

**JÉSSICA DE TORRES BANDEIRA**

**VÍRUS DA SÍNDROME DA MANCHA BRANCA (WSSV) EM  
CRUSTÁCEOS E MOLUSCOS NATIVOS NO RIO PARAÍBA –PB.**

**RECIFE**

**2016**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

**JÉSSICA DE TORRES BANDEIRA**

**VÍRUS DA SÍNDROME DA MANCHA BRANCA (WSSV) EM CRUSTÁCEOS E  
MOLUSCOS NATIVOS NO RIO PARAÍBA –PB.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Ciência Veterinária do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Veterinária.

Orientador:  
Prof. Dr. Fernando Leandro Dos Santos

**RECIFE  
2016**

Ficha Catalográfica

B214v Bandeira, Jéssica de Torres.

Vírus da síndrome da mancha branca (WSSV) em  
crustáceos e

moluscos nativos no Rio Paraíba - PB / Jéssica de Torres

Bandeira. –

Recife, 2016.

52 f. : il.

Orientador: Fernando Leandro dos Santos.

Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) –

Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de  
Medicina Veterinária, Recife, 2016.

Inclui referências.

1. Água doce. 2. Crustáceo. 3. LAMP. 4. Molusco. 5.

WSSD.

I. Santos, Fernando Leandro dos, orientador. II. Título

CDD

636.089

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

**VÍRUS DA SÍNDROME DA MANCHA BRANCA (WSSV) EM  
CRUSTÁCEOS E MOLUSCOS NATIVOS NO RIO PARAÍBA –PB.**

Dissertação de Mestrado elaborada por

**JÉSSICA DE TORRES BANDEIRA**

Aprovada em ...../...../.....

**BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. Fernando Leandro dos Santos  
Orientador – Departamento de Med. Veterinária da UFRPE

Profa. Dra. Emiko Shinozaki Mendes  
Coorientadora - Departamento de Med. Veterinária da UFRPE

Profa. Dra. Suzianny Maria Bezerra Cabral da Silva  
Coorientadora - Departamento de Pesca da UFRPE

Prof. Dr. George Chaves Jimenez  
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da UFRPE

## **Dedicatória**

Dedico este trabalho  
ao meu filho, Chuck.

## **Agradecimentos**

À CAPES, pelo apoio financeiro a minha pesquisa, com a disponibilização de bolsa durante toda a pesquisa.

À Associação de Criadores de Camarão da Paraíba e a Fazenda Rio Azul, representados pelo engenheiro de pesca André Jansen e sua equipe, especialmente a Luiz Antônio do Nascimento, “Tonho”, pelo acolhimento e ajuda durante as coletas.

Agradeço também a Queiroz Galvão Alimentos, representados pela Médica Veterinária Roseli Pimentel, por ter aberto as portas para mim, bem como a Jonh Maridueña e sua equipe pela imensa disposição durante as análises.

Ao Médico Veterinário José Lopes da Silva Júnior, pela pronta disposição em me ajudar com os mapas e georreferenciamento.

Ao Prof. José Carlos Nascimento de Barros, pela atenção e ajuda doadas ao meu trabalho, realizando a classificação taxonômica das espécies, bem como esclarecendo dúvidas sobre as mesmas.

Gostaria de agradecer profundamente ao meu orientador, mestre e grande amigo, Fernando Leandro dos Santos, pela imensa paciência comigo desde os tempos de graduação e por estar sempre me apoiando em todas as minhas decisões profissionais. Tenho o senhor como um Pai-Patológico, tenho uma sorte inimaginável por tê-lo em minha vida.

Agradeço também a Profa. Emiko Mendes e a Profa. Suzianny Maria da Silva, por terem me aceitado e guiado como coorientadoras. E ao Prof. George Jimenez, por toda a ajuda e paciência dedicadas a mim e ao meu trabalho.

Gostaria de agradecer aos meus amigos, especialmente a Flávia Bruna Braga, André Albuquerque, Israel Lira, Camila Meneguini, Melina Barreto, Célio Campos, Bruna Cavalcante e Manuela e Eric Hornsby, pelo estímulo a continuar e sempre buscar ser uma profissional melhor. Agradeço também aos colegas de mestrado, em especial aos meus também colegas de graduação, Emanuel Felipe Filho e Marcela Sampaio, pelo grande aprendizado com vocês, especialmente durante as aulas de seminário!

À Área de Patologia da UFRPE, essa grande família, que sempre está presente e se ajudando e apoiando.

Aos meus sogros, Miriam Souto Maior e Hélio Moraes, por me acolherem com tanto carinho, e pelo apoio constante. Agradecer as minhas primas Alyne e Tatiane Bandeira, pelo apoio, confiança e fé depositados em mim como pessoa e profissional competente.

Gostaria de agradecer a minha Mãe Mariza Bandeira, meu Pai Elzir Bandeira, Meu irmão Augusto Bandeira e Minha segunda mãe, Vera Lúcia pelo apoio incondicional sempre, não importa qual a minha decisão, sempre estão ao meu lado, seja para comemorar ou seja para ajudar a “sacudir a poeira e dar a volta por cima”! Sem vocês eu não seria nada, não conquistaria nada.

Gostaria de agradecer ao meu namorado, Renato Souto Maior Muniz de Moraes, por estar comigo durante todos os momentos. Esse mestrado é NOSSO! Obrigada principalmente pelo amor que me transmitiu durante esses dois anos de mestrado. Foram anos muito difíceis para mim com a perda de Chuck, e você sempre me conforta me fazendo lembrar das coisas boas de vivi com ele enquanto me acalma em um abraço, por isso serei eternamente grata.

E por fim, a todos que colaboraram de forma direta ou indireta para a elaboração desse trabalho, muito obrigada a todos!

## Resumo

A expansão da carcinicultura no Brasil, especialmente no Nordeste, passa por uma mudança no ambiente de cultivo, no qual camarões marinhos da espécie *Litopenaeus vannamei*, estão sendo cultivados em água doce, cujos desafios sanitários precisam ser dimensionados. Diante disso, buscou-se por meio da utilização da técnica de *Loop Mediated Isothermal Amplification* (LAMP), realizar estudo sobre possíveis reservatórios e/ou vetores para o Vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV), no Rio Paraíba, no Vale do Paraíba – PB. Foram estabelecidos oito (8) pontos de coleta nas margens do rio, próximos a pontos de captação de água de fazendas de cultivo de *L. vannamei*. Em cada ponto foram coletados 10 espécimes de *Palaemon pandaliformis*, 10 de *Pomacea lineatae* e 10 de *Melanoides tuberculatus*. Esses animais foram insensibilizados por choque térmico e os camarões tiveram o cordão nervoso cortado para que se prosseguisse com a coleta de material para utilização da LAMP. Foram retirados fragmentos de brânquias dos camarões, fragmentos da musculatura do pé dos *P. lineata* e, da espécie *M. tuberculatus*, foram coletados os indivíduos inteiros, sendo armazenados em tubos de microcentrífuga com etanol a 95% (1:10). Os exames foram realizados no laboratório de análises moleculares da Potiporã – RN e submetido a LAMP (Kit LAMP WSSV, Concepto Azul, Equador) para a detecção do WSSV. Ao final, examinaram-se 81 amostras de *P. pandaliformis*, 40 amostras de *M. tuberculatus* e 26 amostras de *P. lineata* foram obtidas, das quais 29%, 48% e 8% foram positivas respectivamente. Conclui-se que o WSSV está presente em crustáceos e moluscos silvestres, podendo constituir-se como vetores e/ou reservatórios do agente, representando, portanto, um potencial risco a carcinicultura local. É o primeiro relato de WSSV em *M. tuberculatus* e *P. lineata* silvestres.

Palavras-chave: Água doce; Crustáceo; LAMP; Molusco; WSSD.



## Abstract

The expansion of shrimp farming in Brazil, especially in the Northeast, undergoes a change in the management environment, with the Pacific White shrimp, *Litopenaeus vannamei*, being cultured in freshwater, whose health challenges need to be dimensioned. In this sense, we applied the *Loop Mediated Isothermal Amplification* (LAMP) technology in order to investigate the possibility of reservoirs or carrier of Whit Spot Syndrome Virus (WSSV) in Paraíba River, in Paraíba Valley – PB. Were selected eight (8) sampling points on the river, near sources of water used by shrimp farms of the species *L. vannamei*. At each point, 10 specimens of *Palaemon pandaliformis*, 10 *Pomacea lineata*, and 10 *Melanoides tuberculatus*, were collected. These animals were stunned by thermal shock and shrimps had the nerve cord cut, in order to proceed with the collection for LAMP use. Gills fragments were removed from the shrimps, foot muscles fragments from *P. lineata* and the species *M. tuberculatus* were collected entire and all samples were stored in microcentrifuge tubes with 95% ethanol (1:10). The analyses were performed in the laboratory of molecular analyses of Potiporã - RN and all samples were submitted to LAMP (LAMP Kit WSSV, Concepto Azul, Ecuador) for detection of WSSV. In the end, 81 samples of *P. pandaliformis*, 40 samples of *M. tuberculatus* and 26 samples of *P. lineata* were obtained, and positive reactions were observed in 29%, 48% and 8% respectively. IN conclusion, the results confirmed the WSSV presence in wild crustaceans and molluscs, which constitute a reservoirs or carrier of this agent, and a potential risk to local shrimp farming. This is the first report of WSSV in wild *M. tuberculatus* and *P. lineata*.

Keywords: Crustacean; Freshwater; LAMP; Mollusk; WSSD.

## Lista de figuras

Figura 1: Primeiro passo da etapa não cíclica da reação LAMP. ....	20
Figura 2: Segundo passo da etapa não cíclica da reação LAMP. ....	21
Figura 3: Terceiro passo da etapa não cíclica da reação LAMP. ....	21
Figura 4: Quarto passo da etapa não cíclica da reação LAMP. ....	22
Figura 5: Produto final da LAMP, fitas longas de DNA, em processo de amplificação. ....	23
Figura 6: Ilustração da localização geográfica dos pontos de coleta no Rio Paraíba – PB, para pesquisa de WSSV. ....	25
Figura 07: Espécimes adultos coletados. A – <i>M. tuberculatus</i> ; B – <i>P. lineata</i> ; C – <i>P. pandaliformis</i> . ....	29
Figura 08: Eletroforese de LAMP para detecção do WSSV. ....	30
Figura 9: Distribuição espacial dos valores relativos dos resultados obtidos pela LAMP na espécie <i>Palaemon pandaliformis</i> . ....	31
Figura 10: Distribuição espacial dos valores relativos dos resultados obtidos pela LAMP na espécie <i>Pomacea lineata</i> . ....	32
Figura 11: Distribuição espacial dos valores relativos dos resultados obtidos pela LAMP na espécie <i>Melanoides tuberculatus</i> . ....	33
Quadro 1: Listagem dos pontos de coleta no Rio Paraíba – PB, e seus respectivos georreferenciamento. ....	24
Quadro 02: Relação dos constituintes do Mix do Kit LAMP para WSSV (Concepta Azul, Equador). ....	27

## Sumário

Sumário .....	11
1. Introdução e Justificativa .....	10
2. Revisão de Literatura .....	12
2.1. Carcinicultura.....	12
2.2. Carcinicultura em água doce.....	14
2.3. Enfermidades do cultivo de camarão .....	15
2.3.1. Mancha Branca – WSD .....	16
2.3.1.1. O vírus .....	16
2.3.1.2. Susceptibilidade .....	17
2.3.1.3. Perfil da doença.....	18
2.3.1.4. Diagnóstico de WSSD.....	18
2.3.1.5. Loop-Mediated Isothermal Amplification ou Amplificação Isotérmica Mediada por Loop – LAMP .....	19
3. Material e métodos .....	24
3.1. Local para colheita das amostras .....	24
3.2. Amostragem.....	26
3.3. Extração de DNA e Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) .....	26
3.4. Análise estatística .....	28
4. Resultados .....	29
5. Discussão.....	34
6. Conclusão.....	39
7. Referências bibliográficas .....	40

## 1. Introdução e Justificativa

A produção mundial de pescado tem expandido nas últimas cinco décadas, chegando a superar o crescimento populacional, 3,2% e 1,6%, respectivamente (*Food and Agriculture Organization of the United Nations* - FAO, 2014). Em 2012, a captura de peixes e a aquicultura geraram um total de 158 milhões de toneladas de pescado, sendo 136,2 milhões destinados a alimentação humana (FAO, 2014).

Na aquicultura, a produção de crustáceos apresentou alta rentabilidade, representa 9,7% (6.4 milhões de toneladas) do volume total e, em valor monetário, 22,4% (US\$ 30.9 bilhões) em 2012 (FAO, 2014). Neste mercado, o Brasil é o 12º colocado entre os 15 países com maior produção em aquicultura, com 707.461 toneladas/ano (1.1% da produção mundial), com 74.415 toneladas de crustáceos (FAO, 2014). Em relação a aquicultura marinha nacional, destaca-se a produção de 65.670,6 toneladas (77,98% do total nacional) de *Litopenaeus vannamei*, (MPA, 2011).

O consumo *per capita* de camarão cultivado no Brasil cresceu 200% entre os anos de 2005 e 2013 (RODRIGUES, 2014), uma vez que a pesca extrativista já atingiu o máximo, nessa realidade, e o sistema intensivo expandiu com os investimentos na atividade, sobretudo no Nordeste (SCOPEL, 2014). Como prova disso, em 2011 a produção nacional de *L. vannamei* encontrava-se concentrada basicamente nos estados do Nordeste, que em 2014, deteve 90% da produção nacional (ROCHA, 2015).

De acordo com a Associação Brasileira de Criadores de Camarão (ABCC) (2013), boa parte dos micro e pequenos produtores do estado da Paraíba usam águas continentais, com destaque a região do Vale do Rio Paraíba, nos municípios de Itabaiana, Mogeiro e Salgado São Félix. E este fato indica uma interiorização da carcinicultura, na qual a produtividade adquirida supera a média do estado e do Brasil (ABCC, 2013).

O cultivo de *Litopenaeus vannamei*, que é uma espécie marinha (MAGALHÃES, 2004), em água doce, impõe o desafio que é a sanidade dos animais, pois pouco se sabe sobre as doenças que podem acometer nesse ambiente.

Sabe-se que o cultivo intensivo de camarões possui diversos entraves, principalmente decorrentes de problemas relacionados ao manejo e as enfermidades. Desse modo, ressalta-se

a importância de investigar as doenças, bem como desenvolver e utilizar métodos diagnósticos rápidos e seguros (SILVA, 2011). A Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) lista oito doenças em crustáceos, das quais, três têm destaque no cultivo do Nordeste brasileiro; Necrose Hipodermal e Hematopoiética Infecciosa (IHHN), Mionecrose Infecciosa (IMN), e Síndrome da Mancha Branca (WSSD) (OIE, 2014a).

Diante disso, com a possibilidade do Vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV) ser mantido no ambiente de cultivo de água doce, objetivou-se investigar a presença do (WSSV) em potenciais reservatórios, das espécies *Palaemon pandaliformis*, *Pomacea lineata* e *Melanoides tuberculatus*, presentes no Rio Paraíba (PB), do qual é captada a água dos cultivos de *L. vannamei* no estado da Paraíba.

Para alcançar este objetivo, utilizou-se o *Loop-mediated isothermal amplification* (LAMP), recomendado pela OIE para diagnóstico presuntivo e confirmatório, em camarões adultos e juvenis (OIE, 2012), considerando as vantagens, como custo e tempo inferior quando comparado a PCR, e altas sensibilidade e especificidade (JAROENRAM et al 2009).

## 2. Revisão de Literatura

### 2.1. Carcinicultura

No panorama mundial, a aquicultura vem crescendo e ocupa espaços no mercado quando comparada a captura de animais marinhos (FAO, 2014). Neste sistema produtivo, destaca-se a Ásia como detentora de 88% do volume de produção mundial, e, ainda neste cenário, a *Food and Agriculture Organization of the United Nations*– FAO – destaca o crescimento constante do Brasil nos últimos anos (FAO, 2014).

Ximenes et al (2011) relataram que entre os anos de 2000 e 2009, no cenário mundial, a pesca de camarão cresceu 7,8%, em contrapartida o cultivo de camarão, principalmente da espécie *Litopenaeus vannamei*, teve incremento de 207,5% e como reflexo desse crescimento, em 2009, a produção da carcinicultura superou o volume capturado. Relata-se que essa espécie representa cerca de 90% de todos os camarões produzidos no hemisfério oeste (WURMANN et al, 2004).

Tahim e Araújo-Junior (2012) atribuíram essa expansão a fatores como o aumento da demanda internacional por camarão, a alta rentabilidade e, principalmente, “a geração das divisas para as regiões ou países produtores”. Afirmaram, ainda, que houve estímulo e investimentos públicos e privados a fim de desenvolver a atividade, sempre aliando inovações tecnológicas.

No Brasil, a introdução do *L. vannamei* se deu na década de 1980. Desde então, a espécie se mostrou excelente para o cultivo nas condições climáticas brasileiras, devido à sua ampla faixa de tolerância à salinidade, rusticidade, rapidez no crescimento e, à sua boa conversão alimentar (COSTA, 2004). Décadas depois, para que a carcinicultura pudesse se estabelecer e crescer, foi necessário implementar medidas de biosseguridade na cadeia produtiva (LIGHTNER e PANTOJA, 2001; SÁNCHEZ e RODRÍGUEZ, 2004).

No âmbito da biosseguridade, destaca-se a larvicultura, substituindo a coleta de pós-larvas e juvenis de ambientes naturais, uma vez que essa prática tornava a atividade muito susceptível a introdução de agentes patogênicos (LIGHTNER e PANTOJA, 2001). Rocha (2003) afirmou que a utilização de tecnologias de outros países, para domínio do ciclo reprodutivo e a autossuficiência na produção de náuplios e pós-larvas do *L. vannamei*, que associadas às

práticas de manejo de água aprimoradas, contribuiu para o expressivo crescimento do camarão cultivado no início da década de 2000.

Em 1998, cerca de 55% do camarão cultivado no país era destinado à exportação (MPA, 2014). Entretanto, já a partir de 2004, o Brasil enfrentou uma grave crise na carcinicultura, Ximenes et al (2011) apontaram como principais fatores causadores da crise, os surtos de Mionecrose Infecciosa (INMV), a desvalorização do dólar e a ação “antidumping” realizada pelos Estados Unidos, em 2003, prejudicando os carcinicultores nacionais, e ainda seguido por volumes de chuvas em excesso e a concorrência com a produção de *L. vannamei* de países asiáticos.

Como consequência dessa crise, o Brasil perdeu mercado para países da Ásia, fazendo com que a produção fosse quase toda destinada para o mercado interno, que em 2010, absorveu 97,1% da produção nacional (XIMENES et al, 2011). Entretanto, em 2014, percebeu-se uma tímida recuperação do mercado externo, com exportações para França e Espanha (MPA, 2014).

Na carcinicultura nacional, destaca-se a região Nordeste, principalmente os estados do Ceará e Rio Grande do Norte, que em 2011 detiveram juntos, 78% do total produzido no Brasil. O destaque da região nordeste se dá, principalmente, por suas características edafoclimáticas, topográficas e hidrobiológicas que possibilitam produção durante todo o ano (FIGUEIREDO et al, 2003).

A ABCC informou que na região Nordeste “está localizada a grande maioria das fazendas de criação de camarão marinho do Brasil, a quase totalidade dos laboratórios de pós-larvas e a totalidade dos centros de processamento do camarão cultivado para o mercado” (ABCC, 2013). Além disso, outros fatores como mão-de-obra barata, boa aceitação do produto no mercado, incentivos governamentais e perspectivas de crescimento da demanda também colaboram para aquele cenário (CAMPOS e CAMPOS, 2006).

Oliveira (2014) retrata esse cenário no Vale do Paraíba, ao justificar o fortalecimento da carcinicultura na região pelas vantagens que a região oferece, como disponibilidade de água com boas características físico-químicas para o cultivo de camarão, bem como a geração de empregos pela atividade.

Em 2011, cerca de 70% da água utilizada para carcinicultura tinha origem estuarina, e apenas 23% eram provenientes de rios, sendo pouco expressiva a utilização de água oceânica,

de poços e de açudes, mesmo sendo fontes viáveis e com ampla disponibilidade e dispersão geográfica no Brasil, em particular na região Nordeste (ABCC, 2013).

## ***2.2. Carcinicultura em água doce***

A demanda crescente de mercado internacional por camarão cultivado, o adensamento das fazendas nos estuários e a adaptação do *L. vannamei* as águas com baixa salinidade, tem contribuído para o desenvolvimento da carcinicultura em águas interiores de países como Estados Unidos (Arizona, Texas, Alabama e Flórida), Equador, Panamá e Brasil (FIGUEIREDO et al., 2006). No Brasil, esse tipo de cultivo ainda está em expansão, quando já ocupa posição de destaque no ranking mundial dos produtores de camarão (CAMPOS e CAMPOS, 2006).

O *L. vannamei* é tradicionalmente, cultivado em águas litorâneas ou estuarinas (FIGUEIREDO et al., 2006), porém, diferencia-se das demais espécies de camarão cultivadas, por possuir característica eurihalina, suportando por isso, ambiente de baixa salinidade, uma vez que ela é um dos fatores químicos de maior importância para o desenvolvimento e crescimento dos camarões, pois pode alterar as estratégias de utilização dos nutrientes (MENDES et al., 2006). Tal assertiva se baseia na circunstância em que baixos níveis de salinidade, os camarões tendem a usar proteína como fonte de aminoácido, buscando manter a pressão osmótica e seu crescimento (ROSAS et al., 2001).

Bray et al (1994) ao estudarem a interação entre o nível de proteína e a salinidade, no desenvolvimento de *L.vannamei*, relataram que o aumento do teor proteico, na dieta, pode compensar o crescimento diferenciado atribuído à salinidade. Mendes et al. (2006), ao estudarem a aclimação do *L. vannamei* à água doce, com diferentes estratégias de alimentação e calagem, concluíram que pós-larvas podem ser aclimatadas à água doce, na aclimação a concentração de cal exerce influência significativa nos dados zootécnicos da espécie e que a inclusão da artêmia congelada na dieta proporcionou melhores índices de sobrevivência, peso e comprimento final das pós-larvas.

A carcinicultura de água doce tem sido reconhecida como uma forma de produzir crustáceos com baixo impacto ambiental (NEW et al., 2000 apud VALENTI, 2002). Valenti (2002) afirmou que a atividade adapta-se muito bem aos sistemas familiares de produção, atende aos preceitos da aquicultura sustentável e apresenta viabilidade econômica.



De acordo com Oliveira (2014), há 39 criadores de camarão da espécie *Litopenaeus vannamei* nas margens do Rio Paraíba, distribuídos em uma área de 1755 ha. A grande maioria são pequenos produtores, e a atividade gera aproximadamente 125 empregos diretos e 500 indiretos, movimentando mais de R\$ 30.000.000,00, por ano, em áreas onde anteriormente não se utilizava para agricultura e nem para a pecuária.

Ainda, segundo Oliveira (2014), esta região foi escolhida para a implementação da atividade por ter condições físico-químicas favoráveis ao cultivo de *L. vannamei*, e pela probabilidade baixa de contaminação com o WSSV, pois as águas do Rio Paraíba não têm contato direto com águas provenientes dos manguezais e estuários.

### **2.3. *Enfermidades do cultivo de camarão***

O aparecimento de doença, em criatório de camarões, depende de diversos fatores envolvidos em uma interação complexa entre ambiente, patógeno e hospedeiro. A simples presença do patógeno, em princípio, não acarretaria em doença, podendo o camarão conviver com inúmeros patógenos até o fim do cultivo sem acarretar perdas (LIGHTNER e REDMAN, 1998; SNIESZCO, 1974).

Silva (2011) descreveu a saúde do camarão como sendo consequência do equilíbrio entre o meio ambiente e o adequado uso de suas funções, enquanto que a doença, como sendo qualquer distúrbio na saúde ou desempenho zootécnico desses animais.

No cultivo de camarões podem ocorrer doenças não infecciosas, causadas por agentes abióticos (má nutrição, toxinas e efeitos genéticos), como também podem ocorrer doenças infecciosas, causada por agentes patógenos como bactérias, vírus, fungos e parasitos. Dentre esses agentes patógenos, destacam-se os vírus como principal responsável pelo prejuízo econômico e limitante para o desenvolvimento da carcinicultura (FLEGEL et al, 2004; LIGHTNER, 1996; 2005). Dentre as viroses que acometem os peneídeos, destaca-se a Síndrome da Macha Branca (WSSD).

Aquela virose tem grande importância econômica em todo o mundo (KONO et al, 2004), essencialmente, por conta da rápida replicação e alta virulência do agente (SÁNCHEZ-PAZ, 2010). Os surtos dessa doença causaram mortalidade em massa em diversos países, especialmente os asiáticos (SANGAMAHESWARAN e JEYASEELAN, 2001).

A WSSD também já causou surtos no final da década de 1990, no Equador, em um momento de destaque na carcinicultura daquele país (RODRIGUEZ et al, 2003), e pouco depois, por volta de 2005 teve a primeira notificação do Brasil, e desde então, se tem detectado o vírus até em ambientes de água com baixa salinidade (SEIFFERT et al, 2005; CAVALLI et al, 2008; CAVALLI et al, 2011), evidenciando a rápida disseminação do agente.

### **2.3.1. Mancha Branca – WSD**

#### *2.3.1.1. O vírus*

A Síndrome da Mancha Branca (WSSD) é causada pelo Vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV) (LIGHTNER, 2011; OIE, 2012). Foi designado pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) como o único membro do gênero *Whispovirus* dentro da família *Nimaviridae* (OIE, 2012). Vários isolados de WSSV com pequenos polimorfismos genéticos (variantes) foram identificados, entretanto, deve-se levar em consideração que como a *Nimaviridae* é uma família recentemente identificada, logo, o conceito inerente a classificação da espécie estará sujeito a mudar (OIE, 2012).

Os vírios de WSSV possuem forma ovóide ou elipsoide se aproximando de um bacilo, têm uma simetria regular, medem 80-120 nm de diâmetro e 250-380 nm de comprimento (DURAND et al, 1997; LO et al. 2012 apud OIE, 2012; NADALA et al, 1998; van HULTEN et al, 2001), são envelopados, de DNA de cadeia dupla (dsDNA) e densidade aproximadamente de 1,2 g/mL (LIGHTNER, 2011). Apresentam ainda uma extensão de rosca ou flagelos do tipo (apêndice) em sua extremidade. Há diversos isolados identificados em diferentes locais, porém, todos são da mesma espécie viral (LO et al. 2012 apud OIE, 2012).

Momoyama et al (1998) verificaram que esse vírus consegue se manter viável por pelo menos 30 dias, a 30°C sob condições de laboratório. Comprovou-se, também, a viabilidade do WSSV em lagoas por pelo menos 3 a 4 dias (NAKANO et al, 1998 apud OIE, 2012). Kumar et al (2013) demonstraram que em água salgada pode ser mantido por até 12 dias, com permanência de até 19 dias em lagoas de sedimento e que, independente da secagem ao sol e solo, o vírus permaneceu viável por até 35 dias.

Estudos *in vitro* demonstraram que após 12h da infecção por WSSV já ocorrem mudanças metabólicas nas células (CHEN et al, 2011) e com 48h tornam-se visível os efeitos citopáticos (WANG et al, 2000).

Este agente pode ser desativado em 120 minutos a 50°C e 1 minuto a 60°C (NAKANO et al, 1998 apud OIE, 2012).

#### 2.3.1.2. *Susceptibilidade*

Até o momento não há registro de nenhum membro da ordem Decapoda, seja de ambiente marinho, seja de água doce ou salobra, resistente ao WSSV (FLEGEL, 1997; HOSSAIN et al, 2001; LIGHTNER, 1996; MAEDA et al., 2000; STENTIFORD et al, 2009). Inclusive com registro de infecção em diversas espécies selvagens (OIE, 2012).

Todas as espécies de camarões peneídeos são altamente suscetíveis à infecção, muitas vezes resultando em mortalidade alta. Lightner (1996) afirma que o camarão pode se infectar com o WSSV em todas as fases de sua vida, de ovos a reprodutores. A infecção por WSSV pode ocorrer de forma vertical (trans-óvulo), horizontal pelo consumo de tecido infectado (por exemplo, o canibalismo, predação, etc.) e por veiculação hídrica. Pode, também, haver indivíduos infectados, porém, aparentemente saudáveis, que também veiculam o vírus (OIE, 2012).

Quanto aos vetores e reservatórios deste vírus, estudos revelaram a capacidade do zooplâncton, em especial, de rotíferos carrear o WSSV (ZANG et al, 2006), exceto em forma de ovo (YAN et al, 2007). De modo semelhante, algumas poliquetas foram identificadas como fonte de infecção em carcinicultura (HARDYADI et al, 2015; VIJAYAN et al, 2005).

Também endossam a lista de suscetíveis e possíveis reservatórios os caranguejos (DING et al, 2015; LO et al, 1996; POWELL et al, 2015), lagostas (LO et al, 1996; MUSTHAQ et al, 2006), inseto da família Ephydriidae (LO et al, 1996), lagostim (HUANG et al, 2015; LIRAVANICHPAISAL et al, 2001), copépodes (ZHANG et al, 2008) e até artêmia (LI et al, 2003; ZHANG et al, 2010). Os estudos sobre os suscetíveis são inúmeros, tamanha a sua importância na biossegurança de uma fazenda de cultivo de camarão.

### 2.3.1.3. Perfil da doença

Surtos de WSSD podem ser desencadeados por fatores de estresse, tais como mudanças bruscas de salinidade ou de temperatura (GRANJA et al, 2003; VIDAL et al., 2001) ou até mesmo, a própria desova (LIN et al, 2012). Na fase aguda, os camarões infectados pelo WSSV tem uma redução do apetite, letargia e sua cutícula solta-se. Pode-se observar algumas manchas brancas de aproximadamente 2,0 mm de diâmetro (podendo se aglutinar em placas maiores), no lado interno da carapaça, mas que podem também estar presentes em qualquer parte da superfície interior do exoesqueleto (LIGHTNER, 2011; OIE, 2012).

As manchas brancas representam depósitos anormais de sais de cálcio pelo epitélio cuticular infectado com WSSV (LIGHTNER, 2011). Essas manchas brancas não podem, por si só, serem atribuídas exclusivamente a WSSD, uma vez que a alta alcalinidade e bacterioses também podem causá-las, assim como outras variações de cores como tons de rosa e vermelho (OIE, 2012). Nas criações, nas quais ocorrem tais alterações, há a presença de taxas de mortalidade alta, podendo chegar a 100% em poucos dias (LIGHTNER, 2011; OIE, 2012).

O WSSV infecta principalmente os tecidos de origem embrionária ectodérmica e mesodérmica, especialmente o epitélio cuticular e tecidos conjuntivos subcuticulares (WONGTEERASUPAYA, et al., 1995). Embora o WSSV infecte o tecido conjuntivo subjacente ao hepatopâncreas e intestino, as células epiteliais tubulares destes dois órgãos, mesmo sendo de origem endodérmica, não são envolvidas (OIE, 2012). Esse vírus também mostra tropismo por órgãos reprodutivos (LO et al, 1997).

Em preparações de “squash” de brânquias e/ou epitélio cuticular, pode-se visualizar núcleos hipertrofiados e, em camarões altamente infectados, detecta-se inclusões intracelulares eosinofílicas (OIE, 2012). Essas inclusões também podem ser visualizadas em cortes histológicos de epitélio cuticular, tecido conectivo, e menos frequentemente em epitélio de glândula antenal, membrana das células de órgãos linfoides, tecidos hematopoiéticos, e fagócitos do coração fixados (LIGHTNER, 2011). Normalmente, um núcleo infectado por WSSV, contém um único corpo de inclusão (LIGHTNER, 2011).

### 2.3.1.4. Diagnóstico de WSSD

As principais formas de diagnóstico para essas enfermidades são a observação de mudanças comportamentais, exame a fresco, histopatológico, *Loop-mediated Isothermal Amplification* (ou

Amplificação Isotérmica Mediada por Loop - LAMP), *Polymerase Chain Reaction* (ou Reação em Cadeia de Polimerase - PCR) e hibridização *in situ* (OIE, 2012; 2014). Para chegar a um diagnóstico diferencial é aconselhável a utilização de um segundo método diagnóstico além do exame a fresco e histopatológico, como por exemplo hibridização *in situ*, PCR ou LAMP (LIGHTNER 2011; OIE, 2012).

Segundo a OIE (2012), os únicos testes altamente recomendados para vigilância em juvenis e adultos, diagnóstico presuntivo e diagnóstico definitivo são PCR e LAMP. Dentre essas, a LAMP se destaca por ser um teste mais barato, com uma reação mais simples e de maior eficiência, quando comparado com PCR (PARIDA, et al, 2008). Também relata-se que a LAMP possui maior especificidade, sensibilidade e estabilidade durante o teste (DHAMA et al, 2014).

Desde seu desenvolvimento e divulgação em 2000 (NOTOMI et al, 2000), a LAMP vem sendo amplamente utilizada nos estudos relacionados ao WSSV, como por Kono et al (2004), que elaboraram pela primeira vez, os iniciadores específicos para detecção do WSSV e realizaram a LAMP, comparando-a com a PCR e obtiveram resultados positivos. Em 2009, Jaroenram et al, desenvolveram um LAMP combinado com *Chromatographic Lateral Flow Dipstick* (LFD), a fim de diminuir o tempo e custo da LAMP, e também obtiveram resultados positivos.

#### 2.3.1.5. *Loop-Mediated Isothermal Amplification ou Amplificação Isotérmica Mediada por Loop – LAMP*

LAMP é uma técnica de amplificação isotérmica do DNA desenvolvida por Notomi et al (2000), que para sua realização, são necessários quatro iniciadores específicos, complementares a fita de DNA alvo (que se deseja a amplificação). Esses iniciadores são usualmente denominados FIP (*Forward Inner Primer*), BIP (*Backward Inner Primer*), F3 ou FOP (*Forward Outer Primer*), e B3 ou BOP (*Backward Outer Primer*) (PREMIER BIOSOFT).

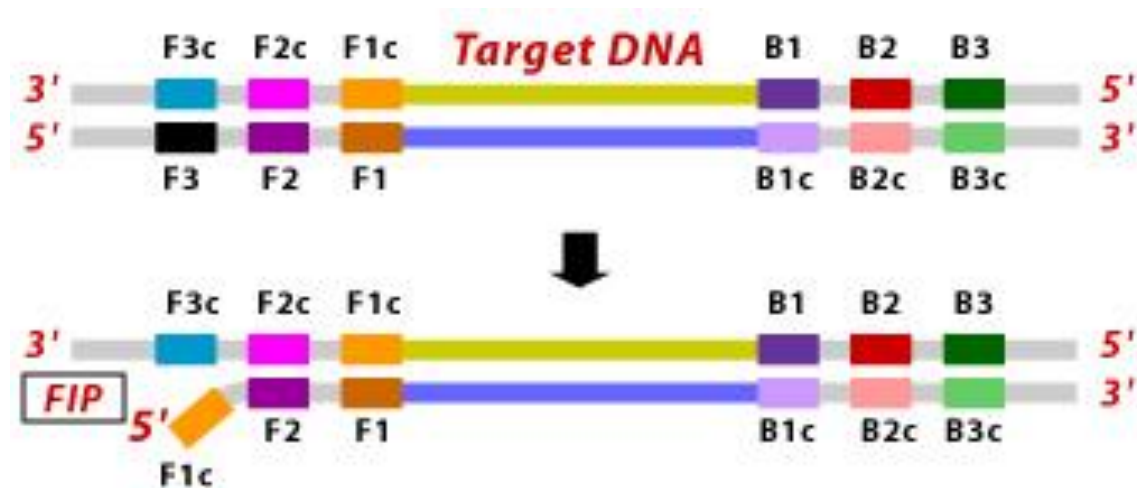
Os iniciadores são desenvolvidos a partir de seis regiões distintas do DNA alvo, sendo elas F3<sub>c</sub>, F2<sub>c</sub> e F1<sub>c</sub>, localizados na extremidade 3' e B3, B2 e B1 na extremidade 5' (CHIARI, 2010). Outro elemento importante na LAMP é a DNA polimerase, *Bst* DNA Polimerase (*Bacillus stearothermophilus*), pois é uma enzima capaz de deslocar a fita de DNA, dispensando dessa forma a necessidade de uma desnaturação térmica da dupla fita de DNA para que ocorra sua separação (DRAPALA e KORDALEWSKA, 2012).

Toda a reação ocorre em uma temperatura constante de 65°C, durante 1h (NOTOMI et al, 2000). Todo o processo pode ser dividido em duas etapas, uma não cíclica e uma cíclica (DRAPALA e KORDALEWSKA, 2012). Na primeira etapa da LAMP, todos os quatro iniciadores são utilizados, posteriormente somente os FIP e BIP são usados (NOTOMI et al, 2000). LAMP recebe esse nome devido ao produto gerado após oito passos da etapa não cíclica, que acaba por formar uma fita complementar em forma de halteres (ou grampo) (CHIARI, 2010).

A etapa não cíclica da reação da LAMP pode ser descrita da seguinte forma:

(1) Começa com o iniciador FIP se ligando a região F2<sub>c</sub> do DNA alvo e assim iniciando a formação de uma fita complementar (figura 1) (EIKEN CHEMICAL CO., 2016; NOTOMI et al, 2000; PREMIER BIOSOFT, 2016).

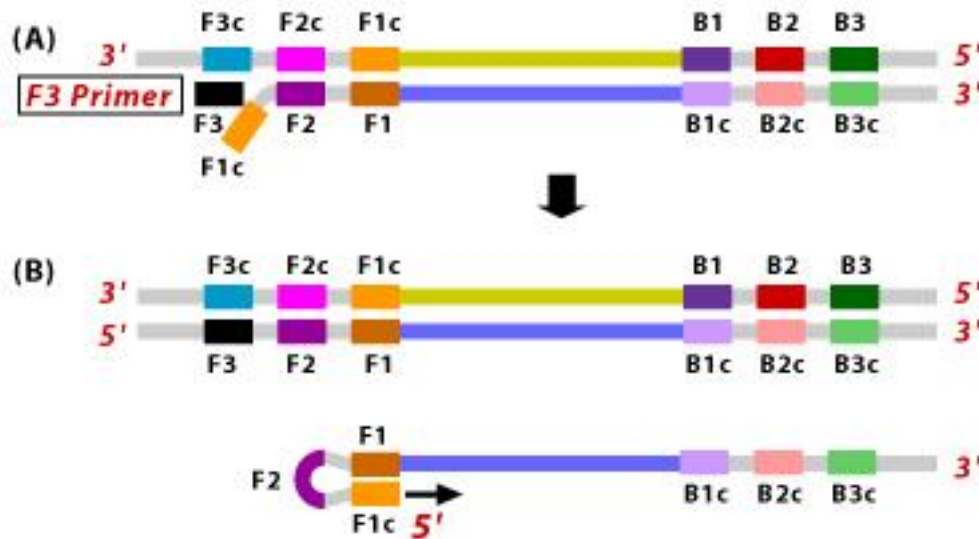
Figura 1: Primeiro passo da etapa não cíclica da reação LAMP.



Fonte: Adaptado de Premier Biosoft, disponível em: [http://www.premierbiosoft.com/tech\\_notes/Loop-Mediated-Isothermal-Amplification.html](http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/Loop-Mediated-Isothermal-Amplification.html)

(2) Em seguida o iniciador F3 lentamente se liga a região F3<sub>c</sub> do DNA alvo e inicia a formação de outra fita complementar ao DNA alvo, liberando a fita complementar iniciada pelo FIP (figura 2 A). A fita complementar liberada forma um “loop” na extremidade 5’ devido a afinidade da região F1<sub>c</sub> e F1 (figura 2 B) (EIKEN CHEMICAL CO., 2016; NOTOMI et al, 2000; PREMIER BIOSOFT, 2016).

Figura 2: Segundo passo da etapa não cíclica da reação LAMP.

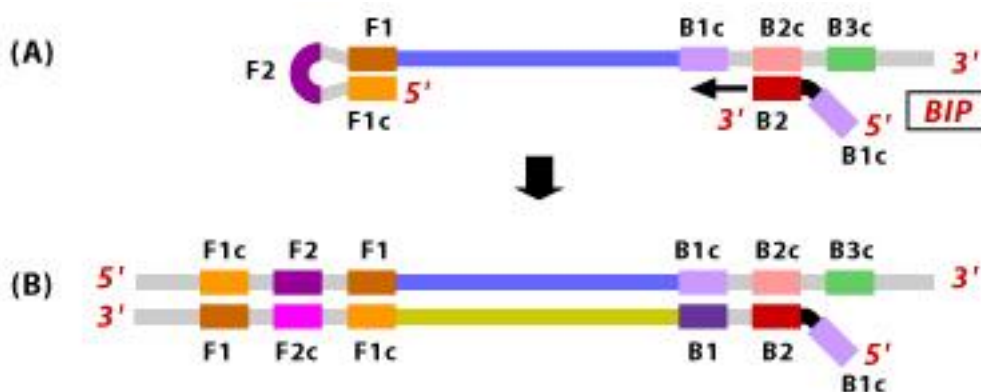


Fonte: Adaptado de Premier Biosoft, disponível em:

[http://www.premierbiosoft.com/tech\\_notes/Loop-Mediated-Isothermal-Amplification.html](http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/Loop-Mediated-Isothermal-Amplification.html)

(3) Essa fita simples de DNA com um "loop" serve como modelo para que o iniciador BIP se ligue a extremidade 3' e se inicia a formação de uma fita complementar a que ele se ligou (figura 3 A). Durante esse processo o "loop" se desfaz e a fita fica linear novamente (figura 3 B) (EIKEN CHEMICAL CO., 2016; NOTOMI et al, 2000; PREMIER BIOSOFT, 2016).

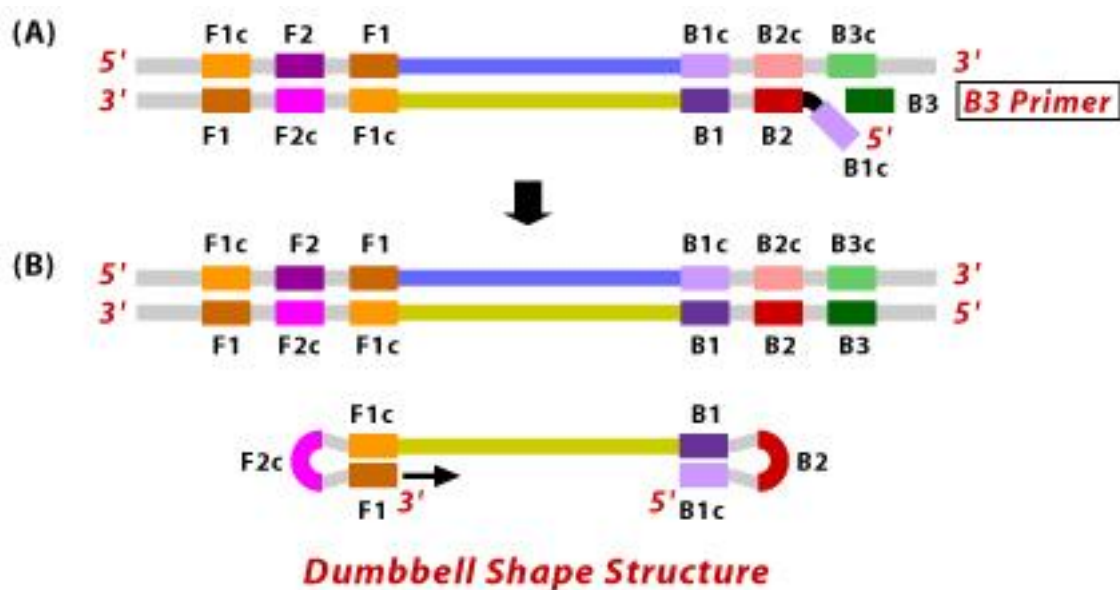
Figura 3: Terceiro passo da etapa não cíclica da reação LAMP.



Fonte: Adaptado de Premier Biosoft, disponível em: [http://www.premierbiosoft.com/tech\\_notes/Loop-Mediated-Isothermal-Amplification.html](http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/Loop-Mediated-Isothermal-Amplification.html)

(4) O iniciador B3 se liga ao BIP e por meio da ação da DNA polimerase começando da extremidade 3' (figura 4 A), que então libera essa nova fita simples de DNA, que irá formar dois “*loops*”, uma em cada extremidade da fita, ficando com o formato de um haltere (ou grampo) (figura 4 B). Essa estrutura é que inicia a etapa cíclica da LAMP, onde ocorre a maior amplificação (EIKEN CHEMICAL CO., 2016; NOTOMI et al, 2000; PREMIER BIOSOFT, 2016).

Figura 4: Quarto passo da etapa não cíclica da reação LAMP.

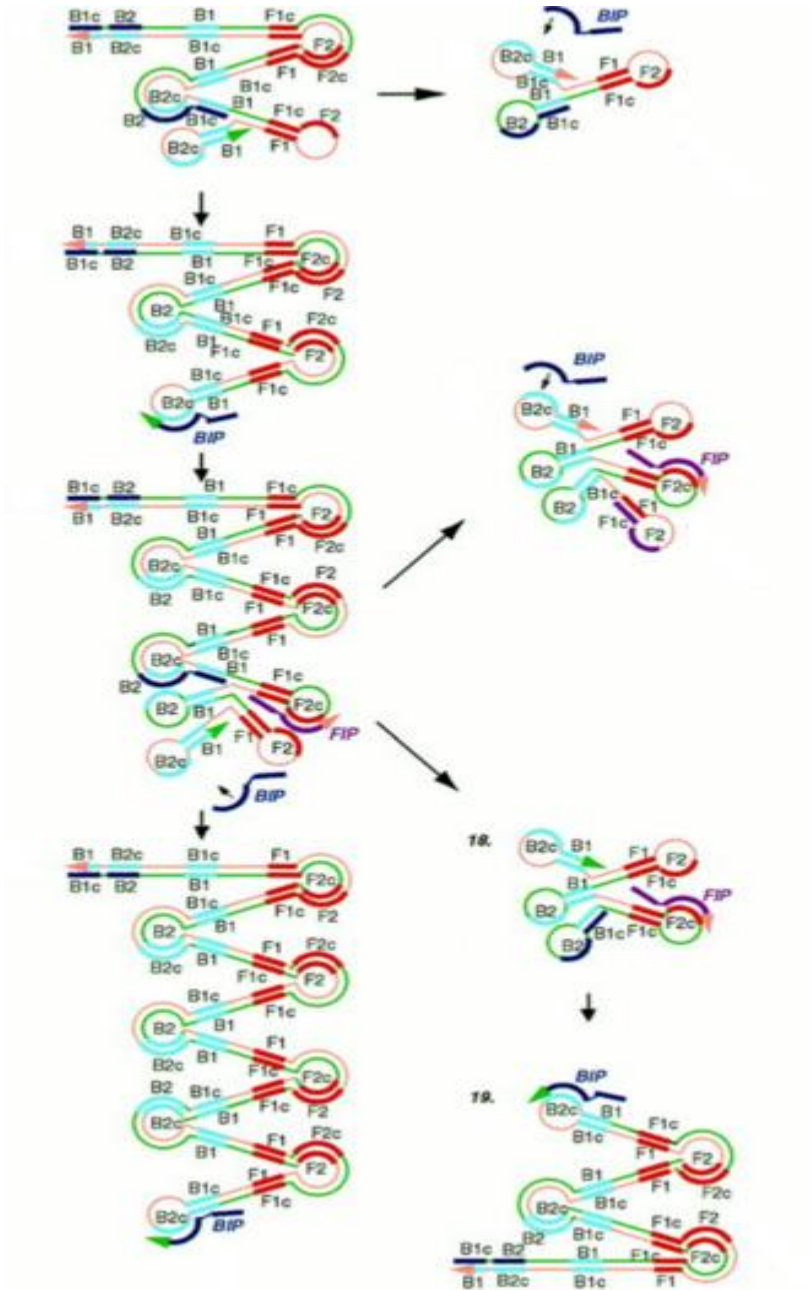


Fonte: Adaptado de Premier Biosoft, disponível em: [http://www.premierbiosoft.com/tech\\_notes/Loop-Mediated-Isothermal-Amplification.html](http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/Loop-Mediated-Isothermal-Amplification.html)

Na etapa cíclica, os iniciadores FIP e BIP se ligam a região de “*loop*” e iniciam a formação de mais fitas de DNA, formando estruturas com formato parecido com um couve-flor (NOTOMI et al, 2000) (figura 5).



Figura 5: Produto final da LAMP, fitas longas de DNA, em processo de amplificação.



Fonte: Adaptado de Notomi et al (2000).

### 3. Material e métodos

#### 3.1. Local para colheita das amostras

No Rio Paraíba, que é o mais importante do estado da Paraíba, cuja bacia hidrográfica é a segunda maior do estado, abrangendo 38% de seu território (AESAs, 2016; SILVA, 2003). Tendo aproximadamente 300 km de extensão, nascendo na Serra Jabitacá, no município de Monteiro e deságua na região canavieira, na planície litorânea (SILVA, 2003). Foi realizado o estudo, com base em amostras às margens do Rio Paraíba, coletadas no Vale do Paraíba, trecho no qual o rio não recebe nenhum afluente. O Vale está localizado entre a região do médio e do baixo Paraíba, distando aproximadamente 100Km da foz.

As coletas foram realizadas durante o mês de julho de 2015. Foram demarcados oito pontos de coleta, em ambas as margens do Rio Paraíba, sendo o georreferenciamento destes ilustrados no quadro 1 abaixo:

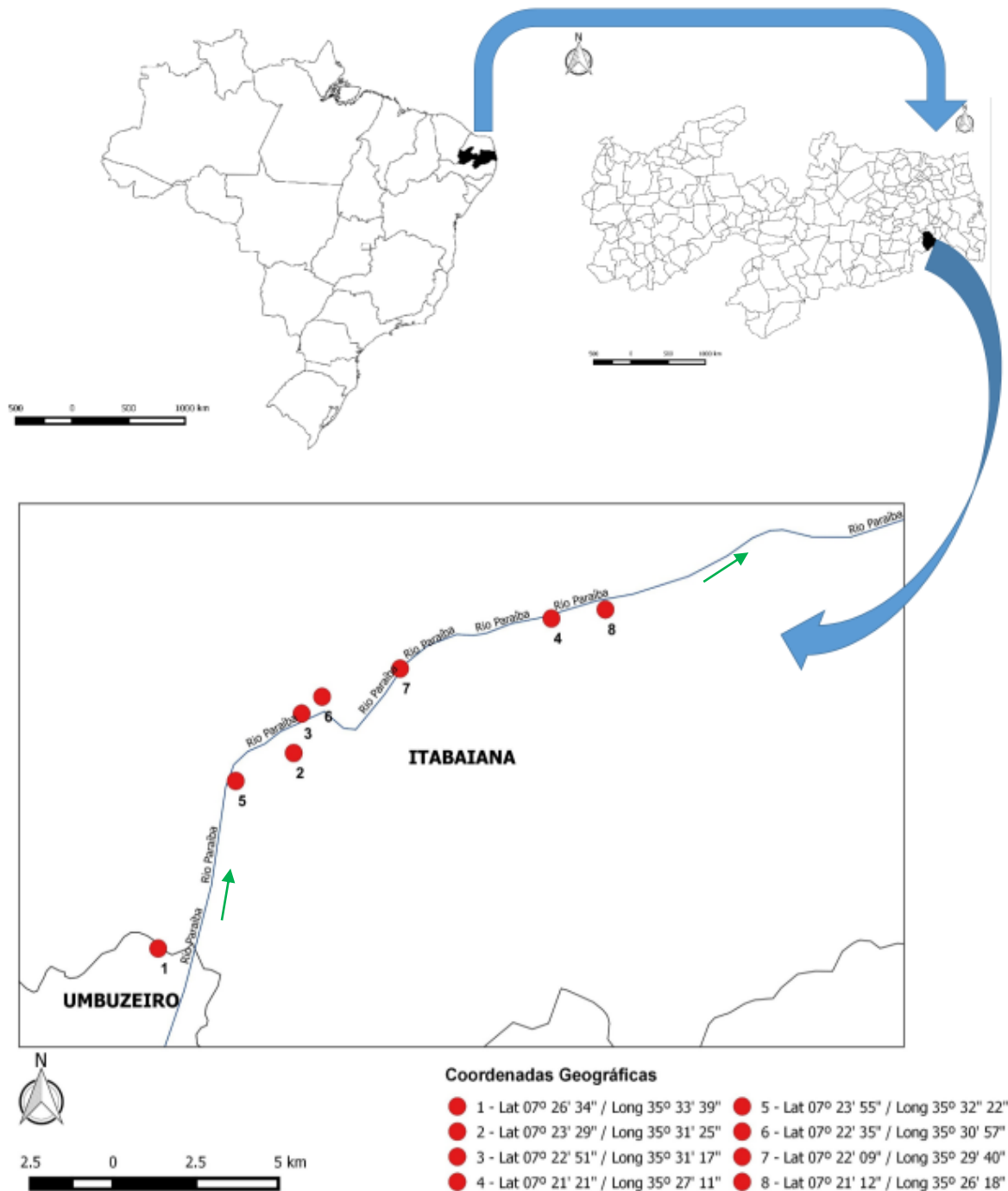
Quadro 1: Listagem dos pontos de coleta no Rio Paraíba – PB, e seus respectivos georreferenciamento.

Pontos	Latitude	Longitude
P1	07°26'34''	35°31'25''
P2	07°23'29''	35°31'25''
P3	07°22'51''	35°31'17''
P4	07°21'21''	35°27'11''
P5	07°23'55''	35°32'22''
P6	07°22'35''	35°30'57''
P7	07°22'09''	35°29'40''
P8	07°21'12''	35°26'18''

Fonte: Arquivo pessoal.

O primeiro foi na barragem de Acauã (Argemiro de Figueiredo), que dista cerca de 20 Km a montante do último ponto de coleta, como ilustrado na figura 6. Os pontos foram escolhidos de acordo com o acesso ao local de coleta e proximidade com pontos de captação de água para criação de *L. vannamei*, sendo distribuídos quatro pontos em cada margem do rio, portanto, em alguns momentos os pontos se intercalam ao longo do rio.

Figura 6: Ilustração da localização geográfica dos pontos de coleta no Rio Paraíba – PB, para pesquisa de WSSV.



Fonte: Arquivo pessoal. Setas verdes indicando a direção do fluxo de água do rio.

### **3.2. Amostragem**

Para monitoramento ambiental e identificação de possíveis reservatórios e/ou vetores na natureza, foram coletados espécimes de camarão *Palaemon pandaliformis*, e moluscos *Pomacea lineata* e *Melanoides tuberculatus*. Estas foram as espécies escolhidas após observações sobre sua predominância no trecho estudado do Rio Paraíba.

Em cada ponto de coleta, foram capturadas manualmente, 10 amostras de cada espécie. Os animais foram coletados no Rio Paraíba e imediatamente acondicionados em potes plásticos de boca larga e tampa em rosca.

Após a coleta, os animais foram submetidos a insensibilização por choque térmico, sendo colocado gelo no recipiente plásticos no qual estavam acondicionados (BOUCENNA et al, 2015; FU et al, 2014; MILINSK et al, 2004; SUNILA e VISEL, 2015; WANG et al, 2000).

Em seguida, os *P. pandaliformis* tiveram seu cordão nervoso cortado e se procedeu a retirada de fragmentos das brânquias, uma vez que é nesta região onde espera-se encontrar a maior concentração do WSSV. Os *P. lineata* tiveram cerca de 10mm<sup>2</sup> retirados dos pés e os *M. tuberculatus* foram utilizados por inteiro, após a retirada da carapaça.

No P1 foram coletados um *M. tuberculatus*, quatro *P.pandaliformis*, e quatro *P. lineata*, acondicionados em formol e encaminhados ao Laboratório de Malacologia, do Departamento de Pesca da Universidade Federal Rural de Pernambuco, para realização de identificação taxonômica pelo Prof. Dr. José Carlos Nascimento de Barros.

### **3.3. Extração de DNA e Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP)**

As análises moleculares foram realizadas no Laboratório de Análises Moleculares da Potiporã. Primeiramente, as amostras foram codificadas com numeração de um a 147, e em seguida, foram fracionadas ao meio, para que se utiliza-se uma parte e ainda tivesse amostra guardada para qualquer eventualidade. As amostras foram lavadas por meio da adição de 1000 µL de água ultra-pura livre de DNase (LGC Biotecnologia) e, centrifugadas (Mikro 120 – Hettich) a 1400 rpm durante cinco minutos, com posterior descarte da água. Esse processo se repetiu cinco vezes até que não houvesse mais resíduos de etanol nas amostras.

Com as amostras sem resíduos, procedeu-se a maceração para extração do DNA, que foi conduzida por meio da utilização do Kit de Extração de DNA (Concepto Azul, Equador), conforme as instruções do fabricante. A extração se deu adicionando 400 µL do reagente R1 em cada microtubo seguido de incubação a 95°C por 10 minutos, então as amostras foram colocadas na centrífuga (Mikro 120 – Hettich) a 1400 rpm durante cinco minutos, e 200 µL do sobrenadante foram transferidos para um novo microtubo contendo 400 µL do reagente R2A e centrifugados (Mikro 120 – Hettich) a 1400 rpm durante cinco minutos, retirando-se o sobrenadante, sendo adicionados 200 µL do reagente R2B e novamente centrifugados (Mikro 120 – Hettich) a 1400 rpm durante cinco minutos. Retirou-se o sobrenadante e adicionou-se novamente 200 µL do reagente R2B, com posterior centrifugação (Mikro 120 – Hettich) a 1400 rpm durante cinco minutos. Concluída essa etapa, retirou-se o sobrenadante e acrescentou-se 100 µL de água ultra-pura livre de DNase (LGC Biotecnologia). O DNA extraído foi armazenado a -20°C até posterior uso na LAMP.

Aplicou-se o Kit LAMP para WSSV (Concepta Azul, Equador), segundo as instruções do fabricante no qual dois µL de DNA extraído das amostras foram misturados ao Mix do Kit (descrito no quadro 02) e água ultrapura para q.s.p de 14µl. Em seguida colocou-se os tubos no termociclador (T1 Thermocycler 96 - Biometra) durante uma hora com a temperatura constante de 65°C.

Os produtos da LAMP (234 pb) foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 3%, durante 10 minutos a 225V. Em todos os géis, foram inseridos controles positivo e negativo (água ultra-pura livre de DNase (LGC Biotecnologia)).

Quadro 02: Relação dos constituintes do Mix do Kit LAMP para WSSV (Concepta Azul, Equador).

Componente	Fabricante	Concentração final
dNTP Mix	Promega	1,5mM
Solução de MgSO <sub>4</sub>	Uniscience do Brasil LTDA	6,25nM
Thermo Pol Reaction Buffer Pack	New England Bio LabsInc	1X
Betaine Solution	Sigma	1M
Bst DNA Polymerase Large Fragment	New England Bio LabsInc	8U
FIP WSSV	Potiporã - Concepta Azul	1,4 ρ moles

BIP WSSV	Potiporã - Concepta Azul	1,4 ρ moles
F3 WSSV	Potiporã - Concepta Azul	0,7 ρ moles
B3 WSSV	Potiporã - Concepta Azul	0,7 ρ moles

Fonte: Arquivo pessoal.

### ***3.4. Análise estatística***

A análise estatística empregada foi do tipo descritiva por meio das distribuições de frequências absolutas e relativas segundo Sampaio (1998). E também foi calculado o Intervalo de Confiança para proporção, utilizando a fórmula a seguir:

$$IC = \frac{NS}{Total} \pm Z . erro$$

#### 4. Resultados

Coletou-se um total 147 amostras, sendo 40 de *Melanoides tuberculatus* (27%) (figura 07 - A), 26 de *Pomacea lineata* (18%) (figura 07 - B) e 81 de *Palaemon pandaliformis* (55%) (figura 07 - C), todos adultos. Ao exame a fresco, todos os espécimes coletados apresentavam-se aparentemente hígidos.

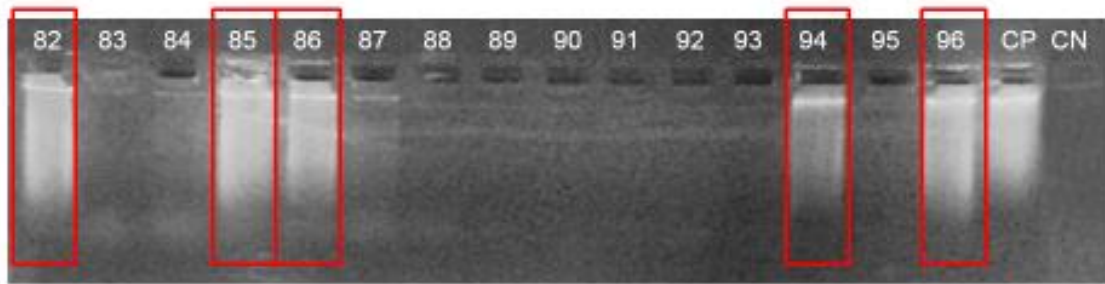
Figura 07: Espécimes adultos coletados. A – *M. tuberculatus*; B – *P. lineata*; C – *P. pandaliformis*.



Fonte: Arquivo pessoal.

Todas as amostras foram submetidas a LAMP, e conseqüentemente efetuada a leitura das placas em eletroforese, a fim de identificar as amostras positivas e as negativas para a presença do WSSV, com a ajuda do controle positivo e do controle negativo presentes nas placas, como ilustrado na figura 08.

Figura 08: Eletroforese de LAMP para detecção do WSSV.



Fonte: Arquivo pessoal. Amostras positivas para WSSV destacadas em vermelho. CP – Controle positivo e CN – Controle negativo.

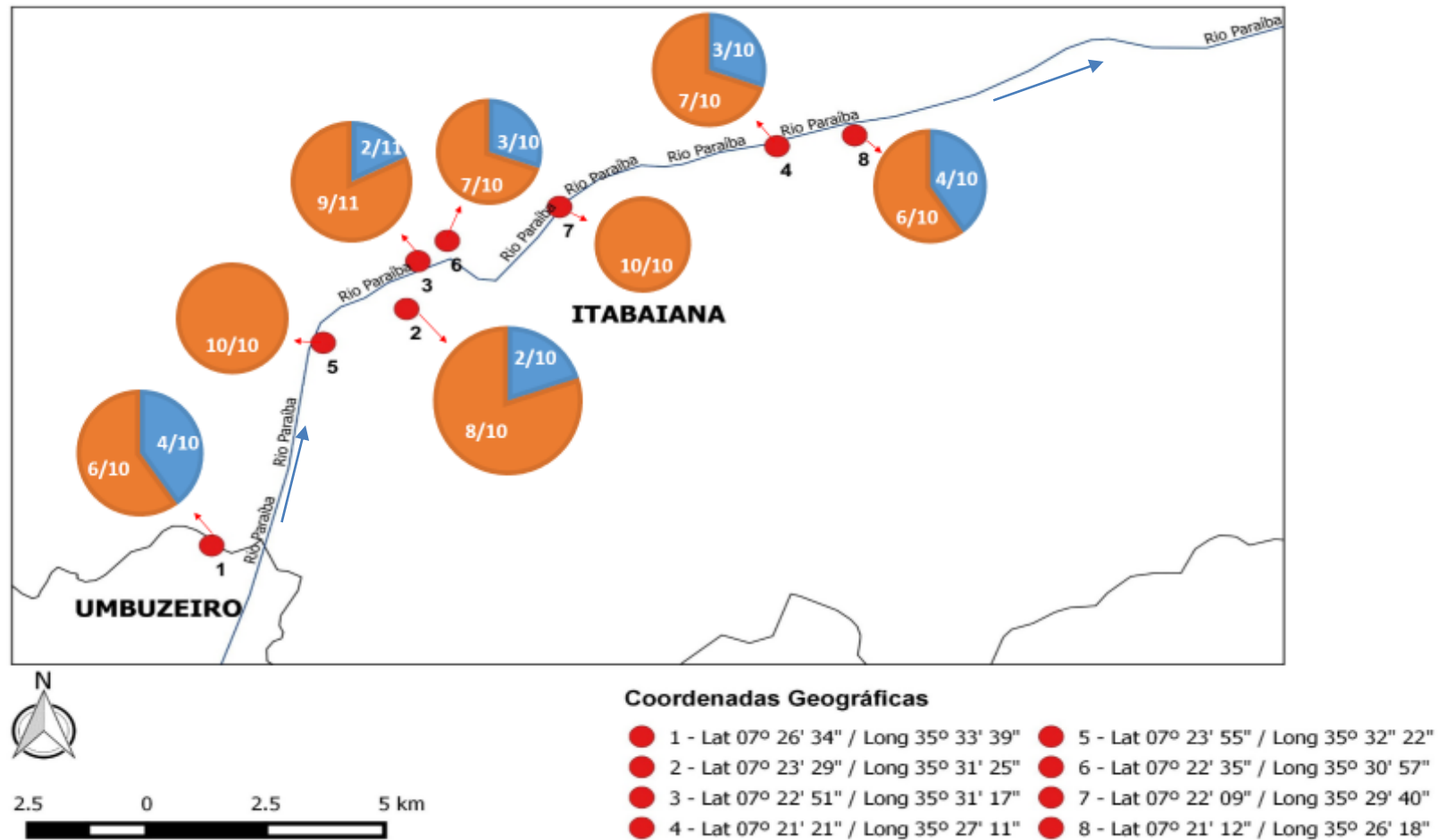
A distribuição dos resultados sobre a presença de WSSV, obtidos pela LAMP, das espécies *Palaemon pandaliformis*, *Pomacea lineata* e *Melanoides tuberculatus*, estão dispostos nas figuras 9, 10 e 11, respectivamente, de acordo com o ponto de coleta, devidamente indicado na imagem. Nos pontos P2, P4, P6 e P8 não se conseguiu coletar algum exemplar da espécie *Pomacea lineata*, por não terem sido encontrados no local, nem próximos ao ponto de captação de água, portanto, não há gráfico representativo. O mesmo ocorreu com a espécie *M. tuberculatus*, nos pontos P3, P4, P7 e P8.

Observando as figuras 9, 10 e 11, percebe-se que no P1 houve o maior número de coletas, 10 exemplares de cada espécie, e que nesse ponto encontrou-se positivos para WSSV em todas as espécies. No P5 também houve coleta de todas as espécies, porém, nenhum positivo para WSSV na espécie *P. pandaliformes*. Nos pontos P4 e P8, só houve a coleta de camarões (*P. pandaliformes*), em ambos com animais positivos para WSSV pela LAMP. Nos demais pontos houve coleta de pelo menos duas espécies. No P7, mesmo com a coleta de 20 espécimes (10 *P. pandaliformes* e 10 *P. lineata*) não encontrou-se nenhum animal positivo para a presença do WSSV.

A espécie *P. lineata* foi a com menor número de espécimes coletados, apresentando um Intervalo de Confiança (IC) de  $7,69 \pm 10,24\%$ . Seguida pela *M. tuberculatus*, que apresentou um IC de  $32,50 \pm 14,51\%$ . E com o maior número de espécimes coletados, está a espécie *P. pandaliformes*, apresentando o IC de  $22,22 \pm 9,05\%$ .

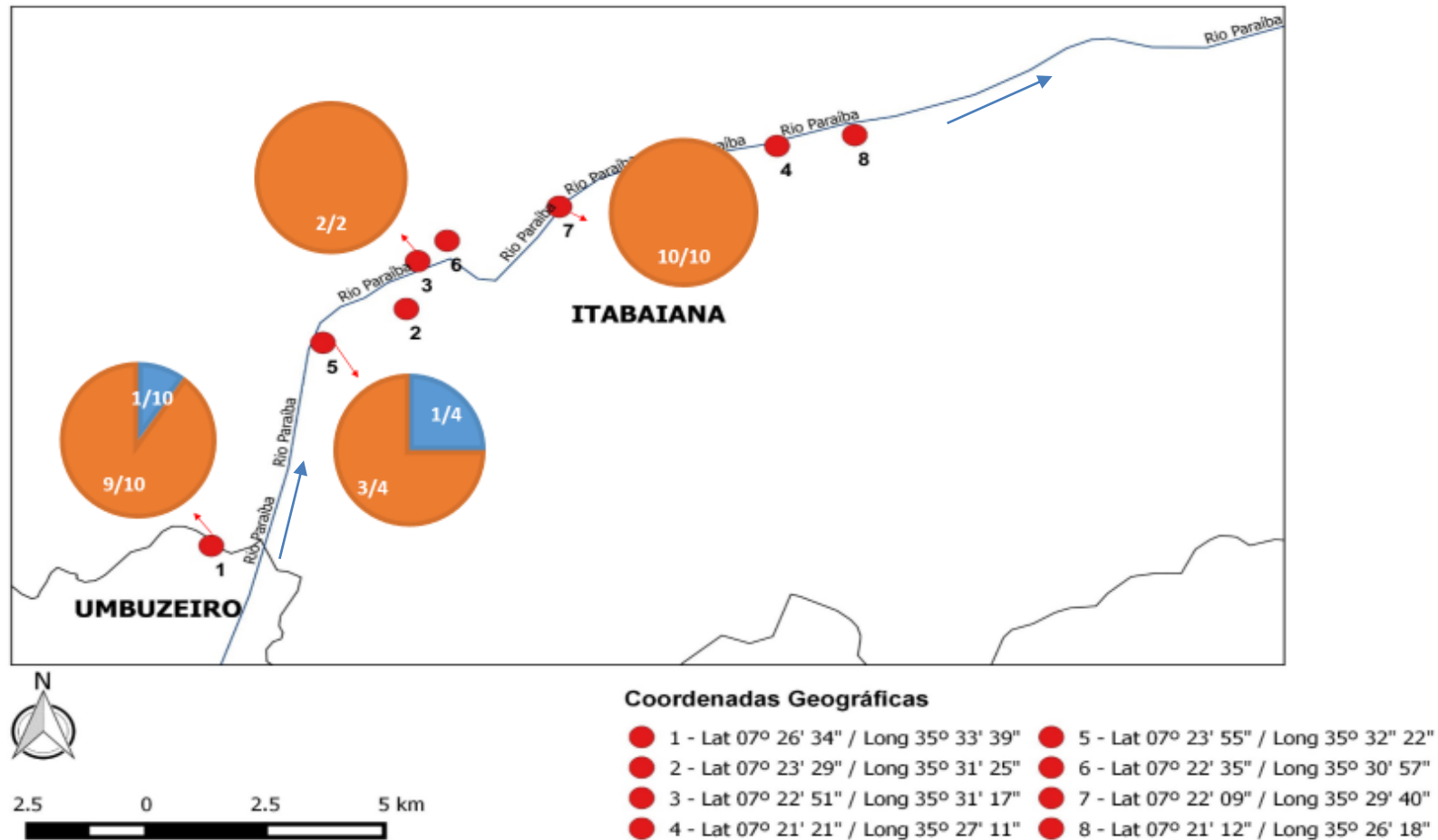


Figura 9: Distribuição espacial dos valores relativos dos resultados obtidos pela LAMP na espécie *Palaemon pandaliformis*.



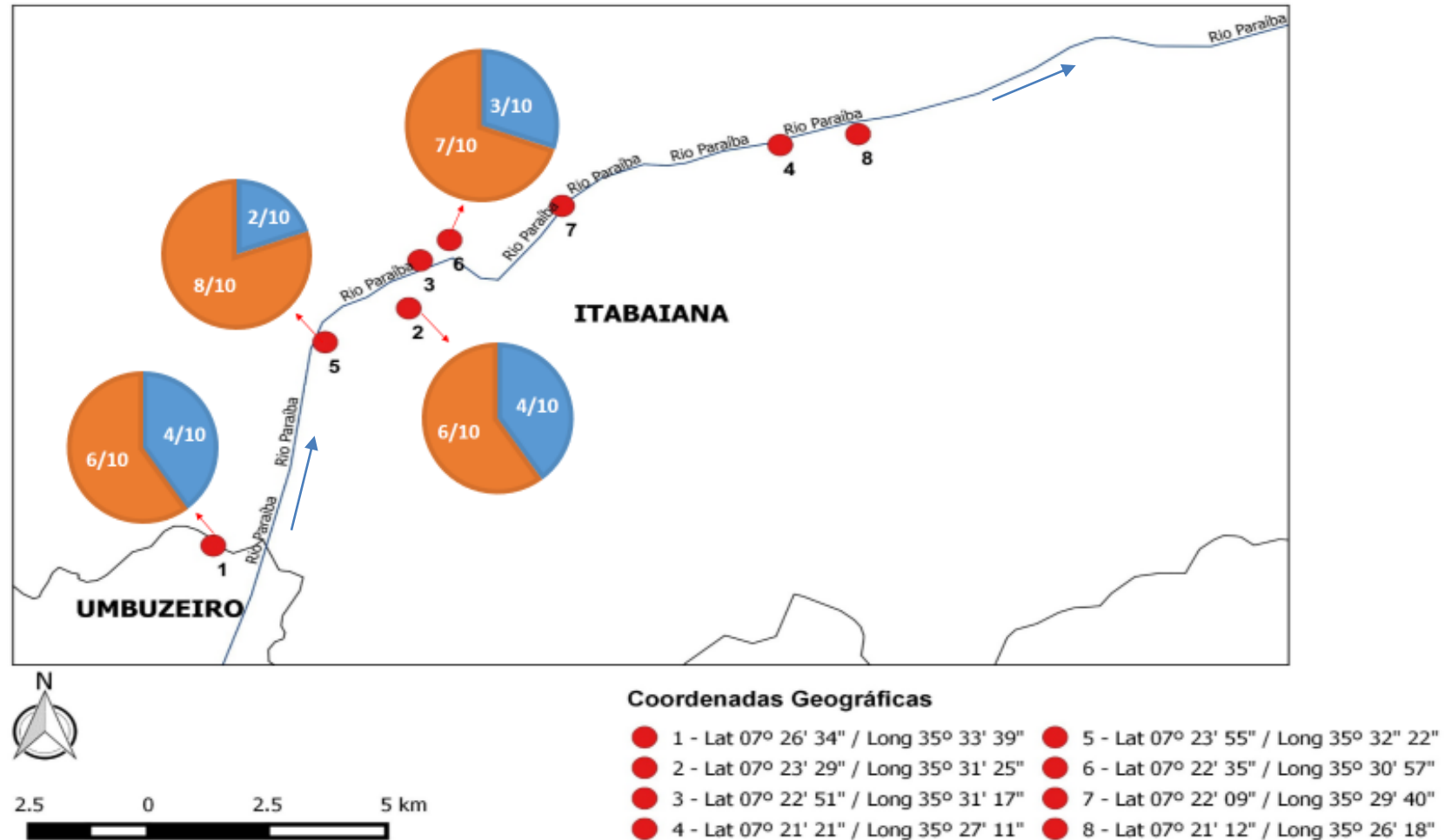
Azul indica os valores positivos e laranja os valores negativos, as setas azul indicam o fluxo das águas do rio. Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 10: Distribuição espacial dos valores relativos dos resultados obtidos pela LAMP na espécie *Pomacea lineata*.



Azul indica os valores positivos e laranja os valores negativos, as setas azul indicam o fluxo das águas do rio. Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 11: Distribuição espacial dos valores relativos dos resultados obtidos pela LAMP na espécie *Melanoides tuberculatus*.



Azul indica os valores positivos e laranja os valores negativos, as setas azul indicam o fluxo das águas do rio. Fonte: Arquivo pessoal.

## 5. Discussão

Na região do Vale do Paraíba, na Paraíba, a carcinicultura tem se desenvolvido, por meio da utilização das águas do rio Paraíba que percorre todo o vale (OLIVEIRA, 2014). Já em 2006, Figueiredo et al, apontaram que a expansão da carcinicultura em águas interiores, especialmente da espécie *Litopenaeus vannamei* tem contribuído para o desenvolvimento da atividade em diversos países, incluindo o Brasil. Toda via, essa atividade tem se expandido espontaneamente, sem uma política que a regulamente (FIGUEIREDO, 2006).

Mesmo sem uma política regulamentadora, o cultivo de *L. vannamei* em água oligohalina, impulsionou diversos estudos buscando dados zootécnicos de produção e produtividade da espécie (ARANEDA et al, 2008; FONSECA et al, 2009; MENDES et al, 2006; ROSAS et al, 2001; SILVA, 2010; SPANGUERO et al, 2008), bem como sobre sua viabilidade econômica (CAMPOS e CAMPOS, 2006). Todos apontaram resultados satisfatórios, indicando a possibilidade de expandir a atividade em território nacional de forma lucrativa, como exemplo a instalação e expansão da atividade carcinícola as margens do rio Paraíba desde 2013 (ITABAIANA 24 HORAS, 30/09/2013).

Contudo, Figueiredo et al (2006) apontaram diversos problemas relativos a expansão da carcinicultura em águas interiores, dentre eles estão o elevado consumo de água doce, concorrendo com outros usos e ao lançamento de efluentes diretamente nos corpos d'água. Na Região de Itabaiana a chuva escassa vem causando problemas de abastecimento e utilização da água do rio Paraíba, tornando o acesso a água, por parte dos carcinicultores, restrito (G1 – PB, 17/10/2015; JORNAL DA PARAÍBA, 17/10/2015) e em pouco tempo proibindo o uso da água do rio Paraíba (CAGEPA, 09/11/2015), diminuindo assim a produtividade de uma atividade altamente rentável.

Além disso, pouco se sabe sobre agentes patógenos aos camarões cultivados, que estejam presentes nesses novos ecossistemas explorados, o que pode influenciar diretamente nas medidas de biossegurança a serem tomadas. Espera-se que com a mudança de habitat, a incidência de doenças no cultivo de *L. vannamei* diminua (ARANEDA et al, 2008). Todavia, carcinicultores de diversos países, estão sofrendo prejuízos por causa do *Vibrio cholerae*, mesmo que ainda não reportada no Brasil, essa vibriose tornou-se o maior problema atual em criações de *L. vannamei* em água doce (CAO et al, 2015; WANG et al, 2013).

Produtores do Vale do Paraíba relataram o surgimento de uma doença cujas características epidemiológicas se assemelham a WSSD. Em ambientes de água salubre já se detectou a presença do WSSV em camarões (CHAKRABARTY et al, 2014; PEÑA et al, 2007) e outros crustáceos (MARQUES et al, 2011; POWELL et al, 2015). Desse modo, ainda que não se tenha estudo anterior na região, a hipótese deste trabalho quanto a ocorrência se confirmou.

Ao se detectar o WSSV em crustáceo e moluscos silvestres do rio Paraíba (*Palaemon pandaliformis*, *Pomacea lineatae* *Melanoides tuberculatus*), reforça a preocupação quanto as criações considerando que os locais de coleta coincidem com os pontos de captação de água para os criatórios e estando o vírus presente, o risco aumenta. Neste sentido, o monitoramento dos possíveis reservatórios na natureza é crucial, como citam Martorelli et al (2010).

E para tanto, a escolha do exame LAMP, seguindo as recomendações da OIE, torna-se o mais viável (OIE, 2012), mesmo sendo uma técnica relativamente recente (NOTOMI et al, 2000) está sendo amplamente explorada no âmbito da patologia de animais aquáticos, como estudos buscando desenvolver iniciadores para doença mais recente que a WSSD (KONGRUENG et al, 2015), bem como usada em consorcio com outras técnicas, buscando identificar e quantificar agentes (ZHONG, et al, 2016). E em alguns momentos, quando comparada a PCR, a LAMP mostrou resultados melhores, como evidenciado por Yingkajorn et al (2015).

Diante dos resultados obtidos pela LAMP, constatou-se que ao longo do curso do rio, onde há criações com o relato de doença semelhante a Síndrome da Mancha Branca, foram encontrados camarões nativos (*P. pandaliformes*) portadores do Vírus da Síndrome da Mancha Branca. Isso comprova que o WSSV pode afetar qualquer membro da ordem Decapoda, independente da salinidade de seu ambiente e de seu estágio de desenvolvimento (FLEGEL, 1997; HOSSAIN et al, 2001; LIGHTNER, 1996; MAEDA et al., 2000; STENTIFORD et al, 2009).

Portanto, os camarões positivos encontrados, podem ter surgido devido ao contato destas espécies nativas com os efluentes dos produtores locais. Entretanto, a não detecção da presença do vírus no P7, e a baixa incidência no P5, não elimina a presença do WSSV, uma vez que este foi encontrado a montante e a jusante destes locais.

No P1, que corresponde a Barragem de Acauã (Argemiro de Figueiredo), encontrou-se nove amostras positivas (quatro *Palaemon pandaliformis*, uma *Pomacea lineata* e quatro *Melanoides tuberculatus*). Devido ao registro de somente um produtor à montante, no município de Boqueirão, em que não há relatos de problemas em seu cultivo, esse achado revela que há algum problema ainda não detectado que pode ter levado a contaminação do rio, e assim, infecção dos animais estudados.

Embora não haja características de infecção aparente, o despejo de animais e restos possivelmente contaminados com WSSV no rio, pode ser a causa de infecção dos animais silvestres, mesmo que estes não manifestassem a doença. Pois a infecção de animais selvagens para animais de cultivo já foi comprovada por Kanchanaphum et al (1998) e Momoyama (2003), podendo o inverso também ocorrer.

A hipótese do vírus ser carregado por grandes distâncias, foi levantada por Martorelli et al (2010), quando defenderam a possibilidade do WSSV ter sido carregado por animais, incluindo plâncton e copépodes parasitas, infectados no Brasil e levados por correntes marítimas até o estuário da Bahía Blanca– Argentina. Os mesmos autores também especulam que animais com infecção aguda por WSSV podem ter morrido e os demais terem se alimentado de seus restos, perpetuando a infecção e permanecendo vivo aqueles crustáceos com infecção crônica.

Como dentre os camarões silvestres coletados nenhum apresentava característica macroscópica de infecção por WSSV, pode-se inferir que estes apresentavam uma infecção crônica, ou que a carga viral presente naquele ambiente não era suficiente para desencadear a doença, pelo menos não sem que ocorresse um estresse maior a esses camarões e, assim, sua imunidade diminuísse. Esse achado colabora com o de Hill (2000), no qual crustáceos silvestres infectados pelo WSSV, tiveram poucas indicações do desdobramento da WSSD. Já os moluscos, como ainda não há relatos desses animais sendo vetores para o WSSV, passa-se a ter um novo alerta na forma de disseminação desse agente.

Há estudos comprovando a presença do WSSV em animais marinhos capturados, como camarões (PEÑA et al, 2007), caranguejos (MENG et al, 2009) e outros, porém sem que fosse provado algum problema em decorrência da presença do vírus nesses ambientes. Chapman et al, (2004) justificaram que essa ausência de infecções graves, pode ocorrer devido a não sobrevivência dos animais doentes, uma vez que esses estariam mais vulneráveis a predação ou

a progressão rápida da WSSD. Desta forma, torna-se aceitável encontrar camarões infectados com o vírus da Síndrome da Mancha Branca, sem que os mesmos estivessem de fato doentes.

Os resultados obtidos por essa pesquisa, indicam o potencial disseminador que a espécie *Melanoides tuberculatus* pode ter, ao albergar o WSSV, uma vez que a mesma é capaz de sobreviver em ambientes com diferentes níveis de salinidade (BOLAJI et al, 2011; SILVA e BARROS, 2015), podendo afetar não somente a criação de *L. vannamei* em água interiores, como também nas criações de áreas costeiras. E estando disseminada por quase todas as regiões do país (FERNANDEZ et al, 2003), especialmente em estados da região Nordeste com maior produção de *L. vannamei* (FIGUEIREDO et al, 2003), podendo acarretar grandes perdas ao setor de carcinicultura.

Embora ainda não se tenha bem mensurado os danos da carcinicultura ao ecossistema, aponta-se como o principal a destruição do ambiente na qual é instalada (BAILEY, 1988; FIGUEIREDO et al, 2006; PÁEZ-OSUNA, 2001). Em água oligohalina, Martorelli et al (2010), realizando monitoramento da Bahía Blanca – Argentina durante quatro anos (2003 – 2007), não encontraram evidências do WSSV, somente em 2008 e 2009 que esse vírus foi detectado, causando doença nos animais silvestres, porém sem altas mortalidades registradas. Estudos sobre a introdução de patógenos e, principalmente, sua consequência em habitats diferentes ainda são insuficientes.

Briggs et al (2004) evidenciaram que algumas doenças somente tornam-se epidêmicas quando os animais estão em condições intensivas de criação, colaborando com Lo et al (1996), que observaram a morte de caranguejos e camarões selvagens infectados com WSSV e assintomáticos, quando trazidos para condições de laboratório. Como os animais objeto desse estudo não foram levados para confinamento em laboratório, não pode-se confirmar esta afirmação.

O WSSV é um vírus com alta mortalidade, com replicação em 20h (a 15°C) e que pode permanecer viável por pelo menos 30 dias (a 30°C) em água salgada (OIE, 2012), sua introdução em habitats com espécies susceptíveis pode ser desastroso, uma vez que a mortalidade pode chegar a 100% em poucos dias (HAMEED et al, 2001). Neste sentido, sugere-se o monitoramento de espécies nativas que sofrem influência de cultivos de camarão, como medida de controle de infecção por este vírus. Este é o primeiro registro, da influência de um

ambiente de cultivo de *L. vannamei* em água doce, sobre a taxa de infecção por WSSV em espécies nativas.



## 6. Conclusão

Os resultados revelaram que nas espécies silvestres do rio Paraíba – PB, *Palaemon pandaliformis*, *Pomacea lineatae* e *Melanoides tuberculatus* encontra-se o Vírus da Síndrome de Mancha Branca e que estes animais tornam-se uma peça importante na manutenção deste agente nas áreas de produção de camarão local, atuando com vetores e/ou reservatórios do WSSV na natureza.

## 7. Referências bibliográficas

AESA – AGÊNCIA EXECUTIVA DE GESTÃO DAS ÁGUAS DO ESTADO DA PARAÍBA. **Comitê Rio Paraíba**, Apresentação. Disponível em:<  
<http://www.aesa.pb.gov.br/comites/paraiba/>> Acesso em: 26/01/2016.

ALFREDO, J. **Relatório do Grupo de Trabalho de Carcinicultura**. Criado no âmbito da Comissão de Meio Ambiente e Desenvolvimento Sustentável (CMADS) da Câmara dos Deputados, em 15 de junho de 2005.

ARANEDA, M.; PÉREZ, E. P.; e GASCA-LEYVA, E. White shrimp *Penaeus vannamei* culture in freshwater at three densities: Condition state based on length and weight. **Aquaculture**, n. 283, p. 13–18. 2008.

BAILEY, C. The Social Consequences of Tropical Shrimp Mariculture Development. **Ocean & Shoreline Management**, v. 11, p. 31-44. 1988.

BOLAJI, D. A.; EDOKPAYI, C. A.; SAMUEL, O. B.; AKINNIGBAGBE, R. O.; e AJULO, A. A. Morphological characteristics and Salinity tolerance of *Melanoides tuberculatus* (Muller, 1774). **World Journal of Biological Research**, v. 4, n. 2. 2011.

BOUCENNA, M.; BERREBBAH, H.; ATAILIA, A.; GUARA, N.; e DJEBAR, M. R. Effects of Metal Dust on Functional Markers and Histology of Gland Digestive and Kidney of the Land Snails (*Helix aspersa*) in the North East of Algeria. **Global Veterinarian**, vol. 14, n°2, p. 189-198, 2015.

BRAY, W. A.; LAWRENCE, A. L.; e LEUNG – TRUJILLO, J. R. The effect of salinity on growth and survival of *Penaeus vannamei*, with observations on the interaction of IHNV virus and salinity. **Aquaculture**, n°122, p.133-146, 1994.

BRIGGS, M.; FUNGE-SMITH, S.; SUBASINGHE, R.; e PHILLIPS, M. Introductions and movement of *Penaeus vannamei* and *Penaeus stylirostris* in Asia and the Pacific. **FAO - Regional Office for Asia and The Pacific**. Bangkok, 2004.

CAGEPA - COMPANHIA DE ÁGUA E ESGOTOS DA PARAÍBA. **Governo do Estado intensifica fiscalização no rio Paraíba para garantir abastecimento**. 09/11/2015. Disponível em:<  
<http://www.cagepa.pb.gov.br/governo-do-estado-intensifica-fiscalizacao-no-rio-paraiba-para-garantir-abastecimento/>> Acesso em: 10/12/2015.

CAMPOS, K. C.; e CAMPOS, R. T. Alternativa Econômica para o Novo Rural do Nordeste do Brasileiro: O Cultivo do Camarão *Litopenaeus vannamei* em Água Doce. **Revista GEPEC**, vol. 10, nº 02, p. 40-53, jul./dez. – 2006.

CAO, H.; AN, J.; ZHENG, W.; e HE, S. *Vibrio cholerae* pathogen from the freshwater-cultured whiteleg shrimp *Penaeus vannamei* and control with *Bdellovibrio bacteriovorus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, n.130, p. 13–20. 2015.

CAVALLI, L. S.; MARINS, L. F.; e ABREU, P. C. Evaluation Of White Spot Syndrome Virus (WSSV) in Wild Shrimp after a Major Outbreak in Shrimp Farms at Laguna, Southern Brazil. **Atlântica**, vol. 30, ed.1, p. 45-52. Rio Grande, 2008.

CAVALLI, L. S.; ROMANO, L. A.; MARINS, L. F.; e ABREU, P. C. First Report of White Spot Syndrome Virus in Farmed and Wild Penaeid Shrimp From Lagoa Dos Patos Estuary, Southern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, nº42, p. 1176-1179. 2011.

CHAKRABARTY, U.; MALLIK, A.; MONDAL, D.; DUTTA, S.; e MANDAL, N. Assessment of WSSV prevalence and distribution of disease-resistant shrimp among the wild population of *Penaeus monodon* along the west coast of India. **Journal of Invertebrate Pathology**, nº 119, p. 12-18. 2014.

CHANG, C.-F.; SU, M.-S.; CHEN, H.-Y.; e LIAO, I.C. Dietary [beta]-1,3-glucan effectively improves immunity and survival of *Penaeus monodon* challenged with white spot syndrome virus. **Fish and Shellfish Immunology**, nº 15, p. 297–310. 2003.

CHAPMAN, R. W.; BROWDY, C. L.; SAVIN, R.; PRIOS, S.; e WENNER, E. Sampling and evaluation of white spot syndrome virus in commercially important atlantic penaeid shrimp stocks. **Disease os Aquatic Organisms**, v. 59, p. 179-185. 2004.

CHEN, I. T.; AOKI, T.; HUANG, Y. T.; HIRONO, I.; CHEN, T. C.; HUANG, J. Y.; CHANG, G. D.; LO, C. F.; e WANG, H. C. White Spot Syndrome Virus Induces Metabolic Changes Resembling the Warburg Effect in Shrimp Hemocytes in the Early Stage of Infection. **Journal of Virology**, v. 85, n. 24, dezembro, p. 12919–12928. 2011.

CHIARI, M. F. **Nova Metodologia de Diagnóstico para *Ehrlichia canis*: PCR x LAMP**. 2010. Dissertação de Mestrado em Biotecnologia – Universidade Federal de São Carlos.

CHOTIGEAT, W.; TONGSUPA; S.; SUPAMATAYA, K.; e PHONGDARA; A. Effect of fucoidan on disease resistance of black tiger shrimp. **Aquaculture**, nº 233, p. 23–30. 2004.

COSTA, W. M. Efeito da Proteína Vegetal na Qualidade de Água dos Efluentes da Carcinicultura. Dissertação de mestrado - Pós-graduação em Recursos Pesqueiros e Aqüicultura da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, 2004.

COSTA, S. W.; FRAGE, A. P. M.; ZAMPARETTI, A. S.; MARQUES, M. R. F.; e ANDREATTA, E. R. Presença do vírus da síndrome da mancha branca em crustáceos decápodes silvestres em lagoas costeiras no Sul do Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.64, n.1, p.209-216, 2012.

CUÉLLAR-ANJEL, J. Métodos de Diagnóstico de Enfermedades em Camarones Marinos de Cultivo p. 1-54. Em: MORALES, V. e CUÉLLAR-ANJEL, J. (eds.). 2008. **Guía Técnica - Patología e Inmunología de Camarones Penaeidos**. Programa CYTED Red II-D Vannamei, Panamá, Rep. de Panamá. p.270.

DEBNATH, P.; KARIM, M.; e BELTON B. Comparative study of the reproductive performance and White Spot Syndrome Virus (WSSV) status of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) collected from the Bay of Bengal. **Aquaculture**, vol. 424–425, p. 71-77. 2014.

DHAMA, K.; KARTLIK, K.; CHAKRABORTY, S.; TIWARI, R.; KAPOOR, S.; KUMAR, A.; e THOMAS, P. Loop-mediated Isothermal Amplification of DNA (LAMP): A New Tool Lights the World of Diagnosis of Animal and Human Pathogens: A Review. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, Vol. 17, ed. 2, p. 151-166. 2014.

DING, Z.; YAO, Y.; ZHANG, F.; WAN, J.; SUN, M.; LIU, H.; ZHOU, G.; TANG, J.; PAN, J.; XUE, H.; e ZHAO, Z. The first detection of white spot syndrome virus in naturally infected cultured Chinese mitten crabs, *Eriocheir sinensis* in China. **Journal of Virological Methods**, nº 220, p. 49-54. 2015.

DRAPALA, D.; e KORDALEWSKA, M. Loop-mediated Isothermal Amplification(LAMP) as a diagnostic tool in detection of infectious diseases. **PhD Interdisciplinary Journal - Special Issue: Biotech Conference. Microbiology Department, Faculty of Chemistry, Gdansk University of Technology, Narutowicza St.** p.80-233. 2012.

EIKEN CHEMICAL CO. **The principle of LAMP method.** Disponível em:<<http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/principle.html>> Acesso em: 10/01/2016.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Fishery and Aquaculture Country Profiles – The Federative Republic of Brazil.** Part II Narrative – Production Sector.

Roma, 2010. Disponível em: <[www.fao.org/fishery/facp/BRA/en#CountrySector-ProductionSector](http://www.fao.org/fishery/facp/BRA/en#CountrySector-ProductionSector)>. Acesso em: 18/11/2015.

\_\_\_\_\_. **Statistical Yearbook - World Food and Agriculture**. Roma, 2013.

\_\_\_\_\_. **The State of World Fisheries and Aquaculture – Opportunities and Challenges**. Roma, 2014.

FERNANDEZ, M. A.; THIENGO, S. C.; e SIMONE, L. R. L. Distribution of the introduced freshwater snail *Melanoides tuberculatus* (Gastropoda: Thiaridae) in Brazil. **The Nautilus**, v. 117, n.3, p. 78 -82. 2003.

FIGUEIREDO, M. C. B.; ARAÚJO, L. F. P.; ROSA, M. F.; MORAIS, L. F. S.; PAULINO, W. D.; e GOMES, R. B. Impactos Ambientais Da Carcinicultura De Águas Interiores. **Engenharia sanitária e ambiental**, v. 11, n. 3, p. 231-240, jul/set. 2006.

FIGUEIREDO, M. C. B.; ROSA, M. F.; e GONDIM, R. S. Sustentabilidade Ambiental da Carcinicultura no Brasil: Desafios para a Pesquisa. **Revista Econômica do Nordeste**, Fortaleza, v. 34, n° 2, abr-jun. 2003.

FLEGEL T.W. Major viral diseases of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, n° 13, p. 433–442. 1997.

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

FONSECA, S.; MENDES, P. P.; ALBERTIM, C. J. L.; BITTENCOURT, C. F.; e SILVA, J. H. V. Cultivo do camarão marinho em água doce em diferentes densidades de estocagem. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, n.10, p.1352-1358. Brasília, out. 2009.

FU, L.; CHEN, X.; e WANG, Y. Quality evaluation of farmed whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*, treated with different slaughter processing by infrared spectroscopy. **Food Chemistry**. n° 151, p.306–310, 2014.

G1 – PB (GLOBO.COM). **Aesa controla retirada da água do rio Paraíba para garantir abastecimento**. 17/10/2015. Disponível em:<<http://g1.globo.com/pb/paraiba/noticia/2015/10/aesa-controla-retirada-da-agua-do-rio-paraiba-para-garantir-abastecimento.html>> Acesso em: 10/12/2015.

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

HILL, B. National and international impacts of white spot disease of shrimp. **Bulletin-European Association of Fish Pathologists**, v.2, p.58-65, 2002.

HUANG, J.; LI, F.; WU, J.; e YANG, F. White spot syndrome virus enters crayfish hematopoietic tissue cells via clathrin-mediated endocytosis. **Virology**, v. 486, p. 35-43. 2015.

ITABAIANA 24 HORAS. **Criação de camarão garante renda para famílias do vale**. 30/09/2013. Disponível em:< <http://itabainana24horas.blogspot.com.br/2013/09/criacao-de-camarao-garante-renda-para.html#more>> Acesso em: 10/12/2015.

JAROENRAM, W.; KIATPATHOMCHAI, W.; e FLEGEL, T. W. Rapid and sensitive detection of white spot syndrome virus by loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick. **Molecular and Cellular Probes**, v. 23, p. 65-70. 2009.

JIRAVANICHPAISAL, P.; BANGYEEKHUN, E.; SÖDERHÄLL, K.; e SÖDERHÄLL, I. Experimental infection of white spot syndrome virus in freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 47, p. 151–157. 2001.

JORNAL DA PARAÍBA. **Crise Hídrica faz AESA restringir retirada de água do rio Paraíba**. 17/10/2015. Disponível em:< [http://www.jornaldaparaiba.com.br/cidades/noticia/160148\\_crise-hidrica-faz-aesa-restringir-retirada-de-agua-do-rio-paraiba](http://www.jornaldaparaiba.com.br/cidades/noticia/160148_crise-hidrica-faz-aesa-restringir-retirada-de-agua-do-rio-paraiba)> Acesso em 10/12/2015.

KANCHANAPHUM, P.; WONGTEERASUPAYA, C.; SITIDILOKRATANA, N.; BOONSAENG, V.; PANYIM, S.; TASSANAKAJAN, A.; WITHYACHUMNARNKUL, B.; e FLEGEL, T. W. Experimental transmission of White Spot Syndrome Virus (WSSV) from crabs to shrimp *Penaeus monodon*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 34, p. 1-7. 1998.

KONGRUENG, J.; TANSILA, N.; MITRAPARP-ARTHORN, P.; NISHIBUCHI, M.; VORA, G. J.; VUDDHAKUL, V. LAMP assay to detect *Vibrio parahaemolyticus* causing acute hepatopancreatic necrosis disease in shrimp. **Aquaculture International**, vol. 23, Issue 5, p. 1179-1188. 2015.

KONO, T.; SAVAN, R.; SAKAI, M.; e ITAMI, T. Detection of white spot syndrome virus in shrimp by loop-mediated isothermal amplification. **Journal of Virological Methods**, v. 115, p. 59-65. 2004.

Le MOULLAC, G.; e HAFFNER, P. Environmental factors affecting immune responses in Crustacea. **Aquaculture**, v. 191, p. 121-131. 2000.

LI, Q.; ZHANG, J.; CHEN, Y.; e YANG, F. White spot syndrome virus (WSSV) infectivity for *Artemia* at different developmental stages. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 57, p. 261–264. 2003.

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

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.; PANTOJA, C. R. **Bioseguridad En El Cultivo De Camarones**. Departamento de Ciencias Veterinarias y Microbiología - Universidad de Arizona, Tucson, U.S.A. p. 123 – 166, 2001.

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

LIN, S.; HSIA, H.; LIU, W.; HUANG, J.; LIU, K.; CHEN, W.; YEH, Y.; HUANG, Y.; LO, C.; KOU, G.; e WANG, H. Spawning stress triggers WSSV replication in brooders via the activation of shrimp STAT. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 38, p. 128-135. 2012.

LO, C.; HO, C.; PENG, S.; CHEN, C.; HSU, H.; CHIU, Y.; CHANG, C.; LUI, K.; SU, M.; WANG, C.; e KOU, G. White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 27, p. 215-225. 1996.

LO, C.F.; AOKI, T.; BONAMI, J.R.; FLEGEL, T.W.; LEU, J.H.; LIGHTNER, D.V.; STENTIFORD, G.; SÖDERHÄLL, K.; WALKER, P.W.; WANG, H.C.; XUN, X.; YANG, F.; e VLAK, J.M. *Nimaviridae*. In: *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, King A.M.Q.,

Adams M.J., Carstens E.B., & Lefkowitz E.J., eds. Elsevier Academic Press, San Diego, CA. USA, pp: 229–234. 2012.

MACHADO, P. C. C. Cultivo de camarão marinho. In SILVA-SOUZA, A. T. (Org.). **Sanidade de organismos aquáticos no Brasil**. Maringá: ABRAPOA, p. 121-135. 2006.

MAEDA, M.; ITAMI, T.; MIZUKI, E.; TANAKA, R.; YOSHIZU, Y.; DOI, K.; YASUNAGA-AOKI, C.; TAKAHASHI, Y.; e KAWARABATA, T. Red swamp crawfish (*Procambarus clarkii*): an alternative experimental host in the study of white spot syndrome virus. **Acta Virologica**, nº 44, p. 371–374. 2000.

MAGALHÃES, M. E. S. **Cultivo Do Camarão Marinho *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) Em Sistema Multifásico**. 2004. Dissertação de mestrado em Recursos Pesqueiros e Aquicultura – Universidade Federal Rural de Pernambuco.

MARQUES, J. S.; MÜLLER, I. C.; MOSER, J. R.; SINCERO, T. C.; e MARQUES, M. R. F. Wild captured crab, *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851), a new host for white spot syndrome virus (WSSV). **Aquaculture**, v. 318, p. 20-24. 2011.

MARTORELLI, S. R.; OVERSTREET, R. M.; e JOVONOVICH, J. A. First Report of Viral Pathogens WSSV And IHNV In Argentine Crustaceans. **Bulletin of Marine Science**, v. 86, ed. 1, p. 117-131. 2010.

MENDES, P. P.; ALBUQUERQUE, M. L. L. T.; QUEIROZ, D. M.; SANTOS, B. L. S.; LIMA, A. C.; E LOPES, Y. V. A. Aclimação do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) à água doce com diferentes estratégias de alimentação e calagem. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**. Maringá, v. 28, n. 1, p. 89-95, Jan./March, 2006.

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

MILINSK, M. C.; PADRE, R. G.; HAYASHI, C.; SOARES, C. M.; SOUZA, N. E.; e MATSUSHITA, M. Composição química e perfil de ácidos graxos em escargot (*Helix aspersa maxima*) alimentados com dietas contendo diferentes fontes protéicas. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**. Maringá, v. 26, no. 4, p. 469-473, 2004.



MOLES, P.; e BUNGE, J. **Shrimp Farming in Brazil: An Industry Overview**. Report prepared under the World Bank, NACA, WWF and FAO Consortium Program on Shrimp Farming and the Environment. Work in Progress for Public Discussion. Publicado pelo Consortium, p. 26. 2002.

MOMOYAMA, K. Detection of White Spot Syndrome Virus from Small Penaeid Shrimp Species Caught in the Western Seto Inland Sea. **Fish Pathology**, v. 38, ed. 3, p. 81-85. 2003.

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

NEW, M.B.; D'ABRAMO, L.R.; VALENTI, W.C. & SINGHOLKA, S. 2000. **Sustainability of freshwater prawn culture**. In: NEW, M.B. & VALENTI, W.C. (Ed.) Freshwater prawn culture: the farming of *Macrobrachium rosenbergii*. Oxford, Blackwell Science. p. 429-443.

NOTOMI, T.; OKAYAMA, H.; MASUBUCHI, H.; YONEKAWA, T.; WATANABE, K.; AMINO, N.; e HASE, T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 28, nº 12. 2000.

OIE – WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH. **OIE-Listed diseases, infections and infestations in force in 2014a**. Disponível em: <<http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2014/>> Acessado em: 07/11/2014.

\_\_\_\_\_. **Aquatic Animal Health Code** - Chapter 9.7. - White spot disease. 2014b.

\_\_\_\_\_. **Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals** - Chapter 2.2.6. — White spot disease. 2012.

OLIVEIRA, A. G. J. **Documento encaminhado ao Banco do Nordeste**. Levantamento dos Criadores de Camarão nas margens do Rio Paraíba – PB. 2014.

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

PARIDA, M.; SANNARANGAIAH, S.; DASH, P. K.; RAO, P. V. L.; e MORITA, K. Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification

technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. **Reviews in Medical Virology**, v. 18, p. 407-421. 2008.

PEÑA, L. D.; LAVILLA-PITOGO, C. R.; VILLAR, C. B. R.; PANER, M. G.; SOMBITO, C. D.; e CAPULOS, G. C. Prevalence of white spot syndrome virus (WSSV) in wild shrimp *Penaeus monodon* in the Philippines. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 77, p. 175–179. 2007.

POWELL, J. W. B.; BROWDY, C. L.; e BURGE, E. J. Blue crabs *Callinectes sapidus* as potential biological reservoirs for white spot syndrome virus (WSSV). **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 113, p. 163–167. 2015.

PREMIER BIOSOFT. **LAMP - Loop Mediated Isothermal Amplification**. Disponível em: <[http://www.premierbiosoft.com/tech\\_notes/Loop-Mediated-Isothermal-Amplification.html](http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/Loop-Mediated-Isothermal-Amplification.html)> Acesso em: 10/01/2016.

ROCHA, I. P. **A Indústria Brasileira do Camarão Cultivado**. Palestra apresentada no Seminário Internacional Sobre a Indústria do Camarão Cultivado, WAS'2003, 19 – 23 de Maio, Salvador – BA. 2003.

ROCHA, I. P. **Cultivo do Camarão Marinho: Atividade Socialmente Justa, Ambientalmente Responsável e, Economicamente Importante, de Forma Especial para o Meio Rural da Região Nordeste**. Carcinicultura Marinha Brasileira – Artigo Executivo. Postado em 21/05/2015 por ABCCAM. Disponível em: <<http://abccam.com.br/site/wp-content/uploads/2015/05/Carcinicultura-Marinha-Brasileira-Artigo-Executivo.pdf>> Acesso em: 21/02/2016.

RODRIGUES, J. Breve análise sobre a participação do pescado na produção mundial de proteínas animais. **Revista da ABCC**. Ano XVI nº2, p. 28. Julho, 2014. Disponível em: <[issuu.com/marineumarocha/docs/revista\\_abcc\\_-\\_julho\\_2014\\_final/0](http://issuu.com/marineumarocha/docs/revista_abcc_-_julho_2014_final/0)> Acesso em: 05/08/1024.

RODRÍGUEZ, J.; BAYOT, B.; AMANO, Y.; PANCHANA, F.; BLAS, I.; ALDAY, V.; e CALDERÓM, J. White spot syndrome vírus infection in cultured *Penaeus vannamei*(Boone) in Ecuador with emphasis on histopathology and ultrastructure. **Journal of Fish Diseases**, v. 26, ed. 8, p. 439-450. Ago., 2003.

ROSAS, C.; CUZON, G.; GAXIOLA, G.; LE PRIOL, Y.; PASCUAL, C.; ROSSIGNYOL, J.; CONTRERAS, F.; SANCHEZ, A.; e VAN WORMHOUDT, A. Metabolism and growth of juveniles of *Litopenaeus vannamei*: effect of salinity and dietary carbohydrate levels. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. Nº 259, p. 1–22, 2001.

SAMPAIO, I.B.M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998. 221p.

SÁNCHEZ, M. C. C.; RODRÍGUEZ, L. M. Medidas de Bioseguridad para Evitar la Introducción y Dispersión de Enfermedades Virales em Granjas Camaronícolas. In: CRUZ SUÁREZ, L. E.; RICQUE MARIE, D.; NIETO LOPEZ, M. G.; VILLARREAL, D.; SCHOLZ, U.; e GONZÁLES, M. **Avances em Nutrición Acuícola VII. Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola**. Hermosillo, Sonora, México. Novembro, 2004.

SCOPEL, B. R.. Vantagens do cultivo intensivo, critérios e oportunidades para o Brasil. **Revista da ABCC**. Ano XVI nº2, p. 35 – 39. Julho, 2014. Disponível em: < [issuu.com/marineumarocha/docs/revista\\_abcc\\_-\\_julho\\_2014\\_final/0](http://issuu.com/marineumarocha/docs/revista_abcc_-_julho_2014_final/0) > Acesso em: 05/08/2014.

SEIFFERT, W.Q.; WINCKLER, S.; e MAGGIONI, D. A mancha branca em Santa Catarina. **Panorama da Aquicultura**, v. 15, ed. 87, p. 51-53, 2005. Disponível em: <<http://www.panoramadaaquicultura.com.br/paginas/Revistas/87/ManchaBrancaemSC87.asp>> Acesso em: 20/10/2015.

SILVA, A. D. R. **Utilização do calcário dolomítico em água doce e com alcalinidade e dureza extremamente baixas, para adequação ao cultivo do camarão marinho *Litopenaeus vannamei***. 2010. Dissertação de Mestrado em Recursos Pesqueiros e Aquicultura – Universidade Federal Rural de Pernambuco.

SILVA, E. C. e BARROS, F. Sensibility of the Invasive Snail *Melanoides Tuberculatus* (Müller, 1774) To Salinity Variations. **Malacologia**, vol. 1 – 2, n. 58, p. 365 – 369. 2015.

SILVA, L. M. T. Nas Margens do Rio Paraíba do Norte. **Cadernos do Logepa**, vol. 2, n. Jul-Dez, p. 74-80. 2003.

SILVA, V. A. **Estudo epidemiológico de enfermidades infecciosas em camarões marinhos cultivados**. 2011. Tese de Doutorado em Ciência – Universidade Federal Rural de Pernambuco.

SNIESZKO, S. F. The effects of environmental stress on outbreaks of infectious diseases of fishes. **Journal of Fish Biology**, v. 6, p. 197-208. 1974.

SOUZA JÚNIOR, J. P.; TEIXEIRA, K. H.; e LIMA, R. C. Camarão brasileiro uma análise comportamental dos preços brasileiro e internacional. **Revista de Política Agrícola**, Ano XVI – Nº 3 – Jul./Ago./Set. 2007.

SPANGUERO, D. B. N. SILVA, U. L.; PESSOA, M. N. C.; MEDEIROS, E. C. A.; OLIVEIRA, I. R.; e MENDES, P. P. Utilização de modelos estatísticos para avaliar dados de produção do camarão *Litopenaeus vannamei* cultivados em águas oligohalina e salgada. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 30, n. 4, p. 451-458, Maringá, 2008.

STENTIFORD, G.D.; BONAMI, J.R.; e ALDAY-SANZ, V. A critical review of susceptibility of crustaceans to Taura Syndrome, yellow head disease and white spot disease and implications of inclusion of these diseases in European legislation. **Aquaculture**, nº 291, p. 1–17. 2009.

SUNILA, I.; e VISEL, T. An epizootic of *Haplosporidium nelsoni* in the eastern oysters *Crassostrea virginica* collected from the Connecticut coastline in 1986 and 1987: an examination of archived slides. **Journal of Shellfish Research**. Vol. 34, nº. 2, p. 297–302, 2015.

TAHIM, E. F.; e ARAÚJO-JUNIOR, I. F.; O processo de aprendizado e de inovação no sistema produtivo da carcinicultura no nordeste brasileiro. **Estud. Soc. e Agric., Rio de Janeiro**, vol. 20, n. 1, p. 30-65, 2012.

VALENTI, W. C. **Criação de camarões de água doce**. In: Congresso de Zootecnia, 12o, Vila Real, Portugal, 2002, Vila Real: Associação Portuguesa dos Engenheiros Zootécnicos. Anais... p. 229-237. 2002.

VIDAL, O.M.; GRANJA, C.B.; ARANGUREN; F.; BROCK, J.A.; e SALAZAR, M. A profound effect of hyperthermia on survival of *Litopenaeus vannamei* juveniles infected with white spot syndrome virus. **J. World Aquaculture Soc.**, nº 32, p. 364–372. 2001.

WANG, L.; CHEN, Y.; HUANG, H.; HUANG, Z.; CHEN, H.; e SHAO, Z. Isolation and identification of *Vibrio campbellii* as a bacterial pathogen for luminous vibriosis of *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture Research**, p. 1- 10. 2013.

WETZEL, R. G.; BOAVIDA, M. J. **Limnologia**. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa. 1993.

WONGTEERASUPAYA, C.; VICKERS, J.E.; SRIURAIRATANA, S.; NASH, G.L.; AKARAJAMORN, A.; BOONSAENG, V.; PANYIM, S.; TASSANAKAJON, A.;

WITHYACHUMNARNKUL, B.; e FLEGEL, T.W. A non-occluded, systemic baculovirus that occurs in cells of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in the black tiger prawn *Penaeus monodon*. **Dis. Aquat. Org.**, nº 21, p. 69–77. 1995.

WURMANN, C. G.; MADRID, R. M.; e BRUGGER, A. M. Shrimp farming in Latin America: Current status, opportunities, challenges and strategies for sustainable development, **Aquaculture Economics & Management**, v. 8, n. 3-4, p. 117-141. 2004.

XIMENES, L. J. F.; VIDAL, M. F.; e FEITOSA, R. A. Recuperação da Carcinicultura Nordestina Pós-Crise. **Informe Rural Etene – Banco do Nordeste**, Ano V – Nº 15, Setembro de 2011.

YINGKAJORN, M.; SERMWITTAYAWONG, N.; KHAMHAENG, N.; NISSHIBUCHI, M.; VUDDHAKUL, V. Quantitative Analysis of Pathogenic and Nonpathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in Shrimp Derived from Industrial Processing. **Journal of Food Safety**, doi: 10.1111/jfs.12238.

ZHANG, J.; DONG, S.; DONG, Y.; TIAN, X.; CAO, Y.; LI, Z.; YAN, D. Assessment of the role of brine shrimp *Artemia* in white spot syndrome virus (WSSV) transmission. **Veterinary Research Communications**. Vol. 34, ed. 1, p. 25-32. Janeiro de 2010.

ZHANG, J.; DONG, S.; DONG, Y.; TIAN, X.; e HOU, C. Bioassay evidence for the transmission of WSSV by the harpacticoid copepod *Nitocrasp*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 97, p. 33–39. 2008.

ZHONG, Q.; TIAN, J.; WANG, B.; WANG, L. PMA based real-time fluorescent LAMP for detection of *Vibrio parahaemolyticus* in viable but non culturable state. **Food Control**, v. 63, p. 230 – 238. 2016.