de camarão levaram a um crescimento expressivo dessa atividade no território brasileiro que chamou a atenção da concorrência mundial, e muitos especialistas apontaram este país como provável detentor de futura hegemonia, principalmente pelas suas potencialidades naturais que possibilitavam o crescimento dessa atividade (ABCC, 2005).

O cultivo de camarão no Brasil cresceu de forma consistente de 1997 até 2003, onde a área cultivada teve um aumento de 317% e um incremento na produtividade de 499%, o que indicava o intenso processo tecnológico a que a atividade foi submetida. Em 1998 o Brasil produziu 7.250 toneladas; no ano de 1999 a produção teve um crescimento superior a 100%, produzindo 15.000 toneladas. Esse crescimento da produção foi acentuado até 2003 chegando ao montante de 90.180 toneladas. (ROCHA E RODRIGUES, 2004; ROCHA, 2007).

Porém em 2004 a produção caiu para 76.000 toneladas e de 2005 até 2007 manteve-se em torno de 65.000 toneladas por ano (ROCHA, 2007). De acordo com o Censo da Carcinicultura Nacional em 2011 realizado pela ABCC, em sete anos entre 2004 e 2011 houve crescimento expressivo em número de produtores e apenas moderado em área total de cultivo e que o setor mostra uma regressão em termos de produção que reflete os efeitos de uma crise que desde meados de 2003 a 2009 afetou o desempenho da atividade (ROCHA et al., 2013).

De acordo com Rocha et al (2013) a produção de 2011 ficou na ordem de 69.571 toneladas. Essa baixa na produção ocorreu devida principalmente ao aparecimento de algumas doenças que são potencialmente prejudiciais a carcinicultura, provocando grandes perdas econômicas (MARTINS, 2003). Durante o período de 2011 o número de fazendas de cultivo no Brasil ficou na ordem de 1.544 com uma produtividade anual por hectare de 3,51 toneladas. Outra dado importante em relação à produção de 2011 foi a produção por área (Hectare) que foi de 19.847 toneladas. Apesar da baixa produção esses dados refletem a persistência e sobrevivência do setor conseguindo contornar a crise que o afetou com

grande intensidade e por um bom período de tempo. Demonstrando a importância dessa atividade para a economia do país, levando renda para diversas famílias que trabalham com a carcinicultura (ROCHA, et al., 2013).

1.4 CARCINICULTURA NO ESTADO DO RIO GRANDE DO NORTE

No Rio Grande do Norte a produção de camarão teve início na década de 70 com a implantação do Projeto Camarão que foi uma iniciativa do governo do estado para incentivar essa atividade. Contudo, a falta de investimentos tecnológicos e inaptidão da espécie cultivada *Penaeus japonicus*, culminou com pouco desenvolvimento da carcinicultura. A partir dos anos 90 com o cultivo do *Litopenaeus vannamei* a carcinicultura despontou no estado, passando a ser uma atividade rentável e promissora (ABCC, 2011). Essa atividade apresenta-se como uma das alternativas econômicas para interiorizar ações desenvolvimentistas e diversificar a produção tradicional nas comunidades rurais (ROCHA, 2012).

O Rio Grande do Norte possui uma faixa litorânea de 410 km com excepcionais características edafoclimáticas altamente favoráveis e atrativas para o desenvolvimento do cultivo de camarão. O estado possui posição de destaque, sendo considerado o segundo maior produtor de camarão no Brasil, ficando atrás apenas do Ceará. Apesar de ocupar esse ponto de destaque na produção brasileira, a carcinicultura do estado tem enfrentado restrições para o desenvolvimento, tais como: obtenção de licenças, restrições de mercado, insuficiência de pacotes tecnológicos e controle das doenças que acometem o camarão (BORGHETTI et al., 2003; SIDONIO et al., 2012).

Em dados comparativos entre os censos de 2003, 2004 e 2011 mostra um declínio na produção de camarão no estado. Em 2003 a produção de camarão foi de 37.473 toneladas, já em 2004 a produção foi de 30.807 toneladas. Ocorrendo um maior declínio em 2011 com a produção de 17.742 toneladas (ROCHA et al., 2013). Diante desse quadro, é importante que se tenha incentivos para o retorno do crescimento da carcinicultura, visto a importância que essa atividade tem no estado do RN na qual promove a inclusão e a distribuição da riqueza no campo, gerando empregos para trabalhadores rurais de baixa qualificação profissional (ROCHA et al., 2013).

Entretanto, para que o crescimento do camarão seja contínuo e ascendente, algumas providências têm sido tomadas, mediante a importância dessa atividade no estado tanto na área econômica, social e ambiental. As ações e projetos que concerne esse crescimento são: disponibilização de linhas de crédito para investimentos e custeio; selo de qualidade

para o camarão cultivado; elaboração do produto com agregação de valor ao camarão cultivado; ênfase aos programas de sustentabilidade ambiental e compromisso social; maior apoio aos programas de ciência e tecnologias, especialmente na genética, nutrição e biossegurança e marketing, promoção e abertura de novos mercados (BORGHETTI et al., 2003; SIDONIO et al., 2012; ROCHA et al, 2013).

1.5 ANATOMIA E SISTEMA IMUNE

A espécie estudada nesse trabalho foi o *Litopenaeus vannamei*, conhecido como camarão branco do Pacífico. É um crustáceo decápode que pertence à família Penaeidae. Atualmente é a espécie predominantemente cultivada no estado do RN. O corpo do camarão é dividido em cefalotórax e abdome. No cefalotórax encontram-se os principais órgãos funcionais e apêndices utilizados no processo de alimentação e locomoção, sendo os do abdomen adaptado para nado (figura 1) (BARBIERI JUNIOR; OSTRENSKY NETO, 2001).

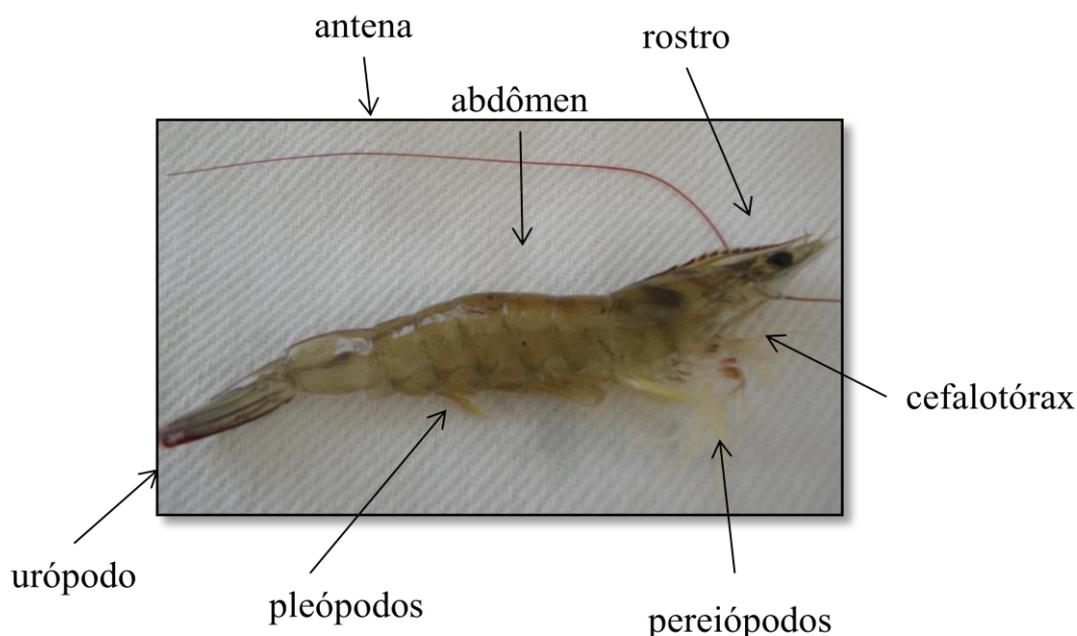


Figura 1: *Litopenaeus vannamei* com informações da anatomia externa

Os camarões possuem um sistema imune inato. Esse sistema é baseado em componentes celulares e humorais do sistema circulatório, os quais interagem para detectar e eliminar microrganismos e parasitas estranhos potencialmente perigosos. Diferente dos vertebrados os camarões não possuem um sistema adaptativo, inviabilizando as tentativas de desenvolvimento de vacinas, pois estes organismos não possuem células de memória

que chamamos de linhagem celular linfocítica presente apenas nos vertebrados (BACHERE, 2000; BARRACO et al., 2007).

A primeira linha de defesa desses animais é conferida por uma carapaça externa rígida ou exoesqueleto, que funciona como uma barreira físico-química protetora. Ao passar por essa barreira o patógeno/microrganismo encontra o primeiro exército do sistema imune dos camarões que são os hemócitos e proteínas plasmáticas (BARRACO et al., 2007). Várias proteínas envolvidas no reconhecimento de microrganismos já foram identificadas, aprimorando o conhecimento da interação patógeno-hospedeiro (BACHERE, 2000). Vários genes envolvidos na atividade antimicrobiana foram clonados e caracterizados. Esse progresso no conhecimento da resposta imune do camarão tem ajudado para entender a interação que os patógenos realizam em uma infecção e mais estudos devem ser realizados com objetivos de entender a respostas antivirais dos camarões (BUSTILLO-RUIZ et al., 2009).

1.6 DOENÇAS EM CULTIVOS DE CAMARÃO

Uma grande ameaça ao desenvolvimento da carcinicultura está representada pelas doenças, responsáveis pelos maiores prejuízos registrados no setor (PAEZ-OSUNA, 2001). As doenças que acometem os camarões de cultivo podem ser de etiologias infecciosas e não infecciosas. As doenças infecciosas são as de maior importância econômica para o cultivo de camarão, pois dependendo da origem, causam mortalidade elevada e podem ser provocadas por vírus, bactérias (incluindo rickettsias), fungos e parasitas. Entre as doenças não infecciosas inclui os impactos ambientais, desequilíbrios nutricionais, agentes tóxicos e fatores genéticos (LIGHTNER; REDMAN, 1998; MORALLES; CUÉLLAR-ANJEL, 2008).

Embora o cultivo de camarão seja atingido por muitos patógenos, os mais sérios em relação a perdas econômicas são causados por patógenos virais. Mais de 20 vírus tem sido descritos por infectar camarões marinhos. Seis patógenos virais de camarões marinhos estão listados pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) e são de notificação obrigatória são eles: Síndrome do Vírus da Mancha Branca (WSSV), Vírus da cabeça Amarela (YHV), Vírus da Síndrome de Taura (TSV), Vírus da Mionecrose Infecciosa (IMNV), Baculovírus do penadeae Monodon (MBV) e Vírus da Necrose Hematopoiética e Necrose Infecciosa (IHHNV), (OIE, 2009).

As doenças ocasionadas por patógenos virais já provocaram perdas consideráveis de produção, em diversos países. Há registros da ocorrência dos vírus IHHNV, TSV e

IMNV nos cultivos do Brasil (MARTINS, 2003; OLIVEIRA NETO, 2006; PINHEIRO, 2007) e WSSV no Nordeste do Brasil e no estado de Santa Catarina (SEIFFERT et al 2005; CAVALLI et al, 2010).

Entre as doenças virais que já foram registradas no Brasil a WSD (White spot Disease) foi a que provocou uma diminuição súbita das atividades quando foi registrada em Santa Catarina (MELLO; FARIAS, 2007). Essa doença vem devastando as fazendas de camarão em todo o mundo (LOTZ; SOTO, 2002). De acordo com Lightner (2012), é o principal patógeno de camarão, afetando o cultivo em ambos os hemisférios Oriental e Ocidental.

1.7 VÍRUS DA SÍNDROME DA MANCHA BRANCA (WSSV)

1.7.1 Distribuição geográfica

A WSD começou a causar mortalidades nos cultivos de camarões no ano de 1992, no continente Asiático (CHOU et al., 1995; Lo et al., 1996a). A partir daí o vírus disseminou rapidamente, provocando elevadas perdas econômicas na carcinicultura, afetando países como o Japão, Coréia, Índia, Tailândia, Malásia, entre outros países asiáticos (Lo et al., 1999). Em um curto período de tempo essa doença diminuiu drasticamente a produção de camarão. Nas Américas esse vírus foi registrado primeiramente nos Estados Unidos no ano de 1995 na Carolina do Sul, no Texas e em Lagostas do Zoológico Nacional em Washington (LIGHTNER, 1997; NUNAN et al, 1998). Em 1999, essa doença foi diagnosticada em países da América Central e do Sul. Durante esse ano, principalmente no México, a mortalidade foi relativamente baixa entre 2 a 10%. A partir dos anos seguintes as perdas econômicas foram drásticas, afetando cerca de 6 mil hectares da produção não sendo observado durante esse período manchas brancas na cutícula do camarão (GALAVIZ-SILVA et al, 2004).

No Brasil a primeira ocorrência do vírus da mancha branca em fazendas de cultivo de camarão foi em Novembro de 2004, no estado de Santa Catarina região Sul do país, sendo notificado pela OIE em 20 de janeiro de 2005. As taxas de mortalidade nos cultivos de camarões chegaram a 90%, causando perdas econômicas de mais de três bilhões de dólares. Por um período foram observadas mortalidades na maioria das fazendas, as quais não conseguiam retomar a produção sem novas perdas. Em 2005 o vírus foi relatado em fazendas do Ceará (SEIFFERT et al, 2005; CAVALLI et al, 2008), e em 2008 foi

identificado o WSSV em fazendas do estado da Bahia ambos os estados na região Nordeste do Brasil (TRINDADE et al., 2008).

Em relação a esses surtos notificados no Brasil, não se sabe ao certo como ocorreu à dispersão do vírus. A hipótese da entrada do WSSV no Brasil através da movimentação de reprodutores e pós-larvas é a mais forte sendo essa hipótese respaldada por ser considerado o mais rápido e efetivo meio de introdução do WSSV em países da Ásia e Américas (SEIFFERT et al, 2005).

Esse vírus tem causado pandemias, provocando impactos sociais e econômicos profundos em países que o cultivo de camarão constitui uma indústria significativa (LIGHTNER, 2012).

1.7.2 Etiologia

O WSSV foi inicialmente classificado como membro da família Baculoviridae devido às semelhanças morfológicas e lesões histológicas ocasionadas por esse vírus (Lo et al., 1996). No entanto, após completa sequência genômica e análise filogenética esses estudos revelaram que o WSSV e o baculovírus não estão intimamente relacionados (VAN HULTEN et al., 2001). Desde então, esse vírus foi classificado, de acordo com o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) como o único membro do gênero *Whispovirus* da família *Nimaviridae* (SANCHEZ-PAZ, 2010). Esse vírus apresenta uma forma elíptica ou ovoide, com um nucleocapsídeo na forma cilíndrica com uma estreita parede de capsídeo e cercada por um envelope trilaminar com dimensões entre 120-150nm de diâmetro e 270-290nm de comprimento (DURAND et al., 1997; VAN HULTEN et al., 2001; HIPOLITO et al., 2012). Outra característica morfológica é a presença de uma extensão em forma de filamento na extremidade viral (MORALLES; CUÉLLAR-ANJEL, 2008).

O genoma desse vírus consiste em uma molécula de DNA dupla fita, circular de grande tamanho e com envelope. O tamanho do genoma depende da cepa isolada, tendo em torno de 300pb (VAN HULTEN et al., 2001). A sequência completa do seu genoma foi determinada para três isolados distintos da China, Tailândia e Taiwan respectivamente (CHEN et al., 2002; VAN HULTEN et al., 2001; YANG et al., 2001). O genoma dos três isolados sequenciados do WSSV mostra diferenças em tamanho. Porém, há uma variação genética muito pequena, com uma identidade genética entre pares de nucleotídeos entre os três isolados, sugerindo que eles, provavelmente, evoluíram de um ancestral comum, e estão intimamente relacionados (MARKS et al., 2004).

Muller et al. (2010), compararam o genoma de dois isolados brasileiros, provenientes de Santa Catarina e Bahia e constataram que os isolados são diferentes em relação a três marcadores genéticos. Uma possível explicação para essa diferença encontrada entre os dois isolados é a ocorrência de mutações genômicas resultantes da adaptação do vírus a diferentes condições ambientais (WAIKHOM et al., 2006).

1.7.3 Proteínas Estruturais do WSSV

O WSSV possui genes que codificam proteínas estruturais e não estruturais. As proteínas estruturais formam o capsídeo e as não estruturais estão relacionadas com enzimas envolvidas no metabolismo de nucleotídeos e replicação viral (LI et al., 2007). Essas proteínas foram denominadas de VP (Proteína viral) acompanhadas com o peso molecular estimados das bandas de proteínas em SDS-PAGE (dodecil sulfato de sódio em gel de poliacrilamida e eletroforese) ou pelo número de aminoácidos. Mais de 50 proteínas estruturais e uma proteína não estrutural têm sido detectadas nesse vírus (LI et al., 2006). Elas são as primeiras moléculas que interagem com as células do hospedeiro, sendo alvos importantes para estudos do mecanismo de defesa celular (TSAI et al., 2006).

1.7.4 Mecanismo molecular da infecção do WSSV

O mecanismo de entrada do WSSV na célula hospedeira é pouco conhecido. Estudos tem revelado que para a neutralização viral devem-se abordar as proteínas do envelope viral (LI et al., 2007).

Inicialmente ocorre uma interação entre moléculas da superfície celular do hospedeiro que funcionam com receptores virais. A infecção se inicia quando o vírus se une a uma molécula da célula do hospedeiro. Um recente estudo descreve que a molécula integrina da superfície celular está envolvida na infecção do WSSV, a qual pode servir como receptores virais (LI et al., 2007). Algumas proteínas da envoltura viral têm motivos RDG (arginina-glicina-ácido aspártico) que podem mediar à adesão do vírus a integrina celular e então, entrar na célula (RUIZ, 2009). O tripeptídeo RGD tem função de reconhecimento celular e infectividade em grande variedade de patógenos (LI et al., 2006). Algumas proteínas do WSSV contêm motivos RGD, sugerindo que a infecção por WSSV pode ser mediada pela adesão dos RGD das proteínas estruturais nas células alvo (HUAN et al., 2002; TSAI et al., 2004).

1.7.5 Hospedeiros, vetores e transmissão

O WSSV pode infectar diferentes espécies de crustáceos não estando presente apenas em camarão, mas também ocorre em outros crustáceos de água doce e marinho incluindo caranguejos e lagostas (LO et al., 1996; OIE, 2012), copépodos (ZHANG et al.,

2007) e siris (CHANG et al., 2001). O vírus também foi detectado em amostras de solo dos viveiros de cultivo, mesmo após 10 meses de estocagem (NATIVIDAD et al., 2008).

Outros artrópodes não crustáceos, como insetos e outros animais podem acumular altas concentrações de partículas virais viáveis, apesar de não existirem ainda evidências da replicação do WSSV nestes organismos (LO et al., 1996; ZHANG et al., 2007).

A infecção pela Síndrome do Vírus da Mancha Branca pode ocorrer através de duas vias: horizontal e vertical (NATIVIDAD et al., 2008; OIE, 2012; SANCHEZ-PAZ, 2010). A via horizontal ocorre pelo contato direto com a água, solo infectado ou indiretamente através da ingestão de organismos infectados que podem apresentar aparência saudável. De acordo com Soto et al (2001) a ingestão parece ser o mais efetivo meio de transmissão em camarões. Na via vertical o vírus é transmitido a partir do progenitor infectado para a progênie. Estudos em relação à transmissão do vírus têm demonstrado que a migração de insetos aquáticos e outros animais, a atividade humana, o transporte de pós-larvas e adultos infectados, a importação de produtos congelados infectados e subprodutos contaminados são fontes potenciais de transmissão do vírus podem funcionar como transmissores, promovendo a dispersão do vírus (LIGHTNER et al., 1997; SUPAMATTAYA et al., 1998).

1.7.6 Sinais Clínicos

O WSSV compromete preferencialmente os tecidos de origem embrionária ectodérmica e mesodérmica (WONGTEERASUPAYA et al., 1995; FLEGEL, 2006). O camarão infectado pode desenvolver manchas brancas, variando de 0,5-2,0 mm de diâmetro na cutícula do cefalotórax ou carapaça (LIGHTNER, 1996). Os animais podem apresentar também letargia, anorexia (DURAND et al., 1997; WANG et al., 2002; RAJENDRAN et al., 2004) em alguns casos podendo apresentar coloração rosa avermelhada para marrom avermelhado (MORALLES; CUÉLLAR-ANJEL, 2008).

Entretanto, os sinais clínicos e as lesões macroscópicas podem variar, não sendo suficiente para o diagnóstico da WSD (AQUAVETPLAN, 2005). Outras condições podem produzir estas manchas, como bactérias e alta alcalinidade da água de cultivo (WANG et al., 2002).

O WSSV também pode apresentar a forma assintomática. De acordo com Waikhom (2006) esse fato pode ocorrer devido à passagem do vírus por diferentes hospedeiros, induzindo a uma alteração genômica, podendo alterar a virulência. Outro motivo pelo qual o vírus não produz sintomas pode ser devido a não ocorrência de condições estressante no cultivo, pois segundo Lo et al (2005) o WSSV replica em condições de estresse.

Quando no aparecimento dos sinais clínicos no período de 3-10 dias é relatada alta mortalidade, podendo chegar a 100% (NAKANO et al., 1994;WANG et AL, 2002).

1.7.7 Métodos de Diagnóstico do WSSV

Os métodos de detecção utilizados para o diagnóstico do WSSV incluem a identificação macroscópica de pontos cuticulares brancos, observações histopatológicas e métodos moleculares (LIGHTNER e REDMAN, 1998). Os métodos de detecção para o WSSV são utilizados para dois propósitos: confirmação da infecção dos animais e certificação e monitoramento do estado de saúde em reprodutores, pós-larvas utilizadas na larvicultura e viveiros de cultivo (OIE, 2012).

Um método recomendado pela OIE (2012) para o diagnóstico do vírus da mancha branca é a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Esse método possui alta sensibilidade e especificidade podendo ser qualitativo ou quantitativo. A técnica de PCR é baseada no uso da DNA polimerase para copiar um molde de DNA, isso ocorre em ciclos repetidos de replicação. A DNA polimerase é guiada por pequenos oligonucleotídeos iniciadores (primers), que são hibridizados ao DNA-molde no início e no final da sequência. Cada ciclo envolve três passos: desnaturação, anelamento e extensão (DEGEN et al., 2006). Na PCR pequenas quantidades de DNA em geral não-detectáveis podem ser amplificadas, produzindo quantidades detectáveis da sequência alvo do patógeno (LIGHTNER e REDMAN, 1998).

A nested-PCR (PCR em dois passos) é o método utilizado por Lo et al (1996b) e recomendado para a detecção do vírus em populações sintomáticas e assintomáticas. A nested -PCR consiste na utilização de dois passos, para isso utiliza o produto do primeiro passo como molde para a amplificação no segundo passo (Lo et al., 1996b; OIE, 2012). Os primers utilizados são específicos e diferentes, sendo utilizado um par de primers no primeiro passo, chamado de primers externos e um par de primers no segundo passo, chamado de primers internos. (Lo et al 1996b). Essa técnica é altamente sensível para a detecção do WSSV, permitindo que o vírus possa ser detectado mesmo quando presente em pequenas quantidades, em animais assintomáticos ou hospedeiros (LU, WANG e LOTZ, 2004). O primeiro passo quando positivo implica na existência de uma infecção aguda, e na positividade do segundo passo implica em uma infecção latente, sem presença dos sinais clínicos (OIE, 2012).

1.7.8 Medidas de Controle para o WSSV

Não existe tratamento adequado disponível para o WSSV. Por isso o esforço de impedir a entrada do vírus e o controle dele deve ser intenso. Pois o tratamento ainda não

foi elucidado. A aplicação de medidas de biossegurança tem sido recomendada para reduzir o risco do WSSV em cultivos de camarões. Para que seja realizado o controle do cultivo deve-se ter o conhecimento do estado de saúde do camarão, baseando-se em inspeções, seguidas de diagnóstico laboratorial conduzido de acordo com as normas estabelecidas pela OIE (LIGHTNER E PANTOJA, 2001). De acordo com Lightner (2005), esses esforços devem estar relacionados com a exclusão do vírus de laboratórios e fazendas, tratamento de água antes do cultivo e troca zero de água, medidas de higiene de trabalhadores, uso de alimentos de qualidade e manutenção de vigilância constante da sanidade animal, através de diagnósticos laboratoriais.

A prevenção contra o WSSV é de fundamental importância para a sustentabilidade da carcinicultura. O controle da sanidade animal depende em grande parte da adoção de procedimentos para diagnosticar o estado de saúde dos camarões cultivados. Essa medida é necessária visando detectar precocemente problemas de cultivo, permitindo que ações sejam tomadas rapidamente para controlar, minimizar ou excluir os efeitos negativos de condições desfavoráveis sobre a produção de camarão, reduzindo os prejuízos financeiros (LENOCH, 2004).

No Brasil o trânsito de pós-larvas, camarão juvenil e adulto é intenso elevando o risco de contaminação entre os estados livres de certas doenças de crustáceos. O risco de contaminação e proliferação pode ser amenizado através de vigilância por meio de diagnósticos presuntivos e confirmatórios das doenças. Atualmente, não se sabe a situação do WSSV no estado do RN devido à ausência de diagnóstico confirmatórios comprovando ou não a presença desse patógeno no estado. Diante dessa realidade, na busca de contribuir para o conhecimento do estado de sanidade dos camarões cultivados no RN em relação ao WSSV, o objetivo deste trabalho foi investigar a ocorrência do Vírus da Síndrome da Mancha Branca, a partir do diagnóstico molecular (nested-PCR), em fazendas do estado do Rio Grande do Norte para a obtenção de informações para avaliar o estado de saúde dos camarões, contribuindo para a adoção de medidas de controle e prevenção da Doença da Mancha Branca.

1.8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AQUAVETPLAN – Australian Aquatic Veterinary Emergency Plan. **Disease Strategy White spot disease**, 2005.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE CAMARÃO (ABCC). **Carcinicultura volta a crescer no Rio Grande do Norte**, 2011. Disponível em: <<http://www.revistanordeste.com.br/noticias/rio+grande+do+norte/carcinicultura+volta+a+crescer+no+g+norte-651>> Acessado em: 03 de mar. 2012.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE CAMARÃO (ABCC). **História da Carcinicultura no Brasil**, 2005. Disponível em: <<http://www.abbcam.com.br>> Acesso em: 10 de mar. 2012.

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

BARRACO, M.A. et al. **Imunologia de crustáceos com ênfase em camarões**. **Universidade Federal de Santa Catarina**, 2007.

BORGHETTI, N.R.B. et al. **AQUICULTURA: uma visão geral sobre a produção de organismos aquáticos no Brasil e no mundo**. Curitiba: Grupo Integrado de Aquicultura e Estudos Ambientais, 128p, 2003.

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

BUSTILLO-RUIZ, M. I. et al. Revisión de patogénesis y estrategias moleculares contra el vírus del síndrome de la mancha blanca en camarones peneidos. **Revista de Biología Marina y Oceanografía** v.44, p. 1-11, abril de 2009.

CAVALLI, L.S. et al. Evaluation of White Spot Syndrome (WSSV) in wild shrimp after a major outbreak in shrimp farms at Laguna, Southern Brazil. **Atlântica**, v. 30(1), p.45-52, 2008.

CAVALLI, L.S et al. White spot syndrome virus in wild penaeid shrimp caught in coastal and offshore Waters in the Southern Atlantic Ocean. **Journal Fisheries Diseases**, v. 33, p.533-536, 2010.

CHANG, Y.S., et al. Sequencing and amplified restriction fragment length polymorphism analysis of ribonucleotide reductase large subunit gene of the white spot syndrome virus in blue crab (*Callinectes sapidus*) from American Coastal Waters. **Marine Biotechnology**, v. 3 p. 163-171, 2001.

CHEN, L.L. et al. Transcriptional analysis of the DNA polymerase gene of shrimp white spot syndrome virus. **Virology**, v. 301, p.136-147, 2002.

CHOU, H.Y. et al. Patogenicity of baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. **Disease Aquatic Organisms**, v23, p.165-173, 1995.

CLAYDON, K. et al. OIE white spot syndrome virus PCR gives false-positive results in *Cherax quadricarinatus*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.62, p. 265-268, 2004.

DEGEN, H.J. et al. **PCR Applications Manual**. Ed. Germany: Roche Diagnostics GMBH, 3^aed. 338p, 2006.

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

FAO. Evolução da Produção Mundial de Pescado: Captura x Aquicultura (1999-2010). Disponível em:<http://WWW.fao.org> Acesso em: 18 de Dez. 2012.

FAO. The state of world fisheries and aquaculture. FAO Fisheries and Aquaculture Department. Rome, 2010. ISBN 978-92-5-106665-1. Disponível em: <http://www.fao.org> Acesso em:30 jan. 2012

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

GALAVIZ-SILVA L. et al. White spot syndrome virus genetic variants detected in Mexico by a new multiplex PCR method. **Aquaculture** v.242, p.53–68, 2004.

HIPOLITO, M. et al. Detection of white spot syndrome virus in Brazil using negative staining, Immunoelectron microscopy and Immunocytochemistry techniques. **Internacional journal of Morphology**, v.30, p.761-768, 2012.

HUANG, C. et al. Characterization of a novel envelope protein (VP281) of shrimp white spot syndrome virus by mass spectrometry. **Journal of General Virology**, v. 83, p. 2385-2392, 2002.

LENOCH, R. Avaliação do risco epidemiológico da carcinicultura catarinense usando como modelo a síndrome de taura e a doença da mancha branca. **Dissertação de(mestrado em Ciência e tecnologia Ambiental)**, UNIVALI, Itajai/SC, 2004.

Li, L.J et al. Multiple envelope proteins are involved in white spot syndrome virus (WSSV) infection in crayfish. **Archives of Virology**. v.151, p.1309-1317, 2006.

Li, Z et al. Shotgun identification of the structural proteome of shrimp white spot syndrome virus and iTRAQ differentiation of envelope and nucleocapsid subproteomes. **Molecular and Cellular Proteomics** **6.9**, p.1609-1620, 2007.

LIGHTNER, D.V. A Handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultures penaeid shrimp. **World Aquaculture Society**. Louisiana, 304p, 1996.

LIGHTNER, D.V. et al. Risk of spread of penaeid shrimp viruses in the Americas by the international movement of live and frozen shrimp. **Revista Science Technique Office International Epizootias**, v.16, p.146-160, 1997.

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

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

LIGHTNER, D.V. et al. Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in the Americas. **Journal of Invertebrate Pathology**. v.110, p.174-183, 2012.

LO, C. F. et al. Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimps using polymerase chain reaction. **Diseases of Aquatic Organism**, v.25, p.133-141, 1996a.

LO, C.F. et al. White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.27, p.215-225, 1996b

LO CF et al. Specific genomic DNA fragment analysis of different geographical clinical samples of shrimp white spot syndrome virus. **Diseases of Aquatic Organisms**. v.35, p. 175-185, 1999.

LO, C.F. et al. White spot syndrome - what we have learned about the virus and then disease. In: DISEASES IN ASIAN AQUACULTURE, 5. 2005, Manila. **Proceedings**. Manila: Asian Fisheries Society, 2005. p.421-433.

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

LU, Y.; WANG, S. Y.; LOTZ, J. M. The use of differential display to isolate viral genomic sequence for rapid development of PCR-based detection methods: A test case using Taura syndrome virus. **Journal of Virological Methods**, v. 121, p. 107-114, 2004.

MAGALHÃES, S. M. Caracterização da variabilidade genética do camarão *Litopenaeus vannamei* (boone, 1931) em fazendas de produção da região de Canavieiras (BA). **Dissertação**. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. Universidade Estadual de Santa Cruz, 2007. 74f.

MAGBANUA, Fe.O. White spot syndrome virus (WSSV) in cultured *Penaeus monodon* in the Philippines. **Diseases of aquatic organisms**, v. 42, p.77-82, 2000.

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

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.

MELLO, G.L; FARIAS, A.P. Policultivo de tilápias e camarões marinhos – Os resultados das primeiras experiências em Laguna – SC. **Panorama Aquicultura**, Botafogo, v. 17, n. 102, p.42-47, jul./ago., 2007.

MORALES, V.Y.J. CUÉLLAR-ANJEL. **Guia Técnica – Patología e Inmunología de Camarones Penaeídeos**. Programa CYTED Red II-D Vannamei, Panamá, Rep. De Panamá, 2008.270p

MULLER, I.C. et al. Genotyping of white spot syndrome virus (WSSV) geographical isolates from Brazil and comparison to other isolates from the Americas. **Diseases of Aquatic Organisms**. vol. 88, p.91-98, 2010.

NAKANO, H. et al. Mass mortalities of cultured Kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, in Japan in 1993: epizootiological survey and infection trials. **Fish Pathology**, v. 29, p.135–139, 1994.

NATIVIDAD, K. D. T. et al. Detection of white spot syndrome virus DNA in pond soil using a 2-step nested PCR. **Journal of Virological Methods**, v.149, p.28-34, 2008.

NUNAN, L.M. et al. The detection of white spot syndrome virus (WSSV) and yellow head virus (YHV) in imported commodity shrimp. **Aquaculture**, v.160, p.19-30, 1998.

OLIVEIRA NETO, J. M. 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. **Dissertação** apresentada ao Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais do Instituto de Ciências do Mar da Universidade Federal do Ceará, 2006.

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

PINHEIRO, A.C.A.S. et al. Epidemiological status of taura syndrome and infectious myonecrosis viruses in *Penaeus vannamei* reared in Pernambuco (Brazil). **Aquaculture**, v.262, p.17-22, 2007.

RAJENDRAN K.V. et al. A comparative study of white spot syndrome virus infection in shrimp from India and Korea. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.84, p.173-176, 2004.

ROCHA, I. P.; RODRIGUES, J. O Agronegócio do camarão cultivado em 2003. Associação Brasileira de Criadores de camarão- ABCC. Agosto de 2004.

ROCHA, I. Panorama da Aquicultura Brasileira – **ABCC**, 2007.

ROCHA, I. Aquicultura: realidade mundial e brasileira, perspectivas para o Brasil com destaque para a carcinicultura marinha. Associação Brasileira de Criadores de Camarão – ABCC. Set. 2012.

ROCHA, I. et al. O Censo da carcinicultura Nacional em 2011. Associação Brasileira de Criadores de Camarão – ABCC. Jan. de 2013.

RUIZ, M.I.B et al. Revisión de patogénesis y estrategias moleculares contra El virus Del síndrome de La mancha blanca em camarones peneidos. **Revista de Biología Marina y Oceanografía**, v.44, p.1-11, 2009.

SANCHEZ-PAZ, A. White spot syndrome virus: an overview on an emergent concern. **Veterinary Research**. v. 41, p.1–34, 2010.

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

SIDONIO, L. et al. Panorama da aquicultura no Brasil: desafios e oportunidades. Banco Nacional de desenvolvimento setorial 35, p. 421-463, 2012.

SOTO, M.A. et al. Transmission of white spot syndrome virus (WSSV) to *Litopenaeus vannamei* from infected cephalothorax, abdomen, or whole shrimp cadaver. **Diseases of Aquatic Organisms**. v.45, p.81-87, 2001.

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

SUPAMATTAYA, K. et al. Experimental transmission of white spot syndrome virus (WSSV) from black tiger shrimp *Penaeus monodon* to the sand crab *Portunus pelagicus*, mud crab *Scylla serrata* and krill *Acetes* sp. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 32, p.79-85.1998.

TRINDADE, I.M.S. et al. Ações de Defesa Sanitária Animal no Combate ao Foco de Mancha Branca do camarões no Município de Canavieiras – BA, **ADAB – Agência Estadual de Defesa Agropecuária da Bahia**, 2008.

TSAI, J.M. Genomic and proteomic analysis of thirty-nine structural proteins of shrimp white spot syndrome virus. **Journal of Virology** . v.78, p. 11360-11370, 2004.

TSAI, J.M. et al. Identification of the nucleocapsid, tegument and envelope proteins of the shrimp white spot syndrome virus virion. **Journal of Virology**. v. 80,n°06, p.3021-3029, mar. 2006.

VAN HULTEN, M.C.W. et al. The white spot syndrome virus DNA genome sequence. **Virology**, v.286, p 7–22. 2001.

WAIKHOM, G. et al. Differential hosts passaging alters pathogenicity and induces genomic variation in white spot syndrome virus. **Aquaculture**, v.261, p.54-63, 2006.

WANG, T.Y. et al. White Spot Syndrome Virus (WSSV) infects specific hemocytes of the shrimp *Penaeus Merquiensis*. **Diseases of Aquatic Organisms**. v.52, p.249-259, 2002.

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

OIE (World Organisation Animal Health) 2012. **Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals**.

YANG, F. et al. Complete genome sequence of the shrimp white spot bacilliform virus. **Journal of Virology**. v. 75, p.11811-11820, 2001.

ZHANG, J.S. et al. Bioassay evidence for the transmission of WSSV by the harpacticoid copepod *Nitocra* sp. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 97, p.33-39, 2007.

**2. INVESTIGAÇÃO DO VÍRUS DA SÍNDROME DA MANCHA BRANCA
(WSSV) EM FAZENDAS DO ESTADO DO RIO GRANDE DO NORTE.**

Trabalho submetido à revista:

DISEASES OF AQUATIC ORGANISMS

Página eletrônica: www.int-res.com

Print ISSN: 0177-5103

Online ISSN:1616-1580

INVESTIGAÇÃO DO VÍRUS DA SÍNDROME DA MANCHA BRANCA (WSSV) EM FAZENDAS DO ESTADO DO RIO GRANDE DO NORTE.

SALES L.E.M, ARAÚJO I.S, BRANDÃO P.E, LIMA J.T.A.X

RESUMO: O Vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV) é um patógeno de camarão marinho que já devastou fazendas de camarão em todo o mundo. Atualmente no estado do Rio Grande do Norte não se sabe a situação atual do WSSV, devido à ausência de estudos comprovando ou não a presença desse patógeno no estado. A Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) recomenda para o diagnóstico confirmatório do WSSV a reação em cadeia da polimerase em dois passos (PCR-nested), seguindo a metodologia e a sequência de primers descritos por Lo et al (1996). Essa técnica consiste na utilização do produto do primeiro passo como molde para o segundo passo da nested-PCR, aumentando a sensibilidade do teste, detectando partículas virais em pequenas quantidades também em indivíduos assintomáticos. O objetivo deste trabalho foi investigar a ocorrência do Vírus da Síndrome da Mancha Branca, a partir do diagnóstico molecular (nested-PCR), em fazendas do estado do Rio Grande do Norte. Foram amostrados 150 camarões da espécie *Litopenaeus vannamei* por fazenda de forma aleatória durante o período de outubro a dezembro de 2012, totalizando 900 animais durante o estudo. Dos animais amostrados nenhum apresentava sinais clínicos da doença da mancha branca, no entanto, entre as fazendas analisadas duas registraram positividade para a presença do WSSV por PCR-nested. Este estudo identificou a ocorrência de focos do WSSV em fazendas dos polos norte e sul da carcinicultura do estado do RN. Faz-se necessário intensificar o monitoramento preventivo do WSSV em camarões com uso da PCR em dois passos devido a presença do referido vírus em animais assintomáticos.

Palavras chave: *Litopenaeus vannamei*, Brasil, vírus da mancha branca.

INTRODUÇÃO

Na carcinicultura as doenças mais importantes de camarões Peneídeos tem origem infecciosa, entre as quais se destaca a Doença da Mancha Branca causada pelo WSSV- Vírus da Síndrome da Mancha Branca (STENTIFORD & LIGHTNER 2011). O WSSV é um agente causador de uma doença grave que afeta espécies de camarões Peneídeos, espécies de caranguejo e lagosta (LO et al. 1996a, CHANG et al. 2001, ZHANG et al. 2007, OIE 2012). Esta doença provoca fortes impactos econômicos no cultivo de camarão em todo o mundo (SANCHEZ-PÁZ 2010, LIGHTNER 2011), com possível mortalidade de 100% entre 3-10 dias (NAKANO et al. 1994, LOTZ & SOTO 2002, WANG et al. 2002). A obtenção da sequência genômica classificou o WSSV como único membro do

gênero Whispovírus da Família Nimaviridae (VAN HULTEN et al. 2001, SANCHEZ-PAZ 2010). O genoma desse vírus consiste em uma molécula de DNA dupla fita circular de grande tamanho e envelopado (WANG et al. 1995, MORALLES & CUÉLLAR-ANJEL 2008, OIE 2012).

A infecção pela Síndrome do Vírus da Mancha Branca pode ocorrer através de duas vias: horizontal e vertical. A via horizontal ocorre pelo contato direto com a água, solo infectado ou indiretamente através da ingestão de organismos infectados que podem apresentar aparência saudável (NATIVIDAD et al. 2008, OIE 2012, SANCHEZ-PAZ 2010). De acordo com Soto et al (2001) a ingestão parece ser o mais efetivo meio de transmissão em camarões. Na via vertical o vírus é transmitido a partir do progenitor infectado para a progênie. Estudos em relação à transmissão do vírus têm demonstrado que a migração de insetos aquáticos e outros animais, a atividade humana, o transporte de pós-larvas e adultos infectados, a importação de produtos congelados infectados e subprodutos contaminados são fontes potenciais de transmissão do vírus podendo funcionar como vetores e transmissores, promovendo a dispersão do vírus (LIGHTNER et al. 1997, SUPAMATTAYA et al. 1998).

O primeiro relato do WSSV ocorreu no continente Asiático em 1992 (CHOU et al. 1995), após isso elevadas perdas econômicas na carcinicultura tem sido registradas em todo mundo (OIE 2012). No Brasil, o WSSV foi diagnosticado em 2005, no estado de Santa Catarina região sul do país. Durante o surto nesse estado as taxas de mortalidade chegaram a 90%, causando perdas econômicas de mais de Três bilhões de dólares (SEIFFERT et al. 2005). O vírus foi identificado também na região Nordeste do Brasil, nos estados do Ceará e Bahia (TRINDADE et al. 2008).

A WSD (Doença da Mancha Branca) em termos econômicos é a mais significativa em camarões Peneídeos, as perdas acumuladas devido essa doença está na ordem dos três bilhões de dólares (LIGHTNER 2012). De acordo com Waikhom et al (2006) e Barraco et al (2007) a presença do agente infeccioso não implica necessariamente na manifestação clínica. Para isso ocorrer são necessárias interações patógeno-hospedeiro-ambiente, depende também do sistema imune do hospedeiro e a cepa que está presente, podendo variar a virulência.

Medidas de controle com diagnóstico precoce do WSSV são extremamente importantes para evitar prejuízos elevados nos cultivos de camarões (FLEGEL 2006). O controle da sanidade animal depende da adoção de procedimentos que analisem o estado de saúde dos camarões cultivados, detectando precocemente problemas de cultivo,

permitindo que ações sejam tomadas rapidamente para controlar, minimizar ou excluir os efeitos negativos de condições desfavoráveis sobre a produção de camarão, reduzindo os prejuízos financeiros (LENOCH 2004). O método recomendado pela Organização Mundial de Saúde Animal-OIE (2012) é a Reação em Cadeia de Polimerase – PCR. Para aumentar a sensibilidade do teste, recomenda-se utilizar a nested-PCR que consiste na técnica de PCR em dois passos, utilizando o produto do primeiro passo como molde para a amplificação no segundo passo (Lo et al. 1996b, OIE 2012). Frequentemente, quando os camarões apresentam sinais clínicos da doença, tais como: pontos brancos no exoesqueleto, letargia, anorexia (LIGHTNER 1996, RAJENDRAN et al. 2004) o vírus da mancha branca geralmente é detectado por um único passo da PCR. No entanto, quando o vírus encontra-se na fase latente, com baixa carga viral, sem a presença de sinais clínicos, são detectados no segundo passo da nested-PCR (OIE 2012).

O estado do Rio Grande do Norte localiza-se na região Nordeste do Brasil e representa o segundo maior produtor de camarão do país (SIDONIO et al. 2012). A espécie predominante cultivada no estado do RN é o *Litopenaeus vannamei*, com uma produção em 2011 de 17.742 toneladas (ROCHA et al. 2013). O trânsito intenso de pós-larvas, camarões juvenis e adultos no Nordeste do Brasil eleva o risco de contaminação entre os estados livres de certas doenças de crustáceos. O risco da contaminação e proliferação pode ser amenizado através de vigilância por meio de diagnósticos presuntivos e confirmatórios das doenças. Atualmente não existe na literatura relatos sobre a presença do WSSV no estado do Rio Grande do Norte. Diante dessa realidade, na busca de contribuir para o conhecimento do estado de sanidade dos camarões cultivados no RN em relação ao WSSV o objetivo deste trabalho foi investigar a ocorrência do Vírus da Síndrome da Mancha Branca, a partir do diagnóstico molecular (nested-PCR), em fazendas do estado do Rio Grande do Norte para a obtenção de informações para avaliar o estado de saúde dos camarões, contribuindo para a adoção de medidas de controle e prevenção da Doença da Mancha Branca.

MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta de Amostras

As amostras avaliadas neste estudo foram coletadas nas regiões de maior densidade de fazendas de cultivo de camarão do estado do Rio Grande do Norte, englobando fazendas do Polo Sul e Polo Norte (Figura 1). Foram coletados exemplares de camarão aleatoriamente da espécie *Litopenaeus vannamei*, com auxílio de tarrafa em diferentes pontos dos viveiros, estando estes no estágio de vida entre juvenis e adultos. Um total de 900 indivíduos foram coletados durante o estudo, compreendendo 150 animais por fazenda, totalizando seis fazendas, num período entre os meses de outubro a dezembro de 2012.

O número de animais coletados foi estabelecido segundo a recomendação da OIE (2012), para o diagnóstico em animais assintomáticos no controle da sanidade animal, recomenda-se a prevalência mínima de 2% em populações ≥ 100.000 indivíduos, totalizando 150 animais por ponto de coleta.

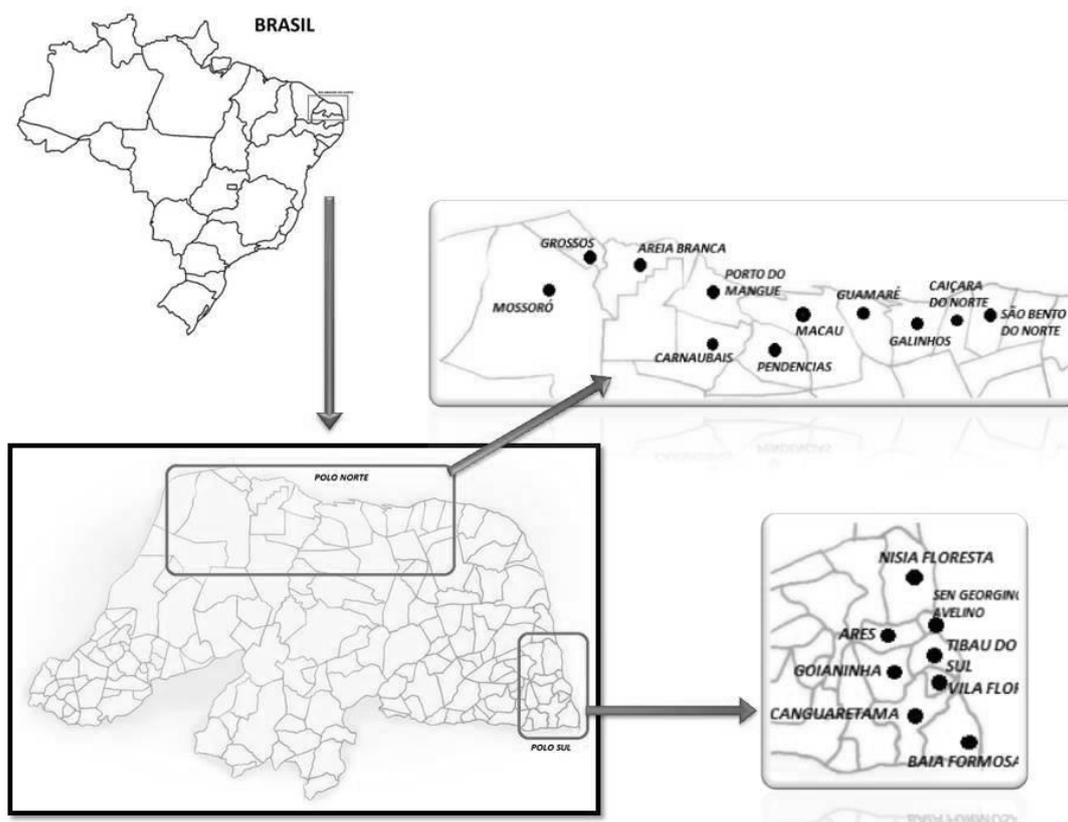


Figura 1: Regiões de coletas das amostras de camarão no RN.

Os animais foram transportados em caixas plásticas lacradas, com água e suporte de oxigênio constante, e encaminhados para o Laboratório de Sanidade de Organismos Aquáticos situado na Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA) para coleta da amostra biológica.

Amostra Biológica

A amostra biológica era formada por um pool de tecido de dez animais, totalizando 200mg de tecido por amostra biológica. O tecido utilizado no estudo foram os pleópodos dos animais. De acordo com a OIE (2012) os pleópodos são um tecido de eleição para o diagnóstico do WSSV. Os pleópodos foram retirados de cada animal com auxílio de uma pinça estéril, após a desensibilização dos animais em gelo. O tecido retirado era conservado imediatamente em álcool a 95% para posterior análise molecular.

Extração DNA Genômico

A extração de DNA genômico foi realizada a partir da amostra biológica no Laboratório de Fitopatologia II e Biologia Molecular situado na (UFERSA) utilizando o protocolo adaptado da OIE (2012). A amostra biológica foi colocada em um microtubo de 2 mL, após a secagem do álcool. Em seguida foi realizada a maceração desse tecido com nitrogênio líquido com o auxílio de pistilo de vidro. Após a maceração o tecido foi digerido em 600ul de solução de lise contendo (100mM NaCl, 10mM Tris-HCl, pH 8, 25mM EDTA, pH 8 e 10% SDS) e colocado em banho-maria a 65°C por 60 minutos. Após a incubação foi adicionado 5M NaCl para uma concentração final de 0,7M. Em seguida foi adicionado 1/10 do volume de CTAB/NaCl sendo 10% CTAB e 0,7M NaCl, sendo novamente incubada em banho-maria a 65°C por 10 minutos. Em seguida foi adicionado na amostra o volume equivalente de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1 v/v) e centrifugadas a 13000g por 5 minutos. O sobrenadante foi recolhido e adicionado o volume equivalente de Fenol e realizado a centrifugação a 13000g por 5 minutos, esse processo de lavagem foi realizado com Fenol duas vezes. Após a última centrifugação o sobrenadante foi coletado e adicionado 2x o volume de clorofórmio/álcool isoamílico na mesma proporção utilizada acima e centrifugado novamente a 13000g por 5 minutos. Em seguida foi transferida a parte superior para um novo tubo e adicionado 2x o volume de etanol a 95% para precipitação do DNA. Após isso a amostra foi incubada a -20°C por 30 minutos. Passado esse tempo foi realizada a centrifugação a 13000g por 30 minutos e descartado o etanol. A lavagem do pellet do DNA foi realizado colocando-se 1mL de álcool a 70% , em seguida foi realizada centrifugação a 13000g por 5 minutos e depois foi descartado o etanol e feito

a secagem do material em temperatura ambiente durante 30 minutos. O DNA foi ressuspensão com 50ul de água Miliq e mantido a 4°C.

Nested-PCR

A presença do vírus da mancha branca foi investigada através da amplificação de um fragmento do genoma viral e também foi realizada no Laboratório de Fitopatologia II e Biologia Molecular situado na (UFERSA). A técnica utilizada foi a Reação em Cadeia da Polimerase em dois passos, nested-PCR, utilizando os primers recomendados pela OIE (2012) e descritos por Lo et al (1996b). Para o primeiro passo de PCR foram utilizados os primers 146F1(5'- ACT ACT AAC TTC AGC CTA TCT AG-3') e 146R1 (5'- TAA TGC GGG TGT AAT GTT CTT ACG A-3') que produzem uma banda específica de 1447pb e no segundo passo produzindo uma banda específica de 941pb os primers utilizados foram 146F2 (5'- GTA ACT GCC CCT TCC ATC TCC A- 3') e 146R2 (5'- TAC GGC AGC TGC TGC ACC TTG T-3'). A reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 25ul, contendo 100ng de DNA, Tris 10mM, MgCl₂ 3,0 mM, 200uM de dNTP, 140nM de cada iniciador (146F1/146R1) e 1U de Taq DNA Polimerase (Ludwig – Biotec). A amplificação foi realizada em um termociclador com desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, seguida de 39 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 1 minuto e 30 segundos e extensão a 72°C por 2 minutos. Após a amplificação, 1 ul do produto da primeira reação foi adicionado ao segundo passo de amplificação em uma mistura idêntica a descrita acima para a primeira reação exceto os iniciadores, sendo, neste caso, utilizados o par 146F2/146R2. Após uma desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, as condições da reação foram as seguintes: anelamento a 55°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto. A extensão final foi realizada a 72°C por 5 minutos. Como controle positivo foi utilizado uma amostra de DNA extraída de pleópodos de *Litopenaeus vannamei* positivo para o WSSV obtida no Laboratório da Empresa Potiporã.

Eletroforese em gel de agarose

A análise dos produtos de PCR foi realizada por meio de eletroforese em gel de agarose a 1% e corados com 4ul de brometo de etídio. Foram utilizados 8ul do produto amplificado adicionado com 2ul do corante azul de bromo-fenol. O marcador de pares de base utilizado foi o 100bp DNA ladder (fermentas[®]). A visualização da corrida dos produtos da PCR foi realizada em transluminador de UV e documentada em câmera digital.

Sequenciamento

Para a confirmação da amplificação dos fragmentos esperados foi realizado o sequenciamento na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP) no Laboratório de Biologia Molecular Aplicada e Sorologia. O tamanho do fragmento esperado (941pb) foi sequenciado no sequenciador automático de DNA ABI modelo3500 (SADNA) para a verificação da proximidade filogenética com uma sequência já estabelecida do WSSV. A verificação da homologia entre as sequências foi realizada através do programa Bioedit.

RESULTADOS

Nested PCR

Dentre as 90 amostras biológicas de camarões oriundas de fazendas do polo norte e polo sul da carcinicultura do RN, foi determinado que 3 amostras obtiveram diagnóstico confirmatório positivo por nested PCR (Figura 2), em que duas amostras estavam em uma fazenda do Polo Norte (Figura 3) e uma amostra em fazenda do Polo Sul (Figura 4), e reconfirmadas positivas com sequenciamento genético. Todos os animais coletados não apresentavam sinais clínicos típicos do Vírus da Mancha Branca.

Com a análise positiva da nested PCR por eletroforese em gel de agarose, revelou-se a presença do fragmento específico para o WSSV com única banda equivalente a 941pb, correspondente a amplificação de um fragmento específico do genoma do WSSV conforme os primers utilizados.

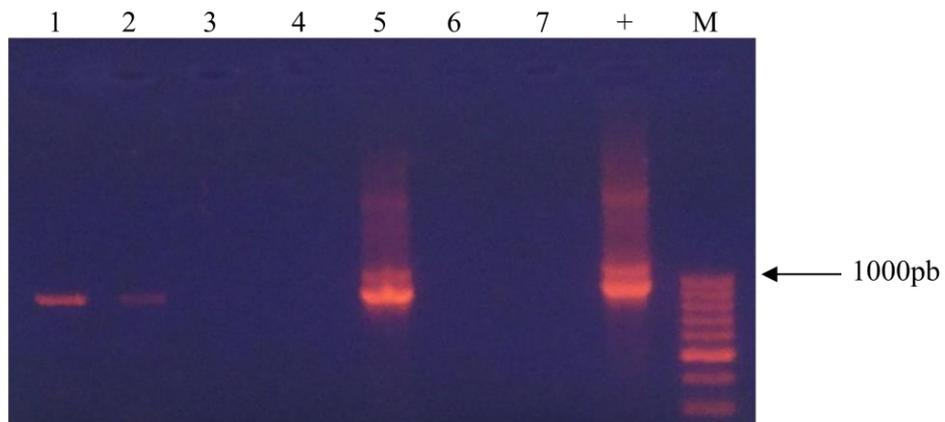


Figura 2: Gel de agarose (1%) dos produtos amplificados por PCR das fazendas analisadas. Amostras 1, 2 e 5 correspondem as amostras positivas revelando o fragmento de banda específica de 941pb; Amostras 3, 4, 6 e 7 são negativas; M: marcador de 100pb; +: controle positivo 941pb= positivo para WSSV.

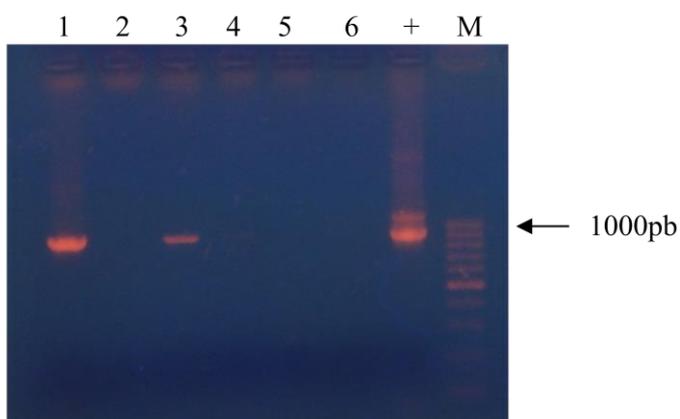


Figura 3: Gel de agarose (1%) dos produtos amplificados por PCR. Amostras 1 e 3 são positivas WSSV correspondendo a Fazenda do Polo Norte; Amostras 2, 4, 6 negativas; M: marcador de 100pb; +: controle positivo 941pb= positivo para WSSV.

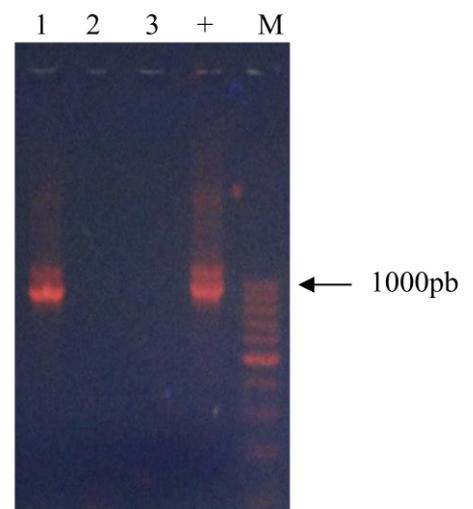


Figura 4: Gel de agarose (1%) dos produtos amplificados por PCR. Amostras 1 positiva WSSV correspondendo a Fazenda do Polo Sul; Amostras 2 e 3 negativas; M: marcador de 100pb; +: controle positivo 941pb= positivo para WSSV.

Sequenciamento

Foram sequenciadas duas amostras positivas, ou seja, cuja amplificação por PCR resultou em um fragmento de tamanho esperado igual a 941pb, com o objetivo de confirmar se as sequências nucleotídicas das mesmas apresentava identidade com uma sequência correspondente do genoma do WSSV. As amostras foram provenientes de

Fazendas do Polo Norte e Polo Sul. As sequências de nucleotídeo obtidas após o sequenciamento foram as seguintes:

Amostra A:

ATCCTCTTTTCGCATTGCCCCGCCAGAAAGTCTCCATGGAAGAAATTAGAGCCACACCCTATCAG
GCCAACAAAGCTTATTAGTGACAAACATTACGTGATGAACATGTCCAAGATCGATTCTAGAGTAA
CAGGATCTTCCCTCCTTAAGAAGGTTAGCGAATGGACTGAAATGAGAATGAACTCCAACCTTTAA
TGGAACATTTGAACCATCAAGACTCGCCCTCTCCAACCTCTGGCATGACAACGGCAGGAGTCAAC
CTCGACGTTATTGTCAAACCAAATAATGCAAGAAGTGTACTAGGAATATTGGAATGTCATCGCC
AGCACGTGTGCACCGCCGACGCCAAGGGAAGTGTGCTTCAGCCATGCCAGCCGTCTTCCAGGC
AACCGATGGAAACGGTAACGAATCTGAACTGATCCAGAATGCTCTGCCAAGGAACAGATACAT
CCAAAAGAGCACAATGAACGCTCAAACCTGTCGTGTTTGCTAATGTTTTGGAACAACCTTATCGCC
GATCTTGGAAAGGTTATCGTGAACGAAGTGGCCGGCACCATCGCTGAATCTGTACCAGAAAGC
GTATATGAAAACACCAAGGAAATGATTGATAGACTAGGCTCTGACGACCTCTTCAAATCTAATA
ATAATGGAGGAGTAGAATCAATGGATTATGAAGATAGCGAAACAACATCCAACAATGGTCCCG
TCCTCATCTCAGAAGCCATGAAGAATGCCGTCTATCACACACTAATTTCCGGCAAGGCAGCTCG
CCCGGAAAATGTACCATTGCTCATGCGCCAGCGGCCCTCTCGCCTTTGATTTCCCT

Amostra B:

GCCCAGAAGTCTCCATGGAAGAAATTAGAGCCACACCCTATCAGGCCAACAAAGCTTATTAGTG
ACAAACATTACGTGATGAACATGTCCAAGATCGATTCTAGAGTAACAGGATCTTCCCTCCTTAA
GAAGGTTAGCGAATGGACTGAAATGAGAATGAACTCCAACCTTTAATGGAACATTTGAACCATC
AAGACTCGCCCTCTCCAACCTCTGGCATGACAACGGCAGGAGTCAACCTCGACGTTATTGTCAAAA
CCAAATAATGCAAGAAGTGTACTAGGAATATTGGAATGTCATCGCCAGCACGTGTGCACCGCC
GACGCCAAGGGAAGTGTGCTTCAGCCATGCCAGCCGTCTTCCAGGCAACCGATGGAAACGGT
AACGAATCTGAACTGATCCAGAATGCTCTGCCAAGGAACAGATACATCCAAAAGAGCACAATG
AACGCTCAAACCTGTCGTGTTTGCTAATGTTTTGGAACAACCTTATCGCCGATCTTGGAAAGGTTAT
CGTGAACGAAGTGGCCGGCACCATCGCTGAATCTGTACCAGAAAGCGTATATGAAAACACCAA
GGAAATGATTGATAGACTAGGCTCTGACGACCTCTTCAAATCTAATAATAATGGAGGAGTAGA
ATCAATGGATTATGAAGATAGCGAAACAACATCCAACAATGGTCCCGTCCTCATCTCAGAAGCC
ATGAAGAATGCCGT

A busca por uma sequência homóloga realizada no GenBank, utilizando-se o Bioedit, mostrou 100% de homologia entre estas sequências e uma sequência específica do genoma do Vírus da Mancha Branca. A amostra-A que corresponde a Fazenda do Polo Norte vai do nucleotídeo 276130 até o 276955 e a amostra- B que corresponde a fazenda do Polo Sul vai do nucleotídeo 276150 até o 276861, posições relativas à sequência de número de acesso: AF369029.

DISCUSSÃO

Os camarões diagnosticados positivamente pela nested-PCR não apresentavam sinais clínicos da Doença da Mancha Branca. Este fato não excluiu a presença do vírus, pois este pode apresentar-se de forma assintomática. Esta condição de positivos para o WSSV e assintomáticos foi observado em estudos realizados anteriormente com *L. vannamei* por Muller et al. (2010). E em outros estudos realizados por Otta et al (1999), Magbanua et al. (2000) com outras espécies de Peneídeos.

Alguns fatores podem influenciar na ausência dos sinais clínicos do vírus da mancha branca em camarões positivos, como: a alta temperatura dos cultivos de camarão; a fase em que o vírus se encontra no hospedeiro; a alteração da virulência e também as condições ambientais dos cultivos. Em relação à temperatura de cultivo, estudos realizados por Vida et al (2001), Granja et al (2003) e Du et al (2006), mostram que o aumento da temperatura da água pode provocar a interrupção ou reduzir a replicação do WSSV. No que diz respeito à fase em que o vírus se encontra no hospedeiro, de acordo com Lenocho (2004) indivíduos na fase latente da infecção com WSSV podem ou não apresentar sinais clínicos da infecção. Já em relação à virulência, Waikhom et al. (2006) afirma que depois da transmissão por outros hospedeiros o Vírus da Mancha Branca pode sofrer alteração na virulência. E em relação às condições dos parâmetros químicos e físicos dos cultivos de acordo com Pinheiro et al. (2007) condições ambientais favoráveis podem reduzir a replicação viral.

No presente estudo o diagnóstico positivo em fazendas com ausência de mortalidade pode ser indicativo da infecção no estágio inicial, elevando o risco de disseminação desse vírus, revelando a necessidade da implantação de programas de biossegurança eficiente para evitar e controlar a entrada desse vírus nos cultivos de camarão. Dessa forma se faz necessária o uso da nested-PCR, pois de acordo com a OIE (2012) esta metodologia tem sido a mais utilizada neste tipo de estudo devido a sua alta sensibilidade, quando comparada a outros métodos moleculares, sendo a amplificação do número de cópias do genoma viral em animais infectados, o principal meio de monitorar a doença em camarões, especialmente em casos de infecção assintomática. Com esta técnica o vírus pode ser detectado na fase latente e na fase patente da infecção. Indivíduos na fase latente somente apresentam resultado positivo em nested-PCR e podem ou não apresentar sinais clínicos da infecção. Indivíduos na fase patente da doença apresentam positividade no primeiro passo podendo apresentar também sinais clínicos. De acordo com Lo et al (1996b) o segundo passo da técnica de nested-PCR, é mais sensível do que o primeiro passo aumentando a sensibilidade da técnica na ordem de 10^3 a 10^4 vezes, elevando assim

o potencial diagnóstico e seu valor como ferramenta laboratorial. Sua utilização pode contribuir para o monitoramento de rotina dos cultivos dentro de uma perspectiva mais eficiente, sendo indicada para monitorar todas as etapas de cultivo de camarão (Lo et al 1997).

O sequenciamento do fragmento de DNA específico do Vírus da Mancha Branca (941pb) foi realizado com o objetivo de verificar a homologia do fragmento amplificado neste trabalho com o genoma já existente do Vírus da Mancha Branca, a fim de excluir o aparecimento de falso-positivo. A sequência de nucleotídeos obtida apresentou 100% de homologia com uma região específica do genoma do WSSV. Fato esse não observado por estudo realizado por Claydon et al. (2004) utilizando o mesmo protocolo recomendado pela OIE, obtiveram falso-positivo para o WSSV em crustáceos da espécie *Cherax quadricarinatus*.

CONCLUSÃO

Este estudo identificou positivamente a ocorrência de focos do WSSV nos Polos Norte e Sul da carcinicultura do estado do RN por PCR em dois passos e sequenciamento genético. Faz-se necessário intensificar a vigilância do WSSV com monitoramento preventivo e diagnóstico confirmatório associado a planos de controle de biossegurança no setor da carcinicultura evitando disseminação da enfermidade. O diagnóstico confirmatório do WSSV com uso da PCR em dois passos é imprescindível devido à positividade do vírus em animais assintomáticos.

Agradecimentos: Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pelo apoio financeiro para a realização dessa pesquisa.

REFERÊNCIAS

Barraco, M.A. et al (2007). Imunologia de crustáceos com ênfase em camarões. Universidade Federal de Santa Catarina.

Chang YS, Penq SE, Wang HC, Hsu HC e outros (2001). Sequencing and amplified restriction fragment length polymorphism analysis of ribonucleotide reductase large subunit gene of the white spot syndrome virus in blue crab (*Callinectes sapidus*) from American Coastal Waters. *Marine Biotechnology* 3: 163-171

Chou HY, Huang CY, Wang CH, Chiang HC, Lo CF (1995). Patogenicity of baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. *Disease Aquatic Organisms* 23: 165-173

Claydon K, Cullen B, Owens L (2004). OIE white spot syndrome virus PCR gives false-positive results in *Cherax quadricarinatus*. *Dis of Aquat Org* 62: 265-268

Du HH, Li WF, Xu ZR, Kil, ZS (2006). Effect of hyperthermia on the replication of white spot syndrome virus (WSSV) in *Procambarus clarkii*. *Dis. Aquat. Org.* 71: 175–178

Flegel TW (2006). Detection of major penaeid shrimp viruses in Asia, a historical perspective with emphasis on Thailand. *Aquaculture* 258: 1-33

Granja CB, Aranguren LF, Vidal OM, Aragon L, Salazar M, (2003). Does hyperthermia increase apoptosis in white spot syndrome virus (WSSV)-infected *Litopenaeus vannamei*. *Dis. Aquat. Org.* 54: 73–78

Lenoch R (2004). Avaliação do risco epidemiológico da carcinicultura catarinense usando como modelo a síndrome de Taura e a doença da Mancha Branca. Dissertação, UNIVALI, Itajai, SC.

Lightner DV (1996). A Handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultures penaeid shrimp. World Aquaculture Society. Louisiana, 304p

Lightner DV, Redman RM, Poulos BT, Nunan LM, Mari JL & Hasson KW (1997). Risk of spread of penaeid shrimp viruses in the Americas by the international movement of live and frozen shrimp. *Rev sci tech Off int Epiz* 16: 146-160

Lightner DV (2011). Virus diseases of farmed shrimp in the Western Hemisphere (the Americas): A review. *J Invertebr Pathol* 106: 110-130

Lightner DV, Redman RM, Pantoja CR, Tang K.F.J e outros (2012). Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in the Americas. *J Invertebr Pathol* 110: 174-183

Lo CF, Leu JH, Ho CH, Chen CH and others (1996a) Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimp using polymerase chain reaction. *Dis Aquat Org* 25: 133–141

Lo CF, Ho CH, Peng SE, Chen CH e outros (1996b). White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods. *Dis Aquat Org* 27: 215-225

Lo CF, Ho CH, Chen CH, Liu KF e outros (1997). Detection and tissue tropism of white spot syndrome baculovirus (WSBV) in captured brooders of *Penaeus monodon* with a special emphasis on reproductive organs. *Dis Aquat Org* 30: 53-72

Lotz JM, Soto AM (2002). Model of white spot syndrome virus (WSSV) epidemics in *Litopenaeus vannamei*. *Dis Aquat Org* 50: 199-209

- Magbanua FO, Natividad KT, Migo VP, Alfafara CG e et al (2000). White spot syndrome virus (WSSV) in cultured *Penaeus monodon* in the Philippines. *Dis Aquat Org* 42: 77-82
- Morales VYJ, Cuéllar-anjel (2008). Guia Técnica – Patología e Inmunología de Camarones Penaeídos. Programa CYTED Red II-D Vannamei, Panamá, Rep. De Panamá.
- Muller IC, Andrade TPD, Tang-Nelson KFJ, Marques MRF, Lightner DV (2010). Genotyping of white spot syndrome virus (WSSV) geographical isolates from Brazil and comparison to other isolates from the Americas. *Dis Aquat Org* 88: 91-98
- Nakano H, Hiraoka M, Umezawa S, Momoyama K, Koube H, Inouye K, Oseko N (1994). Mass mortalities of cultured Kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, in Japan in 1993: epizootiological survey and infection trials. *Fish Pathol* 29: 135–139
- Natividad KDT, Nomura N, Matsumura M (2008). Detection of white spot syndrome virus DNA in pond soil using a 2-step nested PCR. *J Virol Methods* 149: 28-34
- Otta SK, Shubha G, Joseph B, Chakraborty A, Karunasagar I, Karunasagar I (1999). Polymerase Chain reaction (PCR) detection of white spot syndrome virus (WSSV) in cultured and wild crustaceans in India. *Dis Aquat Org* 38: 67-70
- Pinheiro ACAS, Lima APS, Souza ME, Neto ECL e outros (2007). Epidemiological status of taura syndrome and infectious myonecrosis viruses in *Penaeus vannamei* reared in Pernambuco (Brazil). *Aquaculture* 262: 17-22
- Rajendran KV, Mukherjee SC, Vijayan KK, Jung SJ, Kim YJ, Oh MJ (2004). A comparative study of white spot syndrome virus infection in shrimp from India and Korea. *J Invertebr pathol* 84: 173-176
- Rocha I, Borba M, Nogueira J (2013). O Censo da carcinicultura Nacional em 2011. Associação Brasileira de Criadores de Camarão – ABCC
- Sanchez-paz A (2010). White spot syndrome virus: an overview on an emergent concern. *Veterinary Research* 41: 1–34
- Seiffert W, Costa SW, Maggioni D (2005). A mancha branca em Santa Catarina. *Revista Panorama da Aquicultura* 15: 51-53
- Sidonio L, Cavalcanti I, Capanema L, Morch R e outros (2012). Panorama da aquicultura no Brasil: desafios e oportunidades. *Banco Nacional de desenvolvimento setorial* 35: 421-463
- Soto MA, Shervette VR, Lotz JM (2001). Transmission of white spot syndrome virus (WSSV) to *Litopenaeus vannamei* from infected cephalothorax, abdomen, or whole shrimp cadaver. *Dis Aquat Org* 45: 81-87
- Stentiford GD, Lightner DV (2011). Cases of white spot disease (WSD) in European shrimp farms. *Aquaculture* 319: 302-306

- Supamattaya K, Hoffman RW, Boonyaratpalin S, Kanchanaphum P (1998). Experimental transmission of white spot syndrome virus (WSSV) from black tiger shrimp *Penaeus monodon* to the sand crab *Portunus pelagicus*, mud crab *Scylla serrata* and krill *Acetes* sp. *Dis Aquat Org* 32: 79-85
- Trindade IMS, Ribas JRL, Mendonça FF, Fidalgo AVBC, Santos SCH (2008). Ações de Defesa Sanitária Animal no Combate ao Foco de Mancha Branca do camarões no Município de Canavieiras – BA, ADAB – Agência Estadual de Defesa Agropecuária da Bahia
- Van hulten MCW, Witteveldt J, Peters S, Kloosterboer N et al (2001). The white spot syndrome virus DNA genome sequence. *Virology* 286: 7–22
- Vidal OM, Granja CB, Aranguren F, Brock JA, Salazar M (2001). A profound effect of hyperthermia on survival of *Litopenaeus vannamei* juveniles infected with White spot syndrome virus. *J. World Aquacult. Soc.* 32: 364–372
- Waikhom G, John KR, George MR, Jeyaseelan MJP (2006). Differential hosts passaging alters pathogenicity and induces genomic variation in white spot syndrome virus. *Aquaculture* 261: 54-63
- Wang CH, Lo CF, Leu JH, Chou CM et al (1995). Purification and genomic analysis of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) of *Penaeus monodon*. *Dis of Aquat Org* 23: 239–242
- Wang TY, Liu W, Seah JN, Lam CS et al (2002). White Spot Syndrome Virus (WSSV) infects specific hemocytes of the shrimp *Penaeus Merquiensis*. *Dis Aquat Org* 52: 249-259
- OIE (World Organisation Animal Health) 2012. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals.
- Zhang JS, Dong SL, Dong YW, Tian XL, Hou CQ (2007). Bioassay evidence for the transmission of WSSV by the harpacticoid copepod *Nitocra* sp. *J Invertebr Pathol* 97: 33-39