



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS ANIMAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

EMANUELLY CRISTINA RODRIGUES PEIXOTO

**IDENTIFICAÇÃO E GENOTIPAGEM DO VÍRUS DA SÍNDROME DA
MANCHA BRANCA (WSSV) ISOLADO DE *Litopenaeus vannamei* NO ESTADO
DO RIO GRANDE DO NORTE**

MOSSORÓ - RN
2016

EMANUELLY CRISTINA RODRIGUES PEIXOTO

**IDENTIFICAÇÃO E GENOTIPAGEM DO VÍRUS DA SÍNDROME DA
MANCHA BRANCA (WSSV) ISOLADO DE *Litopenaeus vannamei* NO ESTADO
DO RIO GRANDE DO NORTE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), como exigência final para obtenção do título de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal.

Orientador: Dr. Sidnei Miyoshi Sakamoto - UFERSA

MOSSORÓ - RN
2016

© Todos os direitos estão reservados a Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996 e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tomar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata. A mesma poderá servir de base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) sejam devidamente citados e mencionados os seus créditos bibliográficos.

Pi Peixoto, Emanuely Cristina Rodrigues.
IDENTIFICAÇÃO E GENOTIPAGEM DO VÍRUS DA
SÍNDROME DA MANCHA BRANCA (WSSV) ISOLADO DE
Litopenaeus vannamei NO ESTADO DO RIO GRANDE DO
NORTE / Emanuely Cristina Rodrigues Peixoto. -
2016.
47 f. : il.

Orientador: Sidnei Miyoshi Sakamoto.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal
Rural do Semi-árido, Programa de Pós-graduação em
Ciência Animal, 2016.

1. WSSV. 2. ORF 75. 3. ORF 94. 4. ORF 125. 5.
VNTR. I. Sakamoto, Sidnei Miyoshi, orient. II.
Título.

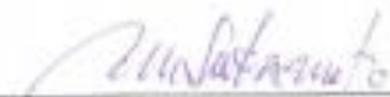
EMANUELLY CRISTINA RODRIGUES PEIXOTO

**IDENTIFICAÇÃO E GENOTIPAGEM DO VÍRUS DA SÍNDROME DA
MANCHA BRANCA (WSSV) ISOLADO DE *Litopenaeus vannamei* NO ESTADO
DO RIO GRANDE DO NORTE**

Dissertação apresentada à Universidade
Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA),
como exigência final para obtenção do
título de Mestre no Curso de Pós-
Graduação em Ciência Animal.

Aprovação em 31 de agosto de 2016

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Sidnei Miyoshi Sakamoto – UFERSA
(Orientador Presidente)



Prof. Dr. Pedro Carlos Cunha Martins – UFERSA
(Examinador)



Prof. Dra. Cibele Soares Pontes – UFRN
(Examinador)

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

EMANUELLY CRISTINA RODRIGUES PEIXOTO nasceu no dia 25 de junho de 1987 na cidade de Paraú/RN. Cursou Aquicultura (Bacharelado) na UFRN de 2007 a 2010. No triênio seguinte foi bolsista de Desenvolvimento Tecnológico e Industrial do CNPq, atuando no Centro de Saúde de Animais Aquáticos na UFRN, com atividades relacionadas ao desenvolvimento sanitário da carcinocultura do estado do Rio Grande do Norte. Lecionou disciplinas de “enfermidades de organismos aquáticos cultiváveis”, “patologia de organismos aquáticos cultiváveis” e “ranicultura” na Escola Agrícola de Jundiá como professora substituta da UFRN em 2013 e 2014. Foi discente de mestrado do Programa de Pós Graduação em Ciência Animal da UFERSA entre os anos de 2014 e 2016.

*À minha filha amada
Tarsila, principal fruto desse mestrado e,
incentivo dessa conquista.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus por todo seu amor e misericórdia por mim.

A minha amada filha Tarsila. Meu maior incentivo e melhor fruto.

Aos meus amados pais, Maria e Erivaldo. Meus primeiros e maiores incentivadores, apoiadores e viabilizadores desse sonho.

A minha querida amiga Vivi, pela persistência, entusiasmo e ensinamentos. Esse título também é graças a você.

A meu marido Aryson, pelo companheirismo, compreensão e apoio.

Ao querido professor e orientador Sakamoto, pessoa incrível que tive o prazer de conhecer. Muito obrigada pelos ensinamentos, compreensão, ajuda, apoio, colaboração, atenção. Sua participação ativa foi determinante para esse feito.

Ao professor Jean Berg e todos os colaboradores do programa da Pós Graduação em Ciência Animal, pela dedicação, empenho e carinho destinado em busca de um mestrado sempre melhor.

A Rebeca, Germana e Bruno pela parceria na execução do trabalho. Sem vocês não teria conseguido. A todos minha infinita gratidão.

A querida Inês pelo acolhimento em seu lar, pela partilha de seu teto, pela comida quentinha e o quarto arejado. Eu conheci uma linda pessoa e sua generosidade cega. Você é parte dessa história.

As minhas Cristinas: Werona, Natália, Fernanda e Maurina pela divisão da casa, dos dias, das tristezas e alegrias. Minha família em Mossoró.

Aos professores, pelos ensinamentos, estímulos e motivação para o nosso melhor aprendizado.

Ao professor Pedro Martins pelo primeiro incentivo e confiança. O senhor é o primeiro responsável dessa caminhada.

Aos responsáveis técnicos Leleu, Jailson, Tennyson e Huidenbergue pela disponibilidade em colaborar com nosso trabalho.

As minhas amigas Leila e Aline, pela torcida, motivação e vibração. Vocês deram ânimo aos meus momentos difíceis.

IDENTIFICAÇÃO E GENOTIPAGEM DO VÍRUS DA SÍNDROME DA MANCHA BRANCA (WSSV) ISOLADO DE *Litopenaeus vannamei* NO ESTADO DO RIO GRANDE DO NORTE

PEIXOTO, Emanuely Cristina Rodrigues. **Identificação e genotipagem do vírus da síndrome da mancha branca (WSSV) isolado de *Litopenaeus vannamei* no estado do Rio Grande do Norte**. 2016. 38f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal: Sanidade Animal) - Universidade Federal Rural do Semi árido (UFERSA), Mossoró- RN, 2016.

RESUMO: A síndrome da mancha branca é uma doença notificável cujo agente etiológico é o Vírus da Síndrome da Mancha Branca (White Spot Syndrome Virus - WSSV) responsável por graves perdas econômicas na carcinicultura mundial. Desde 2012, têm sido verificados registros oficiais da presença do vírus no estado do Rio Grande do Norte - RN , região de extensa produção camaroneira. Apesar da importância, pouca informação tem sido produzida quanto às origens e biodiversidade dos vírus circulantes. Diante disso, objetivou-se investigar a presença do vírus em criações de *Litopenaeus vannamei* oriundos de fazendas do RN, bem como realizar a genotipagem dos isolados. Um total de cinco fazendas foram submetidas ao estudo, das quais foram coletadas 10 amostras de cada. Foram selecionados dois viveiros de cada uma das fazendas, escolhidos mediante suspeita clínica de WSSV. O DNA genômico foi extraído para investigação da presença ou ausência do vírus através da reação em cadeia da polimerase (PCR). Posteriormente, foi realizada por PCR a genotipagem dos isolados utilizando as repetições em tandem de número variável – VNTR (ORFs 75, 94 e 125). Os resultados revelaram a presença do vírus em apenas uma das 5 fazendas analisadas. As regiões (ORF 75 e ORF 94) foram identificadas nos isolados da fazenda positiva e não houve amplificação para o ORF 125. O número de unidades repetidas (RUs) foi calculado, sendo verificado 9 repetições para o ORF 75 e 10 para o ORF 94, um padrão que ainda não havia sido descrito, alertando para a necessidade de mais isolados caracterizados geneticamente para o rastreamento e vigilância epidemiológica da doença.

PALAVRAS-CHAVES: WSSV, ORF 75, ORF 94, ORF 125, VNTR.

**IDENTIFICATION AND GENOTYPING OF WHITE SPOT SYNDROME
VIRUS (WSSV) ISOLATED FROM *Litopenaeus vannamei* IN THE STATE RIO
GRANDE DO NORTE**

PEIXOTO, Emanuely Cristina Rodrigues. **Identification and genotyping of white spot syndrome virus (WSSV) isolated from *Litopenaeus vannamei* in the state Rio Grande do Norte**. 2016. 38 f . Dissertation (Masters in Animal Science : Animal Health) - Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA) Mossoró- RN, 2016

ABSTRACT: White spot syndrome is an acute contagious disease whose etiologic agent is the White Spot Syndrome Virus (WSSV) responsible for serious economic losses in world aquaculture. Since 2012, it has been notified WSSV occurrence in the state of Rio Grande do Norte - RN, one of most important shrimp production region. Despite its importance, there is a lack of information about the origins and biodiversity of circulating virus. The aim of investigation was to detect WSSV in *Litopenaeus vannamei* from farms in the RN as well as perform genotyping of the isolates. A total of five farms were surveyed, from which 10 samples were collected each one. We selected two ponds of each of the farms, chosen because clinical suspicion of WSSV. Genomic DNA was extracted to detect the virus by polymerase chain reaction (PCR). Subsequently, was performed by PCR genotyping of the positive DNA samples analysing variable number of tandem repeats - VNTR in three molecular markers (ORFs 75, 94 and 125). The results revealed the presence of virus in only one of the 5 analyzed farms. The loci ORF 75 and ORF 94 were identified in isolates from positive farm and no amplification failure for ORF 125. The number of repeating units (RUs) was calculated, and found to 9 repetitions ORF 75 and 10 RUs to ORF 94, a pattern that had not been described, stressing the need for more strain typing for screening and surveillance of the disease.

KEYWORDS: WSSV, ORF 75, ORF 94, ORF 125, VNTR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Eletroforese em gel de agarose para pesquisa do WSSV por PCR. L: Ladder 100pb; CN: Controle Negativo; Amostras positivas: 11 – 15 e 17 - 20. _____ 13

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição das amostras de camarões *Litopenaeus vannamei* coletadas no estado do Rio Grande do Norte. _____ 11

Tabela 2. - Iniciadores utilizados na PCR para detecção e genotipagem do WSSV. ___ 12

Tabela 3. Variações no número de unidades repetidas nos ORF75, ORF94 e ORF125 do WSSV em diferentes regiões geográficas. _____ 16

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

% - Porcentagem

°C – grau Celsius

ABCC – Associação Brasileira de Criadores de Camarão

pb – pares de base

CSAq – Centro de Saúde de Animais Aquáticos

DNA – Ácido desoxirribonucléico

DOL – Departamento de Oceanografia e Limnologia

EUA – Estados Unidos da América

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations

IHHN – Necrose hematopoiética e hipodermal infecciosa

Kb – Kilos de pares de base

MAPA – Ministério Agricultura Pecuária e Abastecimento

NHP – Hepatopancreatite necrosante

NIM – Mioncrose Infecciosa

nm – nanômetros

ORF – Região Aberta de Leitura

PCR – Reação da Cadeia em Polimerase

RUs – Unidades Repetidas

UFERSA – Universidade Federal do Rio Grande do Norte

UFRN – Universidade Federal do Rio Grande do Norte

UV – Ultravioleta

VNTR – Número variável de repetições em tandem

VP26 – Proteína viral 26

WSSV – Vírus da Síndrome da Mancha Branca

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS	3
2.1	GERAL	3
2.2	ESPECÍFICOS	3
3	REVISÃO DE LITERATURA	4
3.1	PANORAMA DA PRODUÇÃO DE CAMARÃO	4
3.2	<i>Litopenaeus vannamei</i>	4
3.3	CARCINOCULTURA NO BRASIL	5
3.3.1	Histórico	5
3.3.2	Perfil da carcinocultura brasileira	6
3.4	SÍNDROME DA MANCHA BRANCA	7
3.5	VÍRUS DA SÍNDROME DA MANCHA BRANCA (WSSV)	8
3.6	DIAGNÓSTICO MOLECULAR DO WSSV	8
4	MATERIAIS E MÉTODOS	10
4.1	COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	10
4.2	DETECÇÃO E GENOTIPAGEM DO WSSV POR PCR	11
4.2.1	Extração do DNA genômico	11
4.2.2	PCR para detecção do WSSV	11
4.2.3	Genotipagem do WSSV através da análise de VNTRs	11
4.2.4	Visualização dos produtos da PCR	12
4.3	APLICAÇÃO DE QUESTIONÁRIO PARA CARACTERIZAÇÃO TECNOLÓGICA DAS FAZENDAS POSITIVAS	12
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	13
6	CONCLUSÃO	17
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	18
	APÊNDICE	24

1 INTRODUÇÃO

A carcinicultura é a principal responsável pelo abastecimento de camarão ao mercado consumidor, fornecendo 55% de toda produção desse crustáceo (FAO, 2012). O Brasil está entre os 25 países mais produtores de camarão, contribuindo com 65.100 toneladas no ano de 2014 (FAO, 2016). Associada à importância na oferta desse crustáceo, também é observada a geração de impactos sociais e econômicos nas regiões onde se desenvolve essa atividade. (FAO, 2014). Todavia, a carcinicultura e seus progressos podem estar comprometidos devido a manifestação de doenças que oferecerem risco à produção (STENTIFORD et al., 2012)

Na China, maior produtor aquícola, foi registrado perda de 295.000 toneladas de camarão devido a doenças no ano de 2010 e, em Moçambique os surtos praticamente exterminaram a carcinicultura no país em 2011 (FAO, 2012). No continente americano Lightner et al. (2012), calcula perdas de 1 a 2 bilhões de dólares relacionadas ao aparecimento do WSSV na produção camaroneira no ano de 1999, período que houve uma pandemia do vírus no setor.

A síndrome da mancha branca é uma doença que provoca altas mortalidades nos camarões criados em cativeiro, podendo atingir até 100% entre 2 e 7 dias (CHOU et al., 1995). Seu agente etiológico é o Vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV), o qual possui DNA fita dupla e um dos maiores genomas conhecidos entre os vírus, aproximadamente 290 kb (YANG et al., 1997). Algumas regiões do seu material genético podem servir como marcadores moleculares em estudos evolutivos e epidemiológicos. Dessas, os minissatélites ORF75, ORF 94 e ORF125 apresentam polimorfismo do tipo VNTR (*variable Number of Tandem Repeats*) e já foram estudadas no rastreamento de surtos, pois os padrões moleculares encontrados apresentam assinaturas geográficas do WSSV (DIEU, et al., 2004; MARKS et al., 2004).

Perdas acentuadas na produção de camarão devido ao surgimento da mancha branca bem como heterogeneidade na manifestação clínica da doença nos diferentes polos produtores no estado do Rio Grande do Norte foram verificadas no período de 2010 a 2013 pelo Programa de Saúde nas Fazendas de Camarão (PSF-camarão), trabalho de extensão desenvolvido pelo Centro de Saúde de Animais Aquáticos (CSAq) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN). Este fato, associado a falta de dados publicados sobre o RN, segundo maior produtor nacional (ABCC, 2013),

reitera a importância de estudos sobre a epidemiologia do WSSV na região, sendo necessária a realização de pesquisas que busquem compreender a dinâmica da doença nas fazendas de cultivo, como forma de fornecer subsídios que possibilitem ajudar na prevenção do seu aparecimento e disseminação.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Identificar e realizar a genotipagem do vírus da síndrome da macha branca (WSSV) isolado de camarões (*Litopenaeus vannamei*) cultivados no Estado do Rio Grande do Norte.

2.2 ESPECÍFICOS

Verificar as propriedades positivas para o WSSV;

Realizar a genotipagem dos isolados a partir dos padrões VNTR encontrados.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 PANORAMA DA PRODUÇÃO DE CAMARÃO

A carcinicultura teve início no Sudeste da Ásia, região que continua líder nessa atividade, e desde a década de 70 teve grande expansão (ABREU et al., 2011). Parte desse crescimento ocorreu a partir de 1980 e foi causado pela consolidação das larviculturas e fábricas de ração (SHANG et al., 1998). Esse aumento contínuo e gradual, com taxas de crescimento de 5.3% (2006 a 2011) (ABCC, 2013) levou a uma produção de quase 7 milhões de toneladas em 2014 (FAO, 2016)

No cenário mundial a China é o líder desse agronegócio, contribuindo com 57% de produção anual (cerca de quase 4 milhões de toneladas), acompanhando a tendência de seu continente Asiático, de maior produtor aquícola. No continente Americano, além do Equador e os Estados Unidos (EUA), o Brasil tem destaque no setor camaroneiro, produzindo no ano de 2014 65.100 toneladas de camarão (FAO, 2016).

Esse agronegócio passou por mudança na exploração das espécies cultivadas. No início dos anos 2000 o setor era dominado pelo camarão *Penaeus monodon* e uma pequena parcela do *Macrobrachium rosenbergii*, *Penaeus chinensis* e *Penaeus japonicus*, que juntos produziam cerca de 730.000 toneladas. Ao longo dos 15 anos seguintes houve um salto na produção global causado pelo incremento médio de 298% na criação do *Litopenaeus vannamei*, espécie que mais cresceu e domina o setor, é responsável por 78% de todo camarão produzindo mundialmente (ROCHA, I. 2016).

3.2 *Litopenaeus vannamei*

A espécie *Litopenaeus vannamei* é um camarão marinho, nativo do Oceano Pacífico, com ocorrência natural entre a região costeira do México e Peru (DALL et al, 1990). Sua classificação taxonômica foi descrita por Pérez-Farfane e Kensley (1997) e se apresenta da seguinte forma:

Filo: Artropóda

Classe: Malacostraca

Ordem: Decápoda

Subordem: Dendobranchiata

Superfamília: Penaeoidea

Família: Penaidae

Gênero: *Litopenaeus*

Espécie: *L. vannamei*

O ciclo de vida da espécie ocorre com a reprodução dos machos e fêmeas maduras sexualmente, a partir de 20 g e 28 g, respectivamente o que acontece entre 6 ou 7 meses de vida, em mar aberto. Posteriormente a migração das pós larvas para a região estuarina, onde passam toda a fase juvenil e adulta, quando, então, retornam ao mar novamente para finalizarem o ciclo de vida (DALL et al, 1990)

Características zootécnicas favoráveis ao cultivo, como crescimento acelerado, baixa conversão alimentar, rusticidade e elevada taxa de sobrevivência são notadas nesse crustáceo (PIÉRRRI, 2012). A elevada capacidade de adaptação a variadas condições hidroquímicas que a espécie possui (LOEBMANN, 2010) também colabora para o bom desempenho na atividade.

3.3 CARCINOCULTURA NO BRASIL

3.3.1 Histórico

A carcinicultura no Brasil teve início nos anos 70, no estado do Rio Grande do Norte com o projeto “Projeto Camarão” criado pelo Governo do Estado, com o objetivo de substituir a atividade de extração de sal, que entrava em crise. Dando suporte a nova prática aquícola, o Estado de Santa Catarina desenvolveu pesquisas relacionadas as larvicultura de camarão e conseguiu produzir as primeiras pós-larvas em laboratório da América Latina. Apesar do êxito, a prática se desenvolveu devido a importação de *Penaeus japonicus*, e era caracterizada por cultivos de baixa densidade e utilização de pouca tecnologia (ABCC, 2016).

A Empresa de Pesquisas Agropecuárias do Rio Grande do Norte (EMPARN) contribuiu para os resultados favoráveis nos primeiros três anos de trabalhos, o que estimulou incentivos financeiros da iniciativa privada da época. Porém nos anos seguintes os problemas ambientais, falta de organização do setor e insucesso com domesticação de espécies nativas (*Farfantepenaeus subtilis*, *Farfantepenaeus paulensis* e *Litopenaeus schimitti*) comprometeu o desenvolvimento da atividade. (ABCC, 2016).

O setor retomou seu crescimento e se consolidou a partir de 1995 com a excelente adaptação do *Litopenaeus vannamei*, o domínio da reprodução dessa espécie e

aquisição do pacote tecnológico do mesmo (ABCC, 2016). Contudo a partir de 2004, a atividade sofreu nova crise com o aparecimento de doenças. No primeiro momento a mionecrose infecciosa no Nordeste e, em seguida com a mancha branca (NATORI et al., 2011).

3.3.2 Perfil da carcinocultura brasileira

A criação de camarão brasileira é uma atividade com predomínio na região Nordeste, onde são localizadas 1.429 fazendas engorda de camarão, das 1.545 (em sua maioria micro produtores), distribuídas no país e, a produção de mais de 90% de camarão nacional. O Ceará e Rio Grande do Norte são os estados de maior destaque no setor, produzindo juntos cerca de 50 mil toneladas (ABCC, 2013).

A atividade é bastante heterogênea com relação ao uso de tecnologias no processo de engorda de camarões (TAHIM et al., 2015). A ABCC (2013) em seu último levantamento do setor verificou o uso de comedouros fixos em 82% das fazendas, utilização de probióticos por 33% das propriedades, emprego de aeradores em 42% dos empreendimentos e realização de análises hidrológicas periódicas por 24% das empresas. Mostrando uma falta de uniformidade na aplicação de ferramentas para otimizar a produção.

Essa atividade apesar de consolidada no setor aquícola brasileiro, apresenta problemas que afetam o seu progresso. Entre eles os que estão relacionados às enfermidades são citados como principal desafio a ser superado (ROCHA, I. 2011). Martins (2006) alerta sobre o impacto negativo gerado no fluxo de caixa da fazenda, devido ao comprometimento do desempenho zootécnico nos animais criados nas propriedades. No cenário nacional, as principais doenças registradas no país de origem bacteriana são as vibrioses e a hepatopancreatite necrosante, e as de origem virais é a necrose hematopoiética e hipodermal infecciosa, mionecrose infecciosa e a macha branca (GESTEIRA, 2006).

3.4 SÍNDROME DA MANCHA BRANCA

A síndrome da mancha branca teve seus primeiros registros de surgimento em 1992, quando foi verificado quadros de mortalidade em massa nos cultivos de camarões *Penaeus japonicus* no Norte de Taiwan (CHOU et al., 1995). No ano seguinte foi registrado cenário semelhante no Japão (TAKAHASHI et al., 1994) e em 1994 nos cultivos de camarões da Tailândia, Índia e Malásia (WONGTEERASUPAYA et al., 1996). Essas características de gravidade da doença e do risco de disseminação transfronteira fizeram com que fosse incluída na lista de doenças notificáveis da OIE — *Office International des Epizooties* – Organização Mundial de Saúde Animal (OIDTMANN; STENTIFORD, 2011). Até os dias atuais, surtos ou focos da doença foram relatados em quase todos os países produtores, sendo considerados livres dessa doença a Austrália e algumas zonas da África, de acordo com as diretrizes estabelecidas pelo Código de Saúde de Animal aquático do OIE (LIGHTNER et al., 2012).

A primeira notificação dessa doença no Brasil ocorreu em 2005 em camarões marinhos *Litopenaeus vannamei* criados no estado de Santa Catarina. O relato foi referente a um surto no ano anterior, que provocou mortalidade de 95%. Ainda em 2005, foi registado outro surto no Ceará, região Nordeste do país, porém, com mortalidade menor em relação ao caso anterior, 40% e o relatório completo desses dois episódios está disponível na base de dados mundial de saúde animal WAHID (OIE, 2005). No Rio Grande do Norte, não havia registro oficial da presença do WSSV até o ano de 2011, mas existia grande evidência (quadro clínico característico) da presença da enfermidade na região do Litoral Sul do estado. Em 2012 a doença foi confirmada na região descrita nas fazendas do Rio Grande do Norte por Guerrelhas & Teixeira (2012).

A mancha branca é uma doença conhecida por provocar altas mortalidades em cultivos de camarões, podendo comprometer toda produção em 2 a 7 dias. O animal doente apresenta pontos brancos na carapaça, coloração avermelhada / rosada e torna-se moribundo (CHOU et al., 1995; WONGTEERASUPAYA et al., 1996). A enfermidade pode ocorrer em todas as fases de vida do camarão, porém é com um ou dois meses de povoamento em viveiro de engorda que são mais susceptíveis (WONGTEERASUPAYA et al., 1996). O agente etiológico dessa doença é nomeado de vírus da síndrome da mancha branca (WSSV).

3.5 VÍRUS DA SÍNDROME DA MANCHA BRANCA (WSSV)

O WSSV é um vírus pertencente a família Nimarividae (ICTV, 2015), que infecta diversos crustáceos como variadas espécies de camarão, caranguejos e lagosta (RAJENDRAN et al., 1999). Organismos formadores do plâncton, como rotíferas, também são hospedeiros desse agente (ZHANG et al., 2006).

Esse vírus possui forma elíptica, tamanho médio entre 110 – 130 nm de diâmetro e 260 – 350 nm de comprimento e, com cauda longa semelhante a um flagelo bacteriano (HUANG et al., 2001). Seu material genético é DNA fita dupla circular constituído por cerca de 300 kpb (VAN HULTEN et al., 2001; YANG et al., 2001).

O sequenciamento do seu genoma revelou 184 fases abertas de leitura (Open Reading Frames) ORFs e, nove regiões com sequências de repetição em Tandem (VAN HULTEN et al., 2001). Dieu et al. (2004) e Marks et al. (2004) analisando os genomas dos três isolados disponíveis (China, Taiwan e Tailândia) identificaram que algumas dessas regiões podem ser utilizadas como marcadores moleculares em estudos evolutivos e epidemiológicos.

3.6 DIAGNÓSTICO MOLECULAR DO WSSV

O Manual de Testes de Diagnóstico para Animais Aquáticos (OIE, 2015) recomenda o exame de PCR proposto por Lo et al.,(1996a) e Lo et al., (1996b) como ferramenta para diagnóstico da presença de WSSV. Nesse teste é identificado um fragmento DNA-Sall do DNA do WSSV, que ao ser reconhecido pelos conjuntos dos iniciadores originam produtos de amplificação de 1447 pb. Segundo Marques et al (2006) essa é uma região conservada do vírus, que pode ser detectada facilmente quando os animais apresentam sintomatologia, sendo útil no diagnóstico de ausência ou presença do vírus.

Para investigações que necessitem o monitoramento da presença do camarão como hospedeiro, na reação de PCR, é utilizada a região da proteína viral 26 (VP26) como triagem, para aplicação de testes posteriores. O par de primers amplifica parte da VP26 do WSSV, e seu produto, em seguida, pode analisado por outros testes moleculares (XIE e YANG, 2005).

Devido às poucas diferenças existentes entre os isolados, repetições em tandem de número variável (VNTR) associadas com 3 regiões minissatélites (ORF 94, 75 e

125), têm sido sugeridas para estudos epidemiológicos (WONGTEERASUPAYA et al., 2003, MARKS et al., 2005, PRADEEP et al. 2008) pois apresentam padrões moleculares que servem de assinaturas geográficas e com isso auxiliam o na identificação de surtos (DIEU et al, e MARKS et al, 2004).

Diante do exposto, este estudo objetivou detectar a presença do vírus em fazendas localizadas no estado do Rio Grande do Norte e avaliar o genótipo dos isolado de WSSV em relação a isolados de outras origens geográficas a partir dos marcadores ORF75, ORF94 e ORF 125.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

Foram coletados um total de 50 amostras de camarões da espécie *Litopenaeus vannamei* de cinco fazendas de engorda dos municípios de São Gonçalo do Amarante, Macaíba, Extremoz e Arêz no estado do Rio Grande do Norte, nos anos de 2015 e 2016 (Tabela 1).

Dez camarões foram coletados de cada propriedade trabalhada divididos em cinco de cada viveiro escolhidos de acordo com os seguintes critérios: presença de problemas relacionados a mortalidade, diminuição no ganho de peso dos animais cultivados e/ou alimentação reduzida.

A coleta das amostras foi realizada com o auxílio de tarrafas diretamente das bordas dos viveiros e encaminhadas em caixas isotérmicas para o Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal Rural do Semi-árido – UFERSA, onde as análises foram realizadas. Destes camarões retiraram-se as brânquias e pleópodos com auxílio de pinças individuais previamente esterilizadas com álcool 70% e luz ultravioleta – UV. Posteriormente, estas amostras foram transferidas para microtubos de 2 ml adicionados de álcool absoluto (100 %) em quantidade suficiente para sua submersão e mantidas em freezer a -20°C até o momento da realização das análises moleculares.

Tabela 1. Descrição das amostras de camarões *Litopenaeus vannamei* coletadas no estado do Rio Grande do Norte.

Fazendas	Municípios	Período de coleta	Peso (g)	Tempo de cultivo (dias)	Densidade (cam/m ²)
A	São Gonçalo do Amarante	Setembro/2015	1,5	31	6
			1,5	31	6
B	São Gonçalo do Amarante	Setembro/2015	15	77	3
			7	29	8
C	Macaíba	Maio/2016	6	N.I.	15
			8	N.I.	15
D	Extremoz	Maio/2016	2	15	5
			2	15	5
E	Arêz	Maio/2016	3,6	N.I.	51
			13,5	N.I.	30

N. I.- Não Informado

4.2 DETECÇÃO E GENOTIPAGEM DO WSSV POR PCR

4.2.1 Extração do DNA genômico

Após a lavagem em etanol, o DNA das amostras foi o purificado utilizando o kit de extração QIAmp DNA mini kit (Qiagen) de acordo com o protocolo estabelecido pelo fabricante.

4.2.2 PCR para detecção do WSSV

Para investigação da presença do vírus nas amostras coletadas foi utilizado o primer denominado VP26, descrito na Tabela 2. As condições da PCR foram adaptadas de acordo com a metodologia descrita por (DEIU et al., 2004). No protocolo recomendado pela OIE (Lo et al, 1996 a e b) foram detectados resultados falsos positivos com *Cherax quadricarinatus* (CLAYDON et al, 2004).

4.2.3 Genotipagem do WSSV através da análise de VNTRs

Foram avaliadas três regiões minissatélites do genoma do WSSV com primers validados em publicações anteriores (ORF75, ORF94 e ORF125) (PRADEEP et al., 2008), conforme apresentado na Tabela 2. O número de unidades repetidas (Rus) presente em ORF 94 foi calculado como [amplicon tamanho - (171 + 12)] / 54. No caso do ORF 75, que tem repetições de tamanhos diferentes, o tamanho do amplicon foi usado para as comparações e o ORF 125 não foi calculado. Os VNTR (ORFs 75, 94 e 125) foram utilizados para comparação com outros isolados geográficos do WSSV.

Tabela 2 - Iniciadores utilizados na PCR para detecção e genotipagem do WSSV.

Gene	Primer	Sequência de Nucleotídeos (5'-3')	Produto Amplificado (Pb)	Posição no Genoma
Vp26	Vp26-F	ATGGAATTTGGCAACCTAACAAACCTG	304	
	Vp26-R	GGGCTGTGACGGTAGAGATGAC		
ORF94	ORF94-F	TCTACTCGAGGAGGTGACGAC	Variável	
	ORF94-R	AGCAGGTGTGTACACATTTTCAT		
ORF125	ORF125-F	TGGAAACAGAGTGAGGGTCA	Variável	
	ORF125-R	CATGTGCTACTATACGTTGAATCC		
ORF75	ORF75-F	GCCAGATTTCTTCCCCTACC	Variável	
	ORF75-R	CTCCATGTAGAGGCAAAGCA		

4.2.4 Visualização dos produtos da PCR

Os fragmentos de DNA amplificados, foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio. Os fragmentos foram visualizados em um transluminador ultravioleta (UV), e o gel foi fotografado para análise.

4.3 APLICAÇÃO DE QUESTIONÁRIO PARA CARACTERIZAÇÃO TECNOLÓGICA DAS FAZENDAS POSITIVAS

Nas fazendas positivas para o WSSV foi aplicado um questionário com perguntas abertas para serem respondidas pelo responsável, buscando uma melhor avaliação das causas da infecção pelo vírus. Nesse caso, foi importante incluir no questionário perguntas que possibilitassem a caracterização tecnológica das fazendas positivas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 5 fazendas investigadas, apenas a fazenda B foi positiva para o WSSV. Os resultados da amplificação das amostras positivas estão expressos na Figura 1. A presença do vírus da mancha branca (WSSV) foi confirmada em 90% dos animais amostrados da fazenda B. Essa propriedade possui histórico de elevadas mortalidades nos ciclos de cultivo desde o ano de 2013, associado a quadro clínico característico dessa doença, como camarão de coloração rosada e depósitos de cálcio na carapaça.



Figura 1 – Eletroforese em gel de agarose para pesquisa do WSSV por PCR. L: Ladder 100pb; CN: Controle Negativo; Amostras positivas: 11 – 15 e 17 - 20.

As demais fazendas foram negativas para o agente WSSV. Dessas, a propriedade A foi diagnosticada com mancha branca no ano de 2012, por exame histopatológico realizado pelo CSAq/DOL/UFRN. Na ocasião, foi verificado quadro clínico semelhante ao da fazenda B. Estudos para investigar a presença do WSSV em camarões, comumente utilizam a PCR e histopatologia em conjunto associado a sintomatologia da doença como ferramentas de diagnóstico. Cavalli et al. (2011) e Feijó et al. (2013) identificaram a presença do vírus em criações no estado do Rio Grande do Sul e Ceará, respectivamente fazendo uso simultâneo das técnicas citadas. Neste trabalho não foi

adotada a técnica histológica, o que poderia ajudar na identificação de mais amostras positivas.

As fazendas citadas encontram-se localizadas lado a lado, compartilhando a mesma fonte de água. Hoa et al. (2011); Hoa et al. (2012); Walker et al. (2011a); Walker et al. (2011b); Walker et al. (2011c); relatam a transmissão da doença tanque a tanque por meio de vetores, como crustáceos nativos e, água contaminada. Esse fato pode justificar as mortalidades atribuídas possivelmente a mancha branca em anos consecutivos (2012 e 2013), sugerindo uma contaminação entre propriedades.

Diante dos resultados positivos, foi aplicado um questionário para o responsável da fazenda B, localizada no município de São Gonçalo do Amarante, município inserido em um pólo produtor do estado do Rio Grande do Norte, que corresponde a 10% da produção do estado (ABCC, 2013).

Essa propriedade possui 30 hectares (ha) divididos em 14 viveiros retangulares de 2 ha, em média, operante desde 1999 para criação de camarões da espécie *Litopenaeus vannamei*. Conforme levantamento do MAPA (2001) o desenho da fazenda é característico das propriedades construídas na década de noventa e início dos anos 2000.

As seguintes informações foram obtidas através do questionário aplicado: a captação de água da fazenda B é realizada a partir do estuário do rio Potengi, aproveitando o nível da maré quando sobe, à semelhança de 61% dos produtores potiguares que também utilizam estuários como fonte de água para cultivar (ABCC, 2013). Esse ecossistema aquático sofre grande variação na salinidade de suas águas (SCHIMIEGELOW, 2004), sendo o habitat natural do *L. vannamei*. A espécie, portanto, é adaptada a diferentes faixas de salinidade, tendo sido descrito ótimo desempenho entre 15 e 25 partes por mil (VINATEA, 1997).

Na coleta de água é utilizada uma rede com malha de 200 micrômetros, com a finalidade de impedir a entrada de copépodos para o interior da fazenda. Tal prática é justificada pelo responsável como uma alternativa para minimizar a introdução do WSSV por esse organismo hospedeiro. Copépodos são pequenos crustáceos formadores do plâncton, encontrados em todos os ambientes aquáticos, de tamanhos que variam de 0,5 mm a 25 cm, (ROCHA, C. et. al., 2011), comprovadamente incluídos entre os diversos hospedeiros do WSSV (PRADEEP, et al., 2012). Apesar da maioria das espécies possuírem tamanho para retenção na rede, as espécies menores e os ovos desses microcrustáceos não são filtrados nesse tamanho de malha. Além desse fato, há

outros hospedeiros desse vírus, tais como rotíferas, siris e caranguejos (ZHANG et al., 2006) sem controle de entrada na propriedade.

Na engorda dos animais é adotada uma densidade de 5 camarões/m² com o objetivo de aproveitar o alimento natural disponível como principal fonte de nutrientes dos animais cultivados e diminuir a oferta de ração. Nessas condições, a fazenda produz camarão para despesca de 7 a 9 g em 35 a 45 dias, com uma sobrevivência média entre 40 a 70%. Trabalhos que associam densidades de cultivo e desempenho dos camarões cultivados apontam resultados positivos sobre ganho de peso e peso final em menores densidades de cultivos, como também densidades mais elevadas produzem maiores biomassa final e maiores custos, além de maiores riscos de perdas de estoque (ARNOLD et al., 2006; SOOKYING, et al., 2011; MÁRQUEZ, et al., 2012).

Enfermidades virais, como a mionecrose infecciosa (NIM) e a síndrome da mancha branca, são citadas no histórico da fazenda a partir de 2004 e 2013, respectivamente. Costa et al. (2009) relata os primeiros surtos da NIM no ano de 2002 no estado do Piauí no Nordeste brasileiro. Nos anos seguintes o vírus da mionecrose infecciosa (IMNV) se disseminou por todos os estados da região (GESTEIRA, 2006), semelhante com a época em que o surgimento da NIM foi observado na fazenda. Feijó et al. (2013) relata que a infecção do WSSV no Ceará, estado vizinho ao Rio Grande do Norte, ocorreu no mesmo período em que a síndrome da mancha branca é registrada nessa propriedade.

O histórico da síndrome da mancha branca nessa fazenda foi deduzido pelo relato de sinais clínicos característicos da doença (coloração rosada e depósitos de cálcio na carapaça) associado ao momento epidemiológico que a região passava. Além disso, levou-se em consideração a alta mortalidade observada dentro do período de poucos dias e a presença de garças próximas aos viveiros. Sinais semelhantes aos verificados nessa fazenda foram citados por Martins et al. (2006), com diagnóstico confirmado para a doença.

As nove amostras positivas para o WSSV foram submetidas a pesquisa de VNTR (ORFs 75, 94 e 125). Houve amplificação em 7 (77,78%) das amostras para o ORF75, 5 (55,56%) para o ORF94 e não houve amplificação de nenhuma das amostras para o ORF 125. O número RUs calculados estão expressos na Tabela 3.

Tabela 3 – Variações no número de unidades repetidas nos ORF75, ORF94 e ORF125 do WSSV em diferentes regiões geográficas.

Origem Geográfica	Variedade de Rus em loci de VNTR			Referências
	ORF75 RUs (45, 57 pb)	ORF94 RUs (54 pb)	ORF125 RUs (69 pb)	
China	NA	6-14	NA	(TAN, et al., 2009)
Tailândia	NA	6-20	NA	(KIATPATHOMECHAI, et al., 2005)
Vietnam	5 (4, 1) – 14(10, 4)*	4-17	4-10	(DIEU, et al., 2010)
USA	6 (5, 1) – 14 (11, 3)*	5-8	10-11	(MULLER, et al., 2010)
Índia	6 (5, 1) – 13(10, 3)	2-16	2-14	(PRADEEP, et al., 2008)
México	14	19	7	(MULLER, et al., 2010)
Brasil				
Santa Catarina-2005, 2007 e 2008	10(7, 3)*	16	8	(MULLER, et al., 2010)
Bahia	11(8,3)*	4	9	(MULLER, et al., 2010)
São Gonçalo do Amarante -RN	9(?)**	10	falhou	Este trabalho

*RUs calculados baseados em 45 e 102 pb. NA – não analisado.**baseado no tamanho do fragmento amplificado (≈ 700 pb).

Embora pouco provável, não se pode descartar que a falha na PCR da ORF 125 em todas as amostras tenha sido causada por polimorfismo na região de hibridização dos primers para este marcador, assim como não parece possível a presença de inibidores da PCR ou de concentração de DNA abaixo do limiar de detecção posto que houve amplificação para VP26 e as ORF's 75 e 94.

Em Santa Catarina, os isolados virais de surtos nos anos de 2005, 2007 e 2008 (MULLER, et al., 2010) mantiveram o mesmo padrão VNTR, demonstrando a estabilidade dos marcadores propostos (ORF's 75, 94 e 125). Tal estabilidade foi demonstrada experimentalmente por Sindhupriya et al (2014) que realizaram múltiplas passagens de duas cepas de WSSV em três espécies diferentes de camarão, sem que tenha sido detectada diferença no perfil VNTR para as ORF's 75, 94 e 125. Assim, é possível realizar estudos filogeográficos do vírus e, perfis VNTR idênticos ou muito próximos oriundos de diferentes localidades, que sugerem conexão clonal e, portanto, merecem investigação epidemiológica, como, por exemplo, os isolados de Madagascar, Moçambique e Arábia Saudita identificados por Tang et al (2013). Entretanto, Waikhom et al (2006) observaram que a passagem por espécies diferentes de hospedeiros causam pressão seletiva para variação do vírus.

O padrão encontrado no foco de São Gonçalo do Amarante indica uma assinatura geográfica do vírus, mas é necessário buscar mais isolados no campo e acrescentar novos marcadores como a ORF 23/24 (DIEU et al, 2010) e um maior poder de resolução, por exemplo por sequenciamento de DNA (SIMROUNI et al, 2014) para que seja possível o rastreamento da origem dos focos no tempo e no espaço pela dinâmica de evolução do vírus (DIEU et al, 2010). A falta de informação anterior deixa em dúvida se este foco seria a introdução de um novo genótipo ou a reintrodução de um mesmo tipo viral que se acreditava controlado. O primeiro caso implicaria em múltiplas rotas de contaminação, inclusive possibilitando infecções mistas, com mais de um genótipo (WALKER et al, 2011c). Por outro lado, reincidência de um genótipo viral no criatório sugere a existência de reservatórios no ambiente — outras espécies hospedeiras (CAVALI et al, 2008; COSTA et al, 2012) — ou formas latentes de infecção (SANCHEZ-PAZ, 2010).

O papel do ambiente na transmissão do WSSV por via indireta provou-se mais eficiente do que por contato direto entre *L. vannamei* (TUYEN et al, 2014). Além disso, temperaturas entre 22 e 30 °C aumentam a eficiência de replicação do WSSV (SUN et al, 2014) nos estágios iniciais da infecção aguda, o que coincide com a faixa de temperatura ótima de camarões juvenis quando não infectados (RAHMAN et al, 2006). Interações moleculares entre o vírus e atividades de genes constitutivos importantes no desenvolvimento de *Penaeus monodon*, como por exemplo *hsp70* e ATP sintetase foram identificadas; sugere-se desta forma que o WSSV se beneficia da fase em que há maior desenvolvimento do hospedeiro (BIRADAR et al, 2013). O estudo destes fatores torna-se importante para compreender os episódios cíclicos de infecção, seja pela reincidência do mesmo genótipo, bem como pela introdução de novas variantes virais.

6 CONCLUSÃO

Os achados do vírus da síndrome da mancha branca em amostras de camarões da espécie *Litopenaeus vannamei* em uma fazenda de carcinicultura do estado do Rio Grande do Norte, não é representativo da presença de uma epidemia no estado, mas alerta para a possibilidade de transmissão do mesmo. É necessário conhecer a diversidade viral prevalente na região para gerar hipóteses sobre quais são as deficiências das medidas adotadas como os cuidados no manejo, despesca e transporte que devem ser estabelecidos para evitar maiores contaminações pelo WSSV no estado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABCC (Associação Brasileira de Criadores de Camarão) **Historia da carcinocultura no Brasil**. 2011. Disponível em: < <http://abccam.com.br/site/historia-da-carcinocultura-no-brasil/> > . Acesso em: 10 de ago. 2016.

ABCC (Associação Brasileira de Criadores de Camarão). **Levantamento da infraestrutura produtiva e dos aspectos tecnológicos, econômicos, sociais e ambientais da carcinocultura marinha no Brasil**. Natal, abr. de 2013.

ABREU, M. C. S. et al. Shrimp farming in coastal Brazil: Reasons for market failure and sustainability challenges. **Ocean & Coastal Management**, v. 54, n. 9, p.658-667, set. 2011.

ARNOLD, S. J. et al. An evaluation of stocking density on the intensive production of juvenile brown tiger shrimp (*Penaeus esculentus*). **Aquaculture**, v. 256, n. 1-4, p.174-179, jun. 2006.

BIRADAR, V. et al. White spot Syndrome Virus infection in *Penaeus monodon* is facilitated by housekeeping molecules. **J. Biosci**, v. 38 n.5 p.917-924, 2013.

CAVALLI, L. S. et al. First report of white spot syndrome virus in farmed and wild penaeid shrimp from lagoa dos patos estuary, southern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**. Rio Grande do Sul. p.1176 – 1179. 13 jan. 2011.

CHOU, H. et al. Pathogenicity of a baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. **Diseases Of Aquatic Organisms**, v. 23, p.165-173, 1995.

CLAYDON, K, CULLEN, B., OWENS, L. OIE White spot syndrome vírus PCR gives false-positive results in *Cherax quadricarinatus* **Dis Aquat Org**. 62: 265-268, 2004.

COSTA, A. M. et al. Immune assessment of farm-reared *Penaeus vannamei* shrimp naturally infected by IMNV in NE Brazil. **Aquaculture**, v. 291, n. 3-4, p.141-146, jun. 2009.

COSTA, S. W. et al. Presença do vírus da síndrome da mancha branca em crustáceos decápodes silvestres em lagoas costeiras no Sul do Brasil **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**, v.64, n.1, p.209-216, 2012.

DALL, W. et al. **The Biology of Penaeidae**. Advances in Marine Biology. v.27. Academic Press, Cornwall. 1990. 484p.

DIEU, B. T. M. et al Molecular epidemiology of white spot syndrome virus within Vietnam. **Journal of General Virology**, v.85, p.3607-3618, 2004.

DIEU, B. T. M. et al. Evaluation of White spot syndrome vírus variable DNA loci as molecular markers of vírus spread at intermediate spatiotemporal scales **Journal of General Virology** v.91, p.1164-1172, 2010.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). **The State of World Fisheries and Aquaculture 2012**. Roma, 2012. 209 p.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). **The State of World Fisheries and Aquaculture 2014**. Roma, 2014. 223 p.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). **The State of World Fisheries and Aquaculture 2016**. Roma, 2016. 24 p.

FEIJÓ, R. G. et al. Infectious myonecrosis virus and white spot syndrome virus co-infection in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) farmed in Brazil. **Aquaculture**, v. 380-383, p.1-5, mar. 2013.

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

GUERRELHAS, A.C. de B.; TEIXEIRA, A.P.G. Panorama da situação da mancha branca no Nordeste. **Panorama da Aquicultura**, Rio de Janeiro, RJ: SRG Gráfica e Editora Ltda, v.22, n.129, p. 38-41, jan./fev. 2012.

HOA, T.T.T. et al. Mixed-genotype white spot syndrome vírus infections of shrimp are inversely correlated with disease outbreaks in ponds. **Journal of Fish Diseases** v.35, p.817-828, 2012.

HOA, Tran Thi Tuyet et al. Transmission of white spot syndrome virus in improved-extensive and semi-intensive shrimp production systems: A molecular epidemiology study. **Aquaculture**, v. 313, n. 1-4, p.7-14, mar. 2011

HUANG, C. et al. Purification and characterization of White Spot Syndrome Virus (WSSV) produced in an alternate host: crayfish, *Cambarus clarkii*. **Virus Research**, v. 76, n. 2, p.115-125, ago. 2001.

ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses). London, 2015.

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. **Dis Aquat Org**, v. 25, p. 133 -141, mai 1996a.

LO, C. F. et al. White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crabs, and other arthropods. **Dis Aquat. Org**, v27, p. 215 – 225, 1996b.

LOEBMANN, D.; MAI, A. C. G.; LEE, J. T. The invasion of five alien species in the Delta do Parnaíba environmental protection area, northeastern Brazil. **Rev. Bio. Trop.** v. 58, p. 909-923, 2010.

MAPA (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO). **Plataforma tecnológica do camarão marinho cultivado**. Brasília, DF: ABCC, 2001.

MARKS H. et al. Fitness and virulence of an ancestral white spot syndrome virus isolate from shrimp. **Virus Res** v.110 p.9–20, 2005

MARKS, H. et al. Genetic variation among isolates of White spot syndrome virus. **Archives Of Virology**, v. 149, n. 4, p.673-697, 1 abr. 2004.

MARQUES, M.R.F.; MOSER, J. R.; MÜLLER, I. C. Virologia de crustáceos e métodos moleculares de diagnóstico. In: SILVA-SOUZA, A. T. (Org.). **Sanidade de organismos aquáticos no Brasil**. Maringá: Abrapoa, 2006. p. 159 – 185.

MÁRQUEZ, J. E. Q. et al. Efeito da densidade de estocagem parâmetros zootécnicos da criação de camarões *Litopenaeus schimitti*. **Bol. Int. Pesca**, v. 38, n. 2, p.145-153, jun. 2012.

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

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 Organ**, v. 88, p. 91–98, 2010.

NATORI, M. M. et al. Desenvolvimento da carcinocultura marinha no Brasil e no mundo: avanços tecnológicos e desafios. **Informações Econômicas**. v. 41, n. 2, p.61-73, fev. 2011.

NUNES, A. J. P. & MARTINS, P. C. C. 2002. Avaliando o estado de Saúde de Camarões Marinhos na Engorda. **Panorama da Aquicultura**, V. 12 (72) p. 23-33.

OIDTMANN, B.; STENTIFORD, G. D. White Spot Syndrome Virus (WSSV) Concentrations in Crustacean Tissues – A Review of Data Relevant to Assess the Risk associated with Commodity Trade. **Transboundary and Emerging Diseases**, v.58 p.469-482, 2011.

OIE (Office International des Epizooties). 2005. Acesso em: <http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Reviewreport/Review?reportid=6309> Disponível em 09 de agosto de 2016.

OIE (Organização Internacional de Epizootias) **Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals**. 2015. Disponível em: < <http://www.oie.int/international-standard-setting/aquatic-manual/access-online/>> Acesso em: 9 ago. 2016.

PÉREZ FARFANTE, I.; KENSLEY, Penaeoid and Sergestoid Shrimps and Prawns of the World. Keys and diagnoses for the families and genera. **Mémoires du Muséum National d'Histoire Naturelle**, Paris, V.175, 233p. 1997.

PIÉRRRI, V. **Efeito da alcalinidade sobre o cultivo de *Litopenaeus vannamei* em sistema de bioflocos**. 2012. 48f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina , Florianópolis, 2012.

PRADEEP B. et al. Genotyping of white spot syndrome virus prevalent in shrimp farms of India. **Dis Aquat Org**. v.78, p.189–98, 2008.

PRADEEP, B. et al. Biology, host range, pathogenesis and diagnosis of white spot syndrome virus. **Indian Journal of Virology**. v. 23, p. 161 – 174, 2012.

RAHMAN, M.M. et al. Effect of high water temperature (33°C) on the clinical and virological outcome of experimental infections with White spot syndrome vírus (WSSV) in specific pathogen-free (SPF) *Litopenaeus vannamei* **Aquaculture**, v.361 p.842-849, 2006.

RAJENDRAN, K. V. et al. Experimental host range and histopathology of white spot syndrome virus (WSSV) infection in shrimp, prawns, crabs and lobsters from India. **J Fish Diseases**, v. 22, n. 3, p.183-191, maio 1999.

ROCHA, C. E. F. et al. Copepoda. In: AMARAL, A. C. Z. e NALLIN, A. H. **Biodiversidade e Ecossistemas bentônicos marinhos do litoral norte de São Paulo, Sudeste do Brasil**. Campinas: UNICAMP/IB, 2011. p 189 – 202.

ROCHA, I. P. **Carcinicultura Brasileira: Processos Tecnológicos, Impactos Sócio-Econômicos, Sustentabilidade Ambiental, Entraves e Oportunidades**. 2011. Disponível em: <<http://abccam.com.br/site/wp-content/uploads/2011/03/carcinicultura%20brasileira%20-20revista%20abcc%20-%20janeiro%202011.pdf>>. Acesso em: 08 ago. 2016.

ROCHA, I. P. **Carcinocultura Marinha: Realidade mundial e os desafios confrontados pelo Brasil**. Disponível em: < <http://abccam.com.br/site/wp-content/uploads/2016/01/Carcinocultura-Marinha-Realidade-Mundial-e-os-desafios-Confrontados-pelo-Brasil-Itamar-Rocha.pdf>>. Acesso em: 08 ago. 2016.

SANCHEZ-PAZ, A. White spot syndrome vírus: na overview on na emergente concern. **vet. Res**. v.41 p.1-34, 2010.

SCHMIEGELOW, J. M.; **O planeta azul – Uma introdução às ciências marinhas**. Rio de Janeiro: Editora Interciência. 2004. 202p.

SHANG, Y. C.; LEUNG, P.; LING, B. Comparative economics of shrimp farming in Asia. **Aquaculture**, v. 164, n. 1-4, p.183-200, maio 1998.

SIMROUNI, M. M. et al. Sequence analysis of ORF94 in diferente White Spot Syndrome Virus (WSSV) isolates of Iran. **Iranian Journal of Fisheries Sciences**, v.13, n.2, p.492-502, 2014.

SINDHUPRIYA, M. et al. White spot syndrome virus (WSSV) genome stability maintained over six passages through three different penaeid shrimp species. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.111, n.1, p.23-29, 2014.

SOOKYING, D. et al. Effects of stocking density on the performance of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* cultured under pond and outdoor tank conditions using a high soybean meal diet. **Aquaculture**, v. 319, n. 1-2, p.232-239, set. 2011.

STENTIFORD, G. D. et al. Disease will limit future food supply from the global crustacean fishery and aquaculture sectors. **Journal Of Invertebrate Pathology**, v. 110, n. 2, p.141-157, jun. 2012.

SUN, Y. et al. Transcriptome analysis of the Initial Stage of Acute WSSV Infection Caused by Temperature Change. *Plos One*, v.9, n.3, p.1-16 2014

TAHIM, E. F.; DAMACENO, M. N.; JUNIOR, I. F. A. A influência da trajetória tecnológica no processo de inovação na indústria de cultivo de camarão no Nordeste brasileiro. **Anais do XVI Congresso Latino Iberoamericano de Gestão da**

TAKAHASHI, Y. et al. Electron Microscopic Evidence of Bacilliform Virus Infection in Kuruma Shrimp (*Penaeus japonicus*). **Fish Pathol.**, v. 29, n. 2, p.121-125, 1994.

TAN, Y.; SHI, Z. Genotyping of white spot syndrome virus in Chinese cultured shrimp during 1998–1999. **Virologica Sin.** v. 26: p.123–30, 2009.

TANG, K. F. J.; LE GROUMELLE, M.; LIGHTNER, D.V. Novel, closely related, white spot syndrome virus (WSSV) genotypes from Madagascar, Mozambique and the Kingdom of Saudi Arabia. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.106, n.1, p.1-6, 2013.

TUYEN, N.X. et al. Horizontal transmission dynamics of White spot syndrome vírus by cohabitation trials in juvenile *Penaeus monodon* and *P. vannamei*. **Preventive Veterinary Medicine**, v.117, p.286.-294, 2014.

VAN HULTEN, M. C. W. et al. The White Spot Syndrome Virus DNA Genome Sequence **Virology**, v.286, p.7-22, 2001.

VINATEA, L. **Princípios químicos da qualidade da água em aquicultura**. Florianópolis: EDUFSC, 1997.

WAIKHOM, G. et al. Differential host passaging alters pathogenicity and induces genomic variation in White spot syndrome virus. **Aquaculture**, 261, 54-63, 2006.

WALKER, P. J. et al. Longitudinal disease studies in small-holder black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) farms in Andhra Pradesh, India. I. High prevalence of WSSV infection and low incidence of disease outbreaks in BMP ponds. **Aquaculture**, v. 318, n. 3-4, p.277-282, ago. 2011a.

WALKER, P. J. et al. Longitudinal disease studies in small-holder black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) farms in Andhra Pradesh, India. III. A complex dynamic of WSSV infection and WSSV genotype distribution in farmed shrimp and wild crustaceans. **Aquaculture**, v. 319, n. 3-4, p.319-327, out. 2011b.

WALKER, P. J. et al. Longitudinal disease studies in small-holder black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) ponds in Andhra Pradesh, India. II. Multiple WSSV genotypes associated with disease outbreaks in ponds seeded with uninfected postlarvae. **Aquaculture**, v.319 p.18-24, 2011c.

WONGTEERASUPAYA, C. et al. High variation in repetitive DNA fragment length for white spot syndrome virus (WSSV) isolates in Thailand. **Dis Aquat Org**, v.54, p.253–257, 2003.

WONGTEERASUPAYA, C. et al. DNA fragment of *Penaeus monodon* baculovirus PmNOBII gives positive in situ hybridization with white-spot viral infections in six penaeid shrimp species. **Aquaculture**, v. 143, n. 1, p.23-32, jul. 1996.

XIE, X.; YANG, F. Interaction of white spot syndrome virus VP26 protein with actin. **Virology**, v. 336, n. 1, p.93-99, maio 2005.

YANG, F. W.; WANG, X. XU. A simple and efficient methods for purification of prawn baculovirus DNA. **J. Virol. Methods**. v.67, p.1–4, 1997.

YANG, F. et al. Complete Genome Sequence of the Shrimp White Spot Bacilliform Virus. **Journal Of Virology**, v. 75, n. 23, p.11811-11820, 1 dez. 2001.

ZHANG, J. et al. Studies on the rotifer (*Brachionus urceus* Linnaeus, 1758) as a vector in white spot syndrome virus (WSSV) transmission. **Aquaculture**, v. 261, n. 4, p.1181-1185, dez. 2006.

APÊNDICE

Questionário técnico e sanitário da fazenda infectada com WSSV

Nome da propriedade

Localização

1. Qual o tamanho da propriedade?

2. Número de viveiros

3. Tamanho dos viveiros

4. Qual a data que começou a operar?

5. Qual a fonte de água?

- Mar Estuário
 Rio Outra

6. Qual a forma de captação?

- Por bomba
 Gravidade

7. Qual a densidade Ccamarões/m²?

8. Qual o tamanho médio dos camarões para despesca?

9. Qual o tempo médio de cultivo?

10. Como ocorre a renovação de água?

11. Principal alimentação

- Artificial Natural

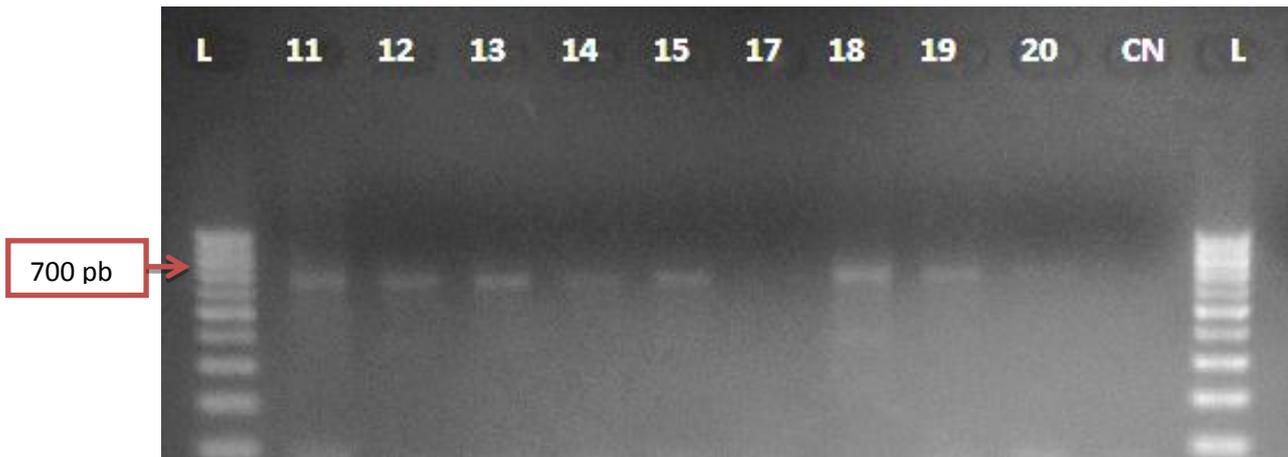
12. Possui histórico de doenças?

- Sim Não

13. Quais?

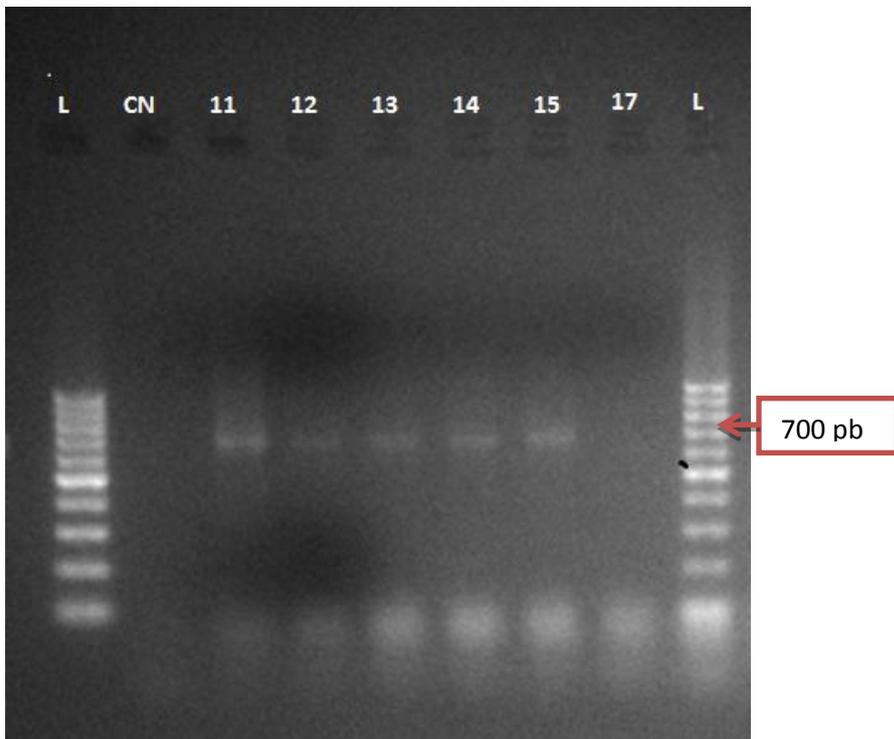
14. Como foi realizado o diagnóstico?

15. Utiliza alguma medida para prevenir o surgimento de doenças? Quais?



L – Lader 100pb; CN: controle negativo

ORF 94



L – Lader 100pb; CN: controle negativo

Short Communication

Identification and genotyping of white spot syndrome virus (WSSV) isolated from *Litopenaeus vannamei* in the state Rio Grande do Norte

ABSTRACT: The aim of our investigation was to detect WSSV in *Litopenaeus vannamei* from farms in Rio Grande do Norte (RN) state, as well as perform genotyping of the isolates. A total of five farms were surveyed, from which 10 samples were collected in each one. We selected two ponds in each of the farms; these were chosen because of clinical suspicion of WSSV. Genomic DNA was extracted to detect the virus by polymerase chain reaction (PCR). Subsequently, we performed, through PCR, genotyping of the positive DNA samples analyzing a variable number of tandem repeats - VNTR in three molecular markers (ORFs 75, 94 and 125). The results revealed the presence of the virus in only one of the 5 analyzed farms. The loci ORF 75 and ORF 94 were identified in isolates from the positive samples and no amplification failure for ORF 125. The number of repeating units (RUs) was calculated, and found to 9 repetitions ORF 75 and 10 RUs to ORF 94, a pattern that had not been described, stressing the need for more strain typing for screening and surveillance of the disease.

KEYWORDS: orf 75, orf 94, orf 125, vntr, wssv.

Introduction

The white spot syndrome is, characteristically, an acute contagious infection, responsible for great economic losses in the global shrimp farming industry (Lightner, 1996). The causative agent is the White Spot Syndrome Virus (White Spot Syndrome Virus - WSSV), which belongs to the genus *Whispovirus*, and is the sole representative of the family *Ninaviridae* (ICTV, 2015).

Brazil is one of the 25 largest producers of shrimp in the world (FAO, 2016), and we have to highlight Rio Grande do Norte (RN), who is responsible for

approximately 33% of the national production (IBGE, 2014). The WSSV combined with other factors is responsible for a reduction in Rio Grande do Norte's shrimp production by 45%, from 37,400 tons in 2003 to 16,900 tons in 2013 (Araújo, 2015).

Given the importance of controlling this disease for the shrimp industry, we aimed to investigate the presence of WSSV in *Litopenaeus vannamei* shrimp coming from farms in RN, as well as perform the genotyping of isolates using variable number tandem repeats - VNTR (ORFs 75, 94 and 125) as markers. Intending to collaborate with further epidemiological studies.

Material and Methods

In total, we collected 50 samples of shrimp *Litopenaeus vannamei* from five farms in Rio Grande do Norte (Table 1). The farms were chosen because their shrimp presented clinical symptoms for WSSV in the ponds. Shrimp sampled were desensitized to collect gills and pleopods with the aid of properly sterilized tweezers; next, the material was placed in 2mL micro tubes with alcohol and kept under refrigeration. Samples were then transported to the Molecular Biology Laboratory of the Federal Rural University of Semi-Arid - UFERSA, where we proceeded with the extraction using a kit from Quiagen - QIAmp DNA Mini Kit - according to the manufacturer's instructions.

We extracted DNA and performed Polymerase Chain Reaction (PCR) to detect the virus using a pair of primers and following reaction conditions described by Dieu et al. (2004). The positive samples were genotyped using the markers ORF 75, ORF 94 and ORF 125, according to Pradeep et al. (2008). From these, we calculated repeating units (RUs) to compare with other geographical isolates of WSSV.

Results and Discussion

From the farms investigated, only farm B was positive for WSSV. The presence of white spot syndrome virus (WSSV) was confirmed in 90% of the sampled animals from farm B. This property has a history of high mortalities in shrimp since the year 2013, associated to the characteristic clinic signs of this disease, such as pink color in shrimp and calcium deposits on the carapace. In the other farms, we could not detect the WSSV.

The nine samples positive for WSSV underwent VNTR essay (ORFs 75, 94 and 125). We observed amplification in 7 (77.78%) of the samples for the ORF75 marker; in 5 (55.56%) samples for ORF94; and, no amplification from any of the samples for the marker ORF 125. The number of RUs calculated is shown in Table 2.

The number of repeating units (RUs) was calculated, and we found 9 repetitions for ORF 75 and 10 for ORF 94, a pattern that had not been previously described. This highlights the need for more isolates to be genetically profiled, in order to better track and surveil this disease.

Although unlikely, it can not be ruled out, that the failure in the PCR of ORF 125 in all the samples was caused by polymorphism in the hybridizing region of the primers for this marker. It does not seem likely that these issues were due to the presence of PCR inhibitors or to low concentrations of DNA – under the detection threshold -, seeing as there was amplification for VP26 and ORF's 75 and 94.

In Santa Catarina, the viral isolates from outbreaks in 2005, 2007 and 2008 (Muller et al., 2010) maintained the same VNTR pattern, demonstrating the stability of

the proposed markers (ORF's 75, 94 and 125). Such stability has been experimentally demonstrated by Sindhupriya et al. (2014), who performed multiple essays on two strains of WSSV in three different species of shrimp, and no difference in the VNTR profile for ORF's 75, 94 and 125 was detected. Thus, it is possible to perform studies that associate the phylogeny and geography of the virus and observe identical or very similar VNTR profiles from different locations, which suggests clonal connection and, therefore, require an epidemiological essay, for example, isolates from Madagascar, Mozambique and Saudi Arabia identified by Tang et al. (2013). However, Waikhom et al. (2006) found that the passing through different host species causes selective pressure for the variation of the virus.

The pattern found in the outbreak of São Gonçalo do Amarante indicates a geographical signature of the virus. Nevertheless, it is necessary to seek more isolates in fieldwork and add new markers such as ORF 23/24 (Dieu et al., 2010) and a greater power of resolution. For example, through DNA sequencing (Simrouni et al., 2014), to be able to place the origin of outbreaks in time and space by observing the dynamics of virus evolution (Dieu et al, 2010). The lack of this kind of information leaves doubt if the origin of this outbreak is the introduction of a new genotype or the reintroduction of the same virus type believed to be under control. The first case would imply several routes of infection, including the possibility of mixed infections with more than one genotype (Walker et al., 2011). On the other hand, the recurrence of a certain viral genotype in the farm suggests the existence of reservoirs in the environment – other host species (Costa et al., 2012) – or latent forms of infection (Sanchez-Paz, 2010).

The role of the environment in the transmission of WSSV through indirect route proved to be more efficient than through direct contact between *L. vannamei* shrimp (Tuyen et al., 2014). In addition, temperatures between 22 and 30°C increased the

replication efficiency of WSSV (Sun et al., 2014) in the early stages of acute infection, which coincides with the optimum temperature range for juvenile shrimp when uninfected (Rahman et al., 2006). Molecular interactions between the virus and the activity of constituent genes, important for the development of *Penaeus monodon*, such as *hsp70* and ATPsynthetase, were identified; thereby, it is suggested that the WSSV benefits from the phase in which there is more development of the host (Biradar et al., 2013). The study of these factors becomes important to understand the cyclic episodes of infection, whether by the recurrence of the same genotype or by the introduction of new viral variants.

Conclusions

Finding the white spot syndrome virus in samples of *Litopenaeus vannamei* shrimp in farms of Rio Grande do Norte state is not representative of the presence of an epidemic in the state, but alerts to the possibility of transmission. We must know the prevalent viral diversity in the region to generate hypotheses about what are the shortcomings of the measures we adopt to manage this disease, either during breeding, harvesting or transportation; and what actions should be taken to prevent further contamination by WSSV in the state.

References

Araújo, R. Produção de camarão reduz 54%. Tribuna do norte. 2015. Disponível em: <<http://www.tribunadonorte.com.br/noticia/produa-a-o-de-camara-o-reduz-54/318300>>. Acesso em: 12 de agosto de 2016.

Biradar, V.; Narwade, S; Paingankar, M e Deobagkar, D. 2013. White spot Syndrome Virus infection in *Penaeus monodon* is facilitated by housekeeping molecules. Journal Biosci, 38(5): 917-924.

Costa, S. W.; Fraga, A. S.; Zamparetti, A. S.; Marques, M. R. F. e Andreatta, E. R. 2012. Presença do vírus da síndrome da mancha branca em crustáceos decápodes silvestres em lagoas costeiras no Sul do Brasil. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia 64(1): 209-216.

Dieu, B. T. M.; Marks, H.; Siebenga, J. J.; Goldbach, R. W.; Zuidema, D.; Duong, T. P. e Vlak, J. M. 2004. Molecular epidemiology of white spot syndrome virus within Vietnam. Journal of General Virology 85: 3607-3618.

Dieu, B. T. M.; Marks, H.; Zwart, M. P. e Vlak, J. M. 2010. Evaluation of White spot syndrome vírus variable DNA loci as molecular markers of vírus spread at intermediate spatiotemporal scales. Journal of General Virology 91: 1164-1172.

Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO. 2016. The State of World Fisheries and Aquaculture 2016. p.24. Roma.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. 2014. Disponível em: <http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2014_v42_br.pdf>.

Acesso em: 11 de agosto de 2016.

International Committee on Taxonomy of Viruses – ICTV. 2015. ICTV Taxonomy History for White spot syndrome vírus. Disponível em: <http://www.ictvonline.org/taxonomyHistory.asp?taxnode_id=20153193&taxa_name=White%20spot%20syndrome%20virus>. Acesso em: 26 de agosto de 2016.

Lightner, D. V. 1996. A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp. Baton Rouge: World Aquaculture Society, 304p.

Muller, I. C.; Andrade, T. P.; Tanq-Nelson, K. F.; Marques, M. R. e Lightner, D. V. 2010. Genotyping of white spot syndrome virus (WSSV) geographical isolates from Brazil and comparison to other isolates from the Americas. Diseases of Aquatic Organisms 88: 91–98.

Pradeep, B.; Shekar, M.; Gudkovs, N.; Karunasagar, I. E Karunasagar, I. 2008. Genotyping of white spot syndrome virus prevalent in shrimp farms of India. Diseases of Aquatic Organisms 78: 189–98.

Rahman, M. M.; Escobedo-Bonilla, C. M.; Corteel, M.; Dantas-Lima, J. J.; Wille, M.; Alday Sanz, V.; Pensaert, M. B.; Sorgeloos, P. e Nauwynk, H. J. 2006. Effect of high water temperature (33°C) on the clinical and virological outcome of experimental infections with White spot syndrome vírus (WSSV) in specific pathogen-free (SPF) *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture 361: 842-849.

Sanchez-Paz, A. 2010. White spot syndrome virus: na overview on na emergente concern. *Veterinary Research* 41: 1-34.

Simrouni, M. M.; Mesbah, M.; Merani, H. R.; Shapori, M. S. A. e Boroujeni, M. P. 2014. Sequence analysis of ORF94 in diferente White Spot Syndrome Virus (WSSV) isolates of Iran. *Iranian Journal of Fisheries Sciences* 13(2): 492-502.

Sindhupriya, M.; Saravanan, P.; Otta, S. K.; Amarnath, C. B.; Arulraj, R.; Bhuvanewari, T.; Praveena, P. E.; Jithendran, K. P. e Ponniah, A. G. 2014. White spot syndrome virus (WSSV) genome stability maintained over six passages through three different penaeid shrimp species. *Diseases of Aquatic Organisms* 111(1): 23-29.

Sun, Y.; Li, F.; Sun, Z.; Zhang, X.; Li, S.; Zhang, C. e Xiang, J. 2013. Transcriptome analysis of the Initial Stage of Acute WSSV Infection Caused by Temperature Change. *Plos One* 9(3): 1-16.

Tang, K. F. J.; Le Groumellec, M. e Lightner, D. V. 2013. Novel, closely related, white spot syndrome virus (WSSV) genotypes from Madagascar, Mozambique and the Kingdom of Saudi Arabia. *Diseases of Aquatic Organisms* 106(1): 1-6.

Tuyen, N. X.; Verreth, J.; Vlak, J. M. e Jong, M. C. M. 2014. Horizontal transmission dynamics of White spot syndrome virus by cohabitation trials in juvenile *Penaeus monodon* and *P. vannamei*. *Preventive Veterinary Medicine* 117: 286.-294.

Waikhom, G.; John, K. R.; George, M. R. e Jeyaseelan, M. J. 2006. Differential host passaging alters pathogenicity and induces genomic variation in White spot syndrome virus. *Aquaculture* 261: 54-63.

Walker, P. J.; Gudkovs, N.; Mohan, C. V.; Raj, V. S.; Pradeep, B.; Sergeant, E.; Mohan, A. B. C.; Ravibabu, G.; Karunasagar, I. e Santiago, T. C. 2011. Longitudinal disease studies in small-holder black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) ponds in Andhra Pradesh, India. II. Multiple WSSV genotypes associated with disease outbreaks in ponds seeded with uninfected postlarvae. *Aquaculture* 319: 18-24.

Table 4 – Description of the *Litopenaeus vannamei* shrimp samples collected in the

Farms	Cities/ Towns	Collection period	Amount of shirmp
A	São Gonçalo do Amarante	September/2015	10
B	São Gonçalo do Amarante	September/2015	10
C	Macaíba	May/2016	10
D	Extremoz	May/2016	10
E	Arêz	May/2016	10

state of Rio Grande do Norte

Table 2 – Variation of the number of repeating units in ORF75, RF94 and ORF125 of the WSSV in different geographical regions

Geographical origin	Variety of RUs in VNTR loci			References
	ORF75 RUs (45, 57 bp)	ORF94 RUs (54 bp)	ORF125 RUs (69 bp)	
China	NA	6-14	NA	(TAN, et al., 2009)
Thailand	NA	6-20	NA	(KIATPATHOMECHAI, et al., 2005)
Vietnam	5 (4.1) – 14(10.4)*	4-17	4-10	(DIEU, et al., 2010)
USA	6 (5.1) – 14 (11.3)*	5-8	10-11	(MULLER, et al., 2010)
India	6 (5.1) – 13(10.3)	2-16	2-14	(PRADEEP, et al., 2008)
Mexico	14	19	7	(MULLER, et al., 2010)
Brazil				
Santa Catarina- 2005, 2007 e 2008	10(7.3)*	16	8	(MULLER, et al., 2010)
Bahia	11(8.3)*	4	9	(MULLER, et al., 2010)
São Gonçalo do Amarante - RN	9**	10	failed	This experiment

*RUs calculated based in 45 and 102 bp. NA – non analyzed. **based on the size of the amplified fragment (≈ 700 bp).

