



Relato de Caso/Case Report

Sedimento e água podem atuar como reservatórios para o vírus da mancha branca em criação de camarões

Lissandra Souto Cavalli^{1*}, Carolina Reyes Batista², Bruna F.S. Nornberg², Luis Fernando Marins², Paulo César Abreu³

Resumo - Água e sedimento de viveiros podem atuar como reservatórios virais naturais, além de outros organismos aquáticos, contribuindo para a disseminação e transmissão de vírus como o vírus da mancha branca (WSSV). O objetivo deste trabalho foi identificar a presença de ácidos nucleicos/material genético DNA de WSSV no sedimento e água em viveiros de criação do camarão branco *Litopenaeus vannamei*. DNA total foi extraído a partir de amostras de sedimento e água em quatro viveiros de criação. A presença de DNA viral foi verificada por uma reação de amplificação - *nested* PCR. As amplificações revelaram a presença de DNA de WSSV nas amostras de sedimento e de água de dois diferentes viveiros. Os resultados demonstram que o WSSV pode estar presente no sedimento e água de viveiros de criação de camarão, atuando como potenciais reservatórios para a disseminação deste patógeno. Medidas sanitárias e de profilaxia devem ser eficientemente empregadas para se evitar futuros casos da doença. O monitoramento da presença de WSSV na água e solo dos locais de criação pode representar uma importante ferramenta de avaliação do potencial de infecção viral.

Palavras-chave: WSSV. Aquicultura. Infecção viral.

Sediment and water can act as reservoirs for White spot syndrome virus in shrimp farming

Abstract - Natural viral reservoirs such as water and sediment, in addition to other aquatic organisms may represent an extra route of transmission of the white spot syndrome virus (WSSV). The aim of the present work was to verify the presence of WSSV DNA in the sediment and water in ponds of the white shrimp

¹ Pesquisadora, Departamento de Diagnóstico e Pesquisa Agropecuária, Secretaria da Agricultura, Pecuária e Irrigação do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. *Autora de correspondência, E-mail: liscavalli@gmail.com

² Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil

³ Instituto de Oceanografia, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil.

Litopenaeus vannamei. DNA from sediment and water samples were obtained from four ponds in the same shrimp farm. The presence of viral DNA was tested by nested PCR with WSSV-specific primers. The data revealed the presence of WSSV DNA in the sediment and water samples from two different ponds. The results demonstrate that WSSV can be present in the sediment and water of shrimp farms, acting as important reservoirs for the dissemination of this pathogen. Sanitary measures and prophylaxis should be efficiently employed to avoid future cases of the disease. Monitoring the presence of WSSV in the water and soil of breeding sites can represent an important tool for assessing the potential of viral infection.

Keywords: WSSV. Aquaculture. Virus infection.

Introdução

Desde o surgimento da doença da mancha branca em 1992, causada pelo *White spot syndrome virus* (WSSV), perdas significativas foram registradas na criação de camarão ao redor do mundo (LIGHTNER et al., 2012). A patogenia provoca grandes perdas econômicas devido à alta mortalidade e sua transmissão pode ocorrer por via vertical ou horizontal (SOTO; SHERVETTE; LOTZ, 2001). A presença de inclusões virais nos órgãos reprodutores de *Penaeus Monodon* sugere fortemente a transmissão vertical do vírus (MOHAN et al., 1997), enquanto que a transmissão horizontal pode acontecer através de larvas ou reprodutores infectados (FLEGEL, 2006), ou pela ingestão de animais infectados (SOTO; SHERVETTE; LOTZ, 2001). Partículas virais presentes na água, sedimento e vetores podem representar importantes reservatórios e fontes de contaminação, re-introduzindo a doença e inviabilizando futuras criações. Segundo a OIE (2018) todas as espécies de crustáceos são hospedeiras em potencial para WSSV. Além disso, insetos (LO et al., 1996b), rotíferos (Yan et al., 2004) e poliquetos (VIJAYAN et al., 2005) também atuam como vetores da doença. A transmissão de viroses pela água ou sedimento depende do tipo de vírus (características morfológicas e adaptativas) e sua capacidade de se manter viável no meio abiótico (NATIVIDAD; NOMURA; MATSUMURA, 2008). Além disso, diferentes fatores como pH (HURST; GERBA; CECH, 1980), propriedades da matéria orgânica (ZHUANG; JIN, 2003), e a presença de DNAses e RNAses (ENGLAND; HOLMES; TREVORS, 1998) podem afetar a permanência partículas virais infectivas/material genético no ambiente.

O objetivo do presente estudo foi verificar a presença de DNA viral na água e sedimento em viveiros de fazenda de criação afetada pela doença da mancha branca.

Material e Métodos

Amostras

Foram coletados sedimento e água (triplicata) de quatro viveiros localizados em uma fazenda de criação do camarão branco *Litopenaeus vannamei*. As amostras foram obtidas no período de janeiro a março

de 2008 em viveiros de criação de São José do Norte (SJN), RS. Alguns viveiros estavam em processo de despesca, com pouca água, e já se observava sinais clínicos de doença nos camarões. Após a coleta o material coletado foi levado imediatamente ao laboratório e processado.

Extração do DNA

A extração de DNA de sedimento e água foi realizada utilizando o kit Ultraclean™ Soil DNA Isolation (MoBio) de acordo com as instruções do fabricante. Após extração, o DNA foi ressuscitado em 80 µl de TE-RNase (10mM Tris, 1mM EDTA, 10 mg mL⁻¹ RNase) e usado posteriormente como molde para reações de reação em cadeia da polimerase (PCR) com a finalidade de detectar DNA de WSSV nas amostras.

Reação em cadeia Polimerase (PCR)

Os testes de PCR para WSSV das amostras de água e sedimento foram conduzidos usando os *primers* 146F1 (5'-ACT ACT AAC TTC AGC CTA TCT AG-3') e 146R1 (5'-TAA TGC GGG TGT AAT GTT CTT ACG A-3') para a primeira reação. E os seguintes *primers* para a segunda reação (*nested*): 146F2 (5'-GTA ACT GCC CCT TCC ATC TCC A-3') e 146R2 (5'-TAC GGC AGC TGC TGC ACC TTG T-3') descritos por Lo et al. (1996a). O tamanho do fragmento gerado é de 1447 bp para a primeira reação e 941 bp para a *nested*. Controles negativos e positivos foram incluídos em cada reação.

O mix da reação de PCR inclui 10 mM dNTP, 1.5 mM 95 MgCL₂, 1 M cada *primer*, 0.02 U Taq DNA polymerase (Invitrogen) na solução tampão de PCR (Tris-HCL, 10 mM; KCl, 50 mM; pH 8.3). A amplificação foi feita em um termociclador (Techne TC-312) usando os seguintes parâmetros: desnaturação inicial a 95 °C por 1 minuto, seguido de 40 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 55 °C por 30 segundos e 72 °C por 1 minuto, e com extensão final de 72 °C por 2 minutos (CROCKFORD, 2001). O produto da amplificação foi separado em gel de agarose a 1 % corado com brometo de etídio e visualizados usando transiluminador UV. O marcador 1 Kb DNA ladder (Invitrogen) foi usado como marcador de peso molecular. Amostras positivas foram enviadas para sequenciamento.

Resultados e Discussão

As amostras de sedimento do viveiro 3 e de água do viveiro 4 foram positivas para DNA de WSSV (Tabela 1). Sedimento (NATIVIDAD; NOMURA; MATSUMURA, 2008), água (HOSSAIN et al., 2004; QUANG et al., 2008) e outros vetores podem representar importantes fontes de disseminação de vírus.

Os resultados da presença de DNA viral em água e sedimento representam uma via extra de armazenamento, disseminação e transmissão do vírus da mancha branca em viveiros de camarão. DNA de WSSV já foi detectado em amostras de água coletadas de viveiros e no ambiente (HOSSAIN et al., 2004), mesmo após um ano do surto da doença (QUANG et al., 2008). Momoyama *et al.* (1998) relataram que

WSSV pode permanecer viável por no mínimo 30 dias a 30 °C em água do mar sob condições de laboratório. A presença de DNA viral na água pode também estar associada a vetores naturais (QUANG et al., 2008). Todavia, a detecção de vírus na água é um desafio, uma vez que suas contagens geralmente são muito baixas para serem detectadas pelos métodos disponíveis, como a PCR (ALAVANDI et al. 2015).

Devido à grande patogenicidade deste vírus e ao potencial de permanecer viável por um grande período, é necessário um monitoramento não só dos camarões de criação, mas também dos possíveis vetores e reservatórios.

Tabela 1. Resultado dos testes de PCR para WSSV em amostras de sedimento e água coletados em fazenda de criação de camarão.

| Tipo de amostra | Viveiros | | | |
|-----------------|----------|----------|----------|----------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 |
| Sedimento | Negativo | Negativo | Positivo | Negativo |
| Água | Negativo | Negativo | Negativo | Positivo |

A OIE considera a água como importante via de contaminação. Entretanto, Fegan & Clifford (2001) consideram o risco da água transmitir WSSV inferior ao que se acredita, já que as partículas virais se diluiriam nas massas de água. Porém, quando se descarta água com alta carga viral em um corpo de água durante um surto, as chances de contaminação aumentam significativamente (FEGAN; CLIFFORD, 2001).

Estudos demonstram que DNA de WSSV permanece intacto por no mínimo 10 meses à temperatura ambiente (NATIVIDAD; NOMURA; MATSUMURA, 2008). Estes autores verificaram que o tratamento térmico a 70 °C por 5 dias não degradou ou desnaturou o DNA viral de WSSV. O sedimento pode ainda abrigar hospedeiros como rotíferos (YAN et al., 2004), que facilitam a permanência e disseminação do vírus. Dessa forma, a persistência do vírus no solo pode também estar associada à presença de hospedeiros que os mantêm viáveis por mais tempo. Embora outros estudos tenham detectado a presença de DNA viral em amostras de sedimento após 19 dias de secagem ao sol e 40 dias sob condições de água, os camarões não desenvolveram a doença, sugerindo que WSSV não era viável (KUMAR et al., 2013).

Nesse estudo, não foi possível determinar se a presença de DNA viral está relacionada apenas ao sedimento, ou se é oriunda de hospedeiros de WSSV presentes no solo ou água do viveiro. Igualmente, não foi possível verificar se o DNA de WSSV encontrado nas amostras é uma partícula infectante viável, devido à impossibilidade momentânea de experimentos de desafio ou de viabilidade viral. Entretanto o monitoramento da presença de WSSV na água e solo dos locais de criação pode representar uma importante ferramenta de avaliação do potencial de infecção viral, antes do povoamento do viveiro com pós-larvas. Além disso, a avaliação da presença de partículas virais nos efluentes das criações, antes que sejam

despejados em bacias de sedimentação ou no ambiente, poderá evitar a disseminação da doença para crustáceos presentes no corpo de água receptor dos efluentes. Dentre as medidas profiláticas para água e solo podemos sugerir uso de substâncias que alterem o pH com o objetivo de inativar o vírus. Chang *et al.* (1998) inativaram partículas de WSSV reduzindo o pH para 1 por 3 minutos, pH 3 por uma hora e com adição de NaOH, aumentando o pH para 12 por 10 minutos a temperatura ambiente (25 °C). Tratamentos com hipoclorito de sódio a 100 ppm também parecem ser eficientes na desinfecção de viveiros de criação (CHANG; CHEN; WANG, 1998; FEGAN; CLIFFORD, 2001).

Tendo em vista que, a presença do vírus pode estar fortemente associada à presença de hospedeiros na água ou sedimento, as medidas profiláticas para eliminar os vírus em água e sedimento devem ser acompanhadas de ações para eliminar possíveis vetores presente nesses meios (CAVALLI et al., 2013). Estudos demonstraram que o tratamento com cloro é eficiente para eliminar larvas infectadas e hospedeiros em potencial deste vírus (CHANRATCHAKOOL; LIMSUWAN, 1998; FEGAN; CLIFFORD, 2001).

Ressaltamos a importância de medidas sanitárias e de profilaxia para se evitar futuros surtos da doença. Entretanto, nossos resultados também mostram a importância do monitoramento de outras fontes de contaminação de viveiros como água e sedimento. Sendo assim, os esforços de controle de entrada de larvas ou reprodutores infectados não são eficazes quando a água ou o sedimento estão previamente contaminadas. Consequentemente, o aperfeiçoamento e adoção de métodos de detecção do vírus em água e sedimento auxiliará a prevenir o surgimento de novos focos de infecção por WSSV oriundos do ambiente abiótico.

Referências

ALAVANDI, A.V. et al. Tangential flow ultrafiltration for detection of white spot syndrome virus (WSSV) in shrimp pond water. *Journal of Virological Methods* v. 218, p. 7–13, 2015.

CAVALLI, L.S. et al. Natural occurrence of White spot syndrome virus and Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in *Neohelice granulata* crab. *Journal of Invertebrate Pathology* v.114, p. 86-88, 2013.

CHANG, P.S.; CHEN, L.J.; WANG, Y.C. The effect of ultraviolet irradiation, heat, pH, ozone, salinity and chemical disinfectants on the infectivity of White spot syndrome baculovirus. *Aquaculture* v. 166, p. 1-17, 1998.

CHANRATCHAKOOL, P.; LIMSUWAN, C. Application of PCR and formalin treatment to prevent white spot disease in shrimp. *In: FLEGEL, T.W. (Ed). Advances in shrimp Biotechnology. BIOTEC, Bangkok, Thailand, 1998, p.287-289.*

CROCKFORD, M. White spot Disease. Australia and New Zeland Standard Diagnostic Procedures, 1-16, 2001.

ENGLAND, L.S.; HOLMES, S.B.; TREVORS, J.T. Review: Persistence of viruses and DNA in soil. World Journal of Microbiology Biotechnology v. 14, p. 163-169, 1998.

FEGAN, D.F.; CLIFFORD, H.C. Health management for viral diseases in shrimp farms. In: BROWDY, C.L.; JORY, D.E. (Ed.). The new Wave, Proceedings of the special session on sustainable shrimp culture, Aquaculture. The World Aquaculture society, Baton Rouge, LA. USA, 2001, p.105-135.

FLEGEL, T.W. The special danger of viral pathogens in shrimp translocated for aquaculture. Science Asia v.32, p. 215-221, 2006.

HOSSAIN, Md.S. et al. Detection of WSSV in cultured shrimps, captured brooders, shrimp postlarvae and water samples in Bangladesh by PCR using different primers. Aquaculture v. 237, p. 59-71, 2004.

HURST, C.J.; GERBA, C.P.; CECH, I. Effects of environmental variables and soil characteristics on virus survival in soil. Applied of Environmental Microbiology v.40, p. 1067-1079, 1980.

KUMAR, S.S. et al. Viability of white spot syndrome virus (WSSV) in sediment during sun-drying (drainable pond) and under non-drainable pond conditions indicated by infectivity to shrimp. Aquaculture v. 402–403, p. 119-126, 2013.

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

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

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

MOHAN, C.V. et al. Vertical transmission of white spot baculovirus in shrimps – a possibility? Current Science v. 73, p. 109-110, 1997.

MOMOYAMA, K. et al. Cryopreservation of penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV) and its survival in sea water at different temperatures. *Fish Pathology* v.33, n. 2, p. 95-96, 1998.

NATIVIDAD, K.D.; NOMURA, N.; MATSUMURA, M. Detection of White spot syndrome virus DNA in pond soil using a 2-step nested PCR. *Journal of Virology Methods* v.149, p. 28-43, 2008.

OIE - OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. Manual of diagnostic tests for Aquatic Animals. Disponível em: http://www.oie.int/index.php?id=2439&L=0&htmfile=chapitre_wsd.htm. Acesso em: 10 dezembro 2018.

QUANG, N.D. et al. Persistence of white spot syndrome vírus in shrimp ponds and surrounding areas after outbreak. *Environmental Monitoring and Assessment*, p. 156-169, 2008.

SOTO, M.A.; SHERVETTE, V.R.; LOTZ, J.M. Transmission of white spot syndromevirus (WSSV) to *Litopenaeus vannamei* from infected cephalotorax, abdomen, or whole shrimp cadaver. *Disease of Aquatic Organisms* v.45, p.81-87, 2001.

VIJAYAN, K.K. et al. Polychaete worms – a vector for white spot syndrome virus (WSSV). *Disease of Aquatic Organisms* v.63, p. 107-111, 2005.

YAN, D.C. et al. White spot syndrome virus (WSSV) detected by PCR in rotifers and rotifer resting eggs from shrimp ponds sediments. *Disease of Aquatic Organisms* v.59, p. 69-73, 2004.

ZHUANG, J.; JIN, Y. Virus retention and transport as influenced by different forms of soil organic matter. *Journal of Environmental Quality* v. 32, p. 816-823, 2003.