

# TRANSMISSÃO DA SÍNDROME DA NECROSE IDIOPÁTICA MUSCULAR (NIM) EM *LITOPENAEUS VANNAMEI*.

**Biólogo Christian Graf (Consultor do Melhoramento de Reprodutores)**

**Biólogo Neil Gervais (Gerente Técnico da Aqualider)**

**Bióloga Maria da Paz C. Fernandes (Técnica da Aqualider)**

**Biólogo Juan Carlos Ayala (Diretor Técnico. da Aquafort)**

## INTRODUÇÃO

Estes bioensaios foram realizados com o objetivo de estudar a transmissibilidade da Síndrome da Necrose Idiopática Muscular (NIM).

Esta doença é apontada por causar perdas econômicas por mortalidade nas fazendas de camarão no início do ano de 2003, nos estados de Piauí, Ceará e Rio Grande do Norte.

Nestes bioensaios testamos a transmissibilidade de NIM pelos seguintes métodos:

1. Infecção através de ingestão de tecido contaminado;
2. Infecção através de água inoculada com extrato de camarão contaminado;
3. Infecção através da ingestão de fezes de aves alimentadas com camarões contaminados;
4. Infecção horizontal através de efluentes de populações de camarões contaminados; e
5. Infecção através da ingestão de biomassa de *Artemia* adulta viva alimentada com uma emulsão de camarões contaminados

Os Bioensaios foram realizados por iniciativa da Aqualider Maricultura Ltda., com apoio da Aquafort Aquacultura de Fortaleza S.A. e financiamento da Associação Brasileira dos Criadores de Camarão (ABCC).

## MÉTODOS

Neste experimento foram utilizados tecidos contaminados homogeneizados de camarões contaminados. A quantificação foi feita por meio de peso e volume, em gramas e mililitros, respectivamente. Estes parâmetros foram suficientes já que o objetivo dos experimentos é quantificar a mortalidade causada pelas diferentes meios e doses de contaminação.

Apresentamos procedimentos de quantificação de massa necessária para contaminações de camarões presumidamente saudáveis, e a mortalidade resultante da administração de diferentes dosagens e vias de transmissão.

Pela inexistência de técnicas para quantificar concentrações da NIM em animais vivos, para este experimento foi estabelecida uma correlação entre uma quantidade específica de biomassa de camarões supostamente infectados e sua patogenicidade pela observação de mortalidade.

### **Bioensaio B#1 - Infecção através da ingestão de tecido contaminado**

A contaminação dos camarões foi feita por alimentação em doses de 1,6 g de tecidos moídos com 0,2 g, 0,4 g, 0,8 g e 1,6 g de tecido contaminado, e a diferença de tecido não contaminado.

### **Bioensaio B#2 - Infecção através de água inoculada com extrato de camarão contaminado.**

A contaminação dos camarões foi feita de forma indireta, inoculando 8 L de água com doses de 1,6 mL de extrato de tecidos liquidificados, centrifugados e passados por um filtro de 1 micron com 0,2 mL, 0,4 mL, 0,8 mL e 1,6

mL de extrato feito com tecido contaminado, e a diferença de extrato feito com tecido não contaminado.

### **Bioensaio B#3 – Infecção através da ingestão de fezes de aves alimentadas com camarões contaminados.**

A contaminação dos camarões foi feita pela ingestão de matéria fecal de patos que foram alimentados com camarões infectados e não infectados. As fezes dos patos foram inoculadas em 8 L de água em doses de 1,6 g .

### **Bioensaio B#4 – Infecção horizontal através de efluentes de populações de camarões contaminados.**

A contaminação dos camarões foi feita através da exposição à matéria fecal, detritos e à água proveniente de aquários populados com camarões contaminados.

### **Bioensaio B#5 - Infecção através da ingestão de biomassa da *Artemia* adulta viva alimentada com uma emulsão de camarões contaminados.**

A contaminação do camarão foi feita pela alimentação de *Artemia* adulta alimentada com uma emulsão de tecidos de camarões contaminados.

Todos os bioensaios e controles foram realizados em replicas de 3 aquários de 8 L de água estocados com 25 camarões juvenis de 0,2 g a 0,5 g. Em total, foram utilizados 60 aquários e aproximadamente 2.400 juvenis.

Para todos os bioensaios houve apenas administração de contaminação no início do experimento após 24 h sem alimentação para assegurar o consumo de todo o alimento ofertado. Além disso, todos os animais mortos foram retirados imediatamente dos meios para evitar contaminações secundárias.

Após a infecção inicial, aplicou-se uma alimentação de 5% da biomassa dos juvenis com uma ração comercial de camarão com 37% de proteína.

Os aquários tiveram uma troca de água diária de 50%. Duas vezes ao dia, o excesso de fezes e de alimentos era sifonado com um filtro para evitar a fuga de camarões.

Para eliminar possíveis vetores, a água utilizada nos bioensaios foi retirada do canal e do reservatório da fazenda, e desinfetada com 20 PPM de Hipoclorito de Sódio por 24 h, desclorada com 10% de Tio-sulfato de Sódio e filtrada até 5 micras e 1 micra.

A salinidade de água para os aquários foi de 35 PPT. A temperatura média foi de 28° C, com mínimo de 25°C pela manhã.

Para a realização destes bioensaios, Aqualider e Aquafort ofereceram gratuitamente apoio logístico e equipe técnica.

Os testes foram realizados durante um período de 6 semanas na fazenda Aquafort, localizada em Camocim-CE, onde se instalou uma infra-estrutura com todos os equipamentos necessários. Os tecidos foram retirados de camarões provenientes de viveiros infectados e com mortalidade associada a NIM

Para assegurar que os camarões dos bioensaios estivessem inicialmente livres dessa doença, foram utilizados camarões juvenis do Centro de Reprodutores da Aqualider,

que os cultiva desde os estágios larvais dentro do próprio laboratório como fator de biosegurança.

## RESULTADOS

Para analisar de forma combinada os resultados dos cinco bioensaios, em todos eles observamos as variáveis e os fatores comuns que são: mortalidade média, mortalidade máxima, mortalidade nos controles e a diferença entre a mortalidade média dos controles e dos animais infectados.

### Observação da infecção

Os juvenis dos bioensaios não apresentaram nenhum sintoma visual de doença até o 5º dia dos experimentos. Após o 5º dia, foram observados pontos vermelhos nos uropódios. No 6º dia os camarões apresentaram uma espécie de anel branco no seguimento do abdômen e, também, manchas brancas ou opacidades. Essa sintomatologia é similar àquela observada nos viveiros suspeitos contaminados pela NIM. Os juvenis dos bioensaios foram guardados em três lotes: controle, positivos e mortos, fixados em solução Davison para serem analisados pelo laboratório Labomar - Universidade Federal de Fortaleza, visando a detecção e identificação da NIM.

### Mortalidade

No 7º dia começamos a recolher os camarões mortos que mostraram sinais típicos da NIM. Esta forma de mortalidade continuou até o 11º dia e não houve mortalidade depois do 15º dia. Nos bioensaios B#1 e B#2, alimentados com maiores doses de tecidos infectados, houve maior mortalidade.

Ao final dos bioensaios os camarões foram contados e em todos os aquários faltaram camarões em um número não superior a 2, de uma população inicial de 25, a que possivelmente atribui-se a canibalismo durante o período noturno. Estes foram contabilizados dentro da mortalidade total dos bioensaios.

Os controles duraram 21 dias e não foi observado infecção alguma, mas em todos os controles existiu mortalidade.

### Bioensaio B#1 - Infecção através da ingestão de tecido contaminado:

A aplicação com a dosagem de 0,2 g de material infectado resultou em 4,33 mortos ou 17,3%; de 1,6 g, 8,67 mortos ou 34,7%. Nos controles, a mortalidade média foi de 1,33 animais ou 5,4%.

### Bioensaio B#2 - Infecção através de água inoculada com extrato de camarão contaminado:

A aplicação com a dosagem de 0,2 mL de extrato infectado resultou 2,33 mortos ou 9,3%; de 1,6 mL, 4,67 mortos, ou 18,7%. Nos controles, a mortalidade média foi de 1,67 animais ou 6,7%.

### Bioensaio B#3 - Infecção através da ingestão de fezes de aves alimentadas com camarões contaminados:

A aplicação de 1,6 g de fezes de patos alimentados com camarões contaminados resultou em 4 mortos ou 16%; na de não contaminados resultou em 2,67 mortos ou 10,7%. Nos controles, a mortalidade média foi de 2,33 animais, ou 9,3%.

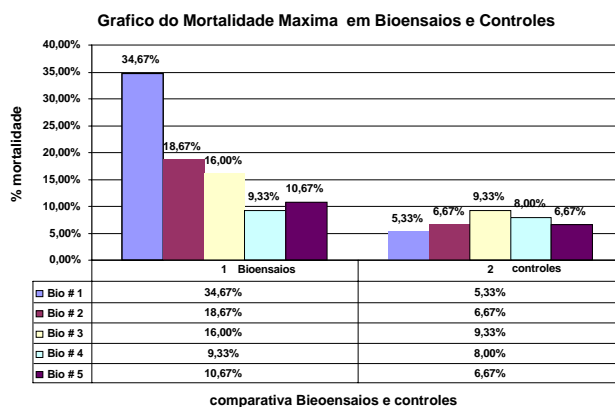
### Bioensaio B#4 - Infecção horizontal através de efluentes de populações de camarões contaminados:

Neste bioensaio os camarões foram expostos aos efluentes, fezes e restos de alimentos de aquários de camarões contaminados. Nos aquários com juvenis não contaminados a mortalidade foi de 2,33 animais ou 9,3%. A

mortalidade dos controles foi de 2 animais ou 8%.

### Bioensaio B#5- Infecção através da ingestão de biomassa da Artemia adulta viva alimentada com uma emulsão de camarões contaminados:

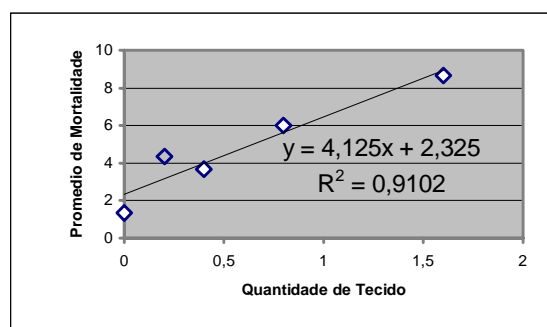
A aplicação de biomassa da Artemia adulta alimentada com emulsão de camarões contaminados resultou em mortalidade de 2,67 animais, ou 10,7%; com biomassa de Artemia adulta alimentada com camarões não contaminados foi de 1,67 animais ou 6,7%. Nos controles, a mortalidade foi de 1,67 animais ou 6,67%.



## CONCLUSÕES

Analisando a mortalidade dos bioensaios pode-se assumir:

1. A maior transmissibilidade ocorreu com a ingestão de tecido contaminado em B#1 no qual a dose de 1,6 g causou uma mortalidade de 34,7%, muito superior à segunda maior mortalidade de 18,7% ocorrida em B#2.
2. Embora não dispuséssemos técnicas laboratoriais para quantificar as concentrações de NIM nos inóculos preparados, foi observada uma forte relação diretamente proporcional entre a mortalidade e a quantidade, em gramas, de tecidos contaminados ( $R^2=0,9102$ ), conforme demonstrado em B#1 e ilustrado no gráfico abaixo. Este alto grau de correlação dá confiança e sustentação para as demais doses aplicadas nos bioensaios.



### Bioensaio 1

3. Em B#3, em cujo caso utilizamos fezes de patos alimentados com camarões infectados, não observamos mortalidade significativa sobre os controles, indicando, aparentemente a contaminação não sobrevive ao sistema digestivo do pato.

4. Em B#4 e B#5, nos quais testamos a transmissão via efluentes de camarões infectados, e *Artemia* alimentada com tecido contaminado, respectivamente, não observamos mortalidade significativa sobre os controles. Portanto, estatisticamente não podemos afirmar infecção por estes meios.

5. Em B#1 foi administrada uma alta dose de tecidos infectados, equivalente a 50% da biomassa existente, mas a mortalidade não foi maior a 34,7%. Podemos presumir que a população o remanescente de aproximadamente dois terços, tolerou ou resistiu a contaminação, sugerindo uma baixa patogenicidade quando comparada com outras doenças de camarão, a exemplo da Mancha Branca.

6. Não se observou mortalidade representativa por contaminação horizontal nos controles, sugerindo que: a) o método de desinfecção da água utilizada em todos os bioensaios foi eficaz, b) a contaminação cruzada não foi significativa e c) os camarões juvenis oriundos do Centro de Reprodutores da Aqualider estavam livres dessa doença no momento dos bioensaios.

## **OBSERVAÇÕES**

Nestes bioensaios observamos que o maior vetor de transmissão dessa patologia ocorreu por ingestão direta de tecidos contaminados, e que os outros vetores de transmissão

horizontal como água, fezes e outros crustáceos demonstraram ser relativamente ineficazes, bem como observamos uma baixa patogenicidade quando comparada com a da Mancha Branca. Isto pode explicar a baixa velocidade com que esta patologia tem se dispersado, estando neste momento, aparentemente, contida nos Estados do Piauí, Ceará e Rio Grande do Norte. E, sendo este o caso, medidas de biosegurança podem mitigar sua possível transmissão horizontal das regiões contaminadas para as regiões ainda não contaminadas.

Agora que temos técnicas científicas para contaminar camarões quantitativamente, devemos desenvolver novos bioensaios para estudar fatores ambientais que influenciem a patogenicidade e transmissibilidade desta doença.

Outros bioensaios necessitam serem desenvolvidos especificamente para estudar a transmissão vertical, que apresentam fator de risco de contaminação de náuplios e pós-larvas originados de reprodutores contaminados.

Os resultados individuais e detalhados dos bioensaios aqui apresentados, bem como os métodos e procedimentos utilizados, estão documentados e disponíveis na ABCC.

Agradecemos a cooperação do Diretor da Aquafort, Blgo. Diego Buenaventura e o Diretor da Aqualider, Eng. Manoel Tavares.