

VERÔNICA ARNS DA SILVA

**ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO DE ENFERMIDADES INFECCIOSAS
EM CAMARÕES MARINHOS CULTIVADOS.**

RECIFE

2011

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

VERÔNICA ARNS DA SILVA

ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO DE ENFERMIDADES INFECCIOSAS
EM CAMARÕES MARINHOS CULTIVADOS.

Tese 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 Doutor em Ciência Veterinária.

Orientador:

Prof^a. Dr^a. Emiko Shinozaki Mendes.

Co-orientador:

Prof. Dr. Fernando Leandro dos Santos.

Prof. Dr. Paulo de Paula Mendes.

RECIFE

2011

Ficha catalográfica

Setor de Processos Técnicos da Biblioteca Central – UFRPE

S586e Silva, Verônica Arns da
Estudo epidemiológico de enfermidades infecciosas em
camarões marinhos cultivados / Verônica Arns da Silva. –
2011.

112 f.: il.

Orientadora: Emiko Shinozaki Mendes.

Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) – Universidade
Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Medicina
Veterinária, Recife, 2011.

Inclui referências e anexo.

1. Camarão 2. Doenças 3. Análise a fresco 4. PCR
5. Histopatologia I. Mendes, Emiko Shinozaki, orientadora
II. Título

CDD 636.089444

DEDICATÓRIA

A **Deus**, pai de infinito amor e bondade, pela sua presença constante em minha vida;

A minha mãe, **Walburga Arns da Silva**, por todo o amor, incentivo e dedicação incansável, sempre ao meu lado com sua ternura.

Ao meu pai, **José Paulino da Silva**, por todo o amor, prestatividade e por sempre me fazer sorrir nos momentos mais difíceis.

Ao meu marido, **Marcelo Cavalcanti de Oliveira**, por todo o amor, companheirismo, compreensão pelos momentos de ausência e por demonstrações de amor e cuidado em momentos difíceis dessa jornada.

Ao meu irmão, **Thiago Paulino da Silva**, por todo amor, amizade e boas conversas.

A **todos** meus familiares, amigos, professores que sempre acreditaram em mim e sempre me deram força nos momentos mais complicados e difíceis. Espero encontrar melhor forma e melhor momento para dizer a todos o quanto sou grata por mais uma etapa vencida.

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) – Departamento de Medicina Veterinária ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária, pelos conhecimentos adquiridos;

Ao Laboratório de Sanidade de Animais Aquáticos (LASAq), no Departamento de Medicina Veterinária pela realização das análises laboratoriais;

Ao Laboratório de Genética Aplicada (LAGA), no Departamento de Pesca e Aqüicultura pela realização das análises moleculares;

Ao CNPq pela concessão da bolsa de doutorado e a FINEP pelos recursos financeiros ao projeto de pesquisa, através do programa RECARCINE;

A professora Dr^a. Emiko Shinozaki Mendes, pela orientação, oportunidade, incentivo, preocupação e compromisso com seus orientandos.

Ao professor Dr. Fernando Leandro dos Santos, pela co-orientação, amizade, prestatividade e principalmente pelas conversas sábias e incentivadoras.

Ao Professor Dr. Paulo de Paula Mendes, pela disponibilidade e boa vontade, contribuindo principalmente com seus conhecimentos estatísticos na elaboração desta tese;

A professora Dr^a. Maria Raquel Moura Coimbra pelas dúvidas esclarecidas durante as análises moleculares e pela agradável convivência na fase mais tensa do doutorado.

Ao professor Dr. Luis Romano pelas valiosas colaborações, dúvidas esclarecidas e prestatividade durante as correções da tese.

Aos professores da área de patologia, Mário Menezes e Márcia Figueiredo pela boa convivência e apoio no decorrer da pesquisa;

Aos médicos veterinários Virgínia Pedrosa, Lílian Maria, Fernanda Meirelles, Eduardo Melo, Joanna Dourado, Andréa Barreto, Rejane Luna, Dulcilene Lacerda pelo apoio incondicional durante as coletas e análises laboratoriais e pelos momentos de convivência agradável;

As amigas do LAGA Klaudia Tenório, Patrícia Lima, Suzianny Maria, Maíra Lima, Karine Oliveira e Hozana Dantas pelo apoio, dúvidas esclarecidas e agradável convivência.

A todos os amigos, funcionários da UFRPE que contribuíram para a execução desta pesquisa.

RESUMO

Camarões cultivados podem ser acometidos tanto por enfermidades não infecciosas, causadas por agentes abióticos, quanto por enfermidades infecciosas, sendo dentre essas as de etiologia viral as responsáveis pelas maiores perdas na carcinicultura. Camarões pequenos e médios foram coletados de quatro fazendas comerciais no litoral do estado de Pernambuco, nos períodos chuvoso e de estio, com o objetivo de investigar a frequência de enfermidades nesses animais. A investigação das viroses Mionecrose Infecciosa Viral (IMNV), Necrose Hematopoiética e Hipodermal Infecciosa (IHHNV) e a Síndrome da Mancha Branca (WSSV) foi realizada pela análise macroscópica, por meio de exame a fresco, microscopicamente, por meio da histopatologia, e por análises moleculares (Reação em Cadeia da Polimerase – PCR e nested PCR), identificando a presença ou não dos agentes etiológicos. HHNV e IMNV foram detectados, assim como lesões sugestivas dessas viroses foram mais frequentes no período de estio. O WSSV não foi detectado por nested PCR nos espécimes. Também não foram verificadas lesões que permitissem a suspeita da circulação deste vírus no período do estudo. Lesões sugestivas de bacterioses, enterite hemocítica, assim como presença de protozoários epicomensais e gregarinas foram constatados nos camarões analisados. Enfermidades infecciosas que acometem camarões cultivados são eventos complexos e registros exatos e contínuos das fazendas são indispensáveis para os estudos epidemiológicos. Esses, identificando fatores de risco e associando-os nas análises são fundamentais para manter e monitorar a saúde dos animais e para a boa produtividade dos cultivos.

Palavras-Chave: Camarão, doenças, análise a fresco, histopatologia, PCR.

ABSTRACT

Shrimp farm can be affected both by non-infectious diseases caused by abiotic agents, as for infectious diseases, and among these viral diseases were responsible for the largest losses in shrimp farming. Small and medium shrimp were collected from four commercial farms in the coastal state of Pernambuco, in the periods of summer and rainy, with the aim to investigate the frequency of diseases in these animals, with the aim to investigate the frequency of diseases in these animals. The investigation of viruses Infectious myonecrosis (IMNV), and Infectious Hipodermal and Hematopoietic Necrosis (IHHNV) and White Spot Syndrome (WSSV) was performed by macroscopic analysis, using wet mount, microscopically for histopathology, and analysis molecular (Polymerase Chain Reaction - PCR and nested PCR), identifying the presence or absence of etiological agents. Viruses causing IHHNV IMNV and were detected as lesions suggestive of these infections were more frequent during the dry season. WSS virus was not detected by nested PCR in the specimens, as well as injuries that just allowed the suspected virus circulation during the study period. Lesions suggestive of bacterial diseases, enteritis hemocitica, as well as the presence of protozoa and epicomensais gregarines were observed in the shrimp examined. Infectious diseases affecting the shrimp are complex events and the continuous and accurate records of the farms are essential for epidemiological studies. These, identifying risk factors and involving them in the analysis are essential to maintain and monitor the health of animals and for the good productivity of crops.

Keywords: Shrimp, diseases, wet mount, histopathology, PCR

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. OBJETIVOS.....	12
2.1. Objetivo geral.....	12
2.2. Objetivos específicos.....	12
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
3.1. Carcinicultura na presença de doenças.....	13
3.2. Fatores de risco ao aparecimento de doenças nos camarões.....	13
3.3. Enfermidades.....	15
3.4. Diagnóstico de doenças infecciosas.....	24
4. REFERÊNCIAS.....	27
5. ARTIGO I.....	39
6. ARTIGO II.....	83

LISTA DE TABELAS

ARTIGO I

TABELA 1.	Primers utilizados para a detecção do IMNV, IHHNV e WSSV.....	65
TABELA 2.	Frequência absoluta e relativa de camarões pequenos (P) e médios (M) de fazendas comerciais de Pernambuco/Brasil com IMNV detectado por PCR.....	66
TABELA 3.	Frequência absoluta e relativa de camarões pequenos (P) e médios (M) de fazendas comerciais de Pernambuco/Brasil com IHHNV detectado por PCR.....	67
TABELA 4.	Densidade, tempo de cultivo e sobrevivência de camarões (cam) nas fazendas pesquisadas.....	68

ARTIGO II

TABELA 1	Frequência absoluta e relativa de camarões pequenos (P) e médios (M) com clusters, em função da estação do ano e seu peso, de fazendas comerciais de Pernambuco/Brasil.....	101
TABELA 2.	Frequência absoluta e relativa de camarões pequenos (P) e médios (M) com epicomensais, em função da estação do ano e seu peso, de fazendas comerciais de Pernambuco/Brasil.....	102
TABELA 3.	Frequência absoluta e relativa de camarões pequenos (P) e médios (M) com gregarinas, em função da estação do ano e seu peso, de fazendas comerciais de Pernambuco/Brasil.....	103
TABELA 4.	Frequência absoluta e relativa de camarões pequenos (P) e médios (M) com Enterite hemocítica (EH), em função da estação do ano e seu peso, de fazendas comerciais de Pernambuco/Brasil.....	104

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO I

- FIGURA 1. Infiltração hemocítica e edema na musculatura do cefalotórax..... 69
- FIGURA 2. Gel de agarose a 2% corado com Brometo de Etídio. Amostra de camarão 1 é positiva e de 2 a 9 são negativas para o IMNV; C +: controle positivo; C - : controle negativo (água ultra-pura) e M, marcador de peso molecular de 100pb..... 70
- FIGURA 3. Gel de agarose a 1,6% corado com Brometo de Etídio. Amostras de camarões 1 a 14 são positivas para o IHHNV; C +: controle positivo; C - : controle negativo (água ultra-pura) e M, marcador de peso molecular de 100pb..... 71
- FIGURA 4. Gel de agarose a 1,% corado com Brometo de Etídio. Amostras de camarões 1 a 12 são negativas para o WSSV; C +: controle positivo; C - : controle negativo (água ultra-pura) e M, marcador de peso molecular de 100pb..... 72

1. INTRODUÇÃO

A produção de camarão possui grande importância econômica e social, principalmente, no Nordeste, região responsável por 93% do camarão cultivado no país (RODRIGUES, 2005). O estado de Pernambuco foi responsável por 2,88% (127 t) do volume de 4.413 t de camarão exportado em 2009 (ABCC, 2009).

O camarão branco do pacífico, *Litopenaeus vannamei*, é a principal espécie cultivada no país e vem sendo objeto de intensos investimentos financeiros e tecnológicos no Nordeste. A carcinicultura é um dos segmentos da aquicultura que mais contribui para o crescimento do agronegócio no mundo. No entanto, esta atividade vem enfrentando grandes desafios relativos à sanidade desses animais cultivados.

Cultivos intensivos dos espécimes, nos quais são adotadas altas biomassas e, quando associados a outros manejos deficientes (cultivos longos; não monitoramento de parâmetros físicos, químicos e microbiológicos da água; excesso de matéria orgânica) causam desequilíbrio no meio aquático, cujo efeito sobre os animais podem ser desastrosos. Os erros de manejo, de modo geral, favorecem ao surgimento e a disseminação de doenças, que são uma das responsáveis pelo baixo desempenho produtivo dos camarões nas diversas etapas de cultivo.

Um dos maiores entraves para a carcinicultura é a ocorrência de enfermidades. Por isso é de suma importância adotar e aperfeiçoar os métodos e as técnicas que permitam um diagnóstico rápido e seguro. Além disso, é necessário também, investigar e identificar outros fatores de risco ao aparecimento de doença (LIGHTNER, 2005). No presente estudo, objetivou-se verificar a frequência de doenças infecciosas em camarões cultivados no litoral de Pernambuco por meio de exame a fresco, histopatologia e Reação da Cadeia da Polimerase (PCR), associando-a a sazonalidade e peso dos animais bem como alguns parâmetros de cultivo.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Contribuir para a produção de camarão marinho sustentável em Pernambuco, ao investigar enfermidades infecciosas, priorizando as viroses Mionecrose Infecciosa Viral (IMNV), Necrose Hematopoiética e Hipodermal Infecciosa (IHHNV) e a Síndrome da Mancha Branca (WSSV).

2.2. Objetivos específicos

- Pesquisar lesões sugestivas das viroses IMNV, IHHNV e WSSV através de exame a fresco e histopatológico em camarões cultivados.
- Verificar a frequência do IMNV, IHHNV e WSSV em camarões cultivados por meio de PCR.
- Estabelecer a frequência de lesões e/ou doenças infecciosas em camarões pequenos e médios, por meio de exame a fresco, histopatológico e PCR.
- Verificar a ocorrência de doenças e lesões conforme a estação de chuva ou de estio.
- Associar os resultados da análise histopatológica, exame a fresco e PCR com parâmetros de manejo.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Carcinicultura na presença de doenças

A demanda, cada vez mais crescente, pelo camarão fez com que a produção extrativista atingisse o limite de exploração sustentável. Assim, a produção de camarão em cultivo tornou-se o único modo de atender a demanda desse produto apreciado para o consumo (ROCHA e ROCHA, 2010).

A carcinicultura tornou-se uma alternativa de produção de alimentos rápida e em grande escala. No entanto, a elevada densidade de povoamento nos viveiros, utilizada em sistemas de cultivos intensivos facilitou o aparecimento e o alastramento de enfermidades. O seu controle se constitui no maior desafio da carcinicultura mundial, já que as doenças se mostraram capazes de exterminar populações inteiras (BARRACO, 2004; LIGHTNER, 2005).

Conforme relatado por Subasinghe (2005), para que se tenha uma carcinicultura economicamente sustentável, é fundamental que se tenha um ambiente de cultivo equilibrado, além de um monitoramento da sanidade dos camarões, prevenindo o aparecimento de doenças. Muitas dessas doenças que afetam camarões cultivados estão sendo associadas ao desequilíbrio do ambiente aquático dos criatórios e do ambiente circundante.

No final da década de 80, um grupo de doenças, até então desconhecidas, surgiu no camarão de viveiro, na Ásia e nas Américas, e se propagou rapidamente através das fronteiras internacionais gerando um impacto muito significativo na produção (WALKER e MOHAN, 2009).

3.2. Fatores de risco ao aparecimento de doenças nos camarões.

A epidemiologia veterinária tem como um de seus objetivos identificar e quantificar fatores de risco ao aparecimento de doenças em animais. Muitos estudos relacionados à saúde e à produção animal envolvem avaliações simultâneas dos fatores de risco a que são submetidos os animais nos criatórios (SOUZA et al., 2002).

É fundamental, em qualquer tipo de criação animal, pesquisar e conhecer os fatores de risco que contribuem para o surgimento ou propagação de uma enfermidade. É possível conviver com algumas doenças na carcinicultura, quando boas práticas de manejo são adotadas em conjunto com um monitoramento sanitário utilizando

ferramentas de diagnóstico para identificação de patógenos, considerando que os animais aquáticos são mais difíceis de serem visualizados e monitorados quando comparados com animais terrestres.

O monitoramento em cultivos no sul da Índia produziu alguns resultados positivos quanto à sobrevivência, produtividade, duração do cultivo (dias) e peso médio dos espécimes quando comparados com os cultivos não monitorados. Na ocasião, o monitoramento foi baseado numa abordagem epidemiológica que consistiu na identificação de riscos e no emprego de boas práticas de manejo. Foi verificado que o impacto ocasionado pelas doenças foi reduzido nos viveiros monitorados (sobrevivência de 58% , produtividade de 318 kg/ha, peso médio final de 18g e cultivo com 87 dias) quando comparados com os não monitorados (sobrevivência de 32% , produtividade de 133 kg/ha, peso médio final de 12g e cultivo com 63 dias) (SUBASINGHE, 2005).

Na carcinicultura, há uma conjunção de fatores que são considerados determinantes no aparecimento de doenças. Dentre eles, podemos citar o manejo deficiente, água de má qualidade (não monitoramento de parâmetros físicos, químicos e microbiológicos da água) aquisição de pós-larvas não certificadas, emprego de altas densidades, nutrição desbalanceada. As enfermidades também podem ser veiculadas de uma fazenda a outra, ou de um cultivo a outro, pelo trânsito de pessoas, veículos e pelo compartilhamento de equipamentos (caiaques, remos, redes, etc.) sem os cuidados mínimos e necessários de higiene e profilaxia (OIE, 2010).

Segundo Martins (2006), a carcinicultura é considerada uma cadeia de elos interligados entre o camarão, o ambiente aquático e o patógeno. Quando ocorre desequilíbrio em um dos três fatores, favorecendo o estresse nos animais cultivados, o que torna os mesmos vulneráveis à ação de patógenos e mais susceptíveis a adoecerem, a cadeia é quebrada. Thrusfield (2004) acrescenta à tríade mencionada, o manejo como quarto elemento, uma vez que a ação do homem pode interferir, positivamente ou negativamente, na saúde de animais que são cultivados de forma intensiva.

O estresse é citado por Stott (1981) como sendo uma condição na qual um ser vivo é incapaz de manter um estado fisiológico normal por causa de vários fatores que afetam negativamente o seu bem-estar. O mesmo torna-se um fator de risco iniciante ou predisponente para que a doença se instale em qualquer animal (LE MOULLAC e HAFFNER, 2000; WALKER e MOHAN, 2009).

A criação de animais aquáticos comumente envolve o deslocamento de espécies do seu habitat natural para um ambiente que é novo e, por vezes, estressante. Um dos riscos sanitários decorrentes dessa prática é o emprego de densidades elevadas nas fazendas que são bem mais elevadas que a do habitat natural, circunstância que facilita a disseminação de agentes infecciosos (WALKER e MOHAN, 2009; OIE, 2010).

Um outro fator de risco são as aves que podem ser vetores mecânicos ao transportar material infectado de um cultivo a outro, por meio de suas fezes, representando importante fonte de disseminação de patógenos (MACIEL, 2002). Também deve ser considerado na propagação de patógenos virais, o camarão congelado comercializado entre regiões e países. Nunan et al.(1998) verificaram que WSSV e YHV (Vírus da cabeça amarela-Yellow Head virus) estavam presentes em camarões congelados importados da Ásia.

Cultivos prolongados, em condições ambientais adversas, podem favorecer ao aparecimento de enfermidades, pois há uma maior exposição dos camarões ao agente patogênico. As vezes os primeiros sinais de doença surgem com o cultivo contínuo (prolongado) tendo, como consequência, camarões com menor qualidade ao serem comercializados (KAUTSKY et al., 2000). Em estudo realizado por Silva et al.(2010) foi evidenciado que o tempo de cultivo influenciou de forma significativa na sobrevivência dos camarões com lesões sugestivas de IMNV. Cultivos com 60 dias, na presença de lesões da IMNV, tiveram sobrevivência de 77,02%, enquanto que com 100 dias tiveram sobrevivência de 56,05%.

3.3. Enfermidades

A saúde é o estado do camarão em perfeito uso de suas funções orgânicas e em equilíbrio com o meio ambiente. A doença, por outro lado, pode ser considerada qualquer alteração adversa na saúde ou no desempenho zootécnico desses animais.

O conjunto de causas que podem originar uma doença é denominado de etiologia. O agente etiológico é considerado determinante primário quando é o responsável principal pela indução da doença, por exemplo, o vírus. Além do determinante primário há outros fatores ou determinantes secundários que predispoem ou agravam o desenvolvimento da enfermidade (THRUSFIELD, 2004). Principalmente,

nos sistemas de cultivo intensivo os peneídeos podem ser alvos, simultaneamente de agentes infecciosos e não infecciosos.

Camarões cultivados podem ser acometidos tanto por enfermidades não infecciosas causadas por agentes abióticos (efeitos nutricionais, genéticos, agentes tóxicos e ambientais), quanto por enfermidades infecciosas, causadas por patógenos transmissíveis, como as bactérias, os fungos, os parasitos e os vírus. Dentre essas, as viroses são responsáveis pelos maiores prejuízos econômicos na carcinicultura, sendo apontadas como o principal fator limitante para o desenvolvimento dessa atividade (LIGHTNER, 1996; FLEGEL et al., 2004; LIGHTNER, 2005).

Em peneídeos, já foram relatadas mais de 20 enfermidades com etiologia viral (LIGHTNER, 1996). Dentre as viroses que acometem o *L.vannamei* no Brasil, quatro merecem destaque: Síndrome de Taura (TSV), Síndrome da Mancha Branca (WSSV), Necrose Hematopoiética e Hipodermal Infecciosa (IHHNV) e Mionecrose Infecciosa (IMNV).

A TSV também é conhecida como doença dos berçários ou da fase larval, pois é possível observar mortalidades entre 14 a 40 dias após a transferência das pós-larvas ao viveiro (LIGHTNER, 1996). Foi relatada pela primeira vez em fazendas de camarão próximas ao rio Taura, em Guayaquil (Equador) em 1991 (JIMÉNEZ, 1992). Naquele país, houve a suspeita de sua existência anteriormente quando elevada mortalidade de camarão foi associada a agrotóxicos (pesticidas e herbicidas) utilizados em plantações de bananas para combater a Sigatoka Negra (causada pelo fungo *Mycosphaerella fijiensis*). Ainda na mesma década, a doença foi registrada nos EUA, na América Central e em países da América do Sul, inclusive no Brasil em 1994 (HASSON et al., 1999). Em Taiwan, a TSV foi registrada em reprodutores de *L. vannamei* que foram importados da América Central e do Sul (YU e SONG, 2000).

A TSV tem como agente etiológico um RNA vírus de fita simples pertencente à família Dicistroviridae, gênero *Cripavirus*, que se replica no citoplasma das células (MAYO, 2002). O vírus acomete pós-larvas, juvenis e adultos, podendo causar mortalidade de 85 a 90% no *L. vannamei*, seu principal hospedeiro. Animais que se recuperam podem ser portadores do vírus por toda vida (LIGHTNER, 1996). Aves desempenham um papel importante na transmissão do TSV, quando se alimentam de camarões infectados, pois podem carrear o vírus por meio de suas fezes de uma fazenda a outra (VANPATTEN et al., 2004).

A TSV tem duas fases clínicas: aguda e crônica (recuperação). Na fase aguda, os camarões estão moribundos, o leque caudal e pleópodos encontram-se avermelhados (devido a expansão dos cromatóforos), intestino vazio, exoesqueleto amolecido e é comum os animais morrerem durante a ecdise (muda). Os camarões que sobrevivem, entram na fase crônica e apresentam melanizações cuticulares, podendo ou não, ser observado o exoesqueleto amolecido e expansão dos cromatóforos (LIGHTNER, 1996; MORALES-COVARRUBIAS, 2010).

São observadas na fase aguda, pela histopatologia, necroses multifocais (semelhante ao formato de pimenta - “peppered”) no epitélio cuticular, caracterizadas por picnose nuclear e cariorrexia. Pode-se também notar focos de necrose nos apêndices, epitélio do estômago e intestino. No órgão linfóide, o vírus pode causar uma desorganização celular formando esferóides do órgão linfóide. Na fase crônica, observa-se infiltração hemocítica cuticular além de esferóides do órgão linfóide ectópico em diferentes tecidos (GESTEIRA, 2006; MORALES-COVARRUBIAS, 2010). Para o diagnóstico dessa enfermidade pode-se citar, dentre as técnicas, a histopatologia, hibridização in situ, dot-blot e PCR .

A Necrose Hematopoiética e Hipodermal Infecciosa (IHHNV) tem ampla distribuição geográfica nas Américas e na Ásia. IHHNV teve seu primeiro registro em 1981, no Havaí, acometendo o camarão azul (*Litopenaeus stylirostris*), quando ocasionou a mortalidade de 90% nesta espécie (LIGHTNER, 1996). No Brasil, foi relatada pela primeira vez em 1991, nas espécies *Penaeus monodon* e *L.vannamei* que apresentavam crescimento reduzido e deformidades externas como rostro desviado, características da Síndrome do Nanismo Deformativo (*runt deformaty syndrome-RDS*) (BUENO, 1991).

A IHHNV é causada por um vírus DNA de fita simples, mede 22 nm de diâmetro, pertencente à família Parvoviridae, gênero *Brevidensovirus* (BONAMI et al., 1990; SHIKE et al. 2000). O IHHNV pode infectar a maioria dos peneídeos, incluindo as principais espécies cultivadas: *L. vannamei*, *P. monodon* e *L. stylirostris*. Nessa última espécie, a doença causa mortalidade elevada, principalmente em juvenis e sub-adultos. Estudo realizado por Hsieh et al. (2006) verificou que o IHHNV infectou pós-larvas e sub adultos de *Macrobrachium rosenbergii*, nos quais o hepatopâncreas foi o órgão mais lesionado, observando-se corpúsculos de inclusão intranucleares

eosinofílicos Cowdry tipo A. Macroscopicamente, foi observado no *M. rosenbergii* deformidades cuticulares no 4º e 6º segmentos abdominais e retardo no crescimento.

O IHHNV pode ser transmitido horizontalmente: quando camarões sadios ingerem camarões mortos pela doença (canibalismo), pelo compartilhamento de equipamentos contaminados de um viveiro para outro, água contaminada com partículas virais, dentre outras formas. A transmissão vertical foi demonstrada por Motte et al.(2003), ao utilizar fêmeas de *L. vannamei* livres do IHHNV e fêmeas da mesma espécie infectadas pelo vírus, que foram fertilizadas por reprodutores livres do IHHNV. Nesse experimento os descendentes das fêmeas infectadas foram positivos para o vírus, no *nested* PCR (PCR em dois passos) enquanto que os descendentes das fêmeas livres desse patógeno permaneceram livres, na mesma técnica de diagnóstico.

No *L.vannamei* a doença é caracterizada pela síndrome do nanismo deformativo, onde ocorre desuniformidade do lote, observada pela presença de animais nanicos, deformidades no rosto, flagelo antenal enrugado e outras alterações cuticulares (OIE, 2009). Nessa espécie o IHHNV não provoca elevados índices de mortalidade, porém o crescimento reduzido e as deformidades contribuem para perdas econômicas, por uma desvalorização do produto no comércio.

Na histopatologia, observam-se necrose no tecido hematopoiético, corpúsculo de inclusão intranuclear em vários órgãos e tecidos como: brânquias, epitélio cuticular e do estômago, cordão nervoso e nervo ganglionar, tecido hematopoiético, glândula antenal, gônadas, órgão linfóide, tecido conectivo, e músculos estriados. (LIGHTNER, 1996; MORALES-COVARRUBIAS, 2010). O diagnóstico para o IHHNV é, geralmente, realizado por meio das técnicas de histopatologia, hibridização *in situ*, *dot-blot* e PCR (GESTEIRA, 2006).

A Síndrome da Mancha Branca (WSSV) é causada por um DNA vírus de fita dupla pertencente à família Nimaviridae e gênero *Whispovirus* (MAYO, 2002). A doença tem causado grandes prejuízos econômicos na carcinicultura desde 1993. Seus primeiros registros foram na China e no Japão (CHOU et al., 1995). Posteriormente, foi registrada no hemisfério ocidental, no Texas e Carolina do Sul, nos EUA (LIGHTNER, 1996). No início de 1999, sua presença foi relatada na América Central e, ainda no mesmo ano, na América do Sul, no Peru e na Colômbia. No Equador, em 1998, a produção de camarão, devido à ocorrência do WSSV, foi reduzida de 115.000 t para 38.000 t em 2000, gerando impacto econômico significativo nesse país (CASTRO et al.,

2000, 2001; RODRIGUEZ et al., 2003). O vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV) foi responsável por grandes perdas econômicas em criatórios de diversos países, como na China com mortalidades de 80 a 100% em poucos dias de infecção (CHOU et al., 1995; LO et al., 1999), demonstrando ser uma das doenças de maior impacto econômico no mundo (WALKER e MOHAN, 2009).

Em 2005, a WSSV foi diagnosticada no Brasil, em cultivos situados nos municípios de Laguna e Imaruí, em Santa Catarina (SEIFFERT et al., 2005). Os fatores de risco, baixa temperatura, problemas de qualidade de água e de solo, foram considerados determinantes para o surgimento da doença.

Cavalli et al. (2010) investigaram por *Nested* - PCR e histologia o WSSV no *L.vannamei* cultivado e, em camarões selvagens no complexo de Laguna e na Costa de Santa Catarina. Os autores detectaram o vírus nas espécies nativas *Farfantepenaeus paulensis*, *F. brasiliensis* e no *L.vannamei* cultivado, e sugerem que os níveis de infecção dos camarões selvagens parecem estar relacionados à proximidade das fazendas.

O WSSV que até pouco tempo esteve presente apenas nos animais cultivados no sul do Brasil, teve sua ocorrência registrada também no Ceará, em animais assintomáticos em 2005 (OIE, 2005). Segundo Peinado-Guevara e López-Meyer (2006), animais podem estar infectados pelo WSSV e serem assintomáticos, não apresentando sinais clínicos da doença. Em 2008 a presença do vírus na Bahia foi responsável por sobrevivência de apenas 5% (MULLER et al., 2010).

O WSSV possui uma diversidade de hospedeiros em potencial, dentre esses hospedeiros podemos citar várias espécies de camarões tanto de cultivo quanto nativos, lagostas, lagostins, caranguejos, copépodes, rotíferos e até larvas de insetos (LO et al., 1996a; YAN et al., 2004; OIE, 2009). Em peneídeos, já foi detectado em pós-larvas, juvenis e adultos (CHANG et al., 1998). Martorelli et al. (2010) relataram a primeira ocorrência de WSSV e IHHNV detectados por PCR e histopatologia em camarões selvagens da espécie *Artemesia longinaris* na Bahia Blanca (Argentina).

Conforme Lo et al. (1997), inclusões virais presentes em órgãos reprodutivos sugerem a transmissão vertical pelo vírus. A transmissão horizontal pode ocorrer por meio de ingestão de animais infectados pelo vírus; contaminação ambiental, por elevadas cargas virais presentes na água e/ou sedimentos e por vetores (caranguejos, rotíferos, poliquetas, dentre outros). O solo dos viveiros, por exemplo, pode ser

considerado como reservatório do vírus, pois é um dos ambientes de zooplâncton, como os rotíferos, que podem ser vetores do vírus (YAN et al. 2004). Soto et al. (2001) compararam as taxas de mortalidade de *L. vannamei* que ingeriram diferentes partes do corpo (cefalotórax, abdômen) ou camarões inteiros infectados com o WSSV e sugeriram que o cefalotórax parece ser mais infeccioso que as outras partes, provavelmente por ser mais palatável.

Sudha et al. (1998) classificaram a doença, quanto a sua manifestação, em três categorias. A categoria I em que ocorrem danos moderados a elevados nos tecidos afetados, há presença de manchas brancas na cutícula e significativa mortalidade no período de 7 a 10 dias após a infecção. Na categoria II, os camarões apresentam coloração avermelhada, tecidos altamente infectados e mortalidade em massa, dentro de 2 a 3 dias. Já na categoria III, há ausência de manchas brancas ou coloração avermelhada, com mortalidade entre 15 a 28 dias.

Os camarões apresentam, por vezes, pontos brancos de 1 a 2 mm de diâmetro na cutícula e carapaça. O nado é errático e há redução de ingestão de alimento. A severidade da enfermidade é agravada pela grande diversidade de hospedeiros, velocidade de multiplicação e poder de propagação do vírus (FLEGEL, 1997). A mortalidade pode alcançar até 100% em 3 a 10 dias após o início dos sinais clínicos (LIGHTNER, 1996). No Equador, a Síndrome da Mancha Branca foi responsável por mortalidades de 60 a 95% após um intervalo de 5 a 8 dias em que os animais apresentaram os primeiros sinais clínicos da doença (RODRIGUEZ et al., 2003).

Na análise histopatológica, podem ser observados corpúsculos de inclusão intranucleares em núcleos hipertrofiados de células ectodermis e mesodermis dos apêndices, tecido conectivo, glândula antenal, brânquias, tecido hematopoiético, órgão linfóide, coração, estômago e trato intestinal (LIGHTNER et al., 1998; SAHUL et al., 2000). Pantoja e Lightner (2003) observaram núcleos picnóticos e cariorrexis nuclear em diferentes tecidos, principalmente no órgão linfóide de espécimes portadores tanto da WSSV quanto de outra doença viral denominada Doença da Cabeça Amarela (Yellow Head Disease-YHD), necessitando de outro meio de realizar o diagnóstico diferencial.

A Mionecrose Infecciosa Viral (IMNV) tem como agente etiológico um RNA vírus pertencente à família Totiviridae (POULOS et al., 2006a). A etiologia viral da doença foi confirmada, em 2004, por microscopia eletrônica e análise genômica

(NUNES et al., 2004). O vírus pode ser responsável por mortalidades de 40 a 70% no *L.vannamei* cultivado (OIE, 2009).

Em 2002, esta enfermidade presente no Piauí foi denominada de Necrose Muscular Idiopática (NIM), por não se conhecer o agente etiológico. Em 2003, já estava disseminada para o Ceará e o Rio Grande do Norte e, em 2004, na Paraíba e Pernambuco (GRAF et al., 2003). No Brasil a enfermidade foi responsável por perdas de 20 milhões de dólares em cultivos do *L. vannamei* em 2003 (NUNES et al., 2004; OIE, 2006). O registro da IMNV ficou restrito ao nordeste brasileiro até 2006 quando foi confirmada na Indonésia (SENAPIN et al., 2007).

A doença caracteriza-se por necrose dos músculos estriados do cefalotórax e abdômen, podendo os últimos segmentos abdominais apresentar aspecto leitoso ou dar a aparência de camarão cozido. As lesões histopatológicas que podem ser evidenciadas são: órgãos linfóides ectópicos em diferentes órgãos e tecidos, infiltração hemocítica, edema, necrose e áreas de cicatrizações na musculatura dos segmentos abdominais e cefalotórax e com menor frequência na musculatura do coração (SANTOS et al., 2005; OIE, 2009).

Convém observar que a necrose muscular, considerada típica da IMNV, foi evidenciada também na doença da cauda branca do *Macrobrachium rosenbergii* (TUNG et al., 1999), cuja etiologia foi atribuída ao Nodavirus *Macrobrachium rosenbergii* (MrNV) (OIE, 2006). Camarões cultivados em Belize, apesar de apresentarem necrose muscular e esferóides ectópicos do órgão linfóide, obtiveram resultado negativo para o IMNV (POULOS et al., 2006b; LIGHTNER et al., 2006).

Em pesquisa realizada por Pinheiro et al. (2007), em camarões cultivados no litoral de Pernambuco, através de RT-PCR, foi constatada uma prevalência do vírus por fazenda que oscilou entre 0% e 35,56%. Dentre os 530 indivíduos analisados, 76 mostraram-se positivos para o IMNV. Estudo realizado por Andrade et al. (2007) em camarões provenientes do Ceará, constatou que a RT-PCR foi um método rápido, específico e sensível para o diagnóstico da IMNV.

Estudo histopatológico da IMNV resultou na identificação de lesões sugestivas da doença em amostras de *L.vannamei* das quatro fazendas pesquisadas no litoral de Pernambuco (SILVA et al., 2010). Em relação ao período climático, foi verificada maior ocorrência da enfermidade no período de estio (novembro de 2005 a março de 2006), divergindo do que é citado pelo relatório da Associação Brasileira dos Criadores

de Camarão (ABCC, 2004), que apontou a maior frequência da IMNV no inverno, devido ao desequilíbrio ambiental, decorrente de fortes chuvas. Segundo Silva et al. (2010), a causa mais provável da redução das ocorrências da doença no período chuvoso (abril a setembro de 2006) esteve associada a mudanças de manejo. De acordo com Lightner et al. (2004), a IMNV está associada a estresse físico e ambiental, assim como a mudanças bruscas de salinidade e temperatura.

Além das viroses anteriormente mencionadas, infecções causadas por endoparasitos como as gregarinas; ectoparasitas como os protozoários epicomensais e doenças bacterianas como as causadas pelas bactérias do gênero *Vibrio* assim como a α -proteobactéria do gênero *Rickettsia* também estão presentes em camarões cultivados no Brasil causando-lhes prejuízos.

Dentre os protozoários que causam doenças em camarões marinhos, destacam-se as gregarinas, que se encontram disseminadas por todo o mundo. São pertencentes ao filo Apicomplexa e podem parasitar moluscos bivalves, anelídeos, insetos, crustáceos (LEANDER et al., 2006). Localizam-se no estômago, trato intestinal e hepatopâncreas de camarões cultivados e silvestres (CHAVÉZ-SÁNCHEZ et al., 2002, JIMÉNEZ et al., 2002).

Em camarões com alto grau de infecção por gregarinas, o intestino pode apresentar alterações variadas, tais como coloração amarelada, inflamação, hiperplasia da mucosa, obstrução, além de perfurações da parede intestinal. Essas podem favorecer o início de uma infecção secundária, principalmente por bactérias (MORALES-COVARRUBIAS, 2010). Infestações por gregarinas podem resultar em má absorção dos alimentos e ter como consequência redução no ganho de peso do camarão e um aumento da taxa de conversão alimentar (CHAYABURAKUL et al., 2004)

O camarão pode se infectar ao alimentar-se de moluscos bivalves e poliquetas do gênero *Polydora*, que vivem no fundo de viveiros e que servem de hospedeiros intermediários para as gregarinas (FAJER-ÁVILA et al. 2005; LEANDER et al., 2006). Esses endoparasitos completam seu ciclo de vida no trato digestivo de artrópodes marinhos, como os crustáceos (CREMONTE et al., 2005).

Epicomensais são protozoários que frequentemente se aderem às brânquias, apêndices e cutícula dos camarões, sem que estes estejam necessariamente doentes. No entanto camarões doentes ou submetidos a situações estressantes reduzem, em consequência, sua atividade limpadora tornando-se mais susceptíveis a uma infestação

massiva pelos protozoários epicomensais (KAUTSKY et al., 2000; MORALES-COVARRUBIAS, 2010).

A presença massiva de organismos epicomensais pode causar alta mortalidade em camarões quando acometem brânquias, região oral, cutícula, apêndices e outras regiões, principalmente de camarões juvenis e adultos (MORALES-COVARRUBIAS, 2010).

As bactérias do gênero *Vibrio* são consideradas patógenos oportunistas e podem ser encontradas tanto em ecossistemas aquáticos quanto em camarões cultivados ou de vida livre (VANDERZANT et al., 1971). São anaeróbicas facultativas, Gram-negativas em forma de bastonete curvo ou reto (RODRICK, 1991).

As vibrionáceas têm grande relevância para a carcinicultura, porque são capazes de infectar todos os estádios de vida do camarão e em larvicultura podem ser responsáveis por 100% de perdas dos animais acometidos (MENDES et al., 2009). BUGLIONE et al. (2010) ao realizarem infecção experimental em larvas e juvenis de *L.vannamei*, detectaram mortalidades de 97,3% em larvas e de 88,7% em juvenis, atribuindo tal fato ao *Vibrio alginolyticus*.

Mendes et al. (2009) ao pesquisarem vibrionáceas em camarões de três fazenda de Pernambuco, observaram uma maior diversidade de *Vibrio* spp no período de estio em animais de duas fazendas, e no período chuvoso em apenas uma fazenda. A vibriose, ocasionada pelas vibrionáceas podem causar infecção localizada ou sistêmica, afetando todos os órgãos e tecidos. Lesões sugestivas de bacteriose como “cluster” bacteriano nas brânquias, epitélio cuticular, coração, inflamação no hepatopâncreas e musculatura podem ser observadas pela histopatologia (MORALES-COVARRUBIAS e CHAVEZ-SANCHEZ, 1999). Na análise a fresco observa-se musculatura opaca, trato digestivo vazio, áreas melanizadas na cutícula e apêndices, palidez e deformidades nos túbulos do hepatopâncreas, luminescência dentre outras (DOURADO, 2009; MORALES-COVARRUBIAS, 2010).

Além de representar um risco sanitário, algumas espécies de *Vibrio* são responsáveis por causar doenças transmitidas por alimentos (DTA) em humanos. O consumo, por exemplo, do pescado sob a forma crua (sushi, sashimis) é um risco à saúde humana, principalmente por esse alimento ser bastante manipulado e não receber nenhum tratamento térmico (MOURA FILHO et al., 2007). Espécies de víbrio como

Vibrio vulnificus, *V. parahaemolyticus* e *V. cholerae* são responsáveis por causar gastroenterite no homem e em alguns casos, septicemia (PANICKER et al., 2004).

A Hepatopancreatite Necrosante Bacteriana (NHPB) tem como agente etiológico uma α -proteobactéria, gram negativa, intracelular obrigatória pertencente ao gênero *Rickettsia* (LOY et al., 1996). A NHPB foi registrada pela primeira vez em camarões cultivados no Texas, sendo na ocasião responsável por mortalidade entre 20 a 95%, e entre 70-90%, nas Américas Central e do Sul (FRELIER et al., 1992; LOY et al., 1996). A ocorrência da NHPB está restrita às Américas, podendo acometer as pós larvas, juvenis e adultos. As principais espécies acometidas são: *L.vannamei*, *L stylirostris*, *Farfantepenaeus aztecus* e *F.californiensis* (LIGHTNER, 1996; VINCENT et al., 2004).

A presença da NHPB está associada a condições de elevadas temperaturas e salinidade (acima de 29°C e 20‰, respectivamente), assim como condições no ambiente de cultivo inadequadas, por exemplo, as eutrofizações no ambiente aquático das carciniculturas (BUCHELI et al., 2004).

Trato digestivo vazio, exoesqueleto amolecido, baixo crescimento e elevada conversão alimentar são relatados nos animais doentes (GOMES et al., 2007). Camarões com NHP apresentam sintomas semelhantes a outras enfermidades como a vibriose, necessitando de diagnóstico diferencial por PCR, por exemplo, para a sua confirmação (GESTEIRA, 2006). Gomes et al. (2010) observaram por histopatologia, infiltração hemocítica, edema, lesões granulomatosas tanto em camarões positivos quanto nos negativos por PCR para essa doença, circunstância essa que exclui esse exame como definitivo para o NHP.

3.4. Diagnóstico de doenças infecciosas

O monitoramento da saúde dos animais aquáticos envolve várias etapas, como anamnese (inquérito epidemiológico), exame clínico e análises laboratoriais.

A anamnese pode ser realizada com a aplicação de questionários com o intuito de buscar informações sobre o histórico das fazendas (localização, quantos viveiros e tempo de funcionamento dos mesmos, presença ou não de doenças), origem de pós-larvas, manejo de cultivo (controle da qualidade de água, densidade empregada, tempo de cultivo, se há ou não compartilhamento de equipamentos de um viveiro a outro, se após a realização de um exame a fresco os animais são devolvidos ou não ao viveiro,

qual o destino de camarões mortos ou moribundos) são de suma importância para embasar o diagnóstico das doenças.

Em episódios e suspeitas de doença, devem ser selecionadas amostras de camarões para dar início às análises laboratoriais. Os animais devem estar vivos ou moribundos, aparentemente saudáveis ou com lesões (OIE, 2009).

O exame a fresco é uma técnica de diagnóstico presuntivo, utilizada para monitorar o estado de saúde dos camarões em laboratório e a campo. Consiste na dissecação do camarão em todos seus estágios para observação das alterações que ocorrem nos órgãos e tecidos do mesmo (PEREIRA e SANTOS, 2003; MORALES-COVARRUBIAS, 2010). Essas observações podem ser macro e microscópicas como:

- Observações macroscópicas: coloração e consistência das antenas e urópodos; integridade e coloração da cutícula, carapaça, pleópodos e periópodos; presença de deformidades e/ou traumas no exoesqueleto e musculatura; repleção do trato intestinal; nível de estresse dos animais (cromatóforos expandidos); depósitos de cálcio na carapaça; tempo de coagulação da hemolinfa.
- Observações microscópicas: avaliação morfológica dos órgãos coletados; presença de indicativo de necrose, sujidades e microrganismos nas brânquias; conteúdo intestinal e presença de protozoários; conteúdo do ceco posterior e presença de gametócitos de *Gregarina* spp.; nível de lipídeos dos túbulos do hepatopâncreas.

A histopatologia é uma importante ferramenta de diagnóstico, pois descreve os tipos e a intensidade de lesões microscópicas nos tecidos e órgãos dos camarões. Na análise histopatológica é importante conhecer quando há ou não alteração em determinado órgão ou tecido, assim como saber o tropismo do patógeno por determinados órgãos ou tecidos. Por exemplo, a α -proteobactéria do gênero *Rickettsia*, agente etiológico da NHPB, acomete o hepatopâncreas, o vírus da IMN tem tropismo pela musculatura.

A imuno-histoquímica (IHQ) é uma outra técnica que pode ser utilizada. É uma combinação de técnicas anatômicas, imunológicas e bioquímicas que permitem identificar as moléculas (antígenos) produzidas por diversos agentes infecciosos, como os vírus. Além disto, permite uma associação entre as lesões histológicas e a presença do agente etiológico (GIMENO, 1995).

Os métodos moleculares têm sido cada vez mais utilizados no diagnóstico de doenças infecciosas de animais aquáticos. A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) convencional envolve um par de iniciadores (*primers*) para amplificar uma pequena sequência do genoma de um agente infeccioso e possui alta sensibilidade e especificidade na detecção do patógeno. Já na *nested* PCR (PCR em dois passos) são realizadas duas reações de PCR, onde o produto da primeira reação servirá como molde da segunda, juntamente com um segundo par de iniciadores. A *nested* PCR é mais sensível e específica que a PCR convencional. Tanto a PCR convencional quanto a *nested* PCR são ferramentas primordiais para detectar doenças de etiologia viral, principalmente em casos de infecções assintomáticas (LO et al., 1996b; HOSSAIN et al., 2001; PEINADO-GUEVARA e LÓPEZ-MEYER, 2006).

O diagnóstico precoce é essencial para o controle das doenças e diminuição do impacto econômico na carcinicultura. Os métodos devem ser sensíveis, específicos, confiáveis, capazes de detectar a doença e estar acessível a técnicos e pesquisadores (LIGHTNER e REDMAN, 1998).

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, T.P.D. et al. Real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay using taq man probe for detection and quantification of infectious myonecrosis virus (IMNV). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 264, p. 9-15, april 2007.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE CAMARÃO (ABCC). **Avaliação da evolução da IMN nas fazendas de camarão da região nordeste**. [S.l], 2004. Disponível em: <<http://www.abccam.com.br/download/Segunda%20parte%20Relatorio%20%20IMN%20versao%20final.pdf>> 2004b. Acesso em: 10 nov.2010.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE CAMARÃO (ABCC). **Brasil- Perfil das exportações de camarão por estados (Jan-Jul) 2007-2009**. [S.l], 2009. Disponível em: <http://www.abccam.com.br/estat70.htm>. Acesso em: 30 out.2010.

BARRACO, M.A. Mecanismos de resistência a doenças em crustáceos. In RANZINI-PAIVA, M.J.T; TAKEMOTO, R.M; LIZAMA, M.L.A (Org). **Sanidade de Organismos Aquáticos**. São Paulo: Varela, 2004. p. 51-54.

BONAMI, J.R. et al. Purification and characterization of IHNV virus of penaeid shrimps. **Journal of General Virology**,v.71, p. 2657-2664.1990.

BUCHELI, P. et al. A Necrose Hepatopancreática (NHP) do *Litopenaeus vannamei*: caracterização e diagnóstico preliminar pelo método de avaliação da deterioração de tecidos (ADT). **Panorama da Aqüicultura**, Rio de Janeiro, n.86, P.31-38, 2004.

BUENO, S.L.S. Doenças em camarões marinhos no Brasil. **Panorama da aqüicultura**, Rio de Janeiro, v.8, p. 1-8. 1991.

BUGLIONE, C.C. et al. Experimental infection with different bacterial strains in larvae and juvenile *Litopenaeus vannamei* reared in Santa Catarina State, Brazil. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, Maringá, v. 32, n. 3, p. 291-296. 2010.

CASTRO J. M., MORENO D.V; TORRES DE LEÓN , J. Las Cifras de la Crisis. **Acuicultura del Ecuador**, 38: 19-23, 2000.

CASTRO J. M., MORENO D.V; TORRES DE LEÓN , J. El impacto económico de la enfermedad de la mancha blanca en la economía ecuatoriana. **Acuicultura del Ecuador**, 43: 65- 68, 2001.

CAVALLI, L.S. et al. White spot syndrome virus in wild penaeid shrimp caught in coastal and offshore waters in southern Atlantic Ocean. **Journal of fish disease**, 33:533-536. 2010.

CHANG, P.S. et al. Detection of white spot syndrome associated baculovirus in experimentally infected wild shrimp, crab and lobster by in situ hybridization. **Aquaculture**, Amsterdam, v.164, p. 233-242. 1998.

CHAVÉZ-SÁNCHEZ, M.C. et al. Survey of Infectious Diseases and Parasites of Penaeid Shrimp from the Gulf of Mexico. **Journal of the World Aquaculture Society**, 33: 316-329. 2002.

CHOU, H.Y. et al. Pathogenicity of a baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. **Dis.Aquat.Org**, v. 23, p 165-173.1995.

CREMONTE, F; FIGUERAS, A; BURRESON, E.M. A histopathological survey of some commercially exploited bivalve mollusks in northern Patagonia, Argentina. **Aquaculture**, Amsterdam, 249:23-33. 2005.

DOURADO, J. Vibriose em camarões marinhos (*L.vannamei*, Boone 1931) cultivados no litoral de Pernambuco, Brasil. 2009. 47 f. **Dissertação**. (Mestrado em Ciência Veterinária) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

FAJER-ÁVILA, E. J; et al. Effectiveness of oral Elancoban™ and Avimix-ST™ against Nematopsis (Apicomplexa: Porosporidae) gametocysts infecting the shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, Amsterdam, 244:11-18. 2005.

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

FLEGEL, T.W et al. Presence of multiple viruses in non-diseased, cultivated shrimp at harvest . **Aquaculture**, Amsterdam, v. 240, p. 55- 68, jun 2004.

FRELIER, P.F.; SIS, R.F.; BELL, T.A. et al. Microscopic and ultrastructural studies of Necrotic Hepatopancreatitis in pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*) cultured in Texas. **Veterinary Pathology**, Baltimore, [s.n.],v. 29, p. 269-277, 1992.

GESTEIRA, T.C.V. Enfermidades infecciosas registradas na carcinicultura brasileira. In: SILVA-SOUZA, A.T. (Org.). **Sanidade de organismos aquáticos no Brasil**. Maringá: ABRAPOA, 2006. p 137-158.

GIMENO, E.J. Fundamentos de Imunohistoquímica Aplicada a Patologia Veterinária. In: 7 ENCONTRO NACIONAL DE PATOLOGIA VETERINÁRIA, 7., 1995, Belo Horizonte. **Proceedings...**1995, 35 p.

GOMES, G.B; MENDES, E.S; SILVA, V.A. Hepatopancreatite Necrosante (NHP) em camarão marinho. **Ciência Veterinária dos trópicos**, Recife-PE, v.10, p. 47 -53. 2007.

GOMES, G.B. et al. Diagnosis of Necrotizing Hepatopancreatitis in Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, through Wet Mount, Histopathology and PCR Techniques. **Journal of the world aquaculture society**, v.41, n.5, p.816-822. 2010

GRAF, C. et al. Transmissão da síndrome da necrose idiopática muscular (NIM) em *Litopennaeus vannamei*. **Revista da ABCC**. Recife, ano 5,n 4, p.45 -47. 2003.

HASSON, K.W. et al. The geographic distribution of Taura Syndrome Virus (TSV) in the Americas: determination by histopathology and in situ hybridization using TSV-specific cDNA probes. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 171, p.13-26. 1999.

HOSSAIN, M.S. et al. Detection of new hosts for white spot syndrome virus using nested polymerase chain reaction. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 198, p.1-11. 2001

HSIEH, C.Y. et al. Infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus (IHHNV) infections in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 258, p.73-79. 2006

JIMÉNEZ, R. Síndrome de Taura (resumen). Acuacultura del Ecuador. **Revista Especializada de la Camara Nacional de Acuacultura**,1:1-16. 1992

JIMÉNEZ, R; BARNIOL, L; MACHUCA M. Nematopsis marinus n. sp., a new septate gregarine from cultured penaeoid shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone), in Ecuador. **Aquaculture Research**, 33: 231-240. 2002.

- KAUTSKY, N. et al. Ecosystem perspectives on management of disease in shrimp pond farming. **Aquaculture**, Amsterdam, v.191, p. 145-161. 2000.
- LEANDER, B. S. et al. Phylogeny of Marine Gregarines (Apicomplexa) - Pterospira, Lithocystis and Lankesteria - and the Origin(s) of Coelomic Parasitism. **Protist**, 157: 45-60. 2006.
- LE MOULLAC, G; HAFFNER, P. Environmental factors affecting immune responses in crustacea. **Aquaculture**, Amsterdam, v.19, n.1, p. 121 - 131, 2000.
- 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.L et al. Experimental infection of western hemisphere penaeid shrimp with Asian white spot syndrome virus and Asian yellow head virus. **Aquatic Animal Health**, v.10, p 271-281, 1998.
- LIGHTNER, D.V.; AND REDMAN, R.M. Shrimp diseases and current diagnostic methods. **Aquaculture**, v.164, p. 201-220, 1998.
- LIGHTNER, D. V. et al. Infectious myonecrosis: new disease in Pacific white shrimp. **Global. Aquacult.Advocate**,v.7, p.85. 2004. Disponível em <http://pdf.gaalliance.org/pdf/gaa-lightner-oct04.pdf>. Acesso em 27.12.2010
- 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. Different viruses cause myonecrosis in cultured *Litopenaeus vannamei* from Brazil and Belize: gross signs and histopathology. In:

INTERNATIONAL SYMPOSIUM AQUATIC ANIMAL HEALTH, 5., 2006, San Francisco. **Abstracts...** San Francisco : [s.n], 2006.

LO, C.F. et al. White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods. **Dis. Aquat. Org.**, v. 27, 215-225. 1996a.

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

LO, C.F. et al. Detection and tissue tropism of white spot syndrome baculovirus (WSBV) in captured brooders of *Penaeus monodon* with special emphasis on reproductive organs. **Dis. Aquat. Org.**, v.30, p.53-72. 1997.

LO, C. et al. Specific genomic DNA fragment analysis of different geographical clinical samples of shrimp white spot syndrome virus. **Dis. Aquat. Org.** v.35, p. 175-185. 1999.

LOY, J.K.; FRELIER, P.F.; VARNER, P. et al. Detection of the etiologic agent of necrotizing hepatopancreatitis in cultured *Penaeus vannamei* from Texas and Peru by polymerase chain reaction. **Dis. Aquat. Org.** v.25, p. 117-122, 1996.

MACIEL, M.L.T. Contribuição para o desenvolvimento de uma proposta de monitoramento e certificação zoonosológica em cultivo de camarão marinho no estado de Santa Catarina. 2002. 42f. **Dissertação** (Mestrado em Aqüicultura, centro de ciências agrárias) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

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

MARTORELLI, S.R; OVERSTREET, R.M; JOVONOVICH, J.A. First report of viral pathogens WSSV and IHNV in argentine crustaceans. **Bulletin of Marine Science**, v.86(1), p.117–131.2010

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

MENDES, E.S et al. *Vibrio* spp. isolados de camarão e água de cultivo de fazenda marinha em Pernambuco. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n.4, p. 1191-1199. 2009.

MORALES-COVARRUBIAS, M.S; CHAVEZ-SANCHEZ, C. Histopathological Studies on Wild Broodstock of White Shrimp *Penaeus vannamei* in the Platanitos Area, Adjacent to San Blas, Nayarit, Mexico. **Journal of the World Aquaculture Society**. v.30, n.2, p 192-200 . 1999

MORALES-COVARRUBIAS, M.S. **Enfermedades del camarón: detección mediante análisis en fresco e histopatología**. México: Trillas, 2010. 180p.

MOTTE, E. et al. Prevention of IHNV vertical transmission in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, Amsterdam, v.219, p. 57–70. 2003

MOURA FILHO, L.G.M et al. Enumeração e pesquisa de *Vibrio* spp. e coliformes totais e termotolerantes em sashimis de atum e vegetais comercializados na região metropolitana do Recife, estado de Pernambuco. **Acta Sci. Technol.**, Maringá, v. 29, n. 1, p. 85-90, 2007.

MULLER, I.C et al. Genotyping of white spot syndrome virus (WSSV) geographical isolates from Brazil and comparison to other isolates from the Americas. **Dis Aquat Org**. v. 88, p. 91–98. 2010.

NUNAN, L.M; POULOS, B.T; LIGHTNER, D.V. The detection of White Spot Syndrome Virus (WSSV) and Yellow Head Virus (YHV) in imported commodity shrimp. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 160, p. 19–30. 1998.

NUNES, A.J.P; MARTINS, P.C., GESTEIRA, T.C. Carcinicultura ameaçada. **Panorama da Aqüicultura**, Rio de Janeiro, v.14, n.83, p.37-57, maio/junho.2004.

OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (OIE). Disease information. In: **White spot disease in Brazil: follow-up report No. 1**. Paris, France, p. 247-249, v.18, n.32, 2005. Disponível em: http://www.oie.int/eng/info/hebdo/AIS_58.HTM#Sec0. Acesso em: 28.nov.2010

OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (OIE). International committee. **Report of the meeting of the OIE aquatic animal health standards commission**. Paris, France, 2006. Disponível em: http://www.oie.int/downld/SC/2006/A_AAC_MARCH2006.pdf. Acesso em: 26 dez. 2006.

OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (OIE). Diseases of Crustaceans. In: **Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals**. Paris, France, p 55-157. 2009. Disponível em: http://www.oie.int/eng/normes/fmanual/A_summry.htm?e1d11. Acesso em 18. nov.2010.

OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (OIE). Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals 2010. Paris, France, p 1-383. 2010. Disponível em: <http://www.oie.int/en/international-standard-setting/aquatic-manual/access-online>. Acesso em 02. mar. 2011.

PANICKER, G. et al. Detection of pathogenic species in shellfish by using multiplex PCR and DNA microarray. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, p. 7436-7444, 2004.

PANTOJA, C.R; LIGHTNER, D.L. Similarity between the histopathology of white spot syndrome virus and yellow head syndrome virus and its relevance to diagnosis of YHV disease in the Americas. **Aquaculture**. Amsterdam, v.218, p 47-54, 2003.

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

PEREIRA, A.M.L.; SANTOS, M.L. **Relatório do treinamento em patologias de camarões marinhos**. Instituto Tecnológico de Sonora, Obregón - México, Parnaíba-Pi., 19-29p. 2003.

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

POULOS, B.T. et al. Purification and characterization of infectious myonecrosis virus of penaeid shrimp. **Journal of General Virology**, 87, 987-996. 2006a.

POULOS, B. T. et al. Different viruses cause myonecrosis in cultured *Litopenaeus vannamei* from Brazil and Belize: characterization of the etiologic agents and molecular methods for detection. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON AQUATIC ANIMAL HEALTH, 5., 2006, San Francisco. **Abstracts...**, San Francisco: [s.n], 2006b.

ROCHA, I.P; ROCHA, D.M. Análise da produção e do mercado interno e externo do camarão cultivado. **Revista da ABCC**, ano12, n.1, p.18-23, junho, 2010.

RODRICK, G. E. **Microbiology of marine food products**. New York: AVI Book, 1991. 285p.

- RODRIGUES, J. Carcinicultura marinha desempenho em 2004. **Revista da ABCC**, ano 7 n.2, p.38 – 44, jun.2005.
- RODRIGUEZ, J et al. White spot syndrome virus infection in cultured *penaeus vannamei* (Boone) in Ecuador with emphasis on histopathology and ultrastructure. **Journal of Fish Diseases**, Taiwan, v.26, p.439-450, 2003.
- SAHUL, H; CHARLES, M.X; ANILKMAR, M. Tolerance of *Macrobrachium rosenbergii* to white spot syndrome virus. **Aquaculture**, Amsterdam, v.183, p 207-213. 2000.
- SANTOS, F.L et al. Aspectos epidemiológicos da necrose muscular infecciosa viral (IMNV) em camarões marinhos (*Litopenaeus vannamei*, Boone,1931) cultivados. **Revista CFMV**, ano XI, n. 34, p 73-76. 2005.
- SEIFFERT, W.Q, WINCKLER, S, MAGGIONI, D. A mancha branca em Santa Catarina. **Panorama da Aquicultura**, Rio de Janeiro,v.15, n. 87, p 51-53. 2005.
- SENPIN, S. et al. Outbreaks of infectious myonecrosis virus (IMNV) in Indonesia confirmed by genome sequencing and use of an alternative RT-PCR detection method. **Aquaculture**, Amsterdam, fev. 2007. 7p.
- SHIKE, H et al. Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus of shrimp is related to mosquito brevidensoviruses. **Virology**, v. 277, p.167–177.2000
- SILVA, V.A et al. A multi-season survey for infectious myonecrosis in farmed shrimp, *Litopenaeus vannamei*, in Pernambuco, Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 104, p. 161–165.2010
- STOTT, G.H. What is animal stress and how is it measured?. **Journal of Animal Science**, v. 52, n.1, p.150-153. 1981.

SOTO, M.A; SHERVETTE, V.R; LOTZ, J.M. Transmission of white spot syndrome virus (WSSV) to *Litopenaeus vannamei* from infected cephalothorax, abdomen, or whole shrimp cadaver. **Dis Aquat Org**, v. 45,p.81–87. 2001

SOUZA, G.N et al. Avaliação de associações e similaridades em epidemiologia veterinária por meio da análise de correspondência. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**. Belo Horizonte, v.54, p.539-542, 2002.

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

SUDHA, P.M et al. Relationship between white spot syndrome virus infection and clinical manifestation in Indian cultured penaeid shrimp. **Aquaculture**, Amsterdam, v.167, p. 95-101.1998.

THRUSFIELD, M. **Epidemiologia veterinária**. São Paulo: Roca, 2^a ed, 556 p.2004

TUNG, C.W. et al. Histological and electron microscopic study on macrobrachium muscle virus (MMV) infection in the grand freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (the man), cultured in Taiwan. **Journal of Fish Diseases**, Taiwan, v.22, p. 319-323.1999.

VANDERZANT, C; NICKELSON, R.; JUDKINS, P.W. Microbial flora of pond-reared brown shrimp (*Penaeus aztecus*). **Appl. Microbiol**. v.21. p.916-921. 1971.

VANPATTEN, K.A. et al. Seabirds as potential vectors of penaeid shrimp viruses and the development of a surrogate laboratory model utilizing domestic chickens. **Aquaculture**, Amsterdam, v.241, p. 31-46.2004.

VINCENT, A.G; BRELAND, V.M; LOTZ, J.M . 2004. Experimental infection of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* with necrotizing hepatopancreatitis (NHP) bacterium by per os exposure. **Dis.Aquat. Org.** 61:227–233.

YAN, D.C et al. White spot syndrome virus (WSSV) detected by PCR in rotifers and rotifer resting eggs from shrimp ponds sediments. **Dis. Aquat. Org.**, 59: 69-73. 2004

YU CI, SONG YL. Outbreaks of Taura syndrome in Pacific white shrimp *Penaeus vannamei* cultured in Taiwan. **Fish Pathology**, v. 35, p. 21–24. 2000.

WALKER P.J., MOHAN C.V. Viral disease emergence in shrimp aquaculture: origins, impacts and the effectiveness of health management strategies. **Reviews in Aquaculture**. v.1 p.125–154. 2009.

5. ARTIGO I

Parte dos resultados obtidos durante o trabalho experimental dessa tese será apresentada no artigo intitulado “Epidemiologia das viroses Mionecrose Infecciosa (IMNV), Necrose Hematopoiética e Hipodermal Infecciosa (IHHNV) e a Síndrome da Mancha Branca (WSSV) em camarões marinhos cultivados em Pernambuco, Brasil” (manuscrito), que se encontra anexado.

1 **Epidemiologia das viroses Mionecrose Infeciosa (IMNV), Necrose**
2 **Hematopoiética e Hipodermal Infeciosa (IHHNV) e a Síndrome da Mancha**
3 **Branca (WSSV) em camarões marinhos cultivados em Pernambuco, Brasil.**

4 Verônica A. da Silva¹, Fernando L. dos Santos¹, Paulo de P. Mendes², Suzianny M. B.
5 C da Silva², Maria R. M. Coimbra² e Emiko S. Mendes¹

6 ¹Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco,
7 Av. Dom Manoel de Medeiros, 52171-900 Recife, Pernambuco, Brazil.

8 ²Departamento de Pesca e Aquicultura, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Av.
9 Dom Manoel de Medeiros, 52171-900 Recife, Pernambuco, Brazil.

10 Corresponding author: Phone: +55 81 3320-6419; Fax: +55 81 3320-6515

11 E-mail address: veronicaarns@yahoo.com.br (V. A. da Silva)

12

13 **Resumo**

14 Enfermidades virais como Mionecrose Infeciosa (IMNV), Necrose
15 Hematopoiética e Hipodermal Infeciosa (IHHNV) e Síndrome da Mancha Branca
16 (WSSV), têm sido relatadas nos camarões cultivados do Brasil, causando elevada
17 mortalidade e conseqüente prejuízo econômico para os carcinicultores. Portanto,
18 objetivou-se verificar a frequência destas viroses nos camarões cultivados, levando-se
19 em consideração a sazonalidade e peso dos animais. Camarões foram coletados em duas
20 fazendas do litoral sul (A e B) e em duas fazendas do litoral norte (C e D) do estado de
21 Pernambuco/Brasil, durante os períodos de chuva e estiagem. Duas coletas de animais
22 pequenos ($4,33 \pm 0,49\text{g}$) e médios ($8,28 \pm 1,35\text{g}$), foram feitas em cada período
23 climático. Cada amostra continha 30 indivíduos, totalizando-se 480 camarões
24 analisados. Exame a fresco, histopatologia e análises moleculares foram realizadas em
25 cada camarão. No exame a fresco foi observado desuniformidade de tamanho e peso,

26 opacidade da musculatura, pleópodos e outras regiões avermelhadas, dentre outras
27 observações. Foram evidenciadas lesões histopatológicas sugestivas de IHHNV como
28 corpúsculos de inclusão em diferentes órgãos e necrose no tecido hematopoiético e de
29 IMNV, como necrose e infiltração hemocítica na musculatura, esferóides do órgão
30 linfóide ectópicos. Não foi detectada por nested-PCR a presença do vírus da WSSV. Os
31 outros vírus estiveram mais presentes no período de estio (IMNV 32/240 - 13,33%;
32 IHHNV 133/240 - 55,42%), que no chuvoso (IMNV 7/240 - 2,92%; IHHNV 82/240 -
33 34,17%). No total dos 480 camarões analisados, o vírus da IMNV esteve presente em 39
34 animais (8,12%) e o IHHNV em 215 camarões (44,79%). Registros de dados nas
35 fazendas, associados aos resultados de análises, são fundamentais em um estudo
36 epidemiológico para a identificação de fatores de risco, o que conduz ao monitoramento
37 da saúde dos animais cultivados e obtenção de boa produtividade.

38 **Palavras chaves:** Viroses, camarão, *Litopenaeus vannamei*, estação do ano, lesões.

39 **Abstract**

40 Viruses as Infectious myonecrosis (IMNV), and infectious hypodermal and
41 hematopoietic necrosis (IHHNV) and White Spot Syndrome (WSSV) have been
42 reported in farmed shrimp from Brazil, causing economic losses to the shrimp. The aim
43 of this study was to verify the frequency of three viruses of economic importance in
44 shrimp farming in Brazil, taking into account the seasonality and weight of animals.
45 Shrimps were collected on two farms south coast (A and B) and two farms on the north
46 coast (C and D) the state of Pernambuco / Brazil during the wet and dry seasons. Two
47 collections, medium ($8.28 \pm 1.35\text{g}$) and small ($4.33 \pm 0.49\text{g}$) animals were made in each
48 climatic period. Each sample contained 30 individuals, totaling 480 shrimps analyzed.
49 Wet-mount analyses, histopathology and molecular analysis were performed on each
50 shrimp. In Wet-mount analyses was observed The lack of size uniformity and a

51 variation in average weight, muscle opacity, and other regions pleopods reddish,
52 among other observations. Histopathological lesions of IHHNV as inclusion bodies in
53 different organs and necrosis in the hematopoietic tissue and lesions suggestive of
54 necrosis and infiltration IMNV hemocitical in muscle, ectopic lymphoid organ
55 spheroids were detected in animals studied. The presence of WSSV was not detected by
56 nested-PCR. The viruses were more frequent during the dry season (IMNV 32/240,
57 13.33%; IHHNV 133/240, 55.42%) than in the wet season (IMNV 7/240, 2.92%;
58 IHHNV 82/240, 34.17%). A total of 480 shrimps examined the IMNV was present in 39
59 animals (8.125%) and IHHNV shrimp in 215 (44.79%). Data records on the farms,
60 associated with the analysis results are fundamental in an epidemiological study to
61 identify risk factors, which leads to monitoring the health of cultured animals and Good
62 yields.

63 **Key words:** Viruses, shrimp, *Litopenaes vannamei*, season year, injuries.

64

65 1. Introdução

66 O cultivo de camarões, particularmente da espécie *Litopenaesus vannamei*, tem
67 crescido rapidamente, contribuindo para o desenvolvimento sócio-econômico de muitos
68 países (Rocha e Rocha, 2010). No final da década de 80, uma sucessão de doenças se
69 propagou através das fronteiras internacionais, gerando impacto significativo na
70 produção (Walker e Mohan, 2009), sendo as de origem viral as que correspondem ao
71 principal entrave no cultivo do camarão marinho (Flegel et al., 2004; Lightner, 2005).
72 No Brasil, viroses listadas pela OIE como Mionecrose Infecciosa Viral (IMNV),
73 Necrose Hematopoiética e Hipodermal Infecciosa (IHHNV) e Síndrome da Mancha
74 Branca (WSSV) (OIE, 2009) têm causado prejuízo econômico considerável.

75 A Mionecrose Infecciosa Viral (IMNV) tem como agente etiológico um RNA
76 vírus pertencente à família Totiviridae (Poulos et al., 2006). Sua primeira ocorrência foi
77 constatada no Brasil, no estado do Piauí em 2002 e, nos anos seguintes, em estados
78 vizinhos (Nunes et al., 2004; Andrade et al., 2007; Pinheiro et al., 2007). A ocorrência
79 da IMNV ficou restrita ao nordeste brasileiro até 2006, quando foi confirmada na
80 Indonésia (Senapin et al., 2007).

81 A IMNV caracteriza-se por necrose dos músculos estriados do cefalotórax e
82 abdômen, podendo os últimos segmentos abdominais apresentar aspecto leitoso ou
83 aparência de camarão cozido (Nunes et al., 2004). Podem ser encontradas lesões
84 microscópicas como: esferóides do órgão linfóide (EOL) ectópico em diferentes órgãos
85 e tecidos, infiltração hemocítica, edema, necrose e áreas de cicatrizações na
86 musculatura, entre outras (Lightner et al., 2004; Santos et al., 2005; OIE, 2009).

87 A Síndrome da Mancha Branca (WSSV) tem como agente etiológico um DNA
88 vírus pertencente à família Nimaviridae, gênero *Whispovirus* (Mayo, 2002). Seus
89 primeiros registros foram na China e no Japão (Chou et al., 1995). No Equador, a
90 WSSV reduziu a produção de camarão, de 115.000 t em 1998 para 38.000 t em 2000,
91 gerando impacto econômico significativo nesse país (Castro et al., 2000, 2001;
92 Rodriguez et al., 2003). No Brasil, a enfermidade ocorreu em 2005, em camarões
93 cultivados no complexo lagunar em Santa Catarina (Seiffert et al., 2005), onde a
94 produção foi reduzida de 4.189 t em 2004 para 172 t em 2009 (Costa, 2010). O vírus
95 também pode ser encontrado em animais assintomáticos (Peinado-Guevara e López-
96 Meyer, 2006), tendo sido detectado sob esta forma em Aracati, Ceará com mortalidade
97 de 40% (OIE, 2005). No ano de 2008, o vírus foi responsável por sobrevivência de
98 apenas 5% dos camarões cultivados no estado da Bahia (Muller et al., 2010).

99 A WSSV é caracterizada por presença de pontos brancos na carapaça, assim
100 como coloração avermelhada ao longo do corpo. Na análise histopatológica, podem ser
101 observados corpúsculos de inclusão intranucleares em núcleos hipertrofiados de células
102 ectodermais e mesodermas dos apêndices, tecido conectivo e hematopoiético,
103 brânquias e outros órgãos (Sahul et al., 2000; Morales-Covarrubias, 2010).

104 A Necrose Hematopoiética e Hipodermal Infecciosa (IHHNV) de ampla
105 distribuição geográfica nas Américas e na Ásia, é causada por um vírus DNA
106 pertencente à família Parvoviridae, gênero *Brevidensovirus* (Bonami et al., 1990; Shike
107 et al. 2000). Teve seu primeiro registro em 1981, no Havaí, quando ocasionou
108 mortalidade de 90% no camarão azul, *Litopenaeus stylirostris* (Lightner, 1996). No
109 Brasil, foi relatada pela primeira vez em 1991 nas espécies *Penaeus monodon* e
110 *L.vannamei* (Bueno, 1991). Braz et al. (2009) relataram a prevalência do IHHNV
111 variando de 9,4% a 81,0% em sete fazendas do nordeste. Em Pernambuco, Silva et
112 al.(2010) detectaram em um total de 60 amostras, 37 ocorrências de lesões sugestivas de
113 IHHNV, das quais 26 estavam conjugadas a lesões sugestivas IMNV.

114 No *L.vannamei* a doença não provoca elevados índices de mortalidade e
115 caracteriza-se pela síndrome do nanismo deformativo, que causa desuniformidade do
116 lote e deformidades nos indivíduos (OIE, 2009). Na microscopia, observa-se necrose no
117 tecido hematopoiético, corpúsculo de inclusão intranuclear em vários órgãos e tecidos
118 como brânquias, epitélio cuticular e do estômago, órgão linfóide, tecido conectivo, e
119 músculos estriados (Lightner, 1996; Morales-Covarrubias, 2010).

120 É fundamental em qualquer tipo de criação animal, que a medicina veterinária
121 preventiva identifique fatores de risco que contribuem para o surgimento ou propagação
122 de enfermidades. Nesse estudo de caráter anátomo-patológico e epidemiológico

123 objetivou-se verificar a frequência das três enfermidades virais, acima citadas, em
124 quatro fazendas do estado de Pernambuco.

125

126 **2. Material e Métodos**

127 **2.1. Local e coleta das amostras**

128 No período de maio a dezembro de 2008, foram coletadas amostras de camarão
129 em duas fazendas do litoral sul (A e B) e duas fazendas do litoral norte (C e D) do
130 estado de Pernambuco/Brasil. Avaliaram-se camarões pequenos e médios da espécie
131 *Litopenaeus vannamei*, de um viveiro por fazenda, durante os períodos chuvoso e de
132 estio. Cada amostra continha 30 indivíduos, totalizando-se 480 camarões analisados em
133 16 coletas. Os espécimes foram transportados sob aeração, em baldes contendo água
134 originária dos viveiros, ao Laboratório de Sanidade de Animais Aquáticos (LASAq) da
135 Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), para a realização das análises.
136 Dados de manejo como densidade de estocagem, tempo de cultivo e sobrevivência
137 foram relacionados com os resultados das análises.

138 **2.2. Exame a fresco e histopatológico**

139 Os animais foram pesados e em seguida examinados, por meio de análise a
140 fresco, tanto macro e microscopicamente, segundo o método descrito por Morales-
141 Covarrubias (2010). Fragmentos de brânquias foram coletados para a análise molecular
142 posterior.

143 Os camarões foram sacrificados por choque térmico, infiltrados e mergulhados
144 com a solução de Davidson's AFA (Humason, 1972), permanecendo no fixador por um
145 período de 24 a 48 horas. Após esse tempo, foram transferidos ao álcool a 70% até o
146 momento de serem desidratados, diafanizados, incluídos em parafina e cortados a 5µm
147 no micrótomo manual. As lâminas foram coradas pelo método de hematoxilina-eosina e

148 examinadas à microscopia óptica, de acordo com as recomendações de Behmer et al.
149 (2003). Foram feitas quatro lâminas (1° e 6° segmentos abdominais, hepatopâncreas e
150 brânquias) por indivíduo, totalizando em 1920 lâminas analisadas.

151 **2.3. Análise molecular**

152 Os fragmentos de brânquias foram coletados em duplicata para as extrações de
153 DNA e RNA. Os tecidos coletados foram preservados em etanol a 95% e armazenados a
154 -80°C até realizar as análises moleculares, que foram executadas no Laboratório de
155 Genética Aplicada (LAGA) do Departamento de Pesca e Aqüicultura da UFRPE.

156 **2.3.1. Extração de RNA e DNA**

157 Para a extração do RNA as brânquias foram maceradas mantidas em nitrogênio
158 líquido e em seguida digeridas em Trizol, conforme as instruções do fabricante. O RNA
159 foi ressuspensionado em água ultrapura tratada com DEPC e armazenado a -80°C . O DNA
160 foi extraído de acordo com o protocolo padrão (Sambrook et al. 1989), com algumas
161 modificações. As amostras foram digeridas em 500 μL de tampão de extração (100 mM
162 de NaCl, 20 mM de Tris-HCl (pH 8,0), 100 mM de EDTA, 0,1% SDS) e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de
163 Proteinase K, sendo incubadas a 37°C por 12 horas. A purificação foi efetuada
164 utilizando fenol-clorofórmio-álcool isoamílico. O DNA foi precipitado com etanol e
165 ressuspensionado em TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM pH 8,0), sendo
166 armazenado a -80°C .

167 **2.3.2. PCR para IMNV**

168 A síntese de cDNA e a PCR para o IMNV foi feita utilizando o kit GeneAmp EZ
169 rTth. Em cada 25 μl de reação foi adicionado: 1 μl de RNA; 1x EZ buffer; 2,5 mM de
170 $\text{Mn}(\text{OAc})_2$; 2,5 pmol de cada primer específico para IMNV (Tabela 1); 0,3 mM de cada
171 dNTP e 2,5 U de enzima rTth DNA polimerase. O ciclo térmico consistiu de um ciclo
172 inicial de 60°C por 30 minutos e 95°C por 2 minutos, seguido por 39 ciclos de 95°C por

173 45 segundos, 60°C por 45 segundos e 60°C por 7 minutos, conforme método citado
174 por Poulos e Lightner (2006).

175 **2.3.3. PCR para IHHNV**

176 Em cada reação com volume final de 25 µl para detecção de IHHNV foi
177 adicionado 100 ng de DNA; 1X PCR Buffer; 2 mM de MgCl₂; 10 pmoles de cada
178 primer específico para IHHNV (Tabela 1); 0,2 mM de cada dNTP e 1 U de enzima Taq
179 DNA polimerase. O ciclo térmico consistiu de uma desnaturação inicial a 94°C por 4
180 minutos, seguido por 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, 72°C
181 por 1 minuto e extensão final a 72°C por 7 minutos (Tang et al., 2000).

182 **2.3.4. Nested PCR para WSSV**

183 Na primeira reação para detecção de WSSV foi adicionado 100 ng de DNA; 1X
184 PCR buffer; 2,5 mM de MgCl₂; 100 pmoles de cada primer específico para WSSV
185 (Tabela 1); 0,2 mM de cada dNTP e 2U de enzima Taq DNA polimerase em 100 µl de
186 reação. Na segunda reação adicionou-se 1µl do produto da 1ª PCR; primers específicos
187 (Tabela 1) da nested-PCR, seguindo as mesmas condições da primeira reação. O ciclo
188 térmico para as duas PCR foi realizado segundo método relatado por Lo et al. (1996).

189 **2.4. Análise de dados**

190 Os resultados foram submetidos a testes estatísticos de hipótese, considerando
191 cada parâmetro estudado. Os resultados das frequências dos camarões com presença de
192 viroses foram tabulados e analisados pelo teste de independência de Qui-quadrado (com
193 correção de Yates) e pelo teste exato de Fisher. Para todas as análises, o nível de
194 significância estabelecido foi de 5% ($\alpha = 0,05$). Para avaliar a relação das viroses em
195 função da densidade de estocagem, estação do ano e peso foi proposto o seguinte
196 modelo:

197

$$198 \quad FRC_{(\text{Viroses})i} = \beta_0 + \beta_1 DE_i + \beta_2 EA_i + \beta_3 P_i + \varepsilon_i$$

199 Em que: FRC-frequência relativa dos camarões; viroses-IMNV ou IHHNV; β_0 , β_1 , β_2 e β_3 -
200 parâmetros do modelo; DE- densidade de estocagem; EA- estação do ano; P- peso; ε_i -erro
201 associado a cada observação, com parâmetros $(0, \sigma^2)$.

202 Informações sobre o índice pluviométrico do litoral sul e norte de Pernambuco,
203 onde se situam as fazendas, foram obtidas no Laboratório de Meteorologia de
204 Pernambuco (LAMEPE) do Instituto de Tecnologia de Pernambuco (ITEP).

205 **3. Resultados**

206 No exame a fresco, em todas as 16 amostras analisadas, observaram-se
207 desuniformidade de tamanho e peso dos camarões. Nos espécimes classificados como
208 pequeno (peso médio \pm desvio padrão foi de $4,33 \pm 0,49$ g), provenientes da fazenda A,
209 havia deformidade em antenas em 10,00% deles. Em relação a musculatura da cauda
210 329/480 (68,54%) animais apresentaram opacidade e/ou necrose muscular. Um fato que
211 chamou atenção foi o trato digestivo vazio em 314/480 (65,42%) dos espécimes
212 examinados, pois os animais aparentemente não estavam em muda. Nos camarões
213 analisados não foram encontrados, macroscopicamente, nenhuma alteração sugestiva de
214 infecção por WSSV.

215 No exame microscópico, não foram detectadas lesões sugestivas de IMNV nos
216 animais de porte médio (peso médio \pm desvio padrão de $8,28 \pm 1,35$ g) da fazenda A, nos
217 espécimes pequenos da fazenda C e nos camarões pequenos e médios da fazenda D,
218 durante o período chuvoso. Quando observou-se lesões microscópicas, ainda em relação
219 a IMNV, as lesões foram: necrose e/ou infiltração hemocítica e EOL ectópicos
220 observadas em 40/480 (8,33%) espécimes. Necrose e/ou infiltração hemocítica foram
221 verificadas, tanto na musculatura do cefalotórax quanto nos 5º e 6º segmentos
222 abdominais (Figura 1).

223 Utilizando-se da análise molecular, foi encontrado que 39/480 (8,12%) dos
224 animais estavam infectados pelo vírus da IMNV (Figura 2). Quanto à distribuição
225 geográfica e o período climático, constatou-se que nas fazendas do litoral sul, a
226 frequência de camarões infectados foi de 20/120 (16,67%), no período de estio e de
227 4/120 (3,33%), no período chuvoso. Os resultados das fazendas do litoral norte foram,
228 seguindo os mesmos critérios, 10,00% (12/120), no período de estio e 2,50% (3/120),
229 no período chuvoso havendo uma diferença significativa ($P < 0,05$) na frequência de
230 animais infectados pelo IMNV nos períodos estudados.

231 As lesões histopatológicas sugestivas de IHHNV, como necrose no tecido
232 hematopoiético, foi observada em 29/480 (6,04%) animais. Corpúsculos de inclusão
233 foram mais frequentes no hepatopâncreas (60/480, 12,50%) e menos frequente no ceco,
234 estômago e brânquias. De um modo geral, verificou-se que 91/480 (18,95%) dos
235 animais apresentavam uma ou mais lesões sugestivas de IHHNV.

236 Pela análise molecular verificou-se ainda que 215/480 (44,79%) dos animais
237 examinados albergavam o vírus do IHHNV (Figura 3). Quanto à distribuição geográfica
238 e o período climático, nas fazendas do litoral sul, período de estio, a frequência de
239 camarões infectados foi de 56,67% (68/120) e no período chuvoso, foi de 46,67%
240 (56/120). Nas fazendas do litoral norte, os resultados foram respectivamente 54,17%
241 (65/120), no período de estio e 21,67% (26/120) no período chuvoso, havendo diferença
242 significativa ($P < 0,05$) na frequência de animais infectados nas fazendas situadas no
243 litoral norte.

244 Com base nos resultados dos exames microscópicos e da análise molecular dos
245 480 camarões não se pode demonstrar infecção pelo vírus WSSV (Figura 4).

246 Em todas as fazendas houve um aumento da frequência de animais infectados
247 com IMNV do período chuvoso (7/240 - 2,92%) para o período de estio (32/240 -

248 13,33%). Os camarões da fazenda D não apresentaram o IMNV no período chuvoso,
249 assim como em todos os animais pequenos ($4,33 \pm 0,49$ g) nos dois períodos estudados
250 (Tabela 2).

251 O IHHNV, presente em todas as amostras de todas as fazendas, infectou 133/240
252 (55,42%) dos camarões no período de estio e 82/240 (34,17%), no período chuvoso. A
253 menor frequência do IHHNV (Tabela 3) foi verificada nos animais pequenos na fazenda
254 D (16/60 - 26,67%) e a maior frequência em animais pequenos e médios da fazenda B,
255 ambas as amostras com a mesma frequência (37/60 - 61,67%). As infecções simultâneas
256 pelo IMNV e IHHNV foram detectadas em animais de todas as fazendas e períodos
257 climáticos, exceto na fazenda D, quando no período chuvoso, não houve detecção do
258 IMNV.

259 O índice pluviométrico de 2008 referente ao litoral sul registrou precipitações
260 acima de 200 mm, com pico de 299,7 mm em agosto, sendo maior que as precipitações
261 pluviométricas registradas no litoral norte, com pico de 248,4 mm em junho. As
262 precipitações registradas no período de estio variaram de 50,1 mm a 0,0 mm em outubro
263 e novembro em 2008, respectivamente.

264 Ao analisar o peso dos animais e frequência das viroses detectadas por PCR
265 (Tabela 2 e 3), pelo Teste Exato de Fisher, observou-se que não houve diferença
266 significativa ($P \geq 0,05$) entre animais pequenos e médios. Houve um aumento
267 significativo na frequência de IHHNV apenas nos animais médios (33/60 - 55,00%) da
268 fazenda C (Tabela 3).

269 Ao relacionar a frequência relativa dos camarões com as duas viroses em função
270 da densidade de estocagem e a estação do ano, utilizando-se regressão múltipla,
271 verificou-se que ao excluir as variáveis não significativas, a densidade de estocagem foi

272 excluída do modelo de predição do IMNV e que a estação do ano influenciou na
273 predição das duas viroses (IMNV e IHHNV).

274 $FRC_{(IMNV)} = 0,0291 + 0,1042EA$ (F= 12,10; P(F)= 0,0132; $R^2 = 66,85\%$).

275 $FRC_{(IHHNV)} = 0,2058 + 0,0029DE + 0,2602EA$ (F= 7,15; P(F)= 0,0341; $R^2 = 74,11\%$).

276 Em que: $FRC_{(IMNV)}$ - frequência relativa dos camarões com Mionecrose
277 Infeciosa Viral, $FRC_{(IHHNV)}$ - frequência relativa dos camarões com Necrose
278 Hematopoiética e Hipodermal Infeciosa Viral, EA- estação do ano, DE- densidade de
279 estocagem, F- estatística “F” de Fisher, P(F)- Valor da probabilidade de F e R^2 -
280 coeficiente de determinação.

281 A melhor sobrevivência (90,00%) dos camarões foi observada na fazenda D, no
282 período chuvoso (Tabela 4), em que houve o emprego de baixa densidade (29,20
283 camarões m^{-2}) e o menor tempo de cultivo (66 dias). Sobrevivências mais baixas foram
284 constatadas nas fazendas B (61,90% a 64,50%) e C (61,82% a 66,24%), onde houve o
285 emprego de densidades mais elevadas e cultivos mais longos. Foi verificada uma maior
286 frequência de infecção simultânea (IMNV+IHHNV) nos animais das fazendas B (9/60;
287 15,00%) e C (7/60; 11,67%), no período de estio.

288

289 **4. Discussão**

290 Alterações observadas no exame a fresco como deformidade, desuniformidade
291 de tamanho e peso, foram atribuídas a síndrome do nanismo deformativo, característica
292 de estágio crônico da IHHNV na espécie *L. vannamei* (Kalagayan et al., 1991; OIE,
293 2009). Enfermidades como a IHHNV, mesmo sem alta mortalidade, podem resultar em
294 considerável impacto econômico. As deformidades e o crescimento reduzido que
295 desvalorizam comercialmente o camarão, além da elevação do fator de conversão

296 alimentar, resultam em perdas financeiras, pois não há retorno adequado dos
297 investimentos.

298 Trato digestivo vazio é um indicativo que o animal não está se alimentando. Isso
299 pode ser atribuído à infestação por parasitas que competem por nutrientes, como
300 também aos comportamentos naturais, tais como o jejum fisiológico no período de
301 muda ou o aumento de movimentação aliado à diminuição da ingestão alimentar,
302 resultante do instinto migratório em fases lunares (Nunes et al., 2004). A hipótese do
303 não fornecimento de ração, antes da coleta, também deve ser considerada.

304 O exame a fresco, técnica simples e de baixo custo, empregado rotineiramente
305 nas fazendas, é importante enquanto diagnóstico presuntivo. Casos como a alta
306 frequência de alterações musculares (68,54%), detectadas nessa pesquisa por exame a
307 fresco, servem de alerta para se pesquisar as causas do evento. No entanto, nas mesmas
308 amostras, foi verificada pelo exame histopatológico apenas 8,33% dos animais com
309 lesões sugestivas de IMNV, sendo confirmada, pela análise molecular, a presença do
310 vírus em 8,12% dos camarões. Esses resultados conduzem às hipóteses de baixa carga
311 viral nos camarões analisados ou que as alterações na musculatura podem ter sido
312 causadas por outros patógenos (bactérias) ou fatores estressantes (desequilíbrio no
313 ambiente de cultivo).

314 Alteração muscular, como opacidade, pode ser verificada tanto na IMNV
315 quanto em infecções bacterianas, assim como em situações de estresse (Nunes et al.,
316 2004; Morales-Covarrubias, 2010). Em estudo bacteriológico realizado por Dourado
317 (2009), nas mesmas amostras da presente pesquisa, foram constatadas várias espécies de
318 *Vibrio*, tanto no hepatopâncreas como na hemolinfa.

319 A presença de corpúsculos de inclusão que foi mais frequente no hepatopâncreas
320 do que em outros órgãos, sugere infecção severa pelo IHHNV, de acordo com Morales-

321 Covarrubias (2010). Hsieh et al. (2006) constataram que o hepatopâncreas foi o órgão
322 mais acometido pelo IHHNV, quando pós-larvas e sub adultos de *Macrobrachium*
323 *rosenbergii* foram naturalmente infectados pelo vírus. Bezerra (2007) verificou lesões
324 histopatológicas sugestivas de IHHNV frequentes no hepatopâncreas, epitélio intestinal
325 e ceco de animais procedentes de cultivos de Pernambuco/Brasil.

326 Lesões sugestivas de IHHNV foram detectadas por exame histopatológico em 91
327 animais, sendo confirmada por PCR a presença do vírus em número muito maior, 215
328 dos 480 camarões. Isso é indicativo de que os animais infectados pelo IHHNV podem
329 não apresentar os sinais clínicos e lesões características da doença, apresentando-se,
330 portanto assintomáticos, ou com a doença em fase inicial, ainda sem lesões evidentes.
331 Infecção por IHHNV pode ser detectada em todos os estágios de vida do camarão.
332 Entretanto, Boada et al. (2008) detectaram o IHHNV por PCR apenas em camarões com
333 a faixa de peso entre 5 a 6 g , ao pesquisarem três grupos de animais assintomáticos
334 constituídos de pós-larvas com 8 a 15 dias, juvenis de 5 a 6 g e de 12 a 15 g.

335 Teixeira et al. (2010) verificaram o IHHNV por PCR em camarões de fazendas
336 do Rio Grande do Norte, Ceará e Piauí e constataram prevalência de 98% em 197
337 camarões avaliados. Na presente pesquisa a frequência do IHHNV foi de 44,79% em
338 480 camarões. Mesmo sendo menor a frequência do IHHNV em Pernambuco, do que
339 quando comparada com as verificadas em outros estados brasileiros, o IHHNV nos
340 animais cultivados pode tornar-se fator adicional para a eclosão ou agravamento de
341 outras enfermidades.

342 IMNV ou IHHNV ou a infecção simultânea foram mais evidenciadas nos
343 animais de porte médio, apesar de não serem estatisticamente diferentes dos camarões
344 pequenos. Entretanto, uma diferença significativa na frequência de IHHNV em animais
345 pequenos e médios foi constatada na fazenda C, onde foi empregado o maior tempo de

346 cultivo (133 dias), conforme pode ser observado na Tabela 4. A saúde dos camarões
347 pode estar mais exposta a fatores de risco devido a uma maior permanência no viveiro.
348 Mortalidade entre 40 e 70% e aparecimento de sintomas são relatados em camarões com
349 peso a partir de 7 g infectados com o IMNV (Nunes et al., 2004; OIE, 2009).

350 A maior sobrevivência (90,00%) foi registrada na ausência do IMNV e na mais
351 baixa ocorrência do IHHNV, em cultivos com baixa densidade (29,20 cam m⁻²) e no
352 menor tempo de cultivo (66 dias) de todas as fazendas, o que aponta para a conjunção
353 de fatores que provavelmente contribuiu para uma melhor sobrevivência na fazenda D,
354 no período chuvoso.

355 Densidades elevadas, assim como cultivos longos, são considerados fatores de
356 risco ao aparecimento ou disseminação de doenças (Kautsky et al., 2000). Em cultivos
357 intensivos, as chances de encontrar animais infectados por patógenos virais é maior que
358 no habitat natural, onde não existem densidades elevadas e, conseqüentemente, não
359 ocorre vulnerabilidade dos animais por estresse gerado por confinamento (Thrusfield,
360 2004; Cavalli et al., 2008). Segundo Thrusfield (2004), faz parte das tendências
361 emergentes da veterinária, considerar o “bem estar animal” que, ultrapassando a simples
362 ausência de enfermidades inclui, entre outros, o equilíbrio físico e ausência de privação
363 de movimentos naturais. Nos peneídeos a restrição de movimentos naturais pelo
364 confinamento é agravada pelas altas densidades que favorecem um maior contato entre
365 os indivíduos e, assim, a proliferação de doenças.

366 Em estudo realizado por Silva et al.(2010) foi evidenciado que o tempo de
367 cultivo influenciou de forma significativa na sobrevivência dos camarões com lesões
368 sugestivas de IMNV. Cultivos com 60 dias, na presença de lesões da IMNV, tiveram
369 sobrevivência de 77,02%, enquanto que com 100 dias tiveram sobrevivência de 56,05%.

370 IHHNV e IMNV estiveram mais frequentes em animais das fazendas do
371 litoral sul, em que as precipitações pluviométricas foram maiores. Segundo Lightner e
372 Pantoja (2004), a IMNV está associada a estresse físico e ambiental. No entanto, Silva
373 (2007) verificou maior ocorrência de lesões indicativas de IMNV no estio de 2006,
374 época de menor quantidade de chuva, o que eliminou, naquela ocasião, a possibilidade
375 de relação causal entre desequilíbrio ambiental decorrente da chuva e expressão da
376 doença.

377 Comparando a ocorrência de IMNV e de IHHNV nos camarões das quatro
378 fazendas (Tabelas 2 e 3), verificou-se a presença crescente dos vírus do primeiro ciclo
379 de cultivo no período chuvoso para o segundo ciclo no estio. A maior presença dos dois
380 vírus no estio, período com temperaturas mais elevadas e menor índice pluviométrico,
381 indicou influência significativa da sazonalidade. Entretanto, é necessário considerar
382 outros fatores que podem influir na sanidade dos camarões, tais como a duração do
383 intervalo entre os ciclos de cultivo, assepsia dos viveiros no período de vazio ou ainda
384 condição sanitária das pós-larvas.

385 No presente estudo não foram detectadas as manchas brancas típicas da WSSV
386 por exame a fresco. No exame histopatológico, a presença de corpúsculos de inclusão
387 em diferentes órgãos poderia até ser uma das características da WSSV, porém outras
388 enfermidades como a IHHNV também apresentam corpúsculos semelhantes (Morales-
389 Covarrubias, 2010). Os resultados da análise molecular confirmaram a ausência de
390 circulação do WSSV.

391 Segundo Peinado-Guevara e López-Meyer (2006), animais podem estar
392 infectados pelo WSSV e serem assintomáticos, não apresentando sinais clínicos da
393 doença, como registrado no Ceará (OIE, 2005). Atualmente, com o fácil trânsito de
394 pessoas e mercadorias, além de barreiras sanitárias nem sempre respeitadas, aumenta o

395 risco de importar patógenos de camarão. A presença do WSSV em outros estados do
396 nordeste torna necessário medidas preventivas, como a de se pesquisar a existência do
397 vírus em Pernambuco.

398 Considerando os resultados obtidos, constatou-se que o emprego de baixas
399 densidades e cultivos mais curtos podem contribuir para a manutenção do bom estado
400 sanitário dos espécimes e melhores taxas de sobrevivência. Desequilíbrio no ambiente
401 aquático, assim como a sazonalidade e o manejo deficiente, devem ser analisados
402 enquanto fatores que se somam a outros para propiciar o surgimento ou agravamento de
403 doenças, que em sua maioria são multifatoriais.

404 As enfermidades que acometem camarões de cultivo são eventos complexos e os
405 registros exatos e contínuos nas fazendas são indispensáveis para os estudos
406 epidemiológicos. Esses, identificando fatores de risco e associando-os nas análises são
407 fundamentais para manter e monitorar a saúde dos animais cultivados e para a boa
408 produtividade dos cultivos.

409

410 **Agradecimentos**

411 Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
412 pela concessão de bolsa de doutorado e a Fundação de Estudos e Projetos
413 (FINEP)/Projeto: Rede de Pesquisa de Carcinicultura do Nordeste (RECARCINE) pelo
414 apoio financeiro.

415

416 **Referências**

417 Andrade, T.P.D; Srisuvan, T; Tang, K.F.J; Lightner, D.V. 2007. Real-time reverse
418 transcription polymerase chain reaction assay using taq man probe for detection and

- 419 quantification of infectious myonecrosis virus (IMNV). *Aquaculture*, Amsterdam, v.
420 264, p. 9-15.
- 421
- 422 Behmer, O. A., Tolosa, E. M. C; Freitas Neto, A. G., and Rodrigues C. J. 2003. Manual
423 de técnicas para histologia normal e patológica. Manole. Barueri. P. 331.
- 424
- 425 Bezerra, S.S. Lesões sugestivas de Infecção Hipodermal e Necrose Hematopoiética em
426 camarão marinho, relacionadas com variáveis de cultivo 2007. 41 f. Dissertação.
427 (Mestrado em Recursos Pesqueiros e Aquicultura) – Universidade Federal Rural de
428 Pernambuco, Recife.
- 429
- 430 Braz, R.F.S; Silva, C.P.R.O; Reis, L.G; Martins, P.C.C.M; Sales, M.P; Meissner, R.V.
431 2009. Prevalence of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV)
432 in *Penaeus vannamei* cultured in northeastern Brazil. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 288,
433 p.143–146.
- 434
- 435 Boada, M; Donato, M; Rodulfo, H. 2008. Detección del virus de la Necrosis Infecciosa
436 Hipodérmica y Hematopoyética (IHHNV) en camarones blancos cultivados
437 asintomáticos, *Litopenaeus vannamei* (Boone), en Venezuela. *Revista Científica*. 17 (1)
438 7-11.
- 439
- 440 Bonami, J.R; Trumper, B; Mari, J; Brehelin, M; Lightner, D.V.1990. Purification and
441 characterization of IHHN virus of penaeid shrimps. *Journal of General Virology*,v.71, p.
442 2657-2664.
- 443

- 444 Bueno, S.L.S. 1991. Doenças em camarões marinhos no Brasil. Panorama da
445 aquicultura, Rio de Janeiro, v.8, p. 1-8.
- 446
- 447 Castro J. M., Moreno D.V; Torres de León, J. Las Cifras de la Crisis. Acuicultura del
448 Ecuador, 38: 19-23, 2000.
- 449
- 450 Castro J. M., Moreno V. D; Torres De León, J. El impacto económico de la enfermedad
451 de la mancha blanca en la economía ecuatoriana. Acuicultura del Ecuador, 43: 65- 68,
452 2001.
- 453
- 454 Cavalli, L. S., Marins, L.F., Netto, S., Abreu, P. C. 2008. Evaluation of white spot
455 syndrome virus (WSSV) in wild shrimp after a major outbreak in shrimp farms at
456 Laguna, southern Brazil. Atlântica, Rio Grande, 30(1) 45-52.
- 457
- 458 Chou, H.Y., Huang, C.Y., Wang, C.H., Chiang, H.C.,Lo, C.F. 1995. Pathogenicity of a
459 baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in
460 Taiwan. Dis.Aquat.Org, v. 23, p 165-173.
- 461
- 462 Costa, S.W. 2010. Aquicultura no Estado de Santa Catarina: situação atual e
463 perspectivas. Revista da ABCC, v.12, p.128-135.
- 464
- 465 Dourado, J. Vibriose em camarões marinhos (*L.vannamei*, Boone 1931) cultivados no
466 litoral de Pernambuco, Brasil. 2009. 47 f. Dissertação. (Mestrado em Ciência
467 Veterinária) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.
- 468

- 469 Flegel, T.W.; Nielsen, L.;Thamavit, V.; Kongtim, S.; Pasharawipas, T. 2004.
470 Presence of multiple viruses in non-diseased, cultivated shrimp at harvest. *Aquaculture*,
471 Amsterdam, 240, 55-68.
472
- 473 Hsieh, C. Y.; Chuang, P. C.; Chen, L.C.; Tu, C.; Chien, M.S.; Huang, K. C.; Kao,
474 H.F.;Tung, M. C.; Tsai, S. S. 2006. Infectious hypodermal and haematopoietic necrosis
475 virus (IHHNV) infections in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*.
476 *Aquaculture*, Amsterdam, v. 258, p.73–79.
477
- 478 Humason, G.L. 1972. *Animal tissue techniques*. 3. ed. San Francisco: W.H. Freeman
479 and Co.
480
- 481 Kalagayan, G.; Godin, D.; Kanna, R.; Hagino, G.; Sweeney, J.; Wyban, J.; Brock, J .
482 1991. IHHN virus as an etiological factor in runt-deformity syndrome of juvenile
483 *Penaeus vannamei* cultured in Hawaii. *J World Aquacult Soc.* 22: 235–243.
484
- 485 Kautsky, N.; Ronnback, P.; Tedengren, M.; Troell, M. 2000. Ecosystem perspectives on
486 management of disease in shrimp pond farming. *Aquaculture*, Amsterdam, v.191, p.
487 145-161.
488
- 489 Lightner, D.V.1996. *Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for*
490 *Diseases of Cultured Penaeid Shrimp*. World Aquaculture Society, Baton Rouge,
491 Louisiana.
492

493 Lightner, D.V. 2005. Biosecurity in shrimp farming: Pathogen Exclusion through use
494 of SPF stock and routine surveillance. *Journal of the World Aquaculture Society*,
495 v.36,p. 229-248.

496

497 Lightner, D. V.; Pantoja, C. R.; Poulos B.T.; Tang, K. F. J.; Redman, R. M.; Pasos de
498 Andrade.; T; Bonami, J.R. 2004. Infectious myonecrosis: new disease in Pacific white
499 shrimp. *Global.Aquacult.Advocate*, v.7, p.85.

500

501 Lo, C.F.; Leu; J.H.; HO; C.H.; Chen; C.H.; Peng; S.E.; Chen; Y.L.; Chou; C.M.; Yeh;
502 P.Y.; Huang; C.J.; Chou; H.Y.; Wang; C.H.; Kou; G.H. 1996. Detection of baculovirus
503 associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrmeps using polymerase
504 chain reaction. *Dis. Aquat. Org.*, v. 25, 133-141.

505

506 Mayo, M. 2002. A summary of taxonomic changes recently approved by ICTV.
507 *Archives of Virology*, v.147, p 1655-1656.

508

509 Morales-Covarrubias, M.S., 2010. Enfermedades del camarón: detección mediante
510 análisis en fresco e histopatología (Diseases Shrimp Detection by Means of Gross
511 Analysis and Histopathology). Trillas, Mexico City. 2d, 180 pp.

512

513 Muller, I.C; Andrade, T.P.D; Tang-Nelson, K.F.J; Marques, M.R.F; Lightner, D.V.
514 2010. Genotyping of white spot syndrome virus (WSSV) geographical isolates from
515 Brazil and comparison to other isolates from the Americas. *Dis Aquat Org.* v. 88, p. 91–
516 98.

517

- 518 Nunes, A.J.P.; Martins, P.C.C.; Gesteira, T.C.V., 2004. Carcinicultura ameaçada.
519 Panorama da Aqüicultura, Rio de Janeiro 14 (83) 37–51.
520
- 521 Office International Des Epizooties (OIE). Disease information. In: White spot disease
522 in Brazil: follow-up report No. 1. Paris, France, p. 247-249, v.18, n.32, 2005.
523 Disponível em: http://www.oie.int/eng/info/hebdo/AIS_58.HTM#Sec0. Acesso em:
524 28.nov.2010
525
- 526 Office International Des Epizooties (OIE). Diseases of Crustaceans. In: Manual of
527 Diagnostic Tests for Aquatic Animals. Paris, France, p 55-157. 2009. Disponível em:
528 http://www.oie.int/eng/normes/fmanual/A_summry.htm?e1d11. Acesso em 18. nov.
529 2010.
530
- 531 Peinado-Guevara, L.I; López-Meyer, M. 2006. Detailed monitoring of white spot
532 syndrome virus (WSSV) in shrimp commercial ponds in Sinaloa, Mexico by nested
533 PCR. Aquaculture. Amsterdam,v. 251, P. 33-45.
534
- 535 Pinheiro, A.C.A.S.; Lima, A.P.S.; Souza, M.E.; Neto, E.C.L.; Adrião, M., Gonçalves,
536 V. S.P., Coimbra, M.R.M. 2007. Epidemiological status of taura syndrome and
537 infectious myonecrosis viruses in *Penaeus vannamei* reared in Pernambuco (Brazil).
538 Aquaculture, Amsterdam, 262, 17-22.
539
- 540 Poulos, B.T.; Tang, K.F.J.; Pantoja, C.R.; Bonami, J.R.; Lightner, D.V. 2006.
541 Purification and characterization of infectious myonecrosis virus of penaeid shrimp.
542 Journal of General Virology, 87, 987-996.

- 543 Poulos, B.T; Lightner, D.V. 2006. Detection of infectious myonecrosis virus (IMNV)
544 of penaeid shrimp by reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). Dis.
545 Aquat. Org. v.73, p. 69-72.
- 546
- 547 Rodriguez, J.; Bayot, B.; Amano, Y.; Panchana, F.; De Blas, I.; Alday, V.; Calderón, J.
548 2003. White spot syndrome virus infection in cultured *penaeus vannamei* (Boone) in
549 Ecuador with emphasis on histopathology and ultrastructure. Journal of Fish Diseases,
550 Taiwan, v.26, p.439-450.
- 551
- 552 Rocha, I.P; Rocha, D.M. 2010. Análise da produção e do mercado interno e externo do
553 camarão cultivado. Revista da ABCC, n.1, p.18-23.
- 554
- 555 Sahul, H; Charles, M.X; Anilkmar, M. 2000. Tolerance of macrobrachium rosenbergie
556 to white spot syndrome virus. Aquaculture, Amsterdam, v.183, p 207-213.
- 557
- 558 Sambrook, J.; Fritsch, E. F. E.; Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory
559 Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Lab. Press, New York, 417p.
- 560
- 561 Santos, F.L.; Mendes, E.S.; Barros, G.C.; Bezerra, S.S.; Silva, V.A. 2005. Aspectos
562 epidemiológicos da necrose muscular infecciosa viral (IMNV) em camarões marinhos
563 (*Litopenaeus vannamei*, Boone, 1931) cultivados. Revista CFMV, n. 34, p 73-76.
- 564
- 565 Seiffert, W.Q.; Winckler, S.; Maggioni, D. 2005. A mancha branca em Santa Catarina.
566 Panorama da Aquicultura, Rio de Janeiro, v.15, n. 87, p 51-53.

567

568 Senapin, S.; Phewsaiya, K.; Briggs, M.; Flegel, T.W. 2007. Outbreaks of infectious
569 myonecrosis virus (IMNV) in Indonesia confirmed by genome sequencing and use of an
570 alternative RT-PCR detection method. *Aquaculture*, Amsterdam, 266, 32-38.

571

572 Shike, H.; Dhar, A.K.; Burns, J.C.; Shimizu, C.; Jousset, F.X.; Klimpel, K.R.; Bergoin,
573 M. 2000. Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus of shrimp is related to
574 mosquito brevidensoviruses. *Virology*, v. 277, p.167–177.

575

576 Silva, V.A. 2007. Estudo anatomopatológico da mionecrose infecciosa viral (IMNV) no
577 camarão cultivado, *Litopenaeus vannamei*, em Pernambuco, Brasil. 2007. 51f.
578 Dissertação (Mestrado em Recursos Pesqueiros e Aqüicultura) – Universidade Federal
579 Rural de Pernambuco, Recife.

580

581 Silva, V.A.; Santos, F.L.; Bezerra, S.S.; Pedrosa, V.F.; Mendes, P.P.; Mendes, E.S.
582 2010. A multi-season survey for infectious myonecrosis in farmed shrimp, *Litopenaeus*
583 *vannamei*, in Pernambuco, Brazil. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 104, p. 161–
584 165.

585

586 Tang, K.F.J.; Durand, S.V.; White, B.L.; Redman, R.M.; Pantoja, C.R.; Lightner, D.V.
587 2000. Postlarvae and juveniles of a selected line of *Penaeus stylirostris* are resistant to
588 infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus infection. *Aquaculture*,
589 Amsterdam. 190, 203-210.

590

- 591 Tang, K.F.J., Pantoja, C.R., Poulos, B.T., Redman, R.M., Lightner, D.V. 2005. *In*
592 *situ* hybridization demonstrates that *Litopenaeus vannamei*, *L.stylirostris* and *Penaeus*
593 *monodon* are susceptible to experimental infection with infectious myonecrosis virus
594 (IMNV). *Dis. Aquat. Org.*, v.63, p.261–265.
- 595
- 596 Teixeira, M.A; Cruz, J.E.F; Vieira, P.R.N; Branco, I.R.C; Costa, F.H.F; Rádis-Baptista,
597 G. 2010. Differential diagnosis of active hypodermal and hematopoietic necrosis virus
598 based on gene choice and reverse transcription coupled with PCR. *Genetics and*
599 *Molecular Research*, 9(4): p.2025-2031.
- 600
- 601 Thrusfield, M., 2004. *Epidemiologia veterinária*. Roca, São Paulo. 556 p.
- 602
- 603 Walker P.J.; Mohan C.V. 2009. Viral disease emergence in shrimp aquaculture: origins,
604 impacts and the effectiveness of health management strategies. *Reviews in Aquaculture*.
605 v.1 p.125–154.

606 Tabela 1. Primers utilizados para detecção do IMNV e IHHNV e WSSV.

Vírus	Primer	Sequência do primer	Tamanho do amplicon
	IMNV-F	5'-CGA-CGC-TGC-TAA-CCA-TAC-AA-3'	328pb (Poulos e
IMNV	IMNV-R	5'-ACT-CGC-CTG-TTC-GAT-CAA-GT-3'	Lightner, 2006)
	IHHNV-392F	5'-GGG-CGA-ACC-AGA-ATC-ACT-TA-3'	392pb (Tang et
IHHNV	IHHNV-392R	5'-ATC-CGG-AGG-AAT-CTG-ATG-TG-3'	al., 2000)
	WSSV-146F1	5'-ACT-ACT-AAC-TTC-AGC-CTA-TCT-AG-3'	1447pb (Lo et
	WSSV-146R1	5'-TAA-TGC-GGG-TGT-AAT-GTT-CTT-ACG-A-3'	al., 1996)
WSSV	WSSV-146F2	5'-GTA-ACT-GCC-CCT-TCC-ATC-TCC-A-3'	941 pb (Lo et
	WSSV-146R2	5'-TAC-GGC-AGC-TGC-TGC-ACC-TTG-T-3'	al., 1996)

608 Tabela 2. Frequência absoluta e relativa de camarões pequenos e médios de fazendas
 609 comerciais de Pernambuco/Brasil com IMNV, detectado por PCR.

Local (Fazenda)	Estação do ano		Peso (g)	
	Chuvoso	Estio	Pequenos ¹	Médios ²
A	2(3,33±4,54%) ^a	10(16,67±9,43%) ^b	6(10,00±7,59%) ^a	6(10,00±7,59%) ^a
B	2(3,33±4,54%) ^a	10(16,67±9,43%) ^b	4(6,67±6,31%) ^a	8(13,33±8,60%) ^a
C	3(5,00±5,51%) ^a	9(15,00±9,04%) ^a	4(6,67±6,31%) ^a	8(13,33±8,60%) ^a
D	0(0,00±0,00%) ^a	3(5,00±5,51%) ^a	0(00,00±0,0%) ^a	3(5,00±5,51%) ^a
Litoral Sul				
(A+B)	4(3,33±3,21%) ^a	20(16,67±6,67%) ^b	10(8,33±4,95%) ^a	14(11,67±5,74%) ^a
Litoral Norte				
(C+D)	3(2,50±2,79%) ^a	12(10,00±5,37%) ^b	4(3,33±3,21%) ^a	11(9,17±5,16%) ^a
Todas				
A+B+C+D	7(2,92±2,13%) ^a	32(13,33±4,30%) ^b	14(5,83±2,97%) ^a	25(10,42±3,86%) ^a

610 Letras diferentes, entre colunas da estação do ano ou peso, diferem significativamente
 611 as frequências ($P < 0,05$), utilizando a estatística χ^2 e/ou o teste Exato de Fisher (F). Em
 612 que: 1- camarões com peso e desvio padrão de $4,33 \pm 0,49$ g; 2- camarões com peso e
 613 desvio padrão de $8,28 \pm 1,35$ g.

614 Tabela 3. Frequência absoluta e relativa de camarões pequenos e médios de fazendas
 615 comerciais de Pernambuco/Brasil com IHNV detectado por PCR.

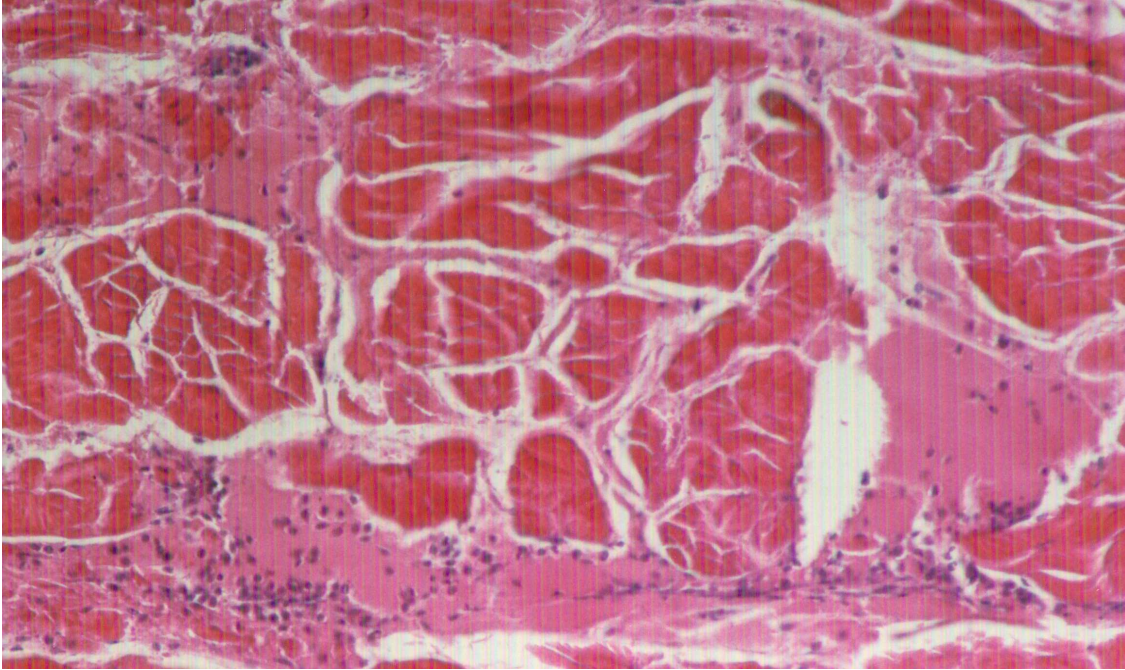
Local (Fazenda)	Estação do ano		Peso (g)	
	Chuvosa	Estio	Pequenos ¹	Médios ²
A	19(31,67±11,77%) ^a	31(51,67±12,64%) ^b	29(48,33±12,64%) ^a	21(35,00±12,07%) ^a
B	37(61,67±12,30%) ^a	37(61,67±12,30%) ^a	37(61,67±12,30%) ^a	37(61,67±12,30%) ^a
C	14(23,33±10,70%) ^a	37(61,67±12,30%) ^b	18(30,00±11,60%) ^a	33(55,00±12,59%) ^b
D	12(20,00±10,12%) ^a	28(46,67±12,62%) ^b	16(26,67±11,19%) ^a	24(40,00±12,40%) ^a
Litoral Sul				
(A+B)	56(46,67±8,93%) ^a	68(56,67±8,87%) ^a	66(55,00±8,90%) ^a	58(48,33±8,94%) ^a
Litoral Norte				
(C+D)	26(21,67±7,37%) ^a	65(54,17±8,92%) ^b	34(28,33±8,06%) ^a	57(47,50±8,93%) ^b
Todas				
A+B+C+D	82(34,17±6,00%) ^a	133(55,42±6,29%) ^b	100(41,67±6,24%) ^a	115(47,92±6,32%) ^a

616 Letras diferentes, entre colunas da estação do ano ou peso, diferem significativamente
 617 as frequências ($P < 0,05$), utilizando a estatística χ^2 e/ou o teste Exato de Fisher (F). Em
 618 que: 1- camarões peso e desvio padrão de $4,33 \pm 0,49\text{g}$; 2- camarões peso e desvio
 619 padrão de $8,28 \pm 1,35\text{g}$.

620 Tabela 4. Densidade, tempo de cultivo e sobrevivência de camarões (cam) das
621 fazendas pesquisadas.

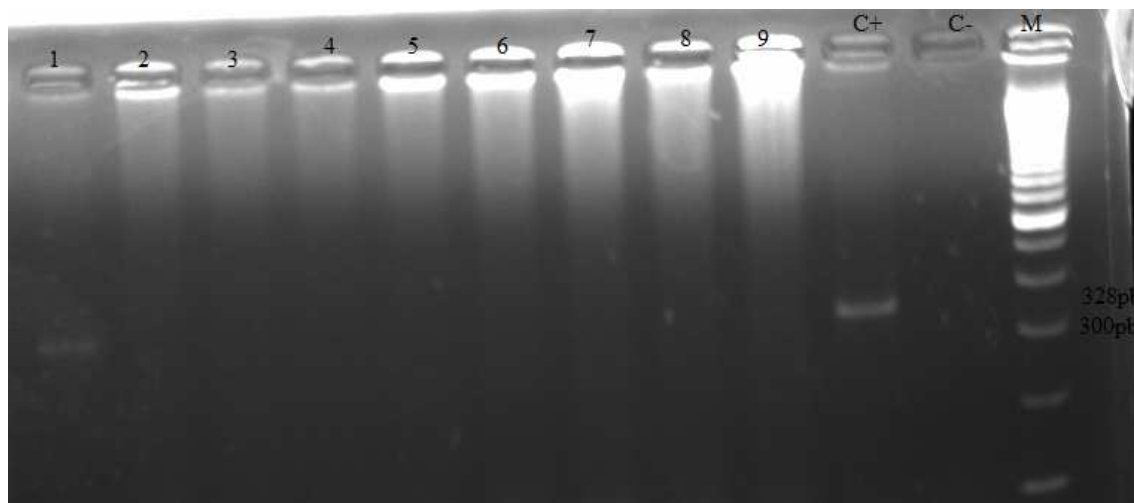
Fazenda	Período	Densidade (cam m ⁻²)	Tempo cultivo (dias)	Sobrevivência (%)
A	Chuvoso	19,00	98	85,00%
	Estio	20,00	98	87,00%
B	Chuvoso	91,80	86	61,90%
	Estio	88,93	104	64,50%
C	Chuvoso	44,64	133	66,24%
	Estio	41,25	95	61,82%
D	Chuvoso	29,20	66	90,00%
	Estio	21,60	75	81,00%

622



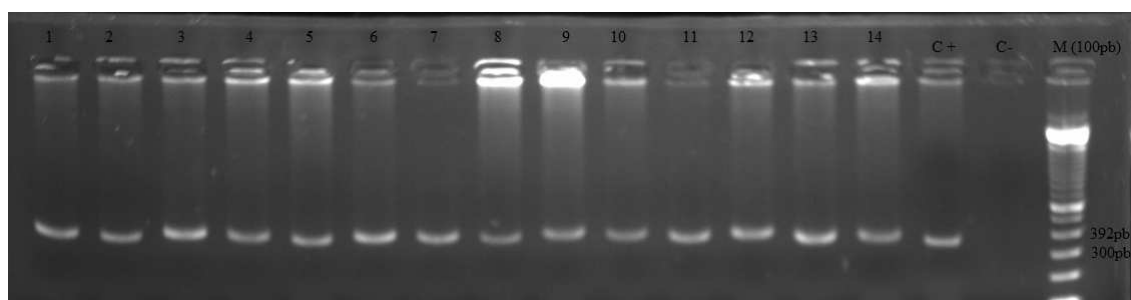
623

624 Figura 1. Infiltração hemocítica e edema na musculatura do cefalotórax.



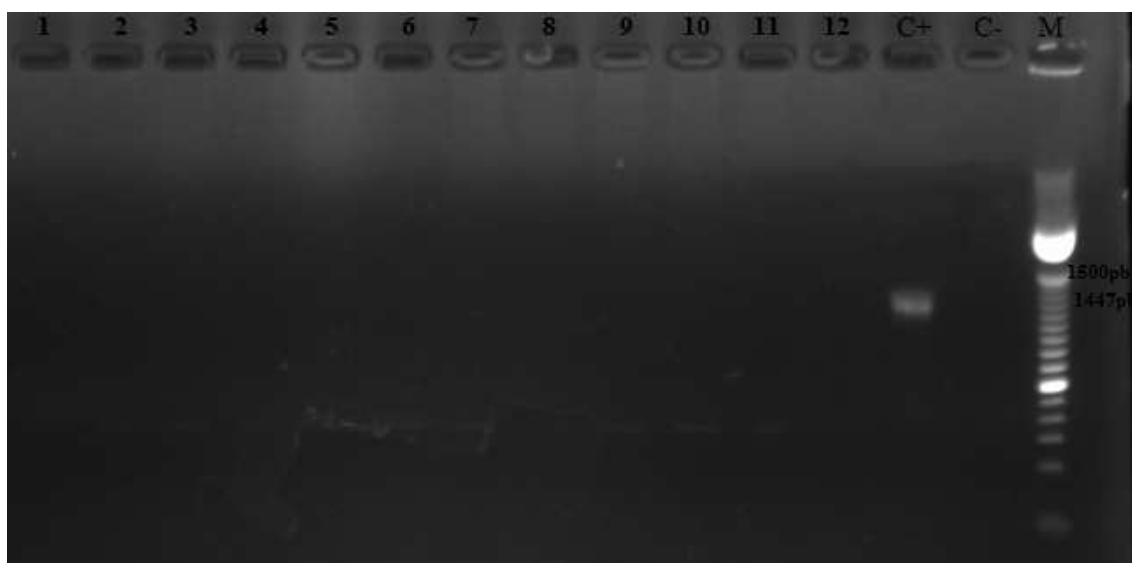
625

626 Figura 2. Gel de agarose a 2% corado com Brometo de Etídio. Amostra de camarão 1 é
627 positiva e de 2 a 9 são negativas para o IMNV; C +: controle positivo; C - : controle
628 negativo (água ultra-pura) e M, marcador de peso molecular de 100pb.



629

630 Figura 3. Gel de agarose a 1,6% corado com Brometo de Etídio. Amostras de camarões
631 1 a 14 são positivas para o IHHNV; C +: controle positivo; C - : controle negativo (água
632 ultra-pura) e M, marcador de peso molecular de 100pb.



633

634 Figura 4. Gel de agarose a 1,% corado com Brometo de Etídio. Amostras de camarões

635 1 a 12 são negativas para o WSSV; C +: controle positivo; C - : controle negativo (água

636 ultra-pura) e M, marcador de peso molecular de 100pb.

637

638 **GUIDE FOR AUTHORS**

639 **INTRODUCTION**

641 The *Journal of Invertebrate Pathology* publishes articles on all aspects of original
642 research concerned with the causation and manifestation (including immunologic
643 responses) of infectious and noninfectious diseases of invertebrates, the
644 suppression of such diseases in beneficial species, and the use of these pathogens in
645 controlling undesirable species such as agricultural pests and vectors of pathogens
646 transmissible to other organisms. In addition, this journal publishes the results of
647 biochemical, physiological, morphological, genetic, and ecological studies related to
648 the etiologic agents of diseases of invertebrates. The journal is particularly
649 dedicated to the publication of contributions of a basic and fundamental nature,
650 although it will accept suitable articles pertaining to the applications of invertebrate
651 pathology. The editor-in-chief and members of the Editorial Board will examine
652 contributions from any qualified worker in any country of the world.

653 **Types of paper**

654 The *Journal of Invertebrate Pathology* publishes the following types of articles:

655 **Regular Articles.** Manuscripts for Regular Articles are full-length papers the reports
656 the results of a large and well-defined study. There is no page limit, but this type of
657 article is usually in the range of eight published pages.

658 **Short Communications.** Manuscripts for Short Communications should be 1500 or
659 fewer words and contain not more than two illustrations or two tables, or one of
660 each. Manuscripts should contain an abstract of not more than 100 words.
661 References should be kept to a minimum and should be styled according to the
662 guidelines in the section on References.

663 **Minireviews.** Manuscripts for Minireviews typically range from four to six published
664 pages and provide
665 a succinct review of important and recent developments in any field of invertebrate
666 pathology.

667 **Forum Articles.** Manuscripts for Forum Articles typically range from one to four
668 published pages and focus on a topical issue in invertebrate pathology. It is the
669 intent of Forum Articles to stimulate discussion of controversial or unresolved issues
670 relevant to all aspects of invertebrate pathology.

671 **BEFORE YOU BEGIN**

672 **Ethics in Publishing**

673 For information on Ethics in Publishing and Ethical guidelines for journal publication
674 see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and
675 <http://www.elsevier.com/ethicalguidelines>.

676 **Conflict of interest**

677 All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest
678 including any financial, personal or other relationships with other people or
679 organizations within three years of beginning the submitted work that could
680 inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also
681 <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>.

682 *Submission declaration*

683 Submission of an article implies that the work described has not been published
684 previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or
685 academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that
686 its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible
687 authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be
688 published elsewhere including electronically in the same form, in English or in any
689 other language, without the written consent of the copyright-holder.

690 **Changes to authorship**

691 This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in
692 the authorship of accepted manuscripts:

693 *Before the accepted manuscript is published in an online issue:* Requests to add or remove
694 an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager
695 from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a)
696 the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged
697 and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree
698 with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of
699 authors, this includes confirmation from the author being added or removed.
700 Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the
701 Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as
702 described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of
703 any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue
704 is suspended until authorship has been agreed.

705 *After the accepted manuscript is published in an online issue:* Any requests to add, delete,
706 or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the
707 same policies as noted above and result in a corrigendum.

708 **Copyright**

709 Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal
710 Publishing Agreement' (for more information on this and copyright see
711 <http://www.elsevier.com/copyright>). Acceptance of the agreement will ensure the
712 widest possible dissemination of information. An e-mail will be sent to the
713 corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal
714 Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

715 Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including
716 abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher
717 is required for resale or distribution outside the institution and for all other
718 derivative works, including compilations and translations
719 (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other
720 copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from
721 the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted
722 forms for use by authors in these cases: please consult
723 <http://www.elsevier.com/permissions>.

724 ***Retained author rights***

725 As an author you (or your employer or institution) retain certain rights; for details
726 you are referred to: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

727 ***Role of the funding source***

728 You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the
729 research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the
730 sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of
731 data; in the writing of the report; and in the decision to submit the paper for
732 publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be
733 stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

734 ***Funding body agreements and policies***

735 Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose
736 articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential
737 manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards.
738 To learn more about existing agreements and policies please visit
739 <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

740 ***Open access***

741 This journal offers you the option of making your article freely available to all via
742 the ScienceDirect platform. To prevent any conflict of interest, you can only make
743 this choice after receiving notification that your article has been accepted for
744 publication. The fee of \$3,000 excludes taxes and other potential author fees such
745 as color charges. In some cases, institutions and funding bodies have entered into
746 agreement with Elsevier to meet these fees on behalf of their authors. Details of
747 these agreements are available at <http://www.elsevier.com/fundingbodies>. Authors
748 of accepted articles, who wish to take advantage of this option, should complete
749 and submit the order form (available at
750 <http://www.elsevier.com/locate/openaccessform.pdf>). Whatever access option you
751 choose, you retain many rights as an author, including the right to post a revised

752 personal version of your article on your own website. More information can be
753 found here: <http://www.elsevier.com/authorsrights> .

754 ***Language and language services***

755 Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but
756 not a mixture of these). Authors who require information about language editing
757 and copyediting services pre- and post-submission please visit
758 <http://webshop.elsevier.com/languageediting> or our customer support site at
759 <http://support.elsevier.com> for more information.

760 ***Submission***

761 Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise
762 through the creation and uploading of your files. The system automatically converts
763 source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review
764 process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF
765 files at submission for the review process, these source files are needed for further
766 processing after acceptance. All correspondence, including notification of the
767 Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need
768 for a paper trail.

769 **PREPARATION**

770 ***Use of word processing software***

771 It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor
772 used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as
773 simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on
774 processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's options to
775 justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts,
776 superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one
777 grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use
778 tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way
779 very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing
780 with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of
781 figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your
782 figures in the text. See also the section on Electronic illustrations.

783 To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the "spell-check" and
784 "grammar-check" functions of your wordprocessor.

785 ***Article structure***

786 ***Subdivision - numbered sections***

787 Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should
788 be numbered

789 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section
790 numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just
791 refer to "the text". Any subsection may be given a brief heading. Each heading
792 should appear on its own separate line.

793 **Introduction**

794 State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a
795 detailed literature survey or a summary of the results.

796 **Material and methods**

797 Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already
798 published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be
799 described.

800 **Results**

801 Results should be clear and concise.

802 **Discussion**

803 This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A
804 combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive
805 citations and discussion of published literature.

806 **Conclusions**

807 The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section,
808 which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and
809 Discussion section.

810 **Appendices**

811 If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae
812 and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq.
813 (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and
814 figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

815 **Essential title page information**

816 • **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval
817 systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

818 • **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a
819 double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses
820 (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a
821 lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of
822 the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including
823 the country name, and, if available, the e-mail address of each author.

824 • **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all
825 stages of refereeing and publication, also post-publication. Ensure that telephone and

826 fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and
827 the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding
828 author.

829 • **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in
830 the article was done, or was visiting at the time, a "Present address" (or
831 "Permanent address") may be indicated as a footnote to that author's name. The
832 address at which the author actually did the work must be retained as the main,
833 affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

834 **Abstract**

835 A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the
836 purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is
837 often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For
838 this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s)
839 and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but
840 if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

841 **Graphical abstract**

842 A Graphical abstract is mandatory for this journal. It should summarize the
843 contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention
844 of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the
845 work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate
846 file in the online submission system. Image size: please provide an image with a
847 minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. Preferred file types:
848 TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts>
849 for examples.

850 **Highlights**

851 Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet
852 points that convey the core findings of the article and should be submitted in a
853 separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file
854 name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters per bullet point
855 including spaces). See <http://www.elsevier.com/researchhighlights> for examples.

856 **Keywords**

857 Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American
858 spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for
859 example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly
860 established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing
861 purposes.

862 **Abbreviations**

863 Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed
864 on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the
865 abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote.
866 Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

867 **Acknowledgements**

868 Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the
869 references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to
870 the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the
871 research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the
872 article, etc.).

873 **Units**

874 Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system
875 of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

876 **Footnotes**

877 Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the
878 article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into
879 the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the
880 position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at
881 the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list. *Table footnotes*
882 Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

883 **Artwork**

884 *Electronic artwork*

885 *General points*

- 886 • Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- 887 • Save text in illustrations as "graphics" or enclose the font.
- 888 • Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times, Symbol.
- 889 • Number the illustrations according to their sequence in the text.
- 890 • Use a logical naming convention for your artwork files.
- 891 • Provide captions to illustrations separately.
- 892 • Produce images near to the desired size of the printed version.
- 893 • Submit each figure as a separate file.

894 A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

895 <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

896 You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

897 *Formats*

898 Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, please
899 "save as" or convert the images to one of the following formats (note the resolution
900 requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given

901 below):EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as
902 "graphics".TIFF: color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum
903 of 300 dpi.TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi. TIFF:
904 Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi
905 is required.

906 DOC, XLS or PPT: If your electronic artwork is created in any of these Microsoft
907 Office applications please supply "as is".

908 **Please do not:**

- 909 • Supply files that are optimised for screen use (like GIF, BMP, PICT, WPG); the
910 resolution is too low;
- 911 • Supply files that are too low in resolution;
- 912 • Submit graphics that are disproportionately large for the content.

913 *Color artwork*

914 Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS
915 Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article,
916 you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge,
917 that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other
918 sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the
919 printed version. For color reproduction in print, you will receive information regarding
920 the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your
921 preference for color in print or on the Web only. For further information on the
922 preparation of electronic artwork, please see
923 <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

924 Please note: Because of technical complications which can arise by converting color
925 figures to "gray scale" (for the printed version should you not opt for color in print)
926 please submit in addition usable black and white versions of all the color
927 illustrations.

928 *Figure captions*

929 Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not
930 attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure
931 itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves
932 to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

933 **Tables**

934 Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place
935 footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript
936 lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure
937 that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the
938 article.

939 **References**

940 **Citation in text**

941 Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference
942 list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full.
943 Unpublished results and personal communications are not recommended in the
944 reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in
945 the reference list they should follow the standard reference style of the journal and
946 should include a substitution of the publication date with either "Unpublished
947 results" or "Personal communication" Citation of a reference as "in press" implies
948 that the item has been accepted for publication.

949 **Web references**

950 As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was
951 last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates,
952 reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be
953 listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired,
954 or can be included in the reference list.

955 **References in a special issue**

956 Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and
957 any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

958 **Reference style**

959 *Text:* All citations in the text should refer to:

- 960 1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and
961 the year of publication;
- 962 2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
- 963 3. *Three or more authors:* first author's name followed by "et al." and the year of
964 publication. Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of
965 references should be listed first alphabetically, then chronologically.

966 Examples: "as demonstrated (Allan, 1996a, 1996b, 1999; Allan and Jones, 1995).
967 Kramer et al.(2000) have recently shown"

968 *List:* References should be arranged first alphabetically and then further sorted
969 chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in
970 the same year must be identified by the letters "a", "b", "c", etc., placed after the
971 year of publication. *Examples:*

972 Reference to a journal publication:

973 Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2000. The art of writing a scientific
974 article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

975 Reference to a book:

- 976 Strunk Jr., W., White, E.B., 1979. *The Elements of Style*, third ed. Macmillan,
977 New York.
- 978 Reference to a chapter in an edited book:
- 979 Mettam, G.R., Adams, L.B., 1999. How to prepare an electronic version of your
980 article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-
981 Publishing Inc., New York, pp. 281–304.
- 982 *Journal abbreviations source*
- 983 Journal names should be abbreviated according to Index Medicus journal
984 abbreviations: <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>;
- 985 List of serial title word abbreviations: [http://www.issn.org/2-22661-LTWA-](http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php)
986 [online.php](http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php); CAS (Chemical Abstracts Service): <http://www.cas.org/sent.html>.

6. ARTIGO II

Parte dos resultados obtidos durante o trabalho experimental dessa tese será apresentada no artigo intitulado “Frequência de protozoários e alterações morfológicas do camarão marinho cultivado em Pernambuco, Brasil.”(manuscrito), que se encontra anexado.

1 **Frequência de protozoários e alterações morfológicas do camarão marinho**
2 **cultivado em Pernambuco, Brasil.**

3 Verônica Arns da Silva¹, Virgínia Fonseca da Pedrosa¹, Fernando Leandro dos Santos¹,
4 Paulo de Paula Mendes² e Emiko Shinozaki Mendes¹.

5 ¹Universidade Federal Rural de Pernambuco, Av. Dom Manuel de Medeiros s/n, Dois
6 Irmãos, Recife/PE, Brasil ¹. E-mail: veronicaarns@yahoo.com.br,
7 vikavet@yahoo.com.br, fls@dmv.ufrpe.br, esmendes@dmv.ufrpe.br.

8 Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Pesca e Aquicultura, Av.
9 Dom Manuel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, Recife/PE, Brasil ². E-mail:
10 paulo_ufrpe@yahoo.com.br.

11

12 Resumo – Objetivou-se com este trabalho verificar a frequência de protozoários
13 externos e internos, assim como, os principais achados histopatológicos e de análise a
14 fresco em camarões *Litopenaeus vannamei*, cultivados de quatro fazendas comerciais do
15 litoral pernambucano. Camarões de classificação pequena ($4,33 \pm 0,49$ g) e média ($8,28$
16 $\pm 1,35$ g) foram coletados em duas fazendas do litoral sul (A e B) e em duas do litoral
17 norte (C e D) do estado de Pernambuco, durante os períodos de chuva e de estiagem.
18 Foram detectadas alterações em hepatopâncreas (exame a fresco - 26,45%,
19 histopatologia - 39,37%), musculatura (exame a fresco - 68,54%, histopatologia –
20 8,33%), brânquias (exame a fresco – 50,62%, histopatologia – 39,17%), intestino
21 (histopatologia – 18,95%) assim como presença de endoparasitas (histopatologia –
22 32,70%) e ectoparasitas (histopatologia – 15,83%). A maior frequência de protozoários
23 e/ou alterações foi constatada nos animais das fazendas B e C, em que foram adotadas
24 maiores densidades e tempo de cultivo. Existe uma conjunção de fatores que determina

25 a saúde dos camarões cultivados, portanto investigações epidemiológicas são
26 necessárias para embasar o monitoramento da saúde dos animais.
27 Termo para indexação: *Litopenaeus vannamei*, gregarinas, epicomensais.

28

29 **Frequency of protozoa and morphological changes of cultured shrimp in**
30 **Pernambuco, Brazil**

31 Abstract - The aim of this work was to determine the frequency of external and internal
32 protozoans, as well as the main histopathological findings and wet mount shrimp grown
33 in four estates of Pernambuco coast. Shrimps were collected in two farms located in the
34 southern (A and B) and northern (C and D) zones of Pernambuco state during the wet
35 and dry seasons. Two samples were collected in each climatic period, small and
36 medium shrimps. Alterations were detected in hepatopancreas (wet mount – 26.45%,
37 histopathology – 39.37%), muscle (wet mount – 68.54%, histopathology – 8.33%), gill
38 (wet mount – 50.62%, histopathology – 39.17%) and intestine (histopathology –
39 18.95%). Moreover, the presence of endoparasites (histopathology - 32.70%) and
40 ectoparasites (histopathology – 15.83%) were observed. The higher frequency of
41 protozoa or alterations was found in the B and C farms, which used to adopt higher
42 densities and longer cycle as culture system. There is a conjunction of factors that
43 determines the health of animals and epidemiological investigations are needed to
44 bolster the monitoring of monitoring of animal health.

45 Index terms: *Litopenaeus vannamei*, gregarine, epicomensal.

46

47

Introdução

48 A carcinicultura mundial é dominada por duas espécies: o camarão tigre,
49 *Penaeus monodon* e o camarão branco do Pacífico, *Litopenaeus vannamei* (Lightner,

50 2005). No Brasil, principalmente no nordeste, o *L.vannamei* é a principal espécie
51 cultivada e representa uma alternativa de rápida produção de alimento e em alta escala.

52 Conforme relatado por Subasinghe (2005), para que se tenha uma carcinicultura
53 economicamente sustentável é fundamental um ambiente de cultivo equilibrado, além
54 de um monitoramento da sanidade dos camarões, para prevenir o aparecimento de
55 doenças.

56 As doenças infecciosas são causadas por patógenos transmissíveis (vírus,
57 bactérias, protozoários e fungos), enquanto as não infecciosas são resultantes de outros
58 agentes como deficiência nutricional, fatores físicos e químicos dos ecossistemas de
59 cultivo, entre outros. Os vírus são relatados como os responsáveis pelas maiores perdas
60 na carcinicultura (Walker & Mohan, 2009), no entanto, protozoários e bactérias também
61 são fortes ameaças à produção de camarão (Fajer-Ávila et al. 2005; Goarant et al.,
62 2006).

63 Dentre os protozoários que causam doenças em camarões marinhos, destacam-se
64 as gregarinas, que se encontram disseminadas por todo o mundo. São pertencentes ao
65 filo Apicomplexa e podem parasitar moluscos bivalves, anelídeos, insetos, crustáceos
66 (Leander et al., 2006). Localizam-se no estômago, trato intestinal e hepatopâncreas de
67 camarões cultivados e silvestres (Chavéz-Sánchez et al., 2002, Jiménez et al., 2002).

68 Em camarões com alto grau de infecção por gregarinas, o intestino pode
69 apresentar alterações variadas, tais como coloração amarelada, inflamação, hiperplasia
70 da mucosa, obstrução, além de perfurações da parede intestinal. Essas podem favorecer
71 o início de uma infecção secundária, principalmente por bactérias (Morales-
72 Covarrubias, 2010).

73 O camarão pode se infectar ao se alimentar de moluscos bivalves e poliquetas do
74 gênero *Polydora*, que vivem no fundo de viveiros e que servem de hospedeiros

75 intermediários para as gregarinas (Fajer-Ávila et al. 2005; Leander et al., 2006). Esses
76 endoparasitos completam seu ciclo de vida no trato digestivo de artrópodes marinhos,
77 como os crustáceos (Cremonte et al., 2005).

78 Epicomensais são protozoários que frequentemente aderem a brânquias,
79 apêndices e cutícula dos camarões, sem que esses estejam necessariamente doentes. No
80 entanto, quando os camarões estão doentes ou submetidos a situações adversas, como
81 estresse ambiental, densidades elevadas, reduzem sua atividade limpadora, tornando-se
82 mais susceptíveis a uma infestação massiva pelos epicomensais, o que pode acarretar
83 dificuldade respiratória, hipoxia (ausência de oxigênio), causando alta mortalidade,
84 principalmente de camarões juvenis e adultos (Morales-Covarrubias, 2010).

85 Objetivou-se verificar a frequência de protozoários externos e internos, assim
86 como, os principais achados histopatológicos e de análise a fresco de camarões
87 cultivados em quatro fazendas do litoral pernambucano.

88

89

Material e Métodos

90 No período de maio a dezembro de 2008, foram coletadas amostras do camarão
91 *Litopenaeus vannamei* em duas fazendas do litoral sul (A e B) e duas fazendas do litoral
92 norte (C e D) do estado de Pernambuco/Brasil. Avaliaram-se camarões de um viveiro
93 por fazenda, durante os períodos chuvoso (1º ciclo de cultivo) e de estio (2º ciclo de
94 cultivo). Em cada período foram realizadas duas coletas, capturando-se camarões com
95 porte pequeno e médio. Cada amostra foi constituída de 30 espécimes, totalizando-se
96 480 camarões analisados de 16 coletas. Os animais foram transportados sob aeração ao
97 Laboratório de Sanidade de Animais Aquáticos (LASAq), da Universidade Federal
98 Rural de Pernambuco (UFRPE), para a realização das análises.

99 Os indivíduos de cada viveiro foram pesados e em seguida examinados, por
100 meio de análise a fresco, tanto macro como microscopicamente, segundo o método
101 descrito por Morales-Covarrubias (2010). Após a análise a fresco, os mesmos foram
102 sacrificados por choque térmico e em seguida, infiltrados e mergulhados na solução de
103 Davidson's AFA (Humason, 1972), permanecendo no fixador por um período de 24 a
104 48 horas para o exame histopatológico. Foram selecionados fragmentos em cortes
105 longitudinais, tanto da musculatura (possibilitando a visualização do intestino e ceco
106 posterior), quanto do cefalotórax (possibilitando a visualização do hepatopâncreas, ceco
107 anterior), com o propósito de pesquisar endoparasitos, como as gregarinas. Cortes de
108 brânquias também foram feitos com o intuito de verificar lesões assim como
109 protozoários epicomensais. Os fragmentos foram desidratados, diafanizados, incluídos
110 em parafina. Os blocos de parafina contendo os fragmentos foram cortados a 5 µm. As
111 lâminas foram coradas com Hematoxilina e Eosina (Behmer et al., 2003).

112 As frequências dos camarões com protozoários ou com alterações foram
113 tabuladas e analisadas pelo teste de independência de Qui-quadrado (com correção de
114 Yates) ou pelo teste exato de Fisher. Para todas as análises, o nível de significância
115 estabelecido foi de 5% ($\alpha = 0,05$). Para avaliar a relação dos protozoários, alterações em
116 função da densidade de estocagem e estação do ano, foram propostos os seguintes
117 modelos:

$$118 \text{FRC}_{(\text{protozoários})i} = \beta_0 + \beta_1 \text{DE}_i + \beta_2 \text{EA}_i + \beta_3 \text{P}_i + \varepsilon_i$$

119 Em que: FRC- frequência relativa dos camarões; protozoários - gregarinas ou
120 epicomensais; β_0 , β_1 , β_2 e β_3 -parâmetros do modelo; DE- densidade de estocagem; EA-
121 estação do ano; P- peso; ε_i -erro associado a cada observação, com parâmetros $(0, \sigma^2)$.

122

123

$$124 \quad \text{FRC}_{(\text{alterações})_i} = \beta_0 + \beta_1 \text{DE}_i + \beta_2 \text{EA}_i + \beta_3 \text{P}_i + \varepsilon_i$$

125 Em que: FRC- frequência relativa dos camarões; alterações – enterite hemocítica (HE)
126 ou clusteres; β_0 , β_1 , β_2 e β_3 -parâmetros do modelo; DE- densidade; EA- estação do ano;
127 P- peso; ε_i -erro associado a cada observação, com parâmetros $(0, \sigma^2)$.

128

129 Informações sobre o índice pluviométrico do litoral sul e norte de Pernambuco,
130 onde se situam as fazendas, foram obtidas no Laboratório de Meteorologia de
131 Pernambuco (LAMEPE) do Instituto de Tecnologia de Pernambuco (ITEP).

132

133 **Resultados e Discussão**

134 No exame a fresco, alterações macroscópicas como desuniformidade de tamanho
135 e peso, trato digestivo vazio e opacidade muscular foram registradas em todas as 16
136 amostras. Desuniformidade de tamanho e peso pode ser atribuída ao estágio crônico da
137 Necrose Hematopoiética e Hipodermal Infecciosa (IHHNV) (OIE, 2009). Trato
138 digestivo vazio e opacidade muscular foram observados, respectivamente, em 65,42% e
139 68,54% do total dos 480 camarões. Essas alterações são de etiologia diversas, desde o
140 estresse por densidade elevada, desequilíbrio ambiental, período de muda, manipulação
141 excessiva, bem como presença de patógenos, sejam eles, vírus, bactérias e/ou gregarinas
142 (Nunes et al., 2004; Morales-Covarrubias, 2010). Em investigação bacteriológica e de
143 exame a fresco realizadas por Dourado (2009), nas mesmas 16 amostras do presente
144 estudo, foram isoladas várias espécies de *Vibrio*, como *Vibrio mediterranei*, *V.*
145 *alginolyticus*, *V. harveyi* e *V. parahaemolyticus*.

146 As alterações mais observadas foram no hepatopâncreas, musculatura e
147 brânquias dos animais pesquisados, assim como a presença de endoparasitas
148 (gregarinas) e ectoparasitos (protozoários epicomensais). Também constataram-se

149 brânquias, telson, urópodos e apêndices avermelhados, devido a expansão dos
150 cromatóforos, indicando estresse nos animais de todas as amostras. Suas maiores
151 ocorrências foram registradas em 50,00% dos animais pequenos (peso médio e desvio
152 padrão de $4,33 \pm 0,49\text{g}$) na fazenda B, período chuvoso e, em menor frequência
153 (33,33%) em camarões pequenos na fazenda C, no período de estio. O estresse é
154 considerado um fator de risco para o surgimento e propagação de doenças (Walker e
155 Mohan, 2009).

156 No exame histopatológico, necrose e/ou infiltração muscular foram constatadas
157 em 8,33% dos 480 animais. Camarões de todas as fazendas apresentaram musculatura
158 alterada, sendo observada com maior frequência no período de estio do que no chuvoso.
159 As alterações microscópicas verificadas no hepatopâncreas, pelo exame a fresco em
160 animais (26,45%), foram desprendimento do epitélio de revestimento, deformidade dos
161 túbulos e vacúolos citoplasmáticos, associados à presença de lipídeos. Constatou-se pelo
162 exame histopatológico, infiltração hemocítica, edema e necrose no hepatopâncreas
163 caracterizando um processo inflamatório (hepatopancreatite hemocítica) em 39,37% dos
164 animais. Essas alterações, verificadas tanto no exame a fresco quanto na histopatologia,
165 sugerem um processo de origem infecciosa.

166 Conforme citado por Morales-Covarrubias (2010), injúrias no hepatopâncreas
167 podem ser comumente observadas em doenças bacterianas, como a Hepatopancreatite
168 Necrosante Bacteriana (NHPB) e/ou vibriose sistêmica. Mendes et al. (2007) ao
169 avaliarem camarões por análise a fresco, verificaram lesões significativas nos túbulos do
170 hepatopâncreas e sugeriram que elas poderam estar também, relacionadas com o manejo
171 nutricional, além do envolvimento dos agentes microbianos.

172 Nas brânquias, pelo exame a fresco, sujidades e/ou focos de necrose foram
173 observados em 50,62% do total dos camarões, sendo mais frequentes (55,83%) nos

174 animais da fazenda C. Na histopatologia, foram encontradas nas brânquias, sujidades,
175 necrose, inflamação (edema e/ou infiltração hemocítica), clusters bacterianos, de forma
176 similar ao observado por Aguirre-Guzmán et al. (2010). Clusters bacterianos, como os
177 causados bactérias vibrionáceas, foram observados em 39,17% dos espécimes.
178 Considerando o total dos animais das quatro fazendas, com base na análise estatística,
179 constatou-se um aumento significativo de clusters no período de estio em 45,83% dos
180 camarões, enquanto no período chuvoso a frequência foi de 32,50% (Tabela 1).

181 A localização desses clusters foi na cutícula, apêndices e brânquias, sendo mais
182 frequentes neste último órgão. Ao considerar o total das fazendas e a variável peso,
183 houve um aumento significativo dessa alteração nos camarões médios (peso e desvio
184 padrão de $8,28 \pm 1,35\text{g}$), com ocorrência de 47,50%. Os achados mencionados são
185 indicativos de que se deva dar maior atenção à prática de manejo, principalmente, no
186 período de estio, evitando assim, o estresse e conseqüentemente, a ação de patógenos
187 oportunistas como as bactérias vibrionáceas.

188 Epicomensais foram encontrados pelo exame histopatológico em 15,83% do
189 total de 480 camarões, sendo as brânquias o sítio anatômico mais parasitado. Com
190 exceção das amostras do período de estio da fazenda D, todas as demais evidenciaram a
191 presença desses ectoparasitas, sendo em maior frequência (46,67%) em animais da
192 fazenda C, no período de estio (Tabela 2).

193 López-Téllez et al. (2009) ao pesquisarem epicomensais em camarões de vida
194 livre e cultivados, verificaram que, nesses últimos, a infestação por estes protozoários
195 foi maior, o que atribuíram em parte, ao emprego de densidade elevada nos cultivos.
196 Porém, no presente estudo, a densidade não exerceu influência significativa ($P \geq 0,05$) na
197 frequência de parasitismo por esse protozoário. Camarões doentes ou submetidos a
198 fatores de risco, tais como, má qualidade da água e com infecções bacteriana, tornam-se

199 mais vulneráveis a infestação massiva por epicomensais (Mendes et al., 2007;
200 Morales-Covarrubias, 2010).

201 Ao se analisar os dados de todas as fazendas, verificou-se um aumento
202 significativo na frequência dos epicomensais no período de estio, em 20% dos
203 camarões, frente a frequência de 11,67%, no período chuvoso. Ainda em relação o fator
204 estação do ano, alguns achados foram pouco esclarecedores, pois em camarões da
205 fazenda D não houve registro de epicomensais, no período de estio, enquanto que nas da
206 fazenda C, no mesmo período climático e, na mesma região (litoral norte), houve a
207 maior frequência dos ectoparasitas em 46,67% dos camarões.

208 Gregarinas e/ou gametócitos estiveram presentes em 32,70% dos 480 camarões
209 pesquisados, exceto nos espécimes da fazenda D (Tabela 3). A maior ocorrência de
210 gregarinas foi nos animais médios das fazenda B (81,67%) e da C (51,67%). A
211 frequência desse endoparasito não foi influenciada pela estação do ano e nem pelo peso
212 dos espécimes.

213 A mais elevada frequência de gregarinas estava associada a enterite hemocítica e
214 animais com trato digestivo vazio. Essas observações, segundo Morales-Covarrubias
215 (2010), podem ser consequência da presença de gregarinas, pois esse endoparasita
216 compete com o camarão por nutrientes, além de causar lesões na mucosa intestinal. As
217 gregarinas estavam localizadas, principalmente, no estômago e ceco posterior dos
218 camarões, o que pode ser confirmativo da ocorrência do distúrbio. Chavéz-Sánchez et
219 al. (2002) também detectaram no exame histopatológico e análise a fresco, a presença
220 de gregarinas no estômago e no intestino de camarões do Golfo do México, nas espécies
221 *Litopenaeus setiferus*, *Farfantepenaeus aztecus*, *F. duorarum* e *L. vanammei*.

222 Não foi realizada distinção entre os três gêneros *Cephalobus* spp,
223 *Paraophioidina* spp e *Nematopsis* spp de gregarinas que infectam o camarão, muito

224 embora, saiba-se que o último gênero seja o mais comumente encontrado (Páez-
225 Osuna et al., 2003). Quando há infecção por gregarinas de forma massiva,
226 principalmente pelo gênero *Nematopsis* spp, as lesões podem ser severas, com
227 consequente baixa taxa de sobrevivência nos cultivos (Fajer-Ávila et al., 2005).

228 Em infecções massivas por gregarinas, além de obstrução do intestino e
229 crescimento reduzido nos camarões, é comum observar enterite hemocítica (inflamação
230 do intestino) (Jiménez et al., 2002). Em camarões das fazendas B e C, onde houve as
231 maiores ocorrências de gregarinas foi observada também, a maior presença de enterite
232 hemocítica de 35,83% e 31,67%, respectivamente.

233 A enterite hemocítica foi observada em 18,95% dos 480 espécimes, exceto em
234 animais coletados no período chuvoso e em camarões médios no período de estio da
235 fazenda D. Houve nos camarões da fazenda B, um aumento significativo desta alteração
236 nos animais médios, atingindo 48,33% dos espécimes (Tabela 4). Enterite hemocítica
237 pode estar associada à presença de gregarinas, mas também a outros fatores, como nas
238 irritações causadas por toxinas de algas cianofíceas (Frías-Espericueta et al., 2008;
239 Morales-Covarrubias, 2010).

240 O índice pluviométrico de 2008 referente ao litoral sul foi acima de 200 mm,
241 com pico de 299,7 mm em agosto, sendo maior que as precipitações pluviométricas
242 registradas no litoral norte, com pico de 248,4 mm em junho. As precipitações
243 registradas no período de estio variaram de 50,1 mm a 0,0 mm em outubro e novembro
244 de 2008, respectivamente.

245 O aumento das ocorrências no estio, tanto dos agentes infecciosos, como das
246 alterações morfológicas detectadas, não pode ser atribuído apenas ao período climático,
247 já que tanto no litoral norte quanto no sul, fazendas com o mesmo índice pluvial,
248 apresentaram percentuais de sobrevivência bem diversos. A maior frequência dos

249 achados no estio, segundo cultivo, serve de alerta para a necessidade de maior
 250 atenção ao manejo adotado nesse período climático, bem como a necessidade de adoção
 251 de medidas sanitárias rigorosas no intervalo dos cultivos. Não pode ser descartada a
 252 hipótese de limpeza deficiente dos viveiros e outras falhas de manejo terem contribuído
 253 para uma degradação do ambiente de cultivo.

254 Ao relacionar a frequência relativa dos camarões (FRC) com protozoários
 255 (gregarinas ou epicomensais), enterite hemocítica (EH) e clusters bacterianos em função
 256 da densidade de estocagem (DE) e a estação do ano (EA), através de regressão múltipla,
 257 verificou-se que não existiu influência da estação do ano na frequência de camarões
 258 com gregarinas e com enterite hemocítica (EH). Entretanto, a densidade de estocagem
 259 influenciou de forma significativa na ocorrência de gregarinas e enterite hemocítica,
 260 com índice determinístico de 83,74% e 65,72%, respectivamente. Não houve influência
 261 da densidade de estocagem, na frequência de camarões com clusters, assim como, não
 262 existiu influência da densidade de estocagem e da estação do ano na frequência de
 263 epicomensais, como pode ser observado, respectivamente, nas funções matemáticas
 264 apresentadas abaixo:

$$265 \quad FRC_{(gregarinas)} = -0,1125 + 0,0095DE \quad (F=30,89; P(F)=0,014; R^2= 83,74\%).$$

$$266 \quad FRC_{(EH)} = -0,0086 + 0,0044DE \quad (F=11,50; P(F)=0,0146; R^2= 65,72\%)$$

$$267 \quad FRC_{(Cluster)} = 0,4583 - 0,1333EA \quad (F=5,99; P(F)=0,049; R^2= 49,99\%)$$

268 Em que: F - estatístico “F” de Fisher, P(F) - Valor da probabilidade de F e R²-
 269 coeficiente de determinação.

270 As melhores taxas de sobrevivência foram registradas nas fazendas A (85,00% a
 271 87,00%) e D (90,00% a 81,00%), nas quais foram constatadas as mais baixas
 272 densidades de estocagem (A - 19 a 20 camarões m⁻², D - 21,60 a 29,20 camarões m⁻²).
 273 As piores sobrevivências foram registradas nas fazendas B (61,90% a 64,50%) e C

274 (61,82% a 66,24%), nas quais foram empregadas as maiores densidades de estocagem
275 (B - 88,93 a 91,80 camarões m⁻², C - 41,25 a 44,64 camarões m⁻²).

276 O bom desempenho produtivo observado nas fazendas A e D, demonstrado pelas
277 altas taxas de sobrevivência, pode ser atribuído a fatores como boas práticas de manejo,
278 aquisição de pós larvas certificadas, dentre outros. Por outro lado, nas fazendas B e C,
279 em que foram empregadas densidades mais elevadas e cultivos mais longos (B - 86 a
280 104 dias, C - 95 a 133 dias), foram registradas sobrevivências mais baixas e as maiores
281 frequências de endo e ectoparasitas, maiores quantidades de alterações morfológicas tais
282 como enterite hemocítica, brânquias e apêndices avermelhados indicando estresse. A
283 menor sobrevivência nessas duas fazendas pode ser atribuída à ocorrência simultânea
284 dos achados mencionados, somados a outros não analisados nessa pesquisa.

285 Um dos desafios da carcinicultura é o emprego de densidades adequadas ao bem
286 estar do camarão e que possam, ao mesmo tempo, tornar o empreendimento
287 economicamente viável, já que densidades elevadas facilitam a disseminação de agentes
288 infecciosos (Walker e Mohan, 2009). Igual atenção deve ser dada ao tempo de cultivo,
289 já que cultivo prolongado, principalmente na presença de patógenos, influi
290 negativamente na sobrevivência dos camarões (Silva et al., 2010).

291

292

Conclusões

- 293 1. Existe uma conjunção de fatores que interfere na saúde dos camarões cultivados
294 e que investigações epidemiológicas são necessárias para embasar o
295 monitoramento da sanidade.
- 296 2. A densidade de estocagem e o tempo de cultivo exercem influencia significativa
297 na frequência de gregarinas e enterite hemocítica.

298 3. A alta frequência de protozoários (externos e internos) e de clusters
299 bacterianos, assim como de alterações morfológicas nos camarões, contribuem
300 para a baixa taxa de sobrevivência.

301

302

Agradecimentos

303 Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela
304 concessão de bolsa de doutorado e a Fundação de Estudos e Projetos (FINEP)/Projeto:
305 Rede de Pesquisa de Carcinicultura do Nordeste (RECARCINE) pelo apoio financeiro.

306

307

Referências

308 AGUIRRE-GUZMÁN, G; SÁNCHEZ-MARTÍNEZ, J. G; PÉREZ-CASTAÑEDA, R;
309 PALACIOS-MONZÓN, A; TRUJILLO-RODRÍGUEZ, T; CRUZ-HERNÁNDEZ, N. I.
310 de la. Pathogenicity and Infection Route of *Vibrio parahaemolyticus* in American White
311 Shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v.41, p.
312 464-470. 2010.

313

314 BEHMER, O. A., TOLOSA, E. M. C; FREITAS NETO, A. G; RODRIGUES, C. J.
315 **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. Manole. Barueri. P. 331.
316 2003.

317

318 CHAVÉZ-SÁNCHEZ, M.C; HERNANDEZ-MARTÍNEZ, M; ABAD-ROSALES, S;
319 FAJER-ÁVILA, E; MONTOYA-RODRIGUEZ, L; ÁLVAREZ-TORRES, P. A Survey
320 of Infectious Diseases and Parasites of Penaeid Shrimp from the Gulf of Mexico.
321 **Journal of the World Aquaculture Society**, 33: 316-329. 2002.

322

- 323 CREMONTE, F; FIGUERAS, A; BURRESON, E.M. A histopathological survey of
324 some commercially exploited bivalve mollusks in northern Patagonia, Argentina.
325 **Aquaculture**, Amsterdam, 249:23-33. 2005.
- 326
- 327 DOURADO, J. **Vibriose em camarões marinhos (L.vannamei, Boone 1931)**
328 **cultivados no litoral de Pernambuco, Brasil**. 2009. 47p. Dissertação (Mestrado) -
329 Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.
- 330
- 331 FAJER-ÁVILA, E. J; MORALES-COVARRUBIAS, M.S; ABAD-ROSALES, S;
332 ROQUE, A; MEZA-BOJÓRQUEZ, P; HERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, C. Effectiveness
333 of oral Elancoban™ and Avimix-ST™ against Nematopsis (Apicomplexa:
334 Porosporidae) gametocysts infecting the shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**,
335 Amsterdam, 244:11-18. 2005.
- 336
- 337 FRÍAS-ESPERICUETA, M.G; ABAD-ROSALES, S; NEVAREZ-VELAZQUEZ,A.C;
338 OSUNA-LOPEZ,I; PAEZ-OUNA,F; LOZNO-OLVERA,R; VOLTOLINA,D.
339 Histological effects of a combination of heavy metals on Pacific white shrimp
340 *Litopenaeus vannamei* juveniles. **Aquatic Toxicology**, 89 (3):152-157.2008.
- 341
- 342 GOARANT, C; ANSQUER, D; HERLIN, J; DOMALAIN, D; IMBERT, F; DECKER,
343 S. “Summer Syndrome” in *Litopenaeus stylirostris* in New Caledonia: Pathology and
344 epidemiology of the etiological agent, *Vibrio nigripulchritudo*. **Aquaculture**,
345 Amsterdam, 253,105-113. 2006.
- 346

- 347 HUMASON, G.L. **Animal tissue techniques**. 3. ed. San Francisco: W.H. Freeman
348 and Co, 1972.
- 349
- 350 JIMÉNEZ, R; BARNIOL, L; MACHUCA M. *Nematopsis marinus* n. sp., a new septate
351 gregarine from cultured penaeoid shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone), in Ecuador.
352 **Aquaculture Research**, 33: 231-240. 2002.
- 353
- 354 LEANDER, B. S; LLOYD, S. A.J; MARSHALL, W; LANDERS, S. C. Phylogeny of
355 Marine Gregarines (Apicomplexa) - Pterospira, Lithocystis and Lankesteria - and the
356 Origin(s) of Coelomic Parasitism. **Protist**, 157: 45-60. 2006.
- 357
- 358 LIGHTNER, D.V. Biosecurity in shrimp farming: Pathogen Exclusion through use of
359 SPF stock and routine surveillance. **Journal of the World Aquaculture Society**, v.36,
360 p. 229-248. 2005.
- 361
- 362 LÓPEZ-TÉLLEZ, N.A; VIDAL-MARTÍNEZ, V.M; OVERSTREET, R.M. Seasonal
363 variation of ectosymbiotic ciliates on farmed and wild shrimps from coastal Yucatan,
364 Mexico. **Aquaculture**, Amsterdam, v.287, p. 271–277. 2009.
- 365
- 366 MENDES, E.S; BARRETO, A.C.G; GÓES L.M.N.B; GUIMARÃES, J.M;
367 NASCIMENTO, D.L; DINIZ FILHO, R.S; MENDES, P.P. Avaliação do exame a
368 fresco em camarões marinhos *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) associado à
369 contagem e identificação de *Vibrio* spp. em água de cultivo. **Medicina Veterinária**,
370 Recife, v.1, n.2, p.7-15. 2007.
- 371

- 372 MORALES-COVARRUBIAS, M.S. **Enfermedades del camarón: detección**
373 **mediante análisis en fresco e histopatología.** México: Trillas, 2010. 180p.
374
- 375 NUNES, A.J.P; MARTINS, P.C.C; GESTEIRA, T.C.V. Carcinicultura ameaçada.
376 **Panorama da Aqüicultura,** Rio de Janeiro 14 (83) 37–51. 2004
377
- 378 OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (OIE). **Diseases of Crustaceans.** In:
379 Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals. Paris, France, p 55-157. 2009.
380 Disponível em: http://www.oie.int/eng/normes/fmanual/A_summry.htm?e1d11. Acesso
381 em 18. nov.2010.
382
- 383 PÁEZ-OSUNA, F; GRACIA, A; FLORES-VERDUGO, F; LYLE-FRITCH, L.P;
384 ALONSO-RODRÍGUEZ, R; ROQUE, A; RUIZ-FERNÁNDEZ, A.C. Shrimp
385 aquaculture development and the environment in the Gulf of California ecoregion. **Mar.**
386 **Pollut. Bull.** 46, 806–815. 2003
387
- 388 SILVA, V.A; SANTOS, F.L; BEZERRA, S.S; PEDROSA, V.F; MENDES, P.P;
389 MENDES, E.S. A multi-season survey for infectious myonecrosis in farmed shrimp,
390 *Litopenaeus vannamei*, in Pernambuco, Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.
391 104, p. 161–165. 2010.
392
- 393 SUBASINGHE, R.P. Epidemiological approach to aquatic animal health management:
394 opportunities and challenges for developing countries to increase aquatic production
395 through aquaculture. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 67, p. 117–124. 2005
396

- 397 WALKER P.J., MOHAN C.V. Viral disease emergence in shrimp aquaculture:
398 origins, impacts and the effectiveness of health management strategies. **Reviews in**
399 **Aquaculture**. v.1 p.125–154. 2009.

400 Tabela 1. Frequência absoluta e relativa de camarões pequenos e médios com
 401 clusters, em função da estação do ano e seu peso, de fazendas comerciais de
 402 Pernambuco/Brasil.

Local (Fazenda)	Estação do ano		Peso (g)	
	Chuvosa	Estio	Pequenos ¹	Médios ²
A	11(18,33±9,79%) ^a	30(50,00±12,65%) ^b	12(20,00±10,12%) ^a	29(48,33±12,64%) ^b
B	22(36,67±12,19%) ^a	30(50,00±12,65%) ^a	25(41,67±12,47%) ^a	27(45,00±12,59%) ^a
C	24(40,00±12,40%) ^a	26(43,33±12,54%) ^a	19(31,67±11,77%) ^a	31(51,67±12,64%) ^b
D	21(35,00±12,07%) ^a	24(40,00±12,40%) ^a	18(30,00±11,60%) ^a	27(45,00±12,59%) ^a
Litoral Sul	33(27,50±7,99%) ^a	60(50,00±8,95%) ^b	37(30,83±8,26%) ^a	56(46,67±8,93%) ^b
(A+B)				
Litoral Norte	45(37,50±8,66%) ^a	50(41,67±8,82%) ^a	37(30,83±8,26%) ^a	58(48,33±8,94%) ^b
(C+D)				
Todas	78(32,50±5,93%) ^a	110(45,83±6,30%) ^b	74(30,83±5,84%) ^a	114(47,50±6,32%) ^b
A+B+C+D				

403 Letras diferentes, entre colunas da estação do ano ou peso, diferem significativamente
 404 as frequências ($P < 0,05$), utilizando a estatística χ^2 e ou o teste Exato de Fisher. Em
 405 que: 1- Camarões com peso e desvio padrão de $4,33 \pm 0,49$ g; 2- Camarões com peso e
 406 desvio padrão de $8,28 \pm 1,35$ g.

407 Tabela 2. Frequência absoluta e relativa de camarões pequenos e médios com
 408 epicomensais, em função da estação do ano e seu peso, de fazendas comerciais de
 409 Pernambuco/Brasil.

Local (Fazenda)	Estação do ano		Peso (g)	
	Chuvosa	Estio	Pequenos ¹	Médios ²
A	2(3,33±4,54%) ^a	6 (10,00±7,59%) ^a	4(6,67±6,31%) ^a	4(6,67±6,31%) ^a
B	6(10,00±7,59%) ^a	14(23,33±10,70%) ^a	5(8,33±6,99%) ^a	15(25,00±10,96%) ^b
C	14(23,33±10,70%) ^a	28(46,67±12,62%) ^b	26(43,33±12,54%) ^a	16(26,67±11,19%) ^a
D	6(10,00±7,59%) ^a	0(0,00±0,0%) ^b	3(5,00±5,51%) ^a	3(5,00±5,51%) ^a
Litoral Sul				
(A+B)	8(6,67±4,46%) ^a	20(16,67±6,67%) ^b	9(7,50±4,71%) ^a	19(15,83±6,53%) ^b
Litoral Norte				
(C+D)	20(16,67±6,67%) ^a	28(23,33±7,57%) ^a	29(24,17±7,66%) ^a	19(15,83±6,53%) ^a
Todas				
A+B+C+D	28(11,67±4,06%) ^a	48(20,00±5,06%) ^b	38(15,83±4,62%) ^a	38(15,83±4,62%) ^a

410 Letras diferentes, entre colunas da estação do ano ou peso, diferem significativamente
 411 as frequências ($P < 0,05$), utilizando a estatística χ^2 e ou o teste Exato de Fisher. Em
 412 que: 1- Camarões com peso e desvio padrão de $4,33 \pm 0,49$ g; 2- Camarões com peso e
 413 desvio padrão de $8,28 \pm 1,35$ g

414 Tabela 3. Frequência absoluta e relativa de camarões pequenos e médios com
 415 gregarinas, em função da estação do ano e seu peso, de fazendas comerciais de
 416 Pernambuco/Brasil.

Local (Fazenda)	Estação do ano		Peso (g)	
	Chuvosa	Estio	Pequenos ¹	Médios ²
A	6 (10,00±7,59%) ^a	11 (18,33±9,79%) ^a	11 (18,33±9,79%) ^a	6 (10,00±7,59%) ^a
B	42 (70,00±11,60%) ^a	46 (76,67±10,70%) ^a	39 (65,00±12,07%) ^a	49 (81,67±9,79%) ^a
C	22 (36,67±12,19%) ^a	30 (50,00±12,65%) ^a	21 (35,00±12,07%) ^a	31 (51,67±12,64%) ^a
D	0 (0,00±0,00%) ^a	0 (0,00±0,00%) ^a	0 (00,00±0,00%) ^a	0 (0,00±0,00%) ^a
Litoral Sul				
(A+B)	48 (40,00±8,77%) ^a	57 (47,50±8,93%) ^a	50 (41,67±8,82%) ^a	55 (45,83±8,92%) ^a
Litoral Norte				
(C+D)	22 (18,33±6,92%) ^a	30 (25,00±7,75%) ^a	21 (17,50±6,80%) ^a	31 (25,83±7,83%) ^a
Todas				
A+B+C+D	70 (29,17±5,75%) ^a	87 (36,25±6,08%) ^a	71 (29,58±5,77%) ^a	86 (35,83±6,07%) ^a

417 Letras diferentes, entre colunas da estação do ano ou peso, diferem significativamente
 418 as frequências ($P < 0,05$), utilizando a estatística χ^2 e ou o teste Exato de Fisher. Em
 419 que: 1- Camarões com peso e desvio padrão de $4,33 \pm 0,49$ g; 2- Camarões com peso e
 420 desvio padrão de $8,28 \pm 1,35$ g.

421 Tabela 4. Frequência absoluta e relativa de camarões pequenos e médios com Enterite
 422 hemocítica (EH), em função da estação do ano e seu peso, de fazendas comerciais de
 423 Pernambuco/Brasil.

Local (Fazenda)	Estação do ano		Peso (g)	
	Chuvosa	Estio	Pequenos ¹	Médios ²
A	3(5,00±5,51%) ^a	3(5,00±5,51%) ^a	5(8,33±6,99%) ^a	1(1,67±3,24%) ^a
B	24(40,00±12,40%) ^a	19(31,67±11,77%) ^a	14(23,33±10,70%) ^a	29(48,33±12,64%) ^b
C	16(26,67±11,19%) ^a	22(36,67±12,19%) ^a	18(30,00±11,60%) ^a	20(33,33±11,93%) ^a
D	0 (0,00±0,00%) ^a	4 (6,67±6,31%) ^a	4 (6,67±6,31%) ^a	0 (0,00±0,00%) ^a
Litoral Sul				
(A+B)	27(22,50±7,47%) ^a	22(18,33±6,92%) ^a	19(15,83±6,53%) ^a	30(25,00±7,75%) ^a
Litoral Norte				
(C+D)	16(13,33±6,08%) ^a	26(21,67±7,37%) ^a	22(18,33±6,92%) ^a	20(16,67±6,67%) ^a
Todas				
A+B+C+D	43(17,92±4,85%) ^a	48(20,00±5,06%) ^a	41(17,08±4,76%) ^a	50(20,83±5,14%) ^a

424 Letras diferentes, entre colunas da estação do ano ou peso, diferem significativamente
 425 as frequências ($P < 0,05$), utilizando a estatística χ^2 e ou o teste Exato de Fisher. Em
 426 que: 1- Camarões com peso e desvio padrão de $4,33 \pm 0,49$ g; 2- Camarões com peso e
 427 desvio padrão de $8,28 \pm 1,35$ g

428 **Instruções para Submissão de Trabalhos Na Revista Pesquisa Agropecuária**
429 **Brasileira (PAB)**

430

431 Os trabalhos enviados à PAB devem ser inéditos e não podem ter sido encaminhados a outro
432 periódico científico ou técnico. Dados publicados na forma de resumos, com mais de 250
433 palavras, não devem ser incluídos no trabalho.

434 A Comissão Editorial faz análise dos trabalhos antes de submetê-los à assessoria científica.
435 Nessa análise, consideram-se aspectos como: escopo; apresentação do artigo segundo as normas
436 da revista; formulação do objetivo de forma clara; clareza da redação; fundamentação teórica;
437 atualização da revisão da literatura; coerência e precisão da metodologia; resultados com
438 contribuição significativa; discussão dos fatos observados frente aos descritos na literatura;
439 qualidade das tabelas e figuras; originalidade e consistência das conclusões. Após a aplicação
440 desses critérios, se o número de trabalhos aprovados ultrapassa a capacidade mensal de
441 publicação, é aplicado o critério da relevância relativa, pelo qual são aprovados os trabalhos
442 cuja contribuição para o avanço do conhecimento científico é considerada mais significativa.
443 Esse critério só é aplicado aos trabalhos que atendem aos requisitos de qualidade para
444 publicação na revista, mas que, em razão do elevado número, não podem ser todos aprovados
445 para publicação. Os trabalhos rejeitados são devolvidos aos autores e os demais são submetidos
446 à análise de assessores científicos, especialistas da área técnica do artigo.

447 São considerados, para publicação, os seguintes tipos de trabalho: Artigos Científicos, Notas
448 Científicas e Artigos de Revisão, este último a convite do Editor.

449 Os trabalhos publicados na PAB são agrupados em áreas técnicas, cujas principais são:
450 Entomologia, Fisiologia Vegetal, Fitopatologia, Fitotecnia, Fruticultura, Genética,
451 Microbiologia, Nutrição Mineral, Solos e Zootecnia.

452

453 O texto deve ser digitado no editor de texto Word, em espaço duplo, fonte Times New Roman,
454 corpo 12, folha formato A4, margens de 2,5 cm, com páginas e linhas numeradas.

455 **Escopo e política editorial**

456

457 A revista Pesquisa Agropecuária Brasileira (PAB) é uma publicação mensal da Embrapa, que
458 edita e publica trabalhos técnico-científicos originais, em português, espanhol ou inglês,
459 resultantes de pesquisas de interesse agropecuário. A principal forma de contribuição é o Artigo,
460 mas a PAB também publica Notas Científicas e Revisões a convite do Editor.

461

462 **Análise dos artigos**

463

464 A Comissão Editorial faz a análise dos trabalhos antes de submetê-los à assessoria científica.
465 Nessa análise, consideram-se aspectos como escopo, apresentação do artigo segundo as normas
466 da revista, formulação do objetivo de forma clara, clareza da redação, fundamentação teórica,
467 atualização da revisão da literatura, coerência e precisão da metodologia, resultados com
468 contribuição significativa, discussão dos fatos observados em relação aos descritos na literatura,
469 qualidade das tabelas e figuras, originalidade e consistência das conclusões. Após a aplicação
470 desses critérios, se o número de trabalhos aprovados ultrapassa a capacidade mensal de
471 publicação, é aplicado o critério da relevância relativa, pelo qual são aprovados os trabalhos
472 cuja contribuição para o avanço do conhecimento científico é considerada mais significativa.
473 Esse critério é aplicado somente aos trabalhos que atendem aos requisitos de qualidade para
474 publicação na revista, mas que, em razão do elevado número, não podem ser todos aprovados
475 para publicação. Os trabalhos rejeitados são devolvidos aos autores e os demais são submetidos
476 à análise de assessores científicos, especialistas da área técnica do artigo.

477 **Forma e preparação de manuscritos**

478

479 - Os trabalhos enviados à PAB devem ser inéditos (não terem dados – tabelas e figuras –
480 publicadas parcial ou integralmente em nenhum outro veículo de divulgação técnico-científica,
481 como boletins institucionais, anais de eventos, comunicados técnicos, notas científicas etc.) e
482 não podem ter sido encaminhados simultaneamente a outro periódico científico ou técnico.
483 Dados publicados na forma de resumos, com mais de 250 palavras, não devem ser incluídos no
484 trabalho.

485 - São considerados, para publicação, os seguintes tipos de trabalho: Artigos Científicos, Notas
486 Científicas e Artigos de Revisão, este último a convite do Editor.

487 - Os trabalhos publicados na PAB são agrupados em áreas técnicas, cujas principais são:
488 Entomologia, Fisiologia Vegetal, Fitopatologia, Fitotecnia, Fruticultura, Genética,
489 Microbiologia, Nutrição Mineral, Solos e Zootecnia.

490 - O texto deve ser digitado no editor de texto Microsoft Word, em espaço duplo, fonte Times
491 New Roman, corpo 12, folha formato A4, com margens de 2,5 cm e com páginas e linhas
492 numeradas.

493

494 **Informações necessárias na submissão on-line de trabalhos**

495

496 No passo 1 da submissão (Início), em "comentários ao editor", informar a relevância e o aspecto
497 inédito do trabalho.

498 No passo 2 da submissão (Inclusão de metadados), em "resumo da biografia" de cada autor,
499 informar a formação e o grau acadêmico. Clicar em "incluir autor" para inserir todos os
500 coautores do trabalho, na ordem de autoria.

501 Ainda no passo 2, copiar e colar o título, resumo e termos para indexação (key words) do
502 trabalho nos respectivos campos do sistema. Depois, ir à parte superior da tela, no campo
503 "Idioma do formulário", e selecionar "English". Descer a tela (clicar na barra de rolagem) e
504 copiar e colar o "title", "abstract" e os "index terms" nos campos correspondentes. (Para dar
505 continuidade ao processo de submissão, é necessário que tanto o título, o resumo e os termos
506 para indexação quanto o title, o abstract e os index terms do manuscrito tenham sido
507 fornecidos.)

508

509 No passo 3 da submissão (Transferência do manuscrito), carregar o trabalho completo em
510 arquivo Microsoft Word 1997 a 2003.

511

512 No passo 4 da submissão (Transferência de documentos suplementares), carregar, no sistema
513 on-line da revista PAB, um arquivo Word com todas as cartas (mensagens) de concordância dos
514 coautores coladas conforme as explicações abaixo:

515

516 Colar um e-mail no arquivo word de cada coautor de concordância com o seguinte conteúdo:
517 "Eu, ..., concordo com o conteúdo do trabalho intitulado "....." e com a submissão para a
518 publicação na revista PAB.

519

520 **Como fazer:** Peça ao coautor que lhe envie um e-mail de concordância, encaminhe-o para o seu
521 próprio e-mail (assim gerará os dados da mensagem original: assunto, data, de e para), marque
522 todo o email e copie e depois cole no arquivo word. Assim, teremos todas as cartas de
523 concordâncias dos co-autores num mesmo arquivo.

524

525 **Organização do Artigo Científico**

526

527 - A ordenação do artigo deve ser feita da seguinte forma:

528 - Artigos em português - Título, autoria, endereços institucionais e eletrônicos, Resumo, Termos
529 para indexação, título em inglês, Abstract, Index terms, Introdução, Material e Métodos,
530 Resultados e Discussão, Conclusões, Agradecimentos, Referências, tabelas e figuras.

531 - Artigos em inglês - Título, autoria, endereços institucionais e eletrônicos, Abstract, Index

- 532 terms, título em português, Resumo, Termos para indexação, Introduction, Materials and
 533 Methods, Results and Discussion, Conclusions, Acknowledgements, References, tables, figures.
 534 - Artigos em espanhol - Título, autoria, endereços institucionais e eletrônicos, Resumen,
 535 Términos para indexación; título em inglês, Abstract, Index terms, Introducción, Materiales y
 536 Métodos, Resultados y Discusión, Conclusiones, Agradecimientos, Referencias, cuadros e
 537 figuras.
 538 - O título, o resumo e os termos para indexação devem ser vertidos fielmente para o inglês, no
 539 caso de artigos redigidos em português e espanhol, e para o português, no caso de artigos
 540 redigidos em inglês.
 541 - O artigo científico deve ter, no máximo, 20 páginas, incluindo-se as ilustrações (tabelas e
 542 figuras), que devem ser limitadas a seis, sempre que possível.

543

544 **Título**

- 545
- 546 - Deve representar o conteúdo e o objetivo do trabalho e ter no máximo 15 palavras, incluindo-
 547 se os artigos, as preposições e as conjunções.
 548 - Deve ser grafado em letras minúsculas, exceto a letra inicial, e em negrito.
 549 - Deve ser iniciado com palavras chaves e não com palavras como "efeito" ou "influência".
 550 - Não deve conter nome científico, exceto de espécies pouco conhecidas; neste caso, apresentar
 551 somente o nome binário.
 552 - Não deve conter subtítulo, abreviações, fórmulas e símbolos.
 553 - As palavras do título devem facilitar a recuperação do artigo por índices desenvolvidos por
 554 bases de dados que catalogam a literatura.

555

556 **Nomes dos autores**

- 557
- 558 - Grafar os nomes dos autores com letra inicial maiúscula, por extenso, separados por vírgula;
 559 os dois últimos são separados pela conjunção "e", "y" ou "and", no caso de artigo em português,
 560 espanhol ou em inglês, respectivamente.
 561 - O último sobrenome de cada autor deve ser seguido de um número em algarismo arábico, em
 562 forma de expoente, entre parênteses, correspondente à chamada de endereço do autor.

563

564 **Endereço dos autores**

- 565
- 566 - São apresentados abaixo dos nomes dos autores, o nome e o endereço postal completos da
 567 instituição e o endereço eletrônico dos autores, indicados pelo número em algarismo arábico,
 568 entre parênteses, em forma de expoente.
 569 - Devem ser agrupados pelo endereço da instituição.
 570 - Os endereços eletrônicos de autores da mesma instituição devem ser separados por vírgula.

571

572 **Resumo**

- 573 - O termo Resumo deve ser grafado em letras minúsculas, exceto a letra inicial, na margem
 574 esquerda, e separado do texto por travessão.
 575 - Deve conter, no máximo, 200 palavras, incluindo números, preposições, conjunções e artigos.
 576 - Deve ser elaborado em frases curtas e conter o objetivo, o material e os métodos, os resultados
 577 e a conclusão.
 578 - Não deve conter citações bibliográficas nem abreviaturas.
 579 - O final do texto deve conter a principal conclusão, com o verbo no presente do indicativo.

580

581 **Termos para indexação**

- 582 - A expressão Termos para indexação, seguida de dois-pontos, deve ser grafada em letras
 583 minúsculas, exceto a letra inicial.
 584 - Os termos devem ser separados por vírgula e iniciados com letra minúscula.
 585 - Devem ser no mínimo três e no máximo seis, considerando-se que um termo pode possuir duas
 586 ou mais palavras.

- 587 - Não devem conter palavras que compoñham o título.
588 - Devem conter o nome científico (só o nome binário) da espécie estudada.
589 - Devem, preferencialmente, ser termos contidos no [AGROVOC: Multilingual Agricultural](#)
590 [Thesaurus](#) ou no [Índice de Assuntos da base SciELO](#) .
591
592
593 **Introdução**
594 - A palavra Introdução deve ser centralizada e grafada com letras minúsculas, exceto a letra
595 inicial, e em negrito.
596 - Deve apresentar a justificativa para a realização do trabalho, situar a importância do problema
597 científico a ser solucionado e estabelecer sua relação com outros trabalhos publicados sobre o
598 assunto.
599 - O último parágrafo deve expressar o objetivo de forma coerente com o descrito no início do
600 Resumo.
601
602 **Material e Métodos**
603
604 - A expressão Material e Métodos deve ser centralizada e grafada em negrito; os termos
605 Material e Métodos devem ser grafados com letras minúsculas, exceto as letras iniciais.
606 - Deve ser organizado, de preferência, em ordem cronológica.
607 - Deve apresentar a descrição do local, a data e o delineamento do experimento, e indicar os
608 tratamentos, o número de repetições e o tamanho da unidade experimental.
609 - Deve conter a descrição detalhada dos tratamentos e variáveis.
610 - Deve-se evitar o uso de abreviações ou as siglas.
611 - Os materiais e os métodos devem ser descritos de modo que outro pesquisador possa repetir o
612 experimento.
613 - Devem ser evitados detalhes supérfluos e extensas descrições de técnicas de uso corrente.
614 - Deve conter informação sobre os métodos estatísticos e as transformações de dados.
615 - Deve-se evitar o uso de subtítulos; quando indispensáveis, grafá-los em negrito, com letras
616 minúsculas, exceto a letra inicial, na margem esquerda da página.
617
618 **Resultados e Discussão**
619 - A expressão Resultados e Discussão deve ser centralizada e grafada em negrito, com letras
620 minúsculas, exceto a letra inicial.
621 - Todos os dados apresentados em tabelas ou figuras devem ser discutidos.
622 - As tabelas e figuras são citadas seqüencialmente.
623 - Os dados das tabelas e figuras não devem ser repetidos no texto, mas discutidos em relação aos
624 apresentados por outros autores.
625 - Evitar o uso de nomes de variáveis e tratamentos abreviados.
626 - Dados não apresentados não podem ser discutidos.
627 - Não deve conter afirmações que não possam ser sustentadas pelos dados obtidos no próprio
628 trabalho ou por outros trabalhos citados.
629 - As chamadas às tabelas ou às figuras devem ser feitas no final da primeira oração do texto em
630 questão; se as demais sentenças do parágrafo referirem-se à mesma tabela ou figura, não é
631 necessária nova chamada.
632 - Não apresentar os mesmos dados em tabelas e em figuras.
633 - As novas descobertas devem ser confrontadas com o conhecimento anteriormente obtido.
634
635 **Agradecimentos**
636 - A palavra Agradecimentos deve ser centralizada e grafada em negrito, com letras minúsculas,
637 exceto a letra inicial.
638 - Devem ser breves e diretos, iniciando-se com "Ao, Aos, À ou Às" (pessoas ou instituições).
639 Devem conter o motivo do agradecimento.

640 **Referências**

- 641 - A palavra *Referências* deve ser centralizada e grafada em negrito, com letras minúsculas,
 642 exceto a letra inicial.
 643 - Devem ser de fontes atuais e de periódicos: pelo menos 70% das referências devem ser dos
 644 últimos 10 anos e 70% de artigos de periódicos.
 645 - Devem ser normalizadas de acordo com a NBR 6023 da ABNT, com as adaptações descritas a
 646 seguir.
 647 - Devem ser apresentadas em ordem alfabética dos nomes dos autores, separados por ponto-e-
 648 vírgula, sem numeração.
 649 - Devem apresentar os nomes de todos os autores da obra.
 650 - Devem conter os títulos das obras ou dos periódicos grafados em negrito.
 651 - Devem conter somente a obra consultada, no caso de citação de citação.
 652 - Todas as referências devem registrar uma data de publicação, mesmo que aproximada.
 653 - Devem ser trinta, no máximo.

654 **Exemplos:**

- 655 - **Artigos de Anais de Eventos** (aceitos apenas trabalhos completos)
 656 AHRENS, S. A fauna silvestre e o manejo sustentável de ecossistemas florestais. In:
 657 SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO SOBRE MANEJO FLORESTAL, 3., 2004, Santa Maria.
 658 **Anais**. Santa Maria: UFSM, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, 2004. p.153-
 659 162.

660 - **Artigos de periódicos**

- 661 SANTOS, M.A. dos; NICOLÁS, M.F.; HUNGRIA, M. Identificação de QTL associados à
 662 simbiose entre *Bradyrhizobium japonicum*, *B. elkanii* e soja. **Pesquisa Agropecuária**
 663 **Brasileira**, v.41, p.67-75, 2006.

665 - **Capítulos de livros**

- 666 AZEVEDO, D.M.P. de; NÓBREGA, L.B. da; LIMA, E.F.; BATISTA, F.A.S.; BELTRÃO,
 667 N.E. de M. Manejo cultural. In: AZEVEDO, D.M.P.; LIMA, E.F. (Ed.). **O agronegócio da**
 668 **mamona no Brasil**. Campina Grande: Embrapa Algodão; Brasília: Embrapa Informação
 669 Tecnológica, 2001. p.121-160.

670 - **Livros**

- 671 OTSUBO, A.A.; LORENZI, J.O. **Cultivo da mandioca na Região Centro-Sul do Brasil**.
 672 Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste; Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura,
 673 2004. 116p. (Embrapa Agropecuária Oeste. Sistemas de produção, 6).

674 - **Teses**

- 675 HAMADA, E. **Desenvolvimento fenológico do trigo (cultivar IAC 24 - Tucuruí),**
 676 **comportamento espectral e utilização de imagens NOAA-AVHRR**. 2000. 152p. Tese
 677 (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

678 - **Fontes eletrônicas**

- 679 EMBRAPA AGROPECUÁRIA OESTE. **Avaliação dos impactos econômicos, sociais e**
 680 **ambientais da pesquisa da Embrapa Agropecuária Oeste**: relatório do ano de 2003.
 681 Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2004. 97p. (Embrapa Agropecuária Oeste.
 682 Documentos, 66). Disponível em: . Acesso em: 18 abr. 2006.

683 **Citações**

- 684 - Não são aceitas citações de resumos, comunicação pessoal, documentos no prelo ou qualquer
 685 outra fonte, cujos dados não tenham sido publicados.
 686 - A autocitação deve ser evitada.
 687 - Devem ser normalizadas de acordo com a NBR 10520 da ABNT, com as adaptações descritas
 688 a seguir.
 689 - Redação das citações dentro de parênteses
 690 - Citação com um autor: sobrenome grafado com a primeira letra maiúscula, seguido de vírgula
 691 e ano de publicação.
 692 - Citação com dois autores: sobrenomes grafados com a primeira letra maiúscula, separados
 693 pelo "e" comercial (&), seguidos de vírgula e ano de publicação.
 694 - Citação com mais de dois autores: sobrenome do primeiro autor grafado com a primeira letra

- 695 maiúscula, seguido da expressão et al., em fonte normal, vírgula e ano de publicação.
 696 - Citação de mais de uma obra: deve obedecer à ordem cronológica e em seguida à ordem
 697 alfabética dos autores.
 698 - Citação de mais de uma obra dos mesmos autores: os nomes destes não devem ser repetidos;
 699 colocar os anos de publicação separados por vírgula.
 700 - Citação de citação: sobrenome do autor e ano de publicação do documento original, seguido da
 701 expressão "citado por" e da citação da obra consultada.
 702 - Deve ser evitada a citação de citação, pois há risco de erro de interpretação; no caso de uso de
 703 citação de citação, somente a obra consultada deve constar da lista de referências.
 704 - Redação das citações fora de parênteses
 705 - Citações com os nomes dos autores incluídos na sentença: seguem as orientações anteriores,
 706 com os anos de publicação entre parênteses; são separadas por vírgula.

707

708 **Fórmulas, expressões e equações matemáticas**

709

- 710 - Devem ser iniciadas à margem esquerda da página e apresentar tamanho padronizado da fonte
 711 Times New Roman.
 712 - Não devem apresentar letras em itálico ou negrito, à exceção de símbolos escritos
 713 convencionalmente em itálico.

714

715 **Tabelas**

716

- 717 - As tabelas devem ser numeradas seqüencialmente, com algarismo arábico, e apresentadas em
 718 folhas separadas, no final do texto, após as referências.
 719 - Devem ser auto-explicativas.
 720 - Seus elementos essenciais são: título, cabeçalho, corpo (colunas e linhas) e coluna indicadora
 721 dos tratamentos ou das variáveis.
 722 - Os elementos complementares são: notas-de-rodapé e fontes bibliográficas.
 723 - O título, com ponto no final, deve ser precedido da palavra Tabela, em negrito; deve ser claro,
 724 conciso e completo; deve incluir o nome (vulgar ou científico) da espécie e das variáveis
 725 dependentes.
 726 - No cabeçalho, os nomes das variáveis que representam o conteúdo de cada coluna devem ser
 727 grafados por extenso; se isso não for possível, explicar o significado das abreviaturas no título
 728 ou nas notas-de-rodapé.
 729 - Todas as unidades de medida devem ser apresentadas segundo o Sistema Internacional de
 730 Unidades.
 731 - Nas colunas de dados, os valores numéricos devem ser alinhados pelo último algarismo.
 732 - Nenhuma célula (cruzamento de linha com coluna) deve ficar vazia no corpo da tabela; dados
 733 não apresentados devem ser representados por hífen, com uma nota-de-rodapé explicativa.
 734 - Na comparação de médias de tratamentos são utilizadas, no corpo da tabela, na coluna ou na
 735 linha, à direita do dado, letras minúsculas ou maiúsculas, com a indicação em nota-de-rodapé do
 736 teste utilizado e a probabilidade.
 737 - Devem ser usados fios horizontais para separar o cabeçalho do título, e do corpo; usá-los ainda
 738 na base da tabela, para separar o conteúdo dos elementos complementares. Fios horizontais
 739 adicionais podem ser usados dentro do cabeçalho e do corpo; não usar fios verticais.
 740 - As tabelas devem ser editadas em arquivo Word, usando os recursos do menu Tabela; não
 741 fazer espaçamento utilizando a barra de espaço do teclado, mas o recurso recuo do menu
 742 Formatar Parágrafo.
 743 - Notas de rodapé das tabelas
 744 - Notas de fonte: indicam a origem dos dados que constam da tabela; as fontes devem constar
 745 nas referências.
 746 - Notas de chamada: são informações de caráter específico sobre partes da tabela, para
 747 conceituar dados. São indicadas em algarismo arábico, na forma de expoente, entre parênteses, à
 748 direita da palavra ou do número, no título, no cabeçalho, no corpo ou na coluna indicadora. São
 749 apresentadas de forma contínua, sem mudança de linha, separadas por ponto.

750 - Para indicação de significância estatística, são utilizadas, no corpo da tabela, na forma de
751 expoente, à direita do dado, as chamadas ns (não-significativo); * e ** (significativo a 5 e 1% de
752 probabilidade, respectivamente).

753

754 **Figuras**

755

756 - São consideradas figuras: gráficos, desenhos, mapas e fotografias usados para ilustrar o texto.

757 - Só devem acompanhar o texto quando forem absolutamente necessárias à documentação dos
758 fatos descritos.

759 - O título da figura, sem negrito, deve ser precedido da palavra Figura, do número em algarismo
760 arábico, e do ponto, em negrito.

761 - Devem ser auto-explicativas.

762 - A legenda (chave das convenções adotadas) deve ser incluída no corpo da figura, no título, ou
763 entre a figura e o título.

764 - Nos gráficos, as designações das variáveis dos eixos X e Y devem ter iniciais maiúsculas, e
765 devem ser seguidas das unidades entre parênteses.

766 - Figuras não-originais devem conter, após o título, a fonte de onde foram extraídas; as fontes
767 devem ser referenciadas.

768 - O crédito para o autor de fotografias é obrigatório, como também é obrigatório o crédito para o
769 autor de desenhos e gráficos que tenham exigido ação criativa em sua elaboração.

770 - As unidades, a fonte (Times New Roman) e o corpo das letras em todas as figuras devem ser
771 padronizados.

772 - Os pontos das curvas devem ser representados por marcadores contrastantes, como: círculo,
773 quadrado, triângulo ou losango (cheios ou vazios).

774 - Os números que representam as grandezas e respectivas marcas devem ficar fora do quadrante.

775 - As curvas devem ser identificadas na própria figura, evitando o excesso de informações que
776 comprometa o entendimento do gráfico.

777 - Devem ser elaboradas de forma a apresentar qualidade necessária à boa reprodução gráfica e
778 medir 8,5 ou 17,5 cm de largura.

779 - Devem ser gravadas nos programas Word, Excel ou Corel Draw, para possibilitar a edição em
780 possíveis correções.

781 - Usar fios com, no mínimo, 3/4 ponto de espessura.

782 - No caso de gráfico de barras e colunas, usar escala de cinza (exemplo: 0, 25, 50, 75 e 100%,
783 para cinco variáveis).

784 - Não usar negrito nas figuras.

785 - As figuras na forma de fotografias devem ter resolução de, no mínimo, 300 dpi e ser gravadas
786 em arquivos extensão TIF, separados do arquivo do texto.

787 - Evitar usar cores nas figuras; as fotografias, porém, podem ser coloridas.

788

789 **Notas Científicas**

790

791 - Notas científicas são breves comunicações, cuja publicação imediata é justificada, por se tratar
792 de fato inédito de importância, mas com volume insuficiente para constituir um artigo científico
793 completo.

794 - A ordenação da Nota Científica deve ser feita da seguinte forma: título, autoria (com as
795 chamadas para endereço dos autores), Resumo, Termos para indexação, título em inglês,
796 Abstract, Index terms, texto propriamente dito (incluindo introdução, material e métodos,
797 resultados e discussão, e conclusão, sem divisão), Referências, tabelas e figuras.

798 - As normas de apresentação da Nota Científica são as mesmas do Artigo Científico, exceto nos
799 seguintes casos:

800 - Resumo com 100 palavras, no máximo.

801 - Deve ter apenas oito páginas, incluindo-se tabelas e figuras.

802 - Deve apresentar, no máximo, 15 referências e duas ilustrações (tabelas e figuras).

803