



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS PESQUEIROS E AQUICULTURA

**AVALIAÇÃO DO USO DE *Crassostrea sp.* COMO BIOINDICADOR DO VÍRUS  
DA MIONECROSE INFECCIOSA EM ESTUÁRIOS DE FAZENDAS DE  
ENGORDA DE *Litopenaeus vannamei* EM PERNAMBUCO**

**Scarlatt Paloma Alves da Silva**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Aquicultura da Universidade Federal Rural de Pernambuco como exigência para obtenção de título de Mestre.

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> SUZIANNY MARIA  
BEZERRA CABRAL DA SILVA**

Orientadora

**Prof. Dr. LUÍS OTÁVIO BRITO DA  
SILVA**

Coorientador

Recife,  
Fevereiro/2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal Rural de Pernambuco  
Sistema Integrado de Bibliotecas  
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- S586aa Silva, Scarlatt Paloma Alves da  
AVALIAÇÃO DO USO DE Crassostrea sp. COMO BIOINDICADOR DO VÍRUS DA MIONECROSE  
INFECCIOSA EM ESTUÁRIOS DE FAZENDAS DE ENGORDA DE Litopenaeus vannamei EM PERNAMBUCO /  
Scarlatt Paloma Alves da Silva. - 2022.  
32 f. : il.
- Orientadora: Suzianny Maria Bezerra Cabral da Silva.  
Coorientador: Luis Otavio Brito da Silva.  
Inclui referências.
- Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Recursos  
Pesqueiros e Aquicultura, Recife, 2022.
1. IMNV. 2. Crassostrea sp.. 3. Bivalve. 4. Sentinela. 5. Bioindicador. I. Silva, Suzianny Maria Bezerra Cabral da,  
orient. II. Silva, Luis Otavio Brito da, coorient. III. Título

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS PESQUEIROS E AQUICULTURA

AVALIAÇÃO DO USO DE *Crassostrea sp.* COMO BIOINDICADOR DO VÍRUS DA  
MIONECROSE INFECCIOSA EM ESTUÁRIOS DE FAZENDAS DE ENGORDA  
DE *Litopenaeus vannamei* EM PERNAMBUCO

**Scarlatt Paloma Alves da Silva**

Dissertação julgada adequada para obtenção  
do título de mestre em Recursos Pesqueiros  
e Aquicultura. Defendida e aprovada em  
25/02/2022 pela seguinte Banca  
Examinadora.

---

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> SUZIANNY MARIA BEZERRA CABRAL DA SILVA** (Orientadora)

Departamento de Pesca e Aquicultura/Universidade Federal Rural de Pernambuco

---

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> GELCIRENE DE ALBUQUERQUE COSTA** (Membro externo)

Departamento de Pesca e Aquicultura/Universidade Federal Rural de Pernambuco

---

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> JULIANA FERREIRA DOS SANTOS** (Membro interno)

Departamento de Pesca e Aquicultura/Universidade Federal Rural de Pernambuco

## **Dedicatória**

Dedico esta dissertação a pessoa mais importante da minha vida, Djanira, minha Mãe. Pela dedicação, paciência, por todo apoio e amor incondicionais, e por sempre acreditar em mim e nos meus sonhos.

## **Agradecimentos**

Primeiramente a Deus, pelo dom da vida e saúde para alcançar meus objetivos.

À UFRPE, pela estrutura, apoio e oportunidade de mais essa formação acadêmica.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa durante o curso.

À Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup> Suzianny Maria B. C. da Silva pelos ensinamentos, orientação, paciência, confiança em mim depositada e, sobretudo, pela amizade.

Ao Prof. Dr. Luís Otávio B. da Silva, pela coorientação e ensinamentos para o desenvolvimento do trabalho.

À Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup> Maria Raquel M. Coimbra, por conceder o uso do espaço e equipamentos do Laboratório de Genética Aplicada (LAGA) sempre que necessário.

Ao Prof. Dr. Fernando Leandro dos Santos, pelas contribuições nas análises histológicas.

À banca avaliadora, pela disponibilidade e contribuições ao meu trabalho.

Aos Professores, técnico-administrativos e demais funcionários do Departamento de Pesca e Aquicultura, por todo aprendizado e colaboração ao longo dos anos.

À minha família, pelo apoio, força e incentivo para a realização deste trabalho.

Ao meu amigo, companheiro de vida e pesquisa, pescador, auxiliar de laboratório e braço direito no desenvolvimento prático e logístico do trabalho, Gênison Carneiro.

À equipe e colegas do Laboratório de Sanidade de Animais Aquáticos (LASAq), por toda ajuda, aprendizado e boa convivência durante todo período.

A todos que de alguma maneira contribuíram de forma positiva ao longo dessa jornada, meu muito obrigado.

## Resumo

A Mionecrose Infecciosa é uma doença causada pelo Vírus da Mionecrose Infecciosa (*IMNV*), e tem como característica principal a necrose do músculo esquelético e mortalidades acumulativas de 70% ao longo do ciclo do *Litopenaeus vannamei*. Assim, visando o impedimento de surtos e detecção de infecções subclínicas de *IMNV* para o *L. vannamei*, uma ação que pode ser adotada é o desenvolvimento de plano de monitoramento do vírus no ambiente, através do uso de organismos sentinelas. Entretanto, até o presente momento não existem protocolos que apliquem estes organismos, como é o caso dos bivalves, para o monitoramento do *IMNV*. Por este motivo, o objetivo desse trabalho é avaliar o uso de ostras selvagens (*Crassostrea sp.*) como sentinelas/bioindicadores para detecção de *IMNV* em áreas próximas a unidades produtoras de *L. vannamei* localizadas nos estuários dos rios Botafogo e dos Passos, ambos situados em Pernambuco. As coletas dos espécimes foram realizadas durante o verão e o inverno, nos litorais Norte e Sul do estado. Cada litoral teve 3 pontos de coleta, e cada ponto teve um total de 25 animais amostrados, totalizando assim 75 animais por litoral e 150 por estação do ano. Estes animais foram avaliados para a presença do *IMNV* através de PCR em tempo real e análise histopatológica. Para análise estatística foram utilizados os testes não paramétricos U de Mann-Whitney e o de Kruskal-Wallis, seguido pelo post-hoc de Dunn. Não foram verificadas diferenças estatísticas no percentual de *Crassostrea sp.* infectadas por *IMNV* por local de coleta e estação do ano, com detecção positiva de animais em ambos os litorais e estações analisadas. Quanto à carga viral, os valores médios determinados no litoral norte não diferiram estatisticamente no verão, com maior carga viral média ( $1,47 \times 10^4$  cópias virais de *IMNV*/μl de RNA total) no ponto A, para o inverno. No litoral sul, para o verão, o menor valor médio de carga viral foi encontrado no ponto C, com  $5,22 \times 10^3$  cópias virais de *IMNV*/μl de RNA total. Por outro lado, durante o inverno, não foram detectadas diferenças nas cargas virais. Não foram encontradas lesões histopatológicas que sugerissem a infecção das ostras por *IMNV*. Conclui-se que as ostras *Crassostrea sp.* selvagens, podem ser usadas de forma eficiente como bioindicador de *IMNV* para monitoramento deste patógeno em estuários de unidades produtoras de camarões *L. vannamei*, sem a necessidade de coleta de camarões nas fazendas, sendo, portanto, organismos candidatos ao desenvolvimento e implementação de programas de vigilância sanitária de animais aquáticos.

**Palavras-chave:** *IMNV*. *Crassostrea sp.*. Bivalve. Sentinela. Bioindicador.

## **Abstract**

Infectious Myonecrosis is a disease caused by the Infectious Myonecrosis Virus (*IMNV*), and its main characteristic is skeletal muscle necrosis and cumulative mortality of 70% throughout the *Litopenaeus vannamei* cycle. Thus, aiming at preventing outbreaks and detecting subclinical infections of *IMNV* for *L. vannamei*, an action that can be adopted is the development of a monitoring plan for the virus in the environment, through the use of sentinel organisms. However, to date, there are no protocols that apply these organisms, such as bivalves, to monitor *IMNV*. For this reason, the objective of this work is to evaluate the use of wild oysters (*Crassostrea sp.*) as sentinels/bioindicators for the detection of *IMNV* in areas close to *L. vannamei* producing units located in the estuaries of the Botafogo and Passos rivers, both located in Pernambuco. The collections of the specimens were carried out during the summer and winter, in the North and South coasts of the state. Each coast had 3 collection points, and each point had a total of 25 animals sampled, thus totaling 75 animals per coast and 150 per season of the year. These animals were evaluated for the presence of *IMNV* through real-time PCR and histopathological analysis. For statistical analysis, the nonparametric Mann-Whitney U and Kruskal-Wallis tests were used, followed by Dunn's post-hoc test. There were no statistical differences in the percentage of *Crassostrea sp.* infected by *IMNV* by collection site and season of the year, with positive detection of animals on both coasts and stations analyzed. As for viral load, the mean values determined on the north coast did not differ statistically in the summer, with the highest mean viral load ( $1.47 \times 10^4$  viral copies of *IMNV*/µl of total RNA) at point A, for the winter. On the south coast, for the summer, the lowest mean value of viral load was found at point C, with  $5.22 \times 10^3$  viral copies of *IMNV*/µl of total RNA. On the other hand, during winter, no differences in viral loads were detected. No histopathological lesions were found to suggest infection of oysters by *IMNV*. It is concluded that the oysters *Crassostrea sp.* wild species, can be efficiently used as a bioindicator of *IMNV* for monitoring this pathogen in estuaries of *L. vannamei* shrimp production units, without the need to collect shrimp on farms, being, therefore, candidate organisms for the development and implementation of programs of sanitary surveillance of aquatic animals.

**Key words:** *IMNV*. *Crassostrea sp.*. Bivalve. Sentinel. Bioindicator.

**Lista de figuras**

	Página
Figura 1 - Distribuição geográfica dos locais de coleta no Litoral Sul de PE	16
Figura 2 – Distribuição geográfica dos locais de coleta no Litoral Norte de PE	17
Figura 3 – Curvas de dissociação de amostras positivas (A) e negativas (B) de <i>Crassostrea sp.</i> para IMNV	20



**Lista de tabelas**

	Página
Tabela 1 – Percentual de <i>Crassostrea sp.</i> infectadas por IMNV por local de coleta nas diferentes estações	21
Tabela 2 – Carga média viral de IMNV (número de cópias/ $\mu$ l de RNA total) dos pontos de coleta nas estações de Verão e Inverno para cada Litoral	21

**Sumário**

	Página
Dedicatória	3
Agradecimentos	4
Resumo	5
Abstract	6
Lista de figuras	7
Lista de tabelas	8
1 – Introdução	10
2 – Artigo	13
3 – Considerações finais	29
4 – Referências	30

## 1 – Introdução

### 1.1 – Contextualização da pesquisa

A aquicultura atingiu em 2018 um recorde histórico, produzindo 114,5 milhões de toneladas de organismos aquáticos, transformando-se no setor de produção de alimento que mais cresce no cenário mundial (FAO, 2020). No Brasil, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE (2020), a aquicultura nacional teve uma produção de 529,6 mil toneladas em 2019, com um crescimento de 1,7% em relação ao ano anterior, enquanto a carcinicultura marinha aumentou 18,8%, produzindo 54,3 mil toneladas de *Litopenaeus vannamei*, sendo a região Nordeste mais uma vez, a principal responsável pelo crescimento da produção nacional, mostrando pelo segundo ano consecutivo, sua recuperação de produtividade após os efeitos negativos causados por doenças virais nos cultivos (IBGE, 2020).

Um dos principais gargalos atrelados ao desempenho da carcinicultura marinha ainda são as questões relacionadas à sanidade e biossegurança, visto que, apesar da recuperação da produtividade nos últimos anos, surtos de doenças ainda atormentam os produtores de camarão (VAZQUEZ-BOUCARD et al., 2012). Estima-se que 80% das perdas causadas por enfermidades na carcinicultura marinha, foram atribuídas a vírus e bactérias, com os vírus tendo aproximadamente quatro vezes mais impacto negativo na produção do que as bactérias (FLEGEL, 2012), o que significa dizer, em termos monetários, que desde o surgimento dos principais vírus de notificação obrigatória à Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) que acometem a produção de peneídeos, tem-se um montante de perdas de aproximadamente US\$ 13,7 bilhões de dólares (LIGHTNER et al., 2012).

Atualmente, as doenças de etiologia viral e bacteriana de notificação obrigatória à OIE são: Doença da Cabeça Amarela (*Infection with Yellowhead Virus*), Necrose Infeciosa Hipodermal e Hematopoiética (*Infectious Hypodermal and Haematopoietic Necrosis*), Síndrome de Taura (*Taura Syndrome*), Doença da Cauda Branca (*White Tail Disease*), Síndrome da Mancha Branca (*White Spot Disease*), Mionecrose Infeciosa (*Infectious Myonecrosis*), Necrose Hepatopancreática Aguda (*Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease*) e Hepatopancreatite Necrosante (*Necrotising Hepatopancreatitis*), uma vez que essas doenças são capazes de provocar perdas recorrentes no setor produtivo, e podem até mesmo, dizimar os animais de uma fazenda ou região quando infectados (OIE, 2021).

Dentre essas enfermidades, a Mionecrose Infecciosa (*IMN*) foi pela primeira vez relatada em 2002, em fazendas de engorda de *L. vannamei* no Brasil (NUNES et al., 2004), onde permaneceu confinada até 2006, ano em que foram registrados novos casos desta doença no sudeste da Ásia (Indonésia, Ilhas de Java, Sumatra, Bangka, Bornéu, Sulawesi, Bali, Lombok e Sumbawa) (SENAPIN et al., 2007), Índia em 2016 (SAHUL HAMEED et al., 2017) e, Malásia, em 2018 (TANG et al., 2019).

A *IMN* causada pelo Vírus da Mionecrose Infecciosa (*IMNV*), um vírus de RNA de fita dupla (dsRNA) pertencente à família Totiviridae (LOY et al., 2015; NAIM et al., 2015), acomete populações juvenis e subadultas de *L. vannamei* em qualquer estágio de crescimento, em que os animais acometidos apresentam áreas necróticas brancas (focais a extensas no músculo esquelético), principalmente nos segmentos abdominais e leque caudal, que ficam avermelhados após a morte, podendo atingir uma mortalidade de 70% no final do ciclo da cultura (NUNES et al., 2004). O *IMNV* pode ser transmitido tanto horizontalmente via canibalismo através da ingestão de tecidos infectados e vetor (*Artemia franciscana*) (SILVA et al., 2015), quanto verticalmente, com detecção do vírus em óvulos e ovários de fêmeas infectadas, sugerindo que a transmissão materna está envolvida (SILVA et al., 2016).

Como camarões possuem um sistema imunológico inato contra infecções virais, que envolvem apenas respostas fisiológicas inespecíficas com ausência de memória imune, as estratégias de gerenciamento para impedimento de surtos de *IMN* ou detecção de infecções subclínicas de *IMNV* em populações de camarão cultivado, particularmente *L. vannamei*, tem se pautado na: quarentena e controle de movimento de animais; investigação de rastreamento; vigilância; uso de pós-larva livre de *IMNV*; uso de camarão resistente a doenças; uso de probióticos; desinfecção de produtos e ovos/náuplios; despesca de emergência; destruição de camarões infectados; descarte de hospedeiros doentes; descontaminação de fazendas contaminadas; controle de vetores e; ativação do mecanismo de RNA de interferência (RNAi) desencadeada por dsRNA de sequência específica (TANG et al., 2019).

Além destas estratégias, segundo Tang et al. (2019), embora protocolos para o uso de organismos sentinelas, como bivalves, em instalações de *L. vannamei* não tenham sido desenvolvidos para o *IMNV*, esta poderia ser exitosa, pois mesmo que os bivalves não sejam infectados por este vírus, como resultado de sua alimentação por filtração, esses organismos poderiam atuar como vetores mecânicos e a presença do vírus, poderia ser

detectada por Transcrição Reversa seguida da Reação em Cadeia pela Polimerase em Tempo Real (RT-qPCR) para monitoramento deste patógeno no sistema. Esta técnica é atualmente o método mais sensível e reprodutível de detecção e quantificação de vírus do camarão (LIU et al., 2013) e, baseia-se, na ação da enzima Taq DNA polimerase atrelada ao uso de corantes (*SYBR Green*) ou sondas marcadas (*Taqman*), no qual os produtos gerados são quantificados por meio da emissão de fluorescência (WITTEWER et al., 1997).

Estudos recentes realizados no México têm demonstrado o uso de organismos sentinelas, como as ostras da espécie *Crassostrea gigas*, para o monitoramento da presença do Vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV) em canais de abastecimento de água de fazendas produtoras de camarão *L. vannamei* com histórico de surtos desta enfermidade viral (VAZQUEZ-BOUCARD et al., 2010; VAZQUEZ-BOUCARD et al., 2012). Segundo Vazquez-Boucard et al. (2012), através da triagem de tecido das brânquias e glândula digestiva das ostras por nested-PCR, foi possível a detecção do vírus, 16 dias antes da ocorrência de surto nos camarões cultivados, devido a capacidade das ostras em capturar e acumular partículas virais suspensas na água dos canais de abastecimento, abrindo novas possibilidades de estudos com espécies sentinelas para o monitoramento da presença de *IMNV* em estuários de áreas de produção de *L. vannamei*.

## 1.2 – Objetivo geral

Avaliar o uso de ostras (*Crassostrea sp.*) como sentinelas para detecção de *IMNV* em estuários de unidades produtoras de camarões *L. vannamei* localizadas no estuário do rio Botafogo (norte do Canal de Santa Cruz, Itamaracá, Litoral Norte) e no Rio dos Passos (Sirinhaém, Litoral Sul), ambas situadas em Pernambuco.

## 1.3 – Objetivos específicos

- Validar o uso de populações selvagens de *Crassostrea sp.* como organismo bioindicador de *IMNV* em regiões próximas a fazendas produtoras de camarão marinho;
- Monitorar a carga viral de *IMNV* em ostras coletadas nas águas estuarinas que abastecem os viveiros de criação de camarões localizados no estuário do rio Botafogo (norte do Canal de Santa Cruz, Itamaracá, Litoral Norte) e no Rio dos Passos (Sirinhaém, Litoral Sul), ambos situados em Pernambuco.

## 2 – Artigo

Os resultados obtidos no desenvolvimento desta dissertação serão apresentados no artigo científico intitulado “**Uso de populações selvagens de *Crassostrea sp.* como bioindicador do Vírus da Mionecrose Infecciosa em estuários de fazendas de engorda de *Litopenaeus vannamei* em Pernambuco, Brasil**”, devendo este, ser submetido à revista Journal of Invertebrate Pathology.

**Uso de populações selvagens de *Crassostrea sp.* como bioindicador do Vírus da Mionecrose Infecciosa em estuários de fazendas de engorda de *Litopenaeus vannamei* em Pernambuco, Brasil**

2.1 – Introdução

Atualmente, o camarão *Litopenaeus vannamei* é a segunda commodity do comércio mundial de pescado, com aproximadamente 15% dos produtos aquícolas comercializados internacionalmente e 52,9% do volume total de crustáceos cultivados em 2018 (FAO, 2020). No cenário brasileiro, o cultivo de animais aquáticos totalizou 551,9 mil toneladas em 2020 e, a carcinicultura marinha, com 99,6% concentrada na região nordeste, produziu um total de 63,2 mil toneladas de *L. vannamei*, resultando em um aumento de 14,1% em relação a 2019, demonstrando assim, uma recuperação continuada após efeitos negativos causados por doença de etiologia viral em fazendas de camarão marinho (IBGE, 2021).

Entretanto, como outras espécies de camarões peneídeos cultivados, o *L. vannamei* é susceptível a inúmeras doenças infecciosas que podem impactar a produção aquícola (NAIM et al., 2014), dentre as quais, a Mionecrose Infecciosa (*Infectious Myonecrosis - IMN*) tem se destacado por gerar um impacto econômico de mais de US\$ 440 milhões de dólares aos carcinicultores brasileiros decorrentes de surtos no final de 2005, com perdas acumuladas no Brasil e na Indonésia, de 2002 a 2011, de mais de US\$ 1 bilhão de dólares (LIGHTNER et al., 2012).

A Mionecrose Infecciosa é uma enfermidade causada pelo Vírus da Mionecrose Infecciosa (*IMNV*), um vírus não envelopado que contém um genoma de RNA de fita dupla (dsRNA) e pertence à família Totiviridae (TANG et al., 2008). A doença caracteriza-se por necrose do músculo esquelético, mais marcadamente no abdômen distal e cauda, com mortalidade ao longo do ciclo próxima a 70% (NUNES et al., 2004).

Como estratégias de gestão para impedimento de surtos de *IMN* ou detecção de infecções subclínicas de *IMNV* aplicadas a populações cultivadas de *L. vannamei*, tem-se destacado: quarentena e controle de movimento de animais; investigação de rastreamento; vigilância; uso de pós-larva livre de patógenos; uso de camarão resistente a doenças; uso de probióticos; desinfecção de produtos e ovos/náuplios; despesca de emergência; destruição de camarões infectados; descarte de hospedeiros doentes; descontaminação de fazendas contaminadas; controle de vetores e; ativação do mecanismo de RNA de

interferência (RNAi) desencadeada por dsRNA de sequência específica (TANG et al., 2019).

Além disso, outra prática de gestão que pode reduzir a incidência e gravidade dos surtos de *IMNV*, é a adoção de um plano de manejo que impeça a transmissão de *IMNV* para populações selvagens de camarão ou outros organismos aquáticos e viabilize o monitoramento do *IMNV* no ambiente (TANG et al., 2019). Para tal, protocolos que apliquem organismos sentinelas em áreas de cultivo de *L. vannamei* têm sido fortemente indicados, embora, até o presente momento, não existam estudos destinados ao uso destes organismos, como é o caso de bivalves para o *IMNV*. Os bivalves, embora não sejam infectados por este vírus, podem atuar como vetores mecânicos devido a sua alimentação por filtração, fazendo com que a presença do patógeno em questão, possa ser detectada e quantificada através de Transcrição Reversa seguida da Reação em Cadeia pela Polimerase em Tempo Real (RT-qPCR) (TANG et al., 2019).

Vazquez-Boucard et al. (2010) e Vazquez-Boucard et al. (2012) têm demonstrado o uso de organismos sentinelas, com ostras da espécie *Crassostrea gigas*, para o monitoramento da presença do Vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV) em canais de abastecimento de água de fazendas produtoras de camarão *L. vannamei* com histórico de surtos desta enfermidade viral. A partir da triagem de tecido branquial e da glândula digestiva das ostras por nested-PCR, estes autores conseguiram detectar a presença do WSSV, 16 dias antes da ocorrência de surto nos camarões cultivados, devido a capacidade das ostras de capturar e acumular partículas virais suspensas na água dos canais de abastecimento, abrindo novas possibilidades de estudos com espécies sentinelas para o monitoramento da presença de *IMNV* em estuários de áreas de produção de *L. vannamei*. Assim, esse trabalho tem por objetivo avaliar o uso de populações selvagens de ostras (*Crassostrea sp.*) como organismos sentinelas, para detecção de *IMNV* em estuários de unidades produtoras de camarões *L. vannamei* localizadas no estuário do rio Botafogo e no Rio dos Passos, ambas situadas em Pernambuco.

## 2.2 – Metodologia

### 2.2.1 – Coleta de ostras (organismos sentinelas)

As ostras (*Crassostrea sp.*) foram coletadas semestralmente no Litoral Norte (LN) e no Litoral Sul (LS) de Pernambuco, em estuários onde há tanto a captação de água, quanto a presença de águas residuais descartadas de cultivos de *L. vannamei*. No LN, a



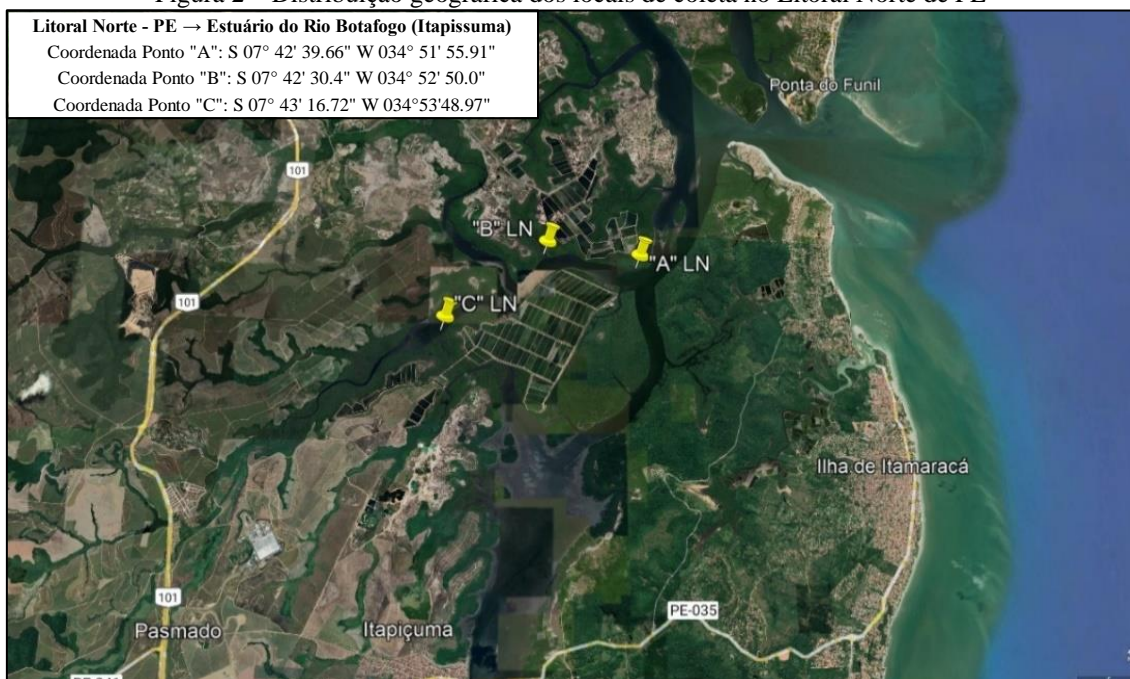
coleta foi realizada no estuário do rio Botafogo, norte do Canal de Santa Cruz, Itamaracá, enquanto no LS, a coleta foi realizada no estuário do Rio dos Passos, Sirinhaém. Em ambos os litorais, foram definidos três pontos de coleta de acordo com a proximidade aos canais de abastecimento e comporta de escoamento das fazendas de engorda de *L. vannamei*. Estes pontos foram georreferenciados através de GPS portátil (Modelo GPSMAP 64x, Garmin, EUA), sendo coletadas 25 ostras por ponto (*Crassostrea sp.*), totalizando 150 indivíduos no verão e 150 indivíduos no inverno. Para a realização da coleta dos espécimes, foi necessário realizar cadastro e possuir autorização do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO), instituído e regulamentado pela Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014. Os pontos de coleta encontram-se sumarizados nas figuras 1 e 2.

Figura 1 - Distribuição geográfica dos locais de coleta no Litoral Sul de PE



Fonte: Google Earth Pro (versão 7.3.4.8248), adaptada pelo autor.

Figura 2 – Distribuição geográfica dos locais de coleta no Litoral Norte de PE



Fonte: Google Earth Pro (versão 7.3.4.8248), adaptada pelo autor.

Os animais coletados foram levados vivos ao Laboratório de Sanidade de Animais Aquáticos (LASAq) localizado no Departamento de Pesca e Aquicultura (DEPAq), da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), para remoção de brânquia conforme Vazquez-Boucard et al. (2012). Estas amostras foram divididas, uma parte para a análise histopatológica que foram imediatamente fixadas em solução de Davidson (Davidson's AFA), e outra parte apenas armazenadas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  para posterior submissão à análise de PCR em tempo real.

### 2.2.2 – Análise histopatológica

A avaliação de possíveis lesões sugestivas de infecção por *IMNV* nas brânquias de *Crassostrea sp.* foi conduzida através da análise histopatológica de 5 animais coletados em cada ponto dos litorais norte e sul. Os animais tiveram as brânquias removidas e fixadas através de imersão do tecido em solução de Davidson (Davidson's AFA), durante 70 horas. Em seguida, as amostras foram transferidas para uma solução de etanol a 70%, para posterior preparo das lâminas histológicas, seguidas de coloração em hematoxilina e eosina (HE), de acordo com procedimento descrito por Lightner (1996). Todas as lâminas foram examinadas em microscópio óptico Olympus BX41, lentes objetivas com aumento de 40x e 100x.

### 2.2.3 – Extração do RNA

O RNA total foi extraído da brânquia, usando aproximadamente 50 mg de tecido dos animais coletados em TRIzol™ Reagent, segundo protocolo adaptado descrito por Chomczynski e Sacchi (1987). Para tal, inicialmente os tecidos foram macerados diretamente nos tubos (1,5 ml) contendo 1 ml de TRIzol™ Reagent, seguido de incubação a 25 °C por 5 minutos e adição de 200µL de clorofórmio. Posteriormente, o macerado foi submetido ao vórtex por 15 segundos e incubado a 25 °C por 3 minutos. Em seguida, foi centrifugado a 15000 rpm a 4 °C por 10 minutos, com o sobrenadante transferido para um novo tubo e adicionado 500µL de isopropanol. Logo após, incubado por 10 minutos a 25 °C e centrifugado a 15000 rpm a 4 °C, por 10 minutos. Então, o sobrenadante foi descartado e 1 ml de etanol a 75% (diluído previamente com água DEPC) foi adicionado. O tubo foi homogeneizado via vórtex por 15 segundos e centrifugado a 10000 rpm por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado seco por 15 minutos à temperatura ambiente.

Após a secagem, o RNA total extraído precipitado foi ressuspenso em 40µL de água ultrapura, com posterior incubação por 10 minutos a 60 °C. Ao final, foram armazenados imediatamente a -80 °C até o uso. A concentração e a relação  $A_{260/280}$  do RNA total extraído foi verificada através de análise espectrofotométrica em 260 e 280nm usando 2 µl do RNA total no espectrofotômetro NanoVue Plus™, seguido de padronização para 100 ng/µl através de diluição com água ultrapura.

### 2.2.5 – PCR em tempo real

A PCR em tempo real (qPCR) foi conduzida para a detecção e quantificação de *IMNV* nas amostras de tecido branquial de *Crassostrea sp.*, conforme metodologia de Silva et al. (2011). Para isso, após a padronização da concentração de RNA total para 100 ng/µl, foi utilizado o kit da Promega (GoTaq® 1-Step RT-qPCR System) de acordo com o manual do fabricante, submetendo as amostras a 1 ciclo de 37 °C por 15 minutos e 95 °C por 10 minutos, seguidos de 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos, 60 °C por 1 minuto. As reações foram feitas em placas de 96 poços e, a cada placa, foram adicionados: uma diluição serial do DNA plasmidial padrão ( $10^8$  a  $10^2$  cópias virais/µl), um controle negativo (água ultra-pura), um controle interno de  $\beta$ -actina (DHAR et al., 2002) e as amostras de cDNA a serem analisadas. Todas as amostras foram analisadas em duplicata, a obtenção de dados e a quantificação da carga viral de cada amostra foi realizada

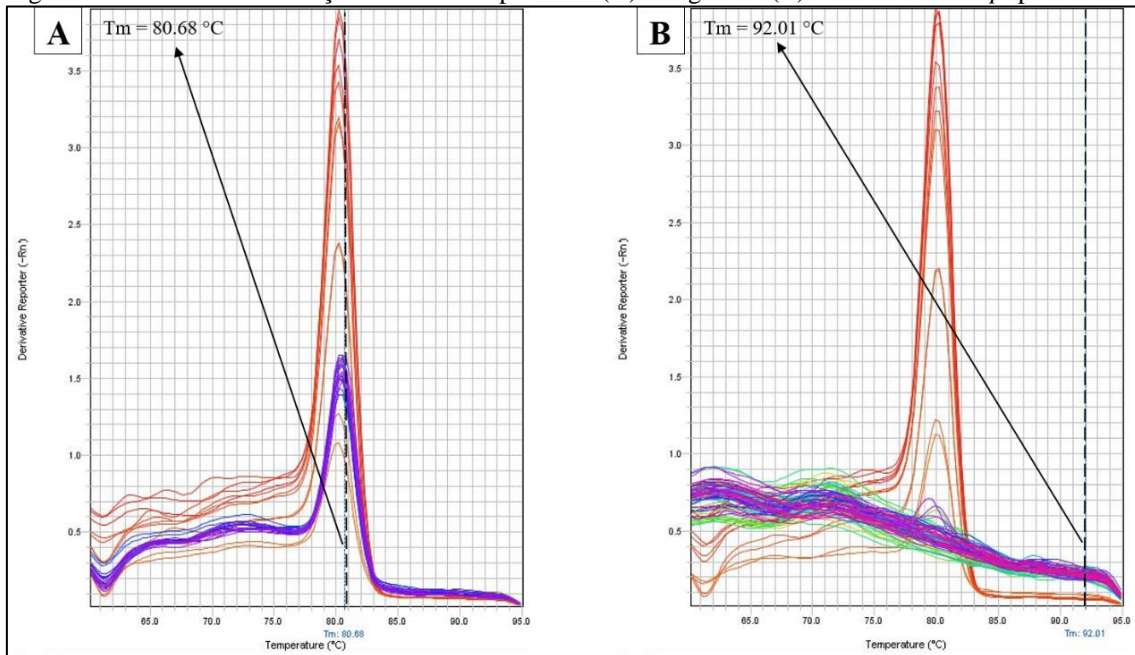
utilizando o programa StepOne Software (versão 2.3), sendo estas validadas de acordo com Silva et al. (2011), e consideradas como amostras positivas para *IMNV* apenas as que apresentaram réplicas técnicas com valores médios de Ct inferior a 36 (SILVA et al., 2011).

#### 2.2.6 – Análise estatística

Os dados de quantificação de carga viral das ostras foram submetidos aos testes de Shapiro-Wilk e Levene, para a verificação da normalidade e da homogeneidade, respectivamente, ambos para um nível de 95% de probabilidade ( $p < 0,05$ ). O teste não paramétrico utilizado para comparar as amostras independentes referente ao percentual de ostras infectadas por *IMNV* entre os litorais Norte e Sul, durante o Verão e o Inverno, separadamente, foi o teste U de Mann-Whitney. Já para comparar as amostras independentes referentes a carga viral de *IMNV* gerados pela PCR em tempo real entre as estações Verão e Inverno, no litoral Norte e Sul, separadamente, foi empregado o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo post-hoc de Dunn ajustados pela correção de Bonferroni. A análise estatística foi realizada com o auxílio do software IBM SPSS Statistic versão 25.0.0.0.

#### 2.3 – Resultados e discussão

O diagnóstico confirmatório obtido através da quantificação do número de cópias virais de *IMNV*/µl de RNA total, via PCR em tempo real, a partir de amostras de brânquias de ostras selvagens *Crassostrea sp.*, foi exitoso para ambos os litorais de Pernambuco, com especificidade dos *amplicons* representada pela curva de dissociação com um único pico e temperatura média de dissociação ( $T_m$ ) de 80,68 °C para todas as amostras positivas (Figura 3).

Figura 3 – Curvas de dissociação de amostras positivas (A) e negativas (B) de *Crassostrea sp.* para *IMNV*

Fonte: StepOne Software (versão 2.3), adaptada pelo autor.

O limite de detecção nas amostras de ostras positivas foi de  $4,92 \times 10^2$  cópias virais de *IMNV*/μl de RNA total, estando de acordo com o estudo desenvolvido por Silva et al. (2011), que ao utilizar essa mesma técnica de quantificação de *IMNV* baseada em *SYBR Green*, foi capaz de detectar em diferentes tecidos de *L. vannamei* infectados,  $10^2$  cópias de *IMNV*/μl de RNA total, enquanto o limite de detecção com PCR convencional ficou entre  $10^5$  e  $10^8$  cópias/μl. De acordo com Liu et al. (2013), a sensibilidade do método de detecção é vital e, dentre os métodos de detecção, a PCR em tempo real é atualmente o método mais sensível e reprodutível de detectar e quantificar *IMNV*, sendo, portanto, a forma eficaz de triagem rotineira de animais para a presença ou ausência do vírus.

Em termos de detecção, não foram verificadas diferenças estatísticas no percentual de *Crassostrea sp.* infectados por *IMNV* por local de coleta e estação do ano (Tabela 1), sendo determinados os valores percentuais médios de 90,7% e 50,67% de animais infectados no verão e inverno, respectivamente, para o litoral sul, enquanto para o litoral norte, para estas mesmas estações, foram encontrados os valores de 68% e 48%, respectivamente (Tabela 1). Todos os dados de *Crassostrea sp.* infectados por *IMNV* por ponto de coleta (A, B e C), litoral e estação do ano encontram-se resumidas na Tabela 1.

Tabela 1 – Percentual de *Crassostrea sp.* infectadas por *IMNV* por local de coleta nas diferentes estações

Estação	Litoral	Ponto			Média (mínimo-máximo)
		A	B	C	
Verão	Sul	100 (25/25)	96 (24/25)	76 (19/25)	90,67 (76 - 100) <sup>a</sup>
	Norte	48 (12/25)	68 (17/25)	88 (22/25)	68,00 (48 - 88) <sup>a</sup>
Inverno	Sul	100 (25/25)	40 (10/25)	12 (3/25)	50,67 (12 - 100) <sup>a</sup>
	Norte	100 (25/25)	44 (11/25)	0 (0/25)	48,00 (0 - 100) <sup>a</sup>

Fonte: Elaborada pelo autor. Os resultados correspondem as médias e valores mínimos e máximos. Os dados foram analisados pelo teste U de Mann-Whitney. As médias na mesma coluna não diferem significativamente diferentes entre si ( $\rho < 0,05$ ).

Quanto à carga viral, os valores médios determinados nos três pontos de coleta (A, B e C) para o litoral norte, variaram de 0 a  $1,03 \times 10^5$  cópias virais de *IMNV*/ $\mu$ l de RNA total no verão e de 0 a  $1,47 \times 10^4$  cópias virais de *IMNV*/ $\mu$ l de RNA total no inverno, não existindo diferença estatística entre os pontos coletados no verão, e durante o inverno houve diferença estatística significativa, com maior carga viral média ( $1,47 \times 10^4$  cópias virais de *IMNV*/ $\mu$ l de RNA total) no ponto A (Tabela 2). No litoral sul, para o verão, os valores médios de carga viral diferiram estatisticamente entre si e para os pontos de coleta A, B e C, variaram de  $6,50 \times 10^3$  a  $2,19 \times 10^4$  cópias virais de *IMNV*/ $\mu$ l de RNA total, de 0 a  $1,78 \times 10^4$  cópias virais de *IMNV*/ $\mu$ l de RNA total e de 0 a  $1,62 \times 10^4$  cópias virais de *IMNV*/ $\mu$ l de RNA total, respectivamente, com menor valor médio detectado no ponto C, com  $5,22 \times 10^3$  cópias virais de *IMNV*/ $\mu$ l de RNA total. Por outro lado, durante o inverno, não foram detectadas diferenças significativas nas cargas virais encontradas no litoral sul (Tabela 2).

Tabela 2 – Carga média viral de *IMNV* (número de cópias/ $\mu$ l de RNA total) dos pontos de coleta nas estações de Verão e Inverno para cada Litoral

Estação	Ponto	Litoral	
		Norte	Sul
		média (mínimo-máximo)	média (mínimo-máximo)
Verão	A	$5,96 \times 10^3$ (0,00 - $1,03 \times 10^5$ ) <sup>b</sup>	$1,50 \times 10^4$ ( $6,50 \times 10^3$ - $2,19 \times 10^4$ ) <sup>a</sup>
	B	$1,33 \times 10^3$ (0,00 - $1,02 \times 10^4$ ) <sup>b</sup>	$8,34 \times 10^3$ (0,00 - $1,78 \times 10^4$ ) <sup>ab</sup>
	C	$9,13 \times 10^2$ (0,00 - $1,21 \times 10^4$ ) <sup>b</sup>	$5,22 \times 10^3$ (0,00 - $1,62 \times 10^4$ ) <sup>b</sup>
Inverno	A	$4,53 \times 10^3$ ( $2,28 \times 10^3$ - $1,47 \times 10^4$ ) <sup>a</sup>	$1,66 \times 10^2$ (0,00 - $2,98 \times 10^3$ ) <sup>c</sup>
	B	$1,40 \times 10^3$ (0,00 - $4,43 \times 10^3$ ) <sup>b</sup>	$1,69 \times 10^2$ (0,00 - $4,22 \times 10^3$ ) <sup>c</sup>
	C	0,00 <sup>c</sup>	$5,77 \times 10^2$ (0,00 - $4,99 \times 10^3$ ) <sup>c</sup>

Fonte: Elaborada pelo autor. Os resultados correspondem as médias e valores mínimos e máximos. Os dados foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido do post-hoc de Dunn ajustado pela correção de Bonferroni. As médias na mesma coluna com diferentes letras sobrescritas são significativamente diferentes ( $\rho < 0,05$ ).

Pinheiro et al. (2007), em estudo epidemiológico realizado no estado de Pernambuco, para detecção de *IMNV* via nested-PCR em fazendas de engorda de camarão

de *L. vannamei*, verificaram que das 11 fazendas analisadas, 9 foram positivas para a presença do *IMNV*, sendo encontrado animais infectados tanto no litoral norte, como no litoral sul, resultados similares ao do presente estudo. Além disso, embora estes autores não tenham considerado a estação do ano *versus* o litoral para a detecção do vírus, visto que coletaram camarões entre agosto e dezembro, compreendendo, portanto, as estações de inverno (término do inverno), primavera e verão (início do verão), houve a detecção total de 5 de camarões positivos de 40 coletados (12,5%) em Sirinhaém (litoral sul) e, 18 animais positivos em 90 coletados (20%) em Itapissuma. Estes valores diferem dos encontrados no atual estudo, no qual, os montantes de ostras positivas, somando-se os três pontos e estações foram de 106 animais positivos (70,67%) em Sirinhaém (litoral sul) e, 87 positivos (58%) em Itapissuma (litoral norte), de um total de 150 amostras analisadas para cada litoral, sendo 75 por estação avaliada.

Tais diferenças entre o número de animais positivos encontrados entre Pinheiro et al. (2007) e o presente estudo podem estar atreladas a capacidade de acúmulo de partículas virais por bivalves, modelo animal usado. De acordo com Chang et al. (2011), os moluscos bivalves se alimentam através da filtração da água do ambiente que habitam, e embora os vírus não sejam considerados como seu alimento natural, podem ser captados eficientemente durante a alimentação, como foi demonstrado quando estes autores inocularam o bivalve *Meretrix lusoria* com o Vírus da Síndrome da Mancha Branca (*WSSV*) através da ingestão de microalga contaminada. Neste estudo, *M. lusoria* foi desafiado experimentalmente com *WSSV* e a carga viral foi marcadamente maior após 48 horas de imersão em inóculo viral diluído 500 vezes, embora nenhuma expressão do gene *WSSV* tenha sido observada neste molusco bivalve, indicando que *M. lusoria* pode efetivamente acumular *WSSV*, mas não pode ser infectado por este vírus.

Resultados similares foram encontrados por Vazquez-Boucard et al. (2012), ao determinarem por nested-PCR, que o *WSSV* se acumulou em brânquias e glândulas digestivas de ostras *Crassostrea gigas* colocadas em canal de abastecimento de fazenda de camarão com surtos frequentes desta virose localizada em Sinaloa (México), indicando que, como ocorreu em testes de transmissão do vírus, embora retenha partículas virais, a *C. gigas* é refratária à infecção por *WSSV*.

A presença de *WSSV* também foi relatada em outros bivalves por Kim et al. (2016), via multiplex nested-PCR, com detecção positiva em amostras de *Mytilus edulis*, *Scapharca subcrenata*, *M. lusoria*, *C. gigas*, *C. nippona*, *Saxidomus purpurata* e

*Sinonovacula constricta*, coletadas em diferentes localidades da República da Coreia (Coreia do Sul), ratificando a presença de vírus de peneídeos em diferentes espécies de moluscos, como encontrado no presente estudo.

A contaminação de bivalves com vírus e outros agentes ocorre, principalmente, devido a filtragem de pequenas partículas e microalgas presentes na água, visto que, muitas espécies de moluscos são comuns em estuários ou áreas com grande carga de nutrientes (LEES, 2000), sendo possível determinar a presença de vírus em todos os tipos de tecidos destes moluscos, mas em graus variados (METCALF et al., 1979).

Segundo Liu et al. (2007), após cultivarem seis microalgas marinhas (*Isochrysis galbana*, *Skeletonema costatum*, *Chlorella sp.*, *Heterosigma akashiwo*, *Scrippsiella trochoidea* e *Dunaliella salina*) com adultos de *Marsupenaeus japonicus* infectados com WSSV, verificaram que todas, exceto *H. akashiwo*, foram positivas ao WSSV, por nested-PCR, sendo capazes de re-infectar juvenis de *M. japonicus*, quando estas microalgas foram novamente co-cultivadas com animais sadios, indicando a capacidade de transporte dos vírus na superfície das microalgas e a transmissão horizontal deste patógeno. Este carreamento de partículas virais pelas microalgas pode ser a provável via de entrada de vírus de peneídeos nos moluscos, conforme encontrado nos resultados positivos de *IMNV* em *Crassostrea sp.* selvagens, coletadas em área próximas de captação e descarte de fazendas de camarão na costa pernambucana.

Do mesmo modo, além de microalgas, diferentes componentes do plâncton, como rotíferos (*Brachionus urceus*) (ZHANG et al., 2006; 2007) e copépodes (*Nitocra sp.* e *Apocyclops royi*) (ZHANG et al., 2008; Chang et al., 2011, respectivamente) também podem carrear o WSSV após ingestão de microalgas, isto é, por meio de desafio via rota de adesão vírus-fitoplâncton. Em estudo realizado por Esparza-Leal et al. (2009), foi demonstrada a presença de vírions de WSSV em diferentes frações de água de um corpo d'água próximo a uma área com surto de WSD, sugerindo que o WSSV infeccioso pode estar associado a subpopulações de plâncton, como micropilâncton (20-200  $\mu\text{m}$ ), nanoplâncton (2-20  $\mu\text{m}$ ) e/ou picoplâncton (0,2-2,0  $\mu\text{m}$ ).

Em relação à análise histológica, não foram encontradas lesões sugestivas de infecção por *IMNV* nas ostras *Crassostrea sp.* selvagens analisadas em ambos os litorais. Embora ainda não haja estudos que demonstrem as alterações histopatológicas de ostras infectadas por *IMNV*, Bachère et al. (2004) sugere que a resposta imune das ostras se desenvolveria de forma similar a de camarões, levando a crer que se houvessem lesões



histopatológicas, estas seriam similares às encontradas em camarões, tais como: necrose muscular coagulativa, acompanhada de acúmulo de líquido entre as fibras musculares (edema); infiltração hemocítica; fibrose; esferóides de órgãos linfóides vistos dentro do órgão linfóide e ectópicos na hemocele e; corpos de inclusão basofílicos escuros no citoplasma de células musculares, hemócitos e células do tecido conjuntivo (POULOS et al., 2006).

Segundo Silva et al. (2010), em estudo realizado para determinação da ocorrência de lesões sugestivas de *IMN* em *L. vannamei* cultivado ao longo do litoral do estado de Pernambuco, das 60 amostras analisadas por exame histopatológico, foram encontradas 31 amostras com lesões sugestivas da doença, sendo 20 (66,7%) na estação seca (verão) e 11 (36,67%) na estação chuvosa (inverno), com exemplares coletados em fazendas localizadas em ambos os litorais (norte e sul). Com base neste estudo, sugere-se que, as ostras selvagens avaliadas, embora filtrem e retenham as partículas de *IMNV*, como demonstrado nos resultados positivos de carga viral determinados em ambos os litorais para as duas estações do ano, provavelmente não se infectam pelo vírus, conforme evidenciado pela ausência de achados histopatológicos.

Com base nos resultados, conclui-se que as ostras *Crassostrea sp.* selvagens, podem ser usadas de forma eficiente como bioindicador de *IMNV* para monitoramento deste patógeno em estuários de unidades produtoras de camarões *L. vannamei*, sem a necessidade de coleta de camarões nas fazendas. Novos estudos devem ser conduzidos para confirmação da susceptibilidade das ostras selvagens ao *IMNV*, visto que a presença do RNA viral nos tecidos destes animais não define se são susceptíveis ou não à infecção por este patógeno.

#### 2.4 – Referências

BACHÈRE, E.; GUEGUEN, Y.; GONZALEZ, M.; LORGERIL, J.; GARNIER, J.; ROMESTAND, B.. Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. **Immunological Reviews**. v. 198, p. 149-168. 2004.

CHANG, Y. S.; CHEN, T. C.; LIU, W. J.; HWANG, J. S.; KOU, G. H.; LO, C. F.. Assessment of the Roles of Copepod *Apocyclops royi* and Bivalve Mollusk *Meretrix lusoria* in White Spot Syndrome Virus Transmission. **Marine Biotechnology**. v. 13, p. 909-917. 2011.

CHOMCZYNSKI, P., SACCHI, N.. **Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol chloroform extraction**. Anal. Biol. Chem. 162, p.156-159. 1987.

DHAR, A. K.; ROUX, M. R.; KLIMPEL, K. R.. Quantitative assay for measuring the load of Taura syndrome virus (TSV) and yellowhead virus (YHV) in shrimp by realtime RT-PCR using SYBR Green chemistry. **Journal of Virological Methods**. v. 104, p. 69-82. 2002.

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

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). **The State of World Fisheries and Aquaculture 2020**. Sustainability in action. p. 21-26. Rome, 2020.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Produção da Pecuária Municipal**. v. 48, p. 1-12. Rio de Janeiro, 2021.

KIM, K. I.; KWON, W. J.; KIM, Y. C.; KIM, M. S.; HONG, S.; JEONG, H. D.. Surveillance of aquatic animal viruses in seawater and shellfish in Korea. **Aquaculture**. v. 461, p. 17-24. 2016.

LEES, D.. Viruses and bivalve shellfish. **International Journal of Food Microbiology**. v. 59, p. 81-116. 2000.

LIGHTNER, D.V.. Handbook of pathology and diagnostic procedures for diseases of penaeid shrimp. Baton Rouge: **World Aquaculture Society**. 304p. 1996.

LIGHTNER, D. V.; REDMAN, R. M.; PANTOJA, C. R.; TANG, K. F. J.; NOBLE, B. L.; SCHOFIELD, P.; MOHNEY, L. L.; NUNAN, L. M.; NAVARRO, S. A.. Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in the Americas. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 110(2), p. 174-183. 2012.

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

LIU, H. L.; YAN, D. C.; SUN, H. S.; WANG, Y. Y.; WANG, L.. A real-time PCR for the detection of infectious myonecrosis virus in penaeid shrimp. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 113(3), p 237-239. 2013.

METCALF, T. G.; MULLIN, B.; ECKERSON, D.; MOULTON, E.; LARKIN, E. P.. Bioaccumulation and Depuration of Enteroviruses by the Soft-Shell Clam, *Mya arenaria*. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 38(2), p. 275-282. 1979.

NAIM, S.; BROWN, J.; NIBERT, M. L.. Genetic diversification of penaeid shrimp infectious myonecrosis virus between Indonesia and Brazil. **Virus Research**. v. 189, p. 97-105. 2014.

NUNES, A. J. P.; MARTINS, P. C. C.; GESTEIRA, T. C. V.. Produtores sofrem com as mortalidades decorrentes do vírus da mionecrose infecciosa (*IMNV*). **Panorama da Aqüicultura**. v. 14, p. 37-51. 2004.

PINHEIRO, A. C. A. S.; LIMA, A.P.S.; SOUZA, M. E.; NETO, E.C.L.; ADRIÃO, M.; GONÇALVES, V.S.P.; COIMBRA, M.R.M.. Epidemiological status of Taura syndrome and Infectious myonecrosis viruses in *Penaeus vannamei* reared in Pernambuco (Brazil). **Aquaculture**. v. 262, p. 17-22. 2007.

POULOS, B. T.; TANG, K. F. J.; PANTOJA, C. R.; BONAMI, J. R.; LIGHTNER, D. V.. Purification and characterization of infectious myonecrosis virus of penaeid shrimp. **Journal of General Virology**. v. 87, p. 987-996. 2006.

SILVA, V. A.; SANTOS, F. L.; BEZERRA, S. S.; PEDROSA, V. F.; MENDES, P. P.; MENDES, E. S.. 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.

SILVA, S. M. B. C.; PINHEIRO, A. C. A S.; COIMBRA, M. R. M.. Quantitation of infectious myonecrosis virus in different tissues of naturally infected Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, using real-time PCR with SYBR Green chemistry. **Journal of Virological Methods**. v. 177, p. 197-201. 2011.

TANG, J.; OCHOA, W. F.; SINKOVITS, R. S.; POULOS, B.T.; GHABRIAL, S. A.; LIGHTNER, D. V.; BAKER, T. S.; NIBERT, M. L.. Infectious myonecrosis virus has a totivirus-like, 120-subunit capsid, but with fiber complexes at the fivefold axes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 105(45), p 17526-17531. 2008.

TANG, K. F. J.; BONDAD-REANTASO, M. G.; ARTHUR, J. R.. Shrimp infectious myonecrosis strategy manual. **FAO Fisheries and Aquaculture Circular N°**. 1187. Rome, FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). 2019.

VAZQUEZ-BOUCARD, C.; ALVAREZ-RUIZ, P.; ESCOBEDO-FREGOSO, C.; ANQUIANO-VEJA, G.; DURAN-AVELAR, M. J.; PINTO, V. S.; ESCOBEDO-BONILLA, C. M.. Detection of White Spot Syndrome Virus (WSSV) in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. **Journal Invertebrate Pathology**. v. 104(3), p. 245-247. 2010.

VAZQUEZ-BOUCARD, C.; ESCOBEDO-FREGOSO, C.; DURAN-AVELAR, M. J.; MERCIER, L.; LLERA-HERRERA, R.; ESCOBEDO-BONILLA, C. M.; VIBANCO-PEREZ, N.. *Crassostrea gigas* oysters as a shrimp farm bioindicator of white spot syndrome virus. **Diseases of Aquatic Organisms**. v. 98, p. 201-207. 2012.

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

ZHANG, J.; DONG, S.; TIAN, X.; DONG, Y.; LIU, X; YAN, D.. Virus-phytoplankton adhesion: A new WSSV transmission route to zooplankton. **Acta Oceanologica Sinica**. v. 26(6), p. 109-115. 2007.

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

### 3 – Considerações finais

- a. A técnica usada de quantificação do *IMNV* via *SYBR Green* desenvolvida para *L. vannamei* pode ser aplicada de forma eficiente para a detecção deste vírus em moluscos bivalves do gênero *Crassostrea sp.*;
- b. A *Crassostrea sp.* selvagem pode cumprir a função de ser um organismo sentinela/bioindicador capaz de monitorar o *IMNV* em ambientes próximos a áreas de cultivo de camarão;
- c. Embora ainda não haja protocolos para o uso de organismos sentinela em instalações de aquicultura, esse gênero de bivalve pode auxiliar no desenvolvimento e implementação de programas de vigilância sanitária de animais aquáticos.

#### 4 – Referências

FLEGEL, T. W.. Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in Asia. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 110(2), p. 166-173. 2012.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). **The State of World Fisheries and Aquaculture 2020**. Sustainability in action. p. 21-26. Rome, 2020.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Produção da Pecuária Municipal**. v. 47, p. 1-12. Rio de Janeiro, 2020.

LIGHTNER, D. V.; REDMAN, R. M.; PANTOJA, C. R.; TANG, K. F. J.; NOBLE, B. L.; SCHOFIELD, P.; MOHNEY, L. L.; NUNAN, L. M.; NAVARRO, S. A.. Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in the Americas. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 110(2), p. 174-183. 2012.

LIU, H. L.; YAN, D. C.; SUN, H. S.; WANG, Y. Y.; WANG, L.. A real-time PCR for the detection of infectious myonecrosis virus in penaeid shrimp. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 113(3), p 237-239. 2013.

LOY, D. S.; LIU, S.; MOGLER, M. A.; LOY, J. D.; BLITVICH, B. J.; BARTHOLOMAY, L. C.. Characterization of newly revealed sequences in the infectious myonecrosis virus genome in *Litopenaeus vannamei*. **Journal of General Virology**. v. 96(7), p. 1821-1829. 2015.

NAIM, S.; TANG, K. F. J.; YANG, M.; LIGHTNER, D. V.; NIBERT, M. L.. Extended genome sequences of penaeid shrimp infectious myonecrosis virus strains from Brazil and Indonesia. **Archives of Virology**. v. 160, p. 1579-1583. 2015.

NUNES, A. J. P.; MARTINS, P. C. C.; GESTEIRA, T. C. V.. Produtores sofrem com as mortalidades decorrentes do vírus da mionecrose infecciosa (*IMNV*). **Panorama da Aqüicultura**. v. 14, p. 37-51. 2004.

OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (OIE). **Aquatic Animal Health Code**. Edition online, cap 9.5. 2021. Disponível em: <<https://www.oie.int/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/aquatic-code-online-access/>> Acesso em: 14 dezembro 2021.

SAHUL HAMEED, A. S.; ABDUL MAJEED, S.; VIMAL, S.; MADAN, N.; RAJKUMAR, T.; SANTHOSHKUMARS, S; SIVAKUMAR, S.. Studies on the occurrence of infectious myonecrosis virus in pond-reared *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) in India. **Journal of fish diseases**. v. 40(12), p 1823-1830. 2017.

SENAPIN, S.; PHEWSAIYAA, K.; BRIGGS, M.; FLEGEL, T. W.. Outbreaks of infectious myonecrosis virus (*IMNV*) in Indonesia confirmed by genome sequencing and use of an alternative RT-PCR detection method. **Aquaculture**. v. 266, p. 32-38. 2007.

SILVA, S. M. B. C.; LAVANDER, H. D.; LUNA, M. M. S.; SILVA, A. O. M. E.; GÁLVEZ, A. O.; COIMBRA, M. R. M.. *Artemia franciscana* as a vector for infectious myonecrosis vírus (*IMNV*) to *Litopenaeus vannamei* juvenile. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 126, p. 1-5. 2015.

SILVA, S. M. B. C.; SILVA, A. D. R.; LAVANDER, H. D.; CHAVES, T. C.; PEIXOTO, S.; GALVEZ, A. O.; COIMBRA, M. R. M.. Vertical transmission of infectious myonecrosis virus in *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**. v. 459, p. 216-222. 2016.

TANG, K. F. J.; BONDAD-REANTASO, M. G.; ARTHUR, J. R.. Shrimp infectious myonecrosis strategy manual. **FAO Fisheries and Aquaculture Circular** N°. 1187. Rome, FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). 2019.

VAZQUEZ-BOUCARD, C.; ALVAREZ-RUIZ, P.; ESCOBEDO-FREGOSO, C.; ANQUIANO-VEJA, G.; DURAN-AVELAR, M. J.; PINTO, V. S.; ESCOBEDO-BONILLA, C. M.. Detection of White Spot Syndrome Virus (WSSV) in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. **Journal Invertebrate Pathology**. v. 104(3), p. 245-247. 2010.

VAZQUEZ-BOUCARD, C.; ESCOBEDO-FREGOSO, C.; DURAN-AVELAR, M. J.; MERCIER, L.; LLERA-HERRERA, R.; ESCOBEDO-BONILLA, C. M.; VIBANCO-PEREZ, N.. *Crassostrea gigas* oysters as a shrimp farm bioindicator of white spot syndrome virus. **Diseases of Aquatic Organisms**. v. 98, p. 201-207. 2012.

WITTWER, C. T.; Ririe, K. M.; ANDREW, R. V.; DAVID, D. A.; GUNDRY, R. A.; BALIS, U. J.. The LightCycler™: A Microvolume Multisample Fluorimeter with Rapid Temperature Control. **BioTechniques**. v. 22, p. 176-181. 1997.