



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
DOUTORADO EM CIÊNCIA ANIMAL

GERMANA GUIMARÃES REBOUÇAS CAVALCANTI

**MARCADORES MOLECULARES NA IDENTIFICAÇÃO DE VARIANTES
GENOTÍPICAS DO VÍRUS DA SÍNDROME DA MANCHA BRANCA EM
CAMARÕES *Litopenaeus vannamei* CULTIVADOS NO ESTADO DO
CEARÁ**

MOSSORÓ/RN
2020

GERMANA GUIMARÃES REBOUÇAS CAVALCANTI

**MARCADORES MOLECULARES NA IDENTIFICAÇÃO DE VARIANTES
GENOTÍPICAS DO VÍRUS DA SÍNDROME DA MANCHA BRANCA EM
CAMARÕES *Litopenaeus vannamei* CULTIVADOS NO ESTADO DO
CEARÁ**

Tese apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Ciência Animal da
Universidade Federal Rural do
Semiárido – UFERSA, como exigência
para a obtenção do título de Doutor em
Ciência Animal.

Linha de Pesquisa: Sanidade Animal

Orientador: Prof. Dr. Sidnei
Miyoshi Sakamoto -
UFERSA

MOSSORÓ/RN

2020

© 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.

C167m Cavalcanti, Germana Guimarães Rebouças.
MARCADORES MOLECULARES NA IDENTIFICAÇÃO DE
VARIANTES GENOTÍPICAS DO VÍRUS DA SÍNDROME DA
MANCHA BRANCA EM CAMARÕES *Litopenaeus vannamei*
CULTIVADOS NO ESTADO DO CEARÁ / Germana
Guimarães Rebouças Cavalcanti. - 2020.
99 f. : il.

Orientador: Sidnei Miyoshi Sakamoto.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural
do Semi-árido, Programa de Pós-graduação em
Ciência Animal, 2020.

1. Carcinicultura. 2. Genoma. 3. Nordeste do
Brasil. 4. Regiões variáveis. 5. WSSV. I. Sakamoto,
Sidnei Miyoshi, orient. II. Título.

GERMANA GUIMARÃES REBOUÇAS CAVALCANTI

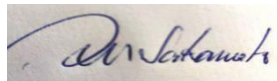
**MARCADORES MOLECULARES NA IDENTIFICAÇÃO DE VARIANTES
GENOTÍPICAS DO VÍRUS DA SÍNDROME DA MANCHA BRANCA EM
CAMARÕES *Litopenaeus vannamei* CULTIVADOS NO ESTADO DO
CEARÁ**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em
Ciência Animal da Universidade Federal Rural do
Semiárido – UFERSA, como exigência para a
obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

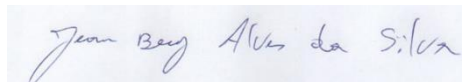
Linha de Pesquisa: Sanidade Animal

Defendida em: 31/08/2020

BANCA EXAMINADORA



Sidnei Miyoshi Sakamoto, Prof. Dr. (UFERSA)
Presidente



Jean Berg Alves da Silva, Prof. Dr. (UFERSA)
Primeiro Membro (interno)



Ioná Santos Araújo Holanda, Profª Dra. (UFERSA)
Segundo Membro (Externo)



Maria Rociene Abrantes, Profª Dra. (CISNE)
Terceiro Membro (Externo)



Karina Ribeiro, Profª. Dra. (UFRN)
Quarto Membro (Externo)

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

GERMANA GUIMARÃES REBOUÇAS CAVALCANTI - filha de Hermano José Rebouças e Edinair Guimarães Lima Rebouças, nasceu em 05 de maio de 1991, na cidade de Russas no Estado do Ceará, onde concluiu o ensino médio na Unidade Educacional Coração Imaculado de Maria – UNECIM. Em 2009 ingressou na Universidade Federal Rural do Semi-árido (UFERSA) no curso de Biotecnologia, graduando-se em outubro de 2013. Como acadêmica atuou como estagiária na área de Microbiologia e foi bolsista de iniciação científica do CNPq no Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal-LIPOA. No mesmo mês que se graduou, ingressou no Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da UFERSA, tendo sido bolsista CAPES. O Título de Mestre foi obtido no ano de 2015. Em 2016 ingressou no Doutorado no mesmo programa, continuando a desenvolver pesquisas na área de Sanidade Animal, mas agora no Laboratório de Multiusuários do Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde. Concomitantemente cursava Especialização em Análises Clínicas pela Faculdade Internacional Signorelli, tornando-se especialista no ano de 2017. Durante o Doutorado pesquisou e estudou o Vírus da Síndrome da Mancha Branca que tem acometido as fazendas de cultivo do Estado do Ceará, nordeste do Brasil, utilizando metodologias para diagnóstico e identificação de variantes genotípicas desses organismos.

Á minha filha Helena que chegou no meio do caminho
e se tornou a razão da minha persistência e garra diante de tantas dificuldades,
pela superação que juntas enfrentamos e por ser o grande amor da minha vida.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus por me permitir entender que toda dificuldade proporciona evolução, amadurecimento e confiança.

A minha filha Helena, a quem eu dedico esta Tese e toda a minha vida.

A minha família, meus pais Hermano e Edinair e meus irmãos Amanda e Hermano filho, pelo incentivo e torcidas constantes, vocês fazem parte dessa história. Amo vocês, obrigada.

Ao meu orientador Prof. Sidnei Miyoshi Sakamoto, pela paciência, compreensão e por me dar a autonomia necessária para a concretização deste trabalho, muito obrigada.

Ao meu grande amigo e companheiro de laboratório Bruno, que foi pesquisador, psicólogo e principal incentivador dessa longa jornada. A ele que é parte essencial na concretização deste sonho, toda a minha gratidão e amizade. Muito obrigada.

A minha grande amiga Rebeca, que mesmo de longe se fez presente me ajudando e sendo peça fundamental no desenvolvimento deste estudo, por sua sempre generosidade e amizade, minha eterna gratidão. Muito obrigada.

Aos mais competentes estagiários Dayane e Tiago, que viraram amigos da vida, e que sem a ajuda incansável durante três longos anos de coleta, nada disso seria possível, obrigada.

Ao querido André, que será um grande Engenheiro de Pesca, meu muito obrigada pela parceria e por dividir seus conhecimentos de campo comigo.

A minha grande amiga Emanuely, responsável por despertar em mim a curiosidade por esse grande universo que é a carcinicultura e pelos conhecimentos compartilhados, minha eterna gratidão.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro de grande importância para a realização deste trabalho.

A todos os professores e profissionais da UFERSA, de onde me despeço após 11 anos de história e muito aprendizado. Gratidão e orgulho por ter feito parte dessa instituição. Muito Obrigada!

EPÍGRAFE

*Todo caminho da gente é resvaloso.
Mas também, cair não prejudica demais
A gente levanta, a gente sobe, a gente volta!...
O correr da vida embrulha tudo, a vida é assim:
Esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa,
Sossega e depois desinquieta.
O que ela quer da gente é coragem.*

Guimarães Rosa

CAVALCANTI, G. G. R. **Marcadores moleculares na identificação de variantes genotípicas do vírus da síndrome da mancha branca em camarões *Litopenaeus vannamei* cultivados no Estado do Ceará. 2020.** 99f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró-RN, 2020.

RESUMO: A Carcinicultura no Brasil é uma atividade bastante rentável, entretanto, é sensível a surtos de doenças, com destaque para a Doença da Síndrome da Mancha Branca (WSSD), cujo agente causador é o Vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV) que devido a sua elevada morbidade e mortalidade, vêm acometendo cultivos de camarões em todo o mundo. Assim, sendo o Estado do Ceará um dos principais produtores de camarão do Brasil, objetivou-se estudar a incidência e a variabilidade genética do WSSV em fazendas do Estado do Ceará. Este estudo foi organizado em três etapas, estruturados em capítulos e com objetivos complementares. O primeiro capítulo é constituído pela construção de um referencial teórico, no segundo capítulo é relatado a caracterização das fazendas em estudo, bem como a influência de parâmetros de cultivo na incidência de WSSV. No capítulo três, está descrita a detecção de amostras positivas para o WSSV e o uso de marcadores moleculares para caracterizá-las, comparando-as em seguida com isolados de outras regiões geográficas. Por fim, o capítulo quatro realiza uma análise in silico das regiões gênicas amplificadas nas amostras discutidas no capítulo três, buscando estudar as regiões variáveis do genoma do WSSV através da análise das similaridades evolutivas e divergências ao longo do tempo, traçando um perfil filogenético. Dessa forma, este trabalho traz dados relevantes sobre as variantes do WSSV circulantes no Estado do Ceará, contribuindo para levantar informações, ainda limitadas, sobre a incidência desse vírus na região Nordeste do Brasil.

Palavras-chave: Carcinicultura, Genoma, Nordeste do Brasil, Regiões variáveis, WSSV.

CAVALCANTI, G. G. R. **Molecular markers in the identification of genotypic variants of the white spot syndrome virus in *Litopenaeus vannamei* shrimp cultivated in the State of Ceará.** 2020. 99f. Thesis (Doctorate in Animal Science) - Federal Rural University of the Semi-Arid (UFERSA), Mossoró-RN, 2020.

ABSTRACT: Shrimp farming in Brazil is a very profitable activity, however, it is sensitive to disease outbreaks, with emphasis on the White Spot Syndrome Disease (WSSD), whose causative agent is the White Spot Syndrome Virus (WSSV) which due to its high morbidity and mortality, have been affecting shrimp farming worldwide. Thus, as the State of Ceará is one of the main shrimp producers in Brazil, the objective was to study the incidence and genetic variability of WSSV in farms in the State of Ceará. This study was organized in three stages, structured in chapters and with complementary objectives. The first chapter consists of the construction of a theoretical framework, in the second chapter it is reported the characterization of the farms under study, as well as the influence of cultivation parameters on the incidence of WSSV. In chapter three, the detection of positive samples for WSSV and the use of molecular markers to characterize them is described, comparing them with isolates from other geographic regions. Finally, chapter four performs an analysis of the amplified gene regions in the samples discussed in chapter three, seeking to study the variable regions of the WSSV genome through the analysis of evolutionary similarities and divergences over time, tracing a phylogenetic profile. Thus, this work brings relevant data on the WSSV variants circulating in the State of Ceará, contributing to raise information, still limited, on the incidence of this virus in the Northeast region of Brazil.

Keywords: Shrimp farming, Genome, Northeastern Brazil, Variable regions, WSSV.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1 - Mapa da classificação climática do Estado do Ceará	31
Figura 2 - Representação esquemática da localização das regiões variáveis do genoma do WSSV-CH. (hr) regiões homólogas (ORF ou O) janela aberta de leitura.....	36

CAPÍTULO II

Figura 1 - Localização dos municípios do Estado do Ceará que compõem a área de estudo...	46
Figura 2- Análise macroscópica de camarões com a presença de cromatóforos expandidos e antenas e urópodos avermelhados, indicando estresse	53
Figura 3 - Fotomicrografia dos túbulos do hepatopâncreas (A) e da região do cefalotórax (B) analisados por exame a fresco.	54

CAPÍTULO IV

Figura 1 - Árvore Filogenética baseada nas sequências obtidas da ORF 75 do WSSV	82
Figura 2 - Árvore Filogenética baseada nas sequências obtidas da ORF 94 do WSSV.....	85
Figura 3 - Árvore Filogenética baseada nas sequências obtidas da VR 14/15 do WSSV	88

LISTA DE GRÁFICOS

CAPÍTULO IV

Gráfico 1 – Modelo de Relógio Molecular para a ORF 75.	83
Gráfico 2 - Modelo de Relógio Molecular para a ORF 94.	86
Gráfico 3 - Modelo de Relógio Molecular para a VR 14/15	89

LISTA DE QUADROS

CAPÍTULO II

Quadro 1 - Classificação quantitativa do grau de severidade da infecção.....	44
--	----

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1 – Número de fazendas estudadas por ano de coleta.....	46
Tabela 2 – Número e porcentagem das fazendas estudadas em relação ao porte do empreendimento e área ocupada.....	50
Tabela 3– Número de fazendas em relação a categoria de águas adotada por Boyd (2001).....	51
Tabela 4 – Resultados da Análise Presuntiva dos animais analisados nas fazendas em estudo.	54

CAPÍTULO III

Tabela 1 – Iniciadores para detecção e caracterização molecular de WSSV.....	64
Tabela 2 – Condições de termociclagem para detecção e caracterização molecular de WSSV.	65
Tabela 3 – Resultados da detecção molecular de WSSV por PCR e nested-PCR.....	67
Tabela 4 – Caracterização molecular do WSSV por VNTRs em relação a outras regiões geográficas.....	69

CAPÍTULO IV

Tabela 1 – Amostras selecionadas para o sequenciamento de acordo com a origem e as regiões variáveis amplificadas.....	78
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABCC – Associação Brasileira de Criadores de Camarão

CSAq – Centro de Saúde de Animais Aquáticos

DNA - Ácido Desoxirribonucléico

EUA – Estados Unidos da América

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations

g - Aceleração da gravidade ou força centrífuga relativa (rcf)

h - Hora

IHHN – Necrose hematopoiética e hipordemal infecciosa

Kb – Kilo de pares de base

L- Litros

M Molar

mA Miliampere

MAPA – Ministério Agricultura Pecuária e Abastecimento

mg - Miligrama

min- minutos

mL- mililitro

mm- milímetro

mM - Milimolar

µg- Micrograma

µL- microlitro

NHP – Hepatopancreatite necrosante

NIM – Mioncrose Infecciosa

nm – nanômetros

OIE – Office International des Épizooties (Organização Mundial de Saúde Animal)

ORF - Open reading frames (fase aberta de leitura)

pb- pares de base

PBS Tampão fosfato salino

PCR- Polymerase chain reaction

pH- Potencial hidrogeniônico

q.s.p. Quantidade suficiente para

RN- Rio Grande do Norte

RNA - Ácido Ribonucleico

rpm - Rotações por minuto

RT-PCR - Reverse transcription polymerase chain reaction

RUs – Unidades Repetidas

s - Segundos

Ta - temperatura ambiente

UFERSA Universidade Federal Rural do Semiárido

UV – Ultravioleta

V- volts

VNTR – Número variável de repetições em tandem

WSSV – Vírus da Síndrome da Mancha Branca

LISTA DE SÍMBOLOS

% - Porcentagem

® - Marca registrada

°C - Graus Celsius

SUMÁRIO

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS	22
2 OBJETIVOS	23
2.1 Geral	23
2.2 Específicos.....	23
REFERÊNCIAS	24
3 CAPÍTULO I - REFERENCIAL TEÓRICO	26
3.1 CARCINICULTURA.....	28
3.2 A CARCINICULTURA BRASILEIRA	28
3.3 CARCINICULTURA NA REGIÃO NORDESTE DO BRASIL	29
3.4 DESENVOLVIMENTO DA CARCINICULTURA NO ESTADO DO CEARÁ.....	30
3.4.1 Classificação climática dos principais municípios produtores de camarão do Estado do Ceará	30
3.4.2 O Rio Jaguaribe no Semiárido Cearense.....	32
3.4.3 Estuário do Rio Jaguaribe	32
3.5 CAMARÃO MARINHO <i>Litopenaeus vannamei</i>	32
3.6 CULTIVO EM ÁGUAS OLIGOHALINAS	33
3.7 SÍNDROME DA MANCHA BRANCA (WSD).....	33
3.8 MARCADORES MOLECULARES.....	34
3.9 VARIAÇÕES GENOTÍPICAS NO GENOMA DO WSSV.....	35
REFERÊNCIAS	37
4 CAPÍTULO II – ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DE PARÂMETROS TÉCNICOS E SANITÁRIOS NA INCIDÊNCIA DO WSSV EM FAZENDAS DE CULTIVO DE CAMARÃO <i>Litopenaeus vannamei</i> NO ESTADO DO CEARÁ, NORDESTE DO BRASIL	43
4.1 INTRODUÇÃO.....	45
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	45
4.2.1 Área de Estudo e Seleção das fazendas.....	45

4.2.2 Caracterização Técnica e Sanitária	47
4.2.3 Análise Presuntiva.....	47
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
4.4 CONCLUSÃO.....	56
REFERÊNCIAS	56
5 CAPÍTULO III – DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE VARIANTES GENOTÍPICAS DO WSSV NO ESTADO DO CEARÁ, NORDESTE DO BRASIL	60
5.1 INTRODUÇÃO.....	61
5.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	62
5.2.1 Área de estudo e seleção das fazendas	62
5.2.2 Coleta das amostras de camarões <i>Litopenaeus vannamei</i> (BOONE, 1931)	62
5.2.3 Extração e quantificação de DNA.....	63
5.2.4 Análises Moleculares	63
5.2.5 Marcadores moleculares para detecção de WSSV por PCR e <i>nested</i> -PCR	65
5.2.6 Análise de repetições em tandem de número variável (VNTRs)	65
5.2.7 Análise das Regiões Variáveis VR 14/15 e VR 23/24	65
5.2.8 Amplificação da sequência de uma transposase.....	66
5.2.9 Análise dos fragmentos amplificados	66
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	66
5.4 CONCLUSÃO.....	71
REFERÊNCIAS	73
6 CAPÍTULO IV – ANÁLISE IN SILICO DE REGIÕES VARIÁVEIS NO GENOMA DO WSSV NO ESTADO DO CEARÁ, NORDESTE DO BRASIL	76
6.1 INTRODUÇÃO.....	76
6.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	77
6.2.1 Seleção das amostras de regiões variáveis do WSSV	77
6.2.2 Sequenciamento de DNA	78

6.2.3 Alinhamento das Regiões Variáveis	78
6.2.4. Análise Filogenética.....	78
6.2.5 Construção de um modelo de Relógio Molecular	79
6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	79
6.3.1 ORF 75	81
6.3.2 ORF 94	83
6.3.3 VR 14/15	86
6.4 CONCLUSÃO.....	89
REFERÊNCIAS	90
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	93
APÊNDICE	94
ANEXO	97

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

O vírus da síndrome da mancha branca (WSSV) é um dos principais patógenos que acometem a carcinicultura a nível mundial, gerando prejuízos econômicos ao cultivo de camarões peneídeos, principalmente devido a sua elevada morbidade e mortalidade (VAN HULTEN et al., 2001; SALEHI, 2010; FLEGEL, 2012; LIGHTNER et al., 2012; STENTIFORD et al., 2012).

A primeira vez que o WSSV foi identificado em fazendas de cultivo, data-se de 1991 na província de Fujian na China, atingindo o Taiwan em 1992, de onde expandiu-se rapidamente por todo o continente Asiático, chegando à América do Norte em 1995 (HASSON et al., 2006; STENTIFORD; LIGHTNER, 2011). Desde então, tem sido identificado em fazendas de cultivo em todo o mundo (ESCOBEDO-BONILLA et al., 2008; MULLER et al., 2010; TAN; SHI, 2011; FEIJÓ et al., 2013; PEREIRA et al., 2019).

No Brasil, a carcinicultura tem destaque na região Nordeste, sendo uma das atividades mais rentáveis, mas que têm enfrentado dificuldades em seu crescimento, devido ao surgimento e disseminação de enfermidades. No âmbito nacional é também a região de maior produtividade, sendo o Estado do Ceará, um dos maiores produtores de camarões *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931) (ABCC, 2017).

O WSSV está presente no Estado do Ceará desde 2005 (MULLER et al., 2010), contudo, foi no ano de 2016, que o Estado foi acometido de forma severa por um surto de WSSV em suas fazendas de cultivo, realidade vivenciada também por outras regiões do País (ABCC, 2017). Segundo Nunes e Feijó (2016), o WSSV atingiu os principais municípios produtores de camarão do Estado do Ceará, e que apesar das incalculáveis perdas econômicas, conseguiu adotar medidas para minimizar os danos provocados por esse vírus em seus cultivos. Já que surtos provocados pela doença da síndrome da mancha branca (WSSD) estão associados ao manejo, tais como densidades impróprias, mudanças bruscas de salinidade ou de temperatura (GRANJA et al., 2003; LIN et al., 2012; VIDAL et al., 2001).

Diante da incidência persistente do WSSV nas fazendas de cultivo no Estado do Ceará, e das várias questões sobre seu modo de infecção e propagação ainda não serem esclarecidas (SÁNCHEZ-PAZ, 2010), além de nenhum estudo ter sido publicado até o momento sobre os genótipos do vírus e sua variabilidade no Estado do Ceará, este trabalho buscou utilizar marcadores moleculares para investigar a presença e a epidemiologia do WSSV em fazendas do Estado.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Identificar e caracterizar molecularmente variantes genotípicas do Vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV) em fazendas de cultivo de camarão *Litopenaeus vannamei* no Estado do Ceará.

2.2 Específicos

- Investigar a influência de parâmetros técnicos e sanitários na incidência de WSSV;
- Detectar a presença do WSSV em fazendas do Estado do Ceará;
- Caracterizar molecularmente o WSSV através da análise das regiões minissatélites ORFs 75, 94 e 125 e das regiões variáveis VRs 14/15 e 23/24;
- Calcular as unidades de repetição (RUs) dentro das VNTRs para comparação com VNTRs de outros isolados geográficas;
- Identificar a presença do gene de uma transposase;
- Sequenciar e realizar uma análise *in silico* de regiões variáveis do genoma do WSSV, para determinar afiliações filogenéticas aproximadas.

REFERÊNCIAS

- BOONE, L. Anomuran, macruran Crustacea from Panama and Canal Zone. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 63, n. 2, p. 137–189, 1931.
- ESCOBEDO-BONILLA, C. M. et al. A review on the morphology, molecular characterization, morphogenesis and pathogenesis of white spot syndrome virus. **Journal of Fish Diseases**, v. 31, n. 1, p. 1–18, jan. 2008.
- ABCC – Associação Brasileira de Criadores de Camarão. Censo da carcinicultura do litoral sul do Estado do Ceará e zonas interioranas adjacentes 2015/2016. Convênio ABCC/MAPA. Natal-RN, Novembro, 2017. 12 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, 4 mar. 2013.
- FLEGEL, T. W. Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in Asia. **Journal of Invertebrate Pathology**, Diseases in Aquatic Crustaceans: Problems and Solutions for Global Food Security. v. 110, n. 2, p. 166–173, 1 jun. 2012.
- GRANJA, C. B. et al. Does hyperthermia increase apoptosis in white spot syndrome virus (WSSV)-infected *Litopenaeus vannamei*? **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 54, n. 1, p. 73–78, 17 mar. 2003.
- HASSON, K. W. et al. White-spot syndrome virus (WSSV) introduction into the Gulf of Mexico and Texas freshwater systems through imported, frozen bait-shrimp. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 71, n. 2, p. 91–100, 25 jul. 2006.
- LIGHTNER, D. V. et al. Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in the Americas. **Journal of Invertebrate Pathology**, Diseases in Aquatic Crustaceans: Problems and Solutions for Global Food Security. v. 110, n. 2, p. 174–183, 1 jun. 2012.
- LIN, S.-J. et al. Spawning stress triggers WSSV replication in brooders via the activation of shrimp STAT. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 38, n. 1, p. 128–135, set. 2012.
- MULLER, I. C. et al. Genotyping of white spot syndrome virus (WSSV) geographical isolates from Brazil and comparison to other isolates from the Americas. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 88, n. 2, p. 91–98, 25 jan. 2010.
- NUNES, A. J. P.; FEIJÓ, R. G.; O Vírus da Mancha Branca e a convivência no cultivo de camarão marinho no Brasil. Panorama da aquicultura. 2017. Disponível em: <https://panoramadaaquicultura.com.br/o-virus-da-mancha-branca-e-a-convivencia-no-cultivo-de-camarao-marinho-no-brasil/>. Acesso em: 10 jul 2020.
- PEREIRA, J. M. P. et al. Alternative PCR primers for genotyping of Brazilian WSSV isolates. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 162, p. 55–63, 2019.
- SALEHI, H. The economic impacts of WSSV on shrimp farming production and export in Iran. **Aquaculture Asia Magazine**, v. 15, n. 2, p. 29–31, 2010.

SÁNCHEZ-PAZ, A. White spot syndrome virus: an overview on an emergent concern. **Veterinary Research**, v. 41, n. 6, 2010.

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.

STENTIFORD, G. D.; LIGHTNER, D. V. Cases of White Spot Disease (WSD) in European shrimp farms. **Aquaculture**, v. 319, n. 1, p. 302–306, 1 set. 2011.

TAN, Y.-W.; SHI, Z. Genotyping of white spot syndrome virus in Chinese cultured shrimp during 1998-1999. **Virologica Sinica**, v. 26, p. 123–30, 1 abr. 2011.

VAN HULTEN, M. C. W. et al. The White Spot Syndrome Virus DNA Genome Sequence. **Virology**, v. 286, n. 1, p. 7–22, 20 jul. 2001.

VIDAL, O. M. et al. A Profound Effect of Hyperthermia on Survival of *Litopenaeus vannamei* Juveniles Infected with White Spot Syndrome Virus. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 32, n. 4, p. 364–372, 2001.

3 CAPÍTULO I - REFERENCIAL TEÓRICO
DOENÇA DA SÍNDROME DA MANCHA BRANCA NA CARCINICULTURA

3 CAPÍTULO I - DOENÇA DA SÍNDROME DA MANCHA BRANCA NA CARCINICULTURA

Desde a década de 80, quando a criação de camarão cresceu exponencialmente em diversos países do mundo, foram identificadas doenças infecciosas nesses animais que surgiram como fator limitante ao desenvolvimento da carcinicultura. A dispersão de agentes patogênicos levou a ocorrência de surtos que geraram grandes perdas econômicas para a atividade (LIGHTNER, 1996; BARRACCO, 2004; FLEGEL et al., 2004).

Dentre essas doenças, destacam-se as causadas por agentes virais que estão entre as principais causas de prejuízos econômicos na carcinicultura mundial, e estão listadas pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE – *World Organization For Animal Health*) (LIGHTNER, 2011; OIE 2020). A lista inclui nove enfermidades de notificação obrigatória em crustáceos, sendo seis destas de etiologia viral, a exemplo da Síndrome da Mancha Branca (WSD) (OIE 2020).

O Virus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV), é um dos principais agentes patogênicos responsáveis por infectar diferentes espécies de camarões cultivados em fazendas de cultivo, tendo sido detectado com alta virulência em uma grande variedade de espécies tais como, *Penaeus stylirostri*, *Penaeus monodon* e *Litopenaeus vannamei* (MAHARDIKA; ZAFRAN; KOESHARYANI, 2004; DANTAS et al., 2015).

Relatos de alta mortalidade e consequentemente grandes perdas na produção camaroeira foram descritos em muitos países do continente Asiático e da América Latina (SENAPIN et al., 2011; ARAFANI; GHAZALI; ALI, 2016). Os animais diagnosticados para a Doença da Síndrome da Mancha Branca apresentaram em diferentes fases da vida, desde estágios larvais ao camarão adulto, tendo sido detectados em todos os tipos de sistema de cultivo (extensivo, semi-intensivo, intensivo e super intensivo) (KARUNASAGAR; OTTA; KARUNASAGAR, 1997; MAIMUNAH; KILAWATI, 2015).

A manifestação de doenças virais nos viveiros de cultivo, estão associados a fatores ambientais e a falhas humanas, que atuam como gatilhos para a instalação das enfermidades nesses animais (AOKI et al., 2011; CHAKRABORTI; BANDYAPADHYAY, 2011; TUMBURU et al., 2012). Condições ambientais estressantes provocadas por mudanças bruscas na salinidade e falhas inerentes ao manejo, biossegurança e má qualidade de pós-larvas são possíveis agravantes dessas condições (SCHOCK et al., 2013; RAMOS-CARREÑO et al., 2014).

3.1 CARCINICULTURA

Atividade que se apresenta como um dos ramos da aquicultura de grande potencial econômico e que, por isso, por muito tempo repercutiu em resultados positivos em termos de produção e rentabilidade. Contudo, seu crescimento acelerado resultou em problemas de ordem ambiental, econômica e social (RIBEIRO et al., 2014).

No âmbito mundial a carcinicultura teve origem no oriente, mas especificamente na Ásia durante a década de 30, fato que concentrou o cultivo de camarões marinhos da espécie *Penaeus japonicus* nessa região, com destaque para países como: Índia, China, Vietnã, Indonésia e Tailândia (ROCHA; MAIA, 1998). Atualmente, os países asiáticos, China, Vietnã, Indonésia, Índia e Tailândia dominam o mercado mundial, sendo responsáveis por 80% da produção, enquanto no continente americano, destacam-se México, Equador e Brasil (FAO, 2018).

Em 1980, a carcinicultura mundial passou por um rápido crescimento, principalmente pelo advento de novas tecnologias, a exemplo de mudanças na obtenção das larvas com o estabelecimento de larviculturas em substituição ao uso de pós-larvas silvestres, que tornavam o cultivo de camarões mais susceptíveis a entrada de patógenos (DA SILVA; PINHEIRO; COIMBRA, 2011; LIGHTNER, 2005). Além disso, tecnologias de incubação e avanços na reprodução dos camarões são apontados como medidas que impulsionaram a expansão dessa atividade (DA SILVA; PINHEIRO; COIMBRA, 2011; LOTZ, 1997).

O camarão *Penaeus monodon* e uma pequena parcela do *Macrobrachium rosenbergii*, *Penaeus chinensis* e *Penaeus japonicus* foram as espécies mais cultivadas até o ano 2000, onde juntos produziam cerca de 730.000 toneladas. Ao longo dos 15 anos seguintes, houve um salto na produção global causada pelo incremento médio de 298% na criação de *Litopenaeus vannamei*, espécie que mais cresceu e domina o setor, sendo responsável por 78% de todo camarão produzindo mundialmente (ROCHA, 2016).

3.2 A CARCINICULTURA BRASILEIRA

O Brasil deu seus primeiros passos para implantação de uma carcinicultura sólida e representativa no mercado mundial, na década de 70. A princípio, inúmeras tentativas voltaram-se para o cultivo da espécie exótica *Penaeus japonicus* e depois para espécies nativas, com destaque para as espécies *Farfantepenaeus subtilis*, *Litopenaeus schmitti* e *Farfantepenaeus brasiliensis*. Porém, foi somente no final da década de 80 e início da década de 90 que a carcinicultura brasileira consolidou-se pelo cultivo da espécie *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931) (ABCC, 2017).

Entre os anos de 2002 e 2003, o país se consolidou como um dos maiores produtores

das Américas, principalmente pelo domínio da tecnologia de produção do camarão *L. vannamei* e as condições climáticas favoráveis (POERSCH et al., 2006). Nesse período, houve um aumento de 50 % na produção, atingindo 90.190 toneladas e uma produtividade média de 6 ton/ha/ano (ROCHA et al., 2004).

No ano de 2004, a expansão da carcinicultura brasileira foi reduzida por fatores como o surto de Mionecrose Infecciosa (IMNV), que atingiu principalmente o Nordeste, seu principal polo produtor (NATORI et al., 2011). A crise vivenciada pelo país foi atribuída também à grande concorrência com países asiáticos, ao excesso de chuvas e à desvalorização do dólar atrelada à ação “antidumping” realizada em 2003 pelos EUA (XIMENES et al., 2011).

Todos esses acontecimentos afetaram a carcinicultura do país durante anos, que sobreviveu graças ao surgimento de um mercado interno que consumiu quase toda a produção nacional, abrangendo em 2010, 97,1% (XIMENES et al., 2011). Em 2014, o país voltou a dar sinais de recuperação no mercado externo com exportações para a Espanha e França (BORBA, 2014). E, atualmente, enfrenta graves perdas econômicas devido a presença de enfermidades de difícil controle, a exemplo do vírus da síndrome da mancha branca (WSSV) (ROCHA, 2011; ABCC, 2017).

3.3 CARCINICULTURA NA REGIÃO NORDESTE DO BRASIL

A carcinicultura desenvolvida na região Nordeste é responsável por 90% de toda a produção nacional. Os estados do Ceará e Rio Grande do Norte são os maiores produtores, produzindo juntos uma quantidade estimada em 50 mil toneladas. A liderança atual está com o estado do Rio Grande do Norte, com o estado do Ceará ocupando a segunda posição como maior produtor nacional (IBGE, 2019).

No Estado do Rio Grande do Norte, a carcinicultura teve apoio do governo através da implantação do “Projeto Camarão” durante a década de 70. Contudo, não foi suficiente para a carcinicultura da região deslançar, pois pouco foi investido em tecnologia e não houve boa adaptação do camarão cultivado (*Penaeus japonicus*). Somente com o cultivo de *Litopenaeus vannamei*, a partir da década de 90, a atividade tornou-se promissora para a economia do estado (ABCC, 2011).

O cultivo de camarão marinho iniciou-se no Estado do Ceará na década de 80, enfrentando uma série de dificuldades, assim como em todo o país. No entanto, o crescimento da atividade no Estado deu-se principalmente pela alta produtividade do camarão *Litopenaeus vannamei*, que encontrou um ambiente favorável ao seu desenvolvimento, além de incentivos governamentais e evolução do empresariado do setor, que passou a se capacitar para administrar seu agronegócio (COSTA et al., 2009).

A região Nordeste detém a grande maioria das fazendas de camarões do Brasil, além

disso é onde estão situados praticamente todos os laboratórios pós-larva. Essas características, atreladas a investimentos governamentais, mão-de-obra barata e boa aceitação do produto, tornam essa região referência no cenário mundial (CAMPOS, 2006; ABCC, 2013).

De acordo com Sampaio, Costa e Sampaio (2008), a carcinicultura no Nordeste trouxe benefícios econômicos e sociais, tais como melhorias nas condições de vida de muitos municípios da região desde a expansão da atividade. Ainda segundo estes autores, o setor agropecuário do Nordeste precisa que a carcinicultura se mantenha firme na geração de emprego e renda, mostrando a grande importância da atividade.

3.4 DESENVOLVIMENTO DA CARCINICULTURA NO ESTADO DO CEARÁ

A carcinicultura cearense acompanhou o desenvolvimento da carcinicultura brasileira, que atingiu seu recorde de produção no ano de 2003, com uma produção estimada em 90.190 toneladas de camarão. Tendo o Estado do Ceará contribuído com 25.915 toneladas de camarões, correspondendo a 28,7% de toda a produção nacional, colocando o Estado na posição de segundo maior produtor do Brasil (ABCC, 2017).

Nesta mesma época a primeira colocação era ocupada pelo Estado do Rio Grande do Norte que foi acometido por enchentes que provocaram sérios danos ao setor produtivo do Estado, nos anos de 2004, 2005 e 2009. Com isso, o Estado do Ceará assumiu em 2010 a 1ª colocação como maior produtor nacional, posição atualmente recuperada pelo estado do Rio Grande do Norte (ABCC, 2017, IBGE, 2019).

O Ceará assim como todos os produtores de camarão da região Nordeste, conseguiram superar os entraves provocados pela lei *antidumping*, pelo processo cambial e as percas na produção devido a presença do vírus da mionecrose infecciosa (IMNV) nos viveiros de cultivo a partir de 2004. Assim, o setor continuou sua expansão nos anos seguintes, colocando os municípios cearenses como destaque no âmbito nacional. Neste período, o município de Aracati tornou-se líder do *ranking* com 12,56 mil toneladas, seguido pelos municípios de Acaraú, Jaguaruana e Beberibe (ABCC, 2017).

Porém, no ano de 2016 o Estado do Ceará foi acometido de forma severa pelo vírus da síndrome da mancha branca (WSSV) (ABCC, 2017). E, de acordo com Nunes e Feijó (2016) o vírus disseminou-se pelas fazendas da região do baixo Jaguaribe onde situam-se os principais municípios produtores. E até hoje, trabalhos buscam uma forma de controle e mitigação do vírus no Estado do Ceará, bem como em outros Estados do Brasil.

3.4.1 Classificação climática dos principais municípios produtores de camarão do Estado do Ceará

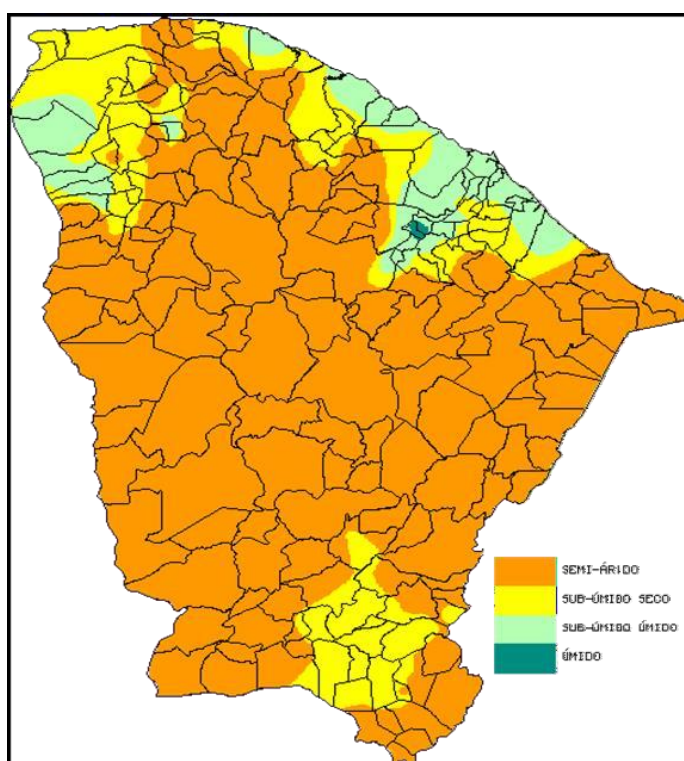
O Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente – UNEP (BARROW, 1992), adota uma classificação climática de acordo com o índice de aridez para diversos postos pluviométricos do Estado do Ceará (Figura 1). Dividindo as regiões em Semiárido, Semiúmido seco, Subúmido úmido e Úmido.

Algumas mudanças devido a baixa pluviosidade encontrada no Estado do Ceará, quatro anos após a primeira classificação em 1992 que perdurou até 2012, permitiu reclassificar alguns municípios. O município de Aracati foi um dos municípios que sofreu alteração, passando de Subúmido seco para Semiárido (FUNCEME, 2020).

De acordo com o Censo da Carcinicultura do Litoral Sul do Estado do Ceará e Zonas Interioranas Adjacentes 2015/2016, 15 municípios possuem fazendas ativas na Região Sul (Litoral leste e Vale Jaguaribe) são eles: Alto Santo, Aracati, Aquiraz, Beberibe, Cascavel, Fortim, Icapuí, Itaiçaba, Jaguaribara, Jaguaribe, Jaguaruana, Limoeiro do Norte, Morada Nova, Russas e Horizonte. Os municípios de Jaguaruana e Aracati são os que possuem o maior número de produtores ativos da região (ABCC, 2017). A classificação de cada um desses municípios está demonstrada no mapa da Figura 1.

Dessa forma, os municípios de Aracati Jaguaruana e Russas, objetos de estudo dessa Tese, estão inseridos no clima Semi-árido. O conhecimento das condições climáticas, revelam-se de extrema importância para a carcinicultura, principalmente no que se refere ao manejo e sanidade dos animais de cultivo (FUNCEME, 2020).

Figura 1 - Mapa da classificação climática do Estado do Ceará



Fonte: FUNCEME, 2020.

3.4.2 O Rio Jaguaribe no Semiárido Cearense

O rio Jaguaribe é importante fonte de captação de água para as fazendas produtoras de camarão no Semiárido Cearense, composto por uma bacia que engloba cerca de 50% do Estado do Ceará, com 610 km de extensão e 74.000 km² de bacia hidrográfica que drena as partes meridional e oriental do Estado, desaguando no oceano Atlântico (ABREU; LACERDA; MARINS, 2003). O rio é considerado o maior rio seco do mundo (CAMPOS, 2006).

Atualmente, assim como em grande parte dos rios da região Nordeste, o rio Jaguaribe é constituído por drenagens de pequeno, médio e grande porte. A barragem do Castanhão, com 6,7 bilhões de m³ de armazenamento de água, destaca-se como a principal garantia de água para o Estado do Ceará (CAVALCANTE; CUNHA, 2012; SANTOS et al., 2017).

3.4.3 Estuário do Rio Jaguaribe

Estuários são definidos como sendo um corpo de água costeiro semifechado com ligação livre com o oceano aberto, no interior do qual a água do mar é diluída pela água doce oriunda da drenagem continental (HOBBIE, 2000). Porém, as regiões semiáridas não podem ser assim definidas, pois são caracterizadas por curtos períodos de chuvas e longos períodos de seca, razão pela qual são denominados de estuários hipersalinos, cujo aporte de água doce somente ocorre durante as épocas chuvosas do ano (POTTER, 2010).

Com isso, a classificação que melhor define as regiões semiáridas é adotada por Day (1980, 1981): Um estuário é um corpo de água parcialmente fechado no qual é também permanentemente ou periodicamente aberto para o mar e dentro do qual existe até certo ponto uma variação de salinidade devido à mistura de água do mar com água doce derivada da drenagem terrestre.

A região estuarina do rio Jaguaribe está localizada no litoral leste do Estado do Ceará, região de maior produção e detentora do maior número de fazendas de cultivo de camarão do Estado do Ceará. O estuário possui uma extensão de 36 km e ocupa uma área de aproximadamente 1.350 km², envolvendo os municípios de Fortim, Aracati e Itaiçaba (SEMACE, 2020).

3.5 CAMARÃO MARINHO *Litopenaeus vannamei*

O camarão marinho inicialmente classificado como *Penaeus vannamei* (BOONE, 1931) e, posteriormente, reclassificado por Pérez Farfante e Kensley (1997) como *Litopenaeus vannamei*, pertence à família dos camarões Peneídeos, nativo da costa leste do oceano pacífico,

entre a região costeira do México e Peru (FAO, 2016). Conhecido popularmente pelo nome comercial “*camarão-branco-do-pacífico*” ou “*camarão cinza*”, foi trazido ao Brasil no ano de 1981, onde a princípio foi cultivado em viveiros do estado do Rio Grande do Norte (TAVARES; MENDONÇA, 1996).

L. vannamei é uma espécie tipicamente eurialina, sendo capaz de suportar diferenças de salinidade entre 0,5 e 40 ppt. Por isso, e pela sua capacidade de tolerar variações ambientais, além da sua elevada rusticidade, tornou-se a espécie de camarão mais cultivada mundialmente (FONSECA et al., 2009).

3.6 CULTIVO EM ÁGUAS OLIGOHALINAS

Até o início dos anos 90 o camarão *Litopenaeus vannamei* tinha sua produção restrita as regiões litorâneas, porém, o elevado custo de implantação decorrente dos altos valores territoriais representavam limitação a seu desenvolvimento nessas regiões. Diante desses entraves, vários estudos traçaram estratégias visando o desenvolvimento da atividade em regiões interioranas, utilizando águas oligohalinas, visto que os valores das terras no interior são muito inferiores as terras no litoral (PESSÔA et al., 2016).

De acordo com Campos e Campos (2006), com o passar dos anos novas fazendas foram surgindo e se instalando cada vez mais longe das áreas litorâneas almejando alternativas pra especulação imobiliária e maior controle de enfermidades, até que os primeiros cultivos em águas oligohalinas e doce demonstraram viabilidade econômica e técnica.

A grande demanda internacional atrelada a sua capacidade de cultivo em baixa salinidade permitiu que a atividade se desenvolvesse em regiões interioranas, impulsionando o mercado da carcinicultura em países como Estados Unidos (Arizona, Texas, Alabama e Flórida), Equador, Panamá e Brasil (FIGUEIRÊDO et al., 2006; FONSECA et al., 2009).

Apesar do sucesso da instalação de fazendas de cultivo de camarões *L. vannamei* em áreas interioranas, existem limitações, principalmente em relação as regiões semiáridas do Nordeste do Brasil, tais como, baixa disponibilidade hídrica, reduzido conhecimento técnico e prático dos carcinicultores e distância dos fornecedores de insumos. Contrapondo a limitação hídrica, este pode ser um problema solucionado pela atividade, já que poços podem ser fonte de captação de água e serem úteis durante os períodos de seca típicos do clima semiárido. A mão de obra capacitada, devido ao conhecimento das características da região, bem como água com boa qualidade física e química para o cultivo, que também são fatores benéficos ao cultivo em águas oligohalinas (PESSÔA et al., 2016).

3.7 SÍNDROME DA MANCHA BRANCA (WSD)

A WSSD é uma enfermidade causada pelo Vírus da Síndrome da Mancha Branca (White Spot Syndrome Virus - WSSV) (OIE, 2020; LIGHTNER, 2011). Este patógeno foi recentemente incluído pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) como o único membro do novo gênero *Whispovirus* dentro da família *Nimaviridae* (OIE, 2020).

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). Seus principais sinais clínicos são evidenciados pela presença de manchas brancas na região interna do exoesqueleto de camarões *L. vannamei*, embora possam se distribuir ao longo de todo o corpo destes animais. As causas dessas lesões não estão totalmente esclarecidas, suspeitando-se que a deposição anormal de sais de cálcio seja responsável por sua aparência macroscópica (LIGHTNER, 2011).

Além da presença de manchas brancas, sintomas como coloração avermelhada / rosada e tornar-se moribundo são característicos da doença (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, com gramatura de aproximadamente 3-5g, que são mais susceptíveis (WONGTEERASUPAYA et al., 1996).

De acordo com Oidtmann e Stentiford (2011), os principais fatores de risco para o desenvolvimento da WSSD em fazendas é a presença de alterações na qualidade da água, principalmente em relação a mudanças bruscas em parâmetros como salinidade e temperatura. Em condições experimentais, à temperatura controlada de 32°C, ocorre inibição da multiplicação viral, mas à 25°C a letalidade da doença pode alcançar 100%. Esse fenômeno explica a predominância da doença em períodos com temperaturas mais amenas, tomando como referência o clima do Nordeste, ou em estados como Santa Catarina que devido ao frio característico da região foi bastante afetado pelo WSSV e que ainda hoje sofre para manter seu controle e disseminação (LIGHTNER, 2011).

Seu agente etiológico, o vírus da síndrome da mancha branca (WSSV), possui DNA fita dupla e um dos maiores genomas conhecidos entre os vírus. com aproximadamente 300 kbp (YANG et al., 2001). Dieu et al. (2004) e Marks et al. (2004), analisando os genomas dos três isolados de WSSV disponíveis (China, Taiwan e Tailândia), identificaram que algumas dessas regiões podem ser utilizadas como marcadores moleculares em estudos evolutivos e epidemiológicos.

3.8 MARCADORES MOLECULARES

Marcadores moleculares são ferramentas utilizadas para identificar variações polimórficas a nível de DNA, em indivíduos, espécies e/ou grupos taxonômicos (ZHANG et

al., 2012). Um marcador molecular ideal deve obedecer a dois critérios de classificação: especificidade da fonte e comportamento conservador. A especificidade de um marcador está associada à sua eficiência de ligação a uma determinada fonte, enquanto o comportamento conservador é essencial para sua eficácia, pois o mesmo não deve ser influenciado pelo ambiente (MARTINS, 2017).

Em estudos aplicados a aquicultura, os marcadores moleculares mais utilizados são os microssatélites (SSR, do inglês *Simple Sequence Repeats*) e os de polimorfismo de nucleotídeo único (SNP, do inglês *Single Nucleotide Polymorphism*) (ZHANG et al., 2012). Esses marcadores caracterizam-se por terem alto nível de polimorfismo, capacidade de reprodutibilidade e classificarem-se como codominantes, possibilitando a diferenciação entre os *loci* em homozigose daqueles em heterozigose (LIU; CORDES, 2004).

Na Carcinicultura o uso de marcadores moleculares têm sido empregados nos últimos anos, como aliados em estudos de melhoramento genético, análise de parentesco, além de estudos sobre a diversidade genética e evolução de camarões peneídeos (ANDRIANTAHINA; LIU; HUANG, 2013; CIOBANU et al., 2010; MARALIT et al., 2014; YU et al., 2014).

3.9 VARIAÇÕES GENOTÍPICAS NO GENOMA DO WSSV

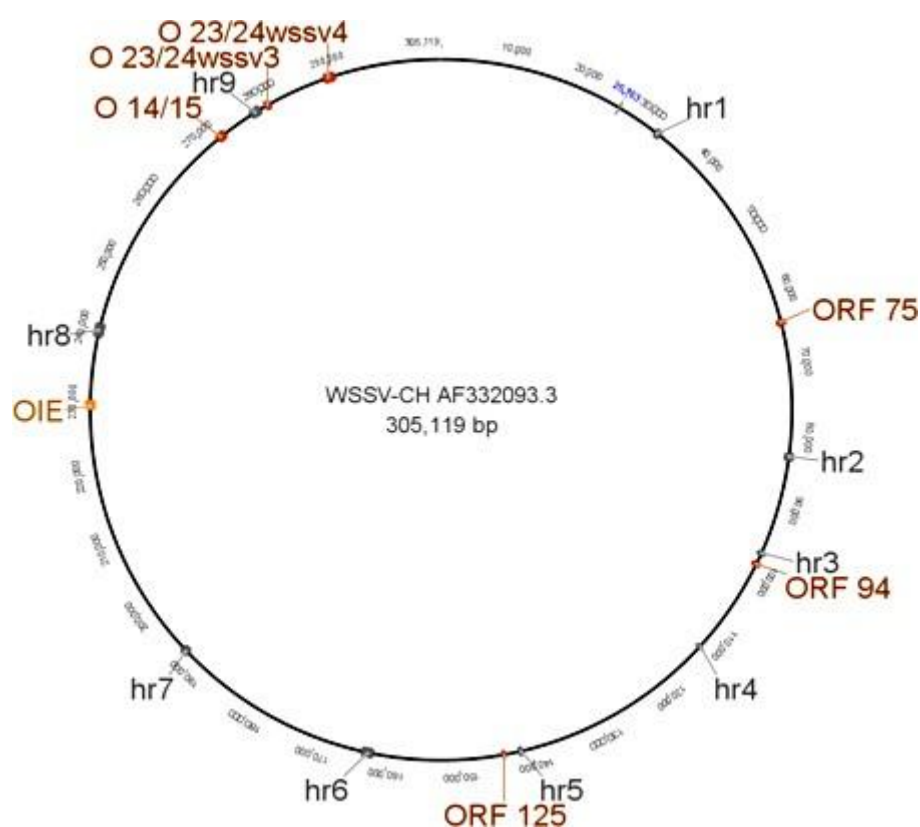
O genoma completo do vírus da síndrome da mancha branca (WSSV), foi depositado pela primeira vez nas bases de dados do *GenBank*, obtido a partir de três isolados geográficos, oriundos da Tailândia (WSSV-TH; VAN HULTEN et al., 2001; Acc. No. AF369029), China (WSSV-CN; YANG et al., 2001., 2001; Acc. No. AF332093) e Taiwan WSSV-TW; TSAI et al., 2000; Acc. No. AF440570). A comparação entre esses diferentes isolados geográficos de WSSV, possibilitou a identificação de regiões gênicas com 95% de identidade, mas também de regiões variáveis, que atualmente são empregadas para a determinação de variantes virais e estudo da origem e dispersão do vírus no tempo e no espaço (DIEU et al., 2004; GUDKOV; MURWANTOKO; WALKER, 2014; RODRÍGUEZ-ANAYA et al., 2016). Além disso, a variação em vários *loci* sugere que o vírus se propagou a partir de um ancestral comum de Taiwan (MARKS et al., 2004).

O sequenciamento revelou 184 fases abertas de leitura (Open Reading Frames) ORFs e nove regiões com sequências de repetição em tandem (VAN HULTEN et al., 2001). Até o momento, pouco se sabe sobre a função da maioria dessas ORFs. São conhecidas algumas das principais regiões variáveis, que são elas: uma região propensa a recombinação ORF14/15, uma região com uma grande deleção ORF23/24, três regiões minissatélites com repetições in tandem de número variável (variable number of tandem repeats - VNTRs) denominadas ORF 75, 94 e 125, uma sequência de uma transposase presente apenas no WSSV-TW e deleções de base única

e polimorfismos de base única (*single nucleotide polymorphisms* – SNPs) (MARKS et al. 2004).

As VNTRs foram propostas para serem marcadores em estudos epidemiológicos (DIEU et al., 2004; MARKS et al., 2004; SHEKAR; KARUNASAGAR; KARUNASAGAR, 2005; WONGTEERASUPAYA et al., 2003), enquanto as ORF 14/15 e 23/24 foram descritas como úteis na identificação de mudanças evolutivas do WSSV (MARKS et al. 2004). A distribuição dessas regiões no genoma do WSSV pode ser visualizada na representação esquemática do genoma de um isolado da China (WSSV-CH) na Figura 2.

Figura 2 - Representação esquemática da localização das regiões variáveis do genoma do WSSV-CH. (hr) regiões homólogas (ORF ou O) janela aberta de leitura



Outras sequências completas do genoma do WSSV foram depositadas nos últimos anos, provenientes de isolados da Coréia do Sul (WSSV-KR; CHAI et al., 2013; Acc. No. JX515788) do Egito (Acc. No. 76 KR083866), três sequências da China (Acc. No. KT995472.1, KT995470.1 e KT995471.1) de um isolado do Brasil (DANTAS et al., 2018 Acc. No. MF784752.1), e, também a sequência proveniente de um isolado da Austrália (OAKEY; SMITH, 2018 Acc. No. MF768985.1), além de uma sequência do genoma parcial proveniente do México (RODRÍGUEZ-ANAYA et al., 2016) Acc. No. KU216744.1).

REFERÊNCIAS

- ABCC - Associação Brasileira de Criadores de Camarão. 2017. **Censo da carcinicultura do litoral sul do estado do Ceará e zonas interioranas adjacentes 2015/ 2016**. Natal: ABCC/MAPA.
- ABREU, I. M.; LACERDA, L. D.; MARINS, R. V. Emissões de nitrogênio e fósforo para o Estuário do Rio Jaguaribe, (CE). **Revista da ABCC**, n. 4, p. 76-79, 2003.
- ANDRIANTAHINA, F.; LIU, X.; HUANG, H. Genetic Map Construction and Quantitative Trait Locus (QTL) Detection of Growth-Related Traits in *Litopenaeus vannamei* for Selective Breeding Applications. **PLOS ONE**, v. 8, n. 9, p. e75206, 25 set. 2013.
- AOKI, T. et al. Microarray analyses of shrimp immune responses. **Marine Biotechnology (New York, N.Y.)**, v. 13, n. 4, p. 629–638, ago. 2011.
- ARAFANI, L.; GHAZALI, M.; ALI, M. Detection of white spot syndrome virus in *Litopenaeus vannamei* in Lombok Island using real-time polymerase chain reaction. **Jurnal Veteriner**, v. 17, n. 1, p. 88–95, 2016.
- BARRACCO, M.A. Mecanismos de resistência a doenças em crustáceos. In: Ranzani-Paiva, M.J.T.; Takemoto, R.M.; Lizama, M.L.A.P. **Sanidade de organismos aquáticos**. São Paulo: Varela, p. 51-74, 2004.
- BARROW, C. J. World atlas of desertification (United nations environment programme), edited by N. Middleton and D. S. G. Thomas. Edward Arnold, London, 1992. **Land Degradation & Development**, v. 3, n. 4, p. 249–249, 1992.
- BOONE, L. Anomuran, macruran Crustacea from Panama and Canal Zone. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 63, n. 2, p. 137–189, 1931.
- BORBA, M. **Balança comercial de pescado do Brasil** – março de 2014. Associação Brasileira dos Criadores de Camarão (ABCC). Abril de 2014. Disponível em: <<http://abccam.com.br/site/balanca-comercial-de-pescado-do-brasil-marco-de-2014/>> Acessado em: 10 de jul de 2020.
- CAMPOS, J. N. A gestão das águas e o desenvolvimento do Estado do Ceará: uma perspectiva histórica. **T&C Amazônia**, v. 4, 1 ago. 2006.
- CAMPOS, K. C.; CAMPOS, R. T. Alternativa econômica para o novo rural do Nordeste brasileiro: o cultivo do camarão *Litopenaeus vannamei* em água doce. 2006.
- CAVALCANTE, A. A.; CUNHA, S. B. DA. MORFODINÂMICA FLUVIAL EM ÁREAS SEMIÁRIDAS: DISCUTINDO O VALE DO RIO JAGUARIBE-CE-BRASIL. **Revista Brasileira de Geomorfologia**, v. 13, n. 1, 13 ago. 2012.
- CEARÁ. Secretária de Recursos Hídricos-SRH. **Atlas Eletrônico dos Recursos Hídricos e Meteorológicos do Ceará**. 1992. Disponível em: Acesso em: 25, fev. 2020

CHAI, C. Y. et al. Analysis of the complete nucleotide sequence of a white spot syndrome virus isolated from pacific white shrimp. **Journal of Microbiology**, v. 51, n. 5, p. 695–699, 1 out. 2013.

CHAKRABORTI, J.; BANDYAPADHYAY, P. K. Seasonal incidence of protozoan parasites of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) of Sundarbans, West Bengal, India. **Journal of Parasitic Diseases: Official Organ of the Indian Society for Parasitology**, v. 35, n. 1, p. 61–65, jun. 2011.

CHOU, H. Y. et al. Pathogenicity of a baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. **Diseases of aquatic organisms**, v. 23, n. 3, p. 165–173, 1995.

CIOBANU, D. C. et al. A major SNP resource for dissection of phenotypic and genetic variation in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Animal Genetics**, v. 41, n. 1, p. 39–47, fev. 2010.

COSTA, R. A. et al. Vibrio em amostras de água de viveiros de cultivo do camarão marinho *litopenaeus vannamei*, no Ceará-Brasil. 2009.

DA SILVA, S. M. B. C.; PINHEIRO, A. C. DE A. S.; COIMBRA, M. R. M. Quantitation of infectious myonecrosis virus in different tissues of naturally infected Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, using real-time PCR with SYBR Green chemistry. **Journal of Virological Methods**, v. 177, n. 2, p. 197–201, 1 nov. 2011.

DANTAS, M. D. A. et al. Analysis of new isolates reveals new genome organization and a hypervariable region in infectious myonecrosis virus (IMNV). **Virus Research**, v. 203, p. 66–71, 4 maio 2015.

DANTAS, M. D. A. et al. Direct sequencing of the white spot syndrome virus from Brazil: Genome assembly and new insights on phylogeny. **Virus Research**, v. 245, p. 52–61, 2 fev. 2018.

DAY, J. H. The nature, origin and classification of estuaries. **Estuarine ecology with particular reference to southern Africa**, p. 1-6, 1981.

DAY, J. H. What is an estuary. **South African Journal of Science**, v. 76, n. 5, p. 198-198, 1980.

DIEU, B. T. M. et al. Molecular epidemiology of white spot syndrome virus within Vietnam. **The Journal of General Virology**, v. 85, n. Pt 12, p. 3607–3618, dez. 2004.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. Fao statistical yearbook 2016. Trends in the fisheries sector. Rome, p. 146, 2016.

FIGUEIRÊDO, M. C. B. DE et al. Environmental impacts of the inland shrimp farming. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 11, n. 3, p. 231–240, set. 2006.

FLEGEL, T. W. et al. Presence of multiple viruses in non-diseased, cultivated shrimp at harvest. **Aquaculture**, v. 240, n. 1, p. 55–68, 27 out. 2004.

FONSECA, S. B. DA et al. Cultivo do camarão marinho em água doce em diferentes densidades de estocagem. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 10, p. 1352–1358, out. 2009.

FUNCEME. Fundação Cearense de Meteorologia e Recursos Hídricos. **Índice de Aridez para o Ceará**. 2020. Disponível em: < <http://www.funceme.br/app/radar> >. Acesso em: 8 mai. 2020.

GUDKOV, N.; MURWANTOKO, M.; WALKER, P. Stability of the WSSV ORF94 VNTR genotype marker during passage in marine shrimp, freshwater crayfish and freshwater prawns. **Diseases of aquatic organisms**, v. 111, p. 249–57, 16 out. 2014.

HOBBIE, J. E. **Estuarine Science: A Synthetic Approach to Research and Practice**. [s.l.] Island Press, 2000.

KARUNASAGAR, I.; OTTA, S. K.; KARUNASAGAR, I. Histopathological and bacteriological study of white spot syndrome of *Penaeus monodon* along the west coast of India. **Aquaculture**, v. 153, n. 1, p. 9–13, 15 jun. 1997.

LIGHTNER, D. V. Biosecurity in Shrimp Farming: Pathogen Exclusion through Use of SPF Stock and Routine Surveillance. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 36, n. 3, p. 229–248, 2005.

LIGHTNER, D. V. Virus diseases of farmed shrimp in the Western Hemisphere (the Americas): a review. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 106, n. 1, p. 110–130, jan. 2011.

Lightner, D.V. **A Handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp**. 1st ed. Baton Rouge: World Aquaculture Society, 1996.

LIU, Z. J.; CORDES, J. F. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. **Aquaculture**, v. 238, n. 1, p. 1–37, 1 set. 2004.

LOTZ, J. M. Viruses, biosecurity and specific pathogen-free stocks in shrimp aquaculture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 405–413, 1 jul. 1997.

MAHARDIKA, K.; ZAFRAN, G. (INDONESIA)); KOESHARYANI, I. Detection of White Spot Syndrome Virus (WSSV) in *Penaeus monodon* reared in hatchery and ponds in Bali and East Java using Polymerase Chain Reaction (PCR) technique. **Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia (Indonesia)**, 2004.

MAIMUNAH, Y.; KILAWATI, Y. Kualitas Lingkungan Tambak Insentif Litapenaeus Vannamei Dalam Kaitannya Dengan Prevalensi Penyakit White Spot Syndrome Virus. **Research Journal of Life Science**, v. 2, n. 1, p. 50–59, 21 abr. 2015.

MARALIT, B. A. et al. **Subtracted Transcriptome Profile of Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*) That Survived WSSV Challenge**. Dataset Paper. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/dpis/2014/807806/>>. Acesso em: 16 ago. 2020.

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

MARTINS, D. DE A. Uso de marcadores moleculares na avaliação da contaminação em estuário do Nordeste Brasileiro: caso do sistema estuarino Ubatuba/Timonha. 2017.

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

NUNES, A. J. P; FEIJÓ, R. G. Convivência com o vírus da mancha branca no cultivo de camarão marinho no Brasil. **Revista da ABCC – Associação Brasileira dos Criadores de Camarão**. Natal, Ano XVIII Nº 2, 2016.

Oakey, H. J.; Smith, C. S. Complete genome sequence of a white spot syndrome virus associated with a disease incursion in Australia. **Aquaculture**, v. 484, p. 152–159, 1 fev. 2018.

OIE – World Organisation For Animal Health. Doenças, infecções e infestações listadas pela OIE em vigor em 2020. Disponível em: < <https://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2020/>>. Acesso em: 18 de abril de 2020.

OIE – World Organisation For Animal Health. **Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals** - Chapter 2.2.6. — White spot disease. 2020. Disponível em: < https://www.oie.int/index.php?id=2439&L=0&htmlfile=chapitre_wsd.htm> Acessado em 10 de jul de 2020.

PÉREZ FARFANTE, I.; KENSLEY, B. Penaeoid and sergestoid shrimps and prawns of the world. Keys and diagnoses for the families and genera. **Mémoires du Muséum National d'Histoire naturelle**, v. 175, p. 1–233, 1997.

PESSÔA, M. N. D. C. et al. MARINE SHRIMP CULTIVATED AT DIFFERENT DENSITIES AND FEEDING REGIMENS IN OLIGOHALINE WATERS. **Revista Caatinga**, v. 29, n. 3, p. 700–708, set. 2016.

POERSCH, L. et al. Perspectivas para o desenvolvimento dos cultivos de camarões marinhos no estuário da Lagoa dos Patos, RS. **Ciência Rural**, v. 36, 1 ago. 2006.

POTTER, I. C.; CHUWEN, B. M.; HOEKSEMA, S. D.; ELLIOTT, M. The concept of an estuary: A definition that incorporates systems which can become closed to the ocean and hypersaline. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. v. 87, p. 497-500. 2010.

RAMOS-CARREÑO, S. et al. White spot syndrome virus (WSSV) infection in shrimp (*Litopenaeus vannamei*) exposed to low and high salinity. **Archives of Virology**, v. 159, n. 9, p. 2213–2222, set. 2014.

RIBEIRO, L. F. et al. Desafios da carcinicultura: aspectos legais, impactos ambientais e alternativas mitigadoras. **Revista de Gestão Costeira Integrada**, v. 14, n. 3, p. 365–383, set. 2014.

ROCHA, I. P. Carcinocultura Marinha: Realidade mundial e os desafios confrontados pelo Brasil, **Revista da ABCC**, 2016. Disponível em: < <http://abccam.com.br/site/wpcontent/uploads/2016/01/Carcinocultura-Marinha-Realidade-Mundial-e-os-desafiosConfrontados-pelo-Brasil-Itamar-Rocha.pdf>>. Acesso em: 10 jul. 2020.

ROCHA, I. P. Carcinicultura brasileira: Processos tecnológicos, impactos sócio-econômicos, sustentabilidade ambiental, entraves e oportunidades. **Revista da ABCC**, v. 13, n. 1, p. 13-23, 2011.

ROCHA, I. P. **Cultivo do Camarão Marinho: Atividade Socialmente Justa, Ambientalmente Responsável e, Economicamente Importante, de Forma Especial para o Meio Rural da Região Nordeste**. Carcinicultura Marinha Brasileira – Artigo Executivo. Disponível em: <<http://abccam.com.br/site/wp-content/uploads/2015/05/Carcinicultura-Marinha-Brasileira-Artigo-Executivo.pdf>> Acessado em: 10 de jul de 2020.

ROCHA, I. P.; MAIA, E.P. Desenvolvimento tecnológico e perspectivas de crescimento da carcinicultura marinha brasileira. **WORLD AQUACULTURE SOCIETY (WAS) AND AQUICULTURA BRASIL**, v. 98, 1998.

ROCHA, I.P.; RODRIGUES, J.; AMORIM, L.A. Carcinicultura Brasileira em 2003. **Revista da ABCC**, v.6, n. 1, p. 30-36, 2004.

RODRÍGUEZ-ANAYA, L. Z. et al. **Analysis of repeated compound units in ORF94 of white spot syndrome virus isolated from Litopenaeus vannamei from outbreak and non-outbreak shrimp farms in Sonora, Mexico**. Disponível em: <[/paper/Analysis-of-repeated-compound-units-in-ORF94-of-and-Rodr%C3%ADguez-Anaya-Ibarra-G%C3%A1mez/293a82a573a3e261af7afcbb98c4f9722385f090](https://doi.org/10.1186/s13041-020-00500-0)>. Acesso em: 16 ago. 2020.

SAMPAIO, Y.; COSTA, E. DE F.; SAMPAIO, E. A. B. R. Impactos socioeconômicos do cultivo de camarão marinho em municípios selecionados do Nordeste brasileiro. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 46, n. 4, p. 1015–1042, dez. 2008.

SANTOS, J. A. et al. Hydrochemistry and trophic state change in a large reservoir in the Brazilian northeast region under intense drought conditions. **Journal of Limnology**, v. 76, n. 1, 2017.

SCHOCK, T. B. et al. Evaluation of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) Health during a Superintensive Aquaculture Growout Using NMR-Based Metabolomics. **PLOS ONE**, v. 8, n. 3, p. 595, 26 mar. 2013.

SENAPIN, S. et al. False rumours of disease outbreaks caused by infectious myonecrosis virus (IMNV) in the whiteleg shrimp in Asia. **Journal of Negative Results in Biomedicine**, v. 10, p. 10, 3 ago. 2011.

SHEKAR, M.; KARUNASAGAR, I.; KARUNASAGAR, I. A computer-based identification of variable number tandem repeats in White spot syndrome virus genomes. **Current Science**, v. 89, n. 5, p. 882–887, 2005.

TAVARES, M. & MENDONÇA JR., J. B. *Charybdis hellerii* (A. Milne Edwards, 1867)(Brachyura: Portunidae), eighth nonindigenous marine decapod recorded from Brazil. **Crustacean Research**, v. 25, p. 151-157, 1996.

TSAI, M. F. et al. Identification and characterization of a shrimp white spot syndrome virus (WSSV) gene that encodes a novel chimeric polypeptide of cellular-type thymidine kinase and thymidylate kinase. **Virology**, v. 277, n. 1, p. 100–110, 10 nov. 2000.

TUMBURU, L. et al. Effects of endosulfan exposure and Taura Syndrome Virus infection on the survival and molting of the marine penaeid shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Chemosphere**, v. 86, n. 9, p. 912–918, 1 mar. 2012.

VAN HULTEN, M. C. W. et al. The White Spot Syndrome Virus DNA Genome Sequence. **Virology**, v. 286, n. 1, p. 7–22, 20 jul. 2001.

XIMENES, L. J. F.; VIDAL, M. F.; e FEITOSA, R. A. **Recuperação da Carcinicultura Nordestina Pós-Crise**. Informe Rural Etene – Banco do Nordeste, Ano V – Nº 15, Setembro de 2011. Disponível em: <
http://www.bnb.gov.br/documents/88765/89729/ire_ano5_n15.pdf/358b4c3c-031a-44b9-86c0-412ef894c3d8> Acessado em: 10 de jul. de 2020.

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, 15 jul. 1996.

WONGTEERASUPAYA, C. et al. High variation in repetitive DNA fragment length for white spot syndrome virus (WSSV) isolates in Thailand. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 54, n. 3, p. 253–257, 24 abr. 2003.

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.

YU, Y. et al. SNP Discovery in the Transcriptome of White Pacific Shrimp *Litopenaeus vannamei* by Next Generation Sequencing. **PLOS ONE**, v. 9, n. 1, p. e87218, 30 jan. 2014.

ZHANG, J. et al. Genomic Resources for Functional Genomics in Aquaculture Species. In: **Functional Genomics in Aquaculture**. [s.l.: s.n.]. p. 41–77, 2012.

**4 CAPÍTULO II – ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DE PARÂMETROS
TÉCNICOS E SANITÁRIOS NA INCIDÊNCIA DO WSSV EM
FAZENDAS DE CULTIVO DE CAMARÃO *Litopenaeus vannamei* NO
ESTADO DO CEARÁ, NORDESTE DO BRASIL**

4 CAPÍTULO II – ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DE PARÂMETROS TÉCNICOS E SANITÁRIOS NA INCIDÊNCIA DO WSSV EM FAZENDAS DE CULTIVO DE CAMARÃO *Litopenaeus vannamei* NO ESTADO DO CEARÁ, NORDESTE DO BRASIL

RESUMO – Alterações nos parâmetros de cultivo como variações bruscas de temperatura e salinidade têm sido associados à presença de altas mortalidades por WSSV nas fazendas de cultivo e, por isso, este trabalho objetivou analisar a influência desses parâmetros na incidência de WSSV em fazendas de cultivo de camarão do Estado do Ceará. Foi aplicado um questionário semiestruturado desenvolvido utilizando o software Epi info™ 7, para ser respondido por responsáveis técnicos de fazendas localizadas nos municípios de Aracati, Jaguaruana e Russas no Estado do Ceará, entre os meses julho de 2017 a setembro de 2019. As informações quanto ao porte dos empreendimentos, qualidade da água, monitoramento de parâmetros como temperatura e salinidade e histórico de enfermidades, foram obtidas pela aplicação dos questionários, que foram tabuladas em planilhas do Excel e analisadas por estatística descritiva. A incidência de WSSV foi verificada pela análise presuntiva dos camarões, realizada a partir da análise macroscópica do camarão fresco e por microscopia óptica. Os questionários aplicados permitiram o levantamento de informações quanto a fonte de captação de água, mostrando ser variável dentro das fazendas em estudo. Foi possível inferir que a salinidade não foi determinante para incidência de WSSV, pois ambientes com diferentes salinidades parecem ter sido acometidos e que a temperatura é determinante na incidência de mortalidade, principalmente em épocas mais frias do ano. Constatou-se ainda reincidência da presença de WSSV em fazendas acometidas pelo surto de 2016 e que um melhor monitoramento dos parâmetros de cultivo é indispensável no controle de enfermidades, tendo sido relatado importante recuperação dos viveiros de cultivo com o controle adequado da temperatura e qualidade da água. A análise presuntiva possibilitou estimar o grau de severidade dos sinais clínicos do camarões de cultivo, tendo sido adotados scores de 0 a 4, de acordo com Lightner (1996). Foram adotados scores entre 3 e 4 para o parâmetro quanto a deposição de calcário no cefalotórax, estes scores foram prevalentes em animais com gramatura média entre 2,3 a 4,8g, sugerindo que animais com peso de até 5g podem ter mais predisposição a infecção por WSSV. Assim, considerando o impacto que o WSSV pode causar as fazendas de cultivo de camarão do Estado do Ceará, este estudo comprovou a importância do acompanhamento diário dos parâmetros de cultivo e sua influência em animais mais jovens, entre 3 e 5g, na incidência do WSSV, gerando dessa forma, dados científicos e uma contribuição ao setor produtivo.

Palavras-chave: Análise presuntiva, Salinidade, Temperatura, Vírus da Síndrome da Mancha Branca.

4.1 INTRODUÇÃO

No Brasil, o cultivo do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* ocorre principalmente na região Nordeste do país, sendo produzido de forma semi-intensiva em tanques localizados em águas costeiras e interiores (SUPLICY et al., 2017).

O Estado do Ceará é hoje o segundo maior produtor de camarão do Nordeste, mas assim como outros estados do país, teve sua produção impactada no ano de 2016 pelo Vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV) (IBGE, 2019). Antes disso, a carcinicultura cearense estava em constante expansão, atingindo em 2015 uma produção equivalente a 41.414 toneladas, consolidando-o como maior produtor nacional (ABCC, 2017).

Apesar do WSSV já ter sido identificado no Estado do Ceará em anos anteriores, 2005 e 2007, foi em junho do ano de 2016 que o vírus atingiu os polos produtores cearenses causando danos severos a produção e afetando a economia do Estado (ABCC, 2017; FEIJÓ et al., 2013). Diante de mais esse desafio para o setor da carcinicultura do Estado do Ceará, novos métodos de cultivo precisaram ser adotados para que os produtores passassem a conviver com a epidemia que se instalava. Estratégias já utilizadas em outros países para o controle do WSSV foram adaptadas nas fazendas de cultivo do Ceará, tais como: redução da densidade de estocagem para menos de 10 camarões/ m² nos meses mais frios do ano; manutenção da temperatura em sistemas de estufa; adoção de policultivos com tilápia, onde e quando a salinidade da água permitisse (SUPLICY et al., 2017).

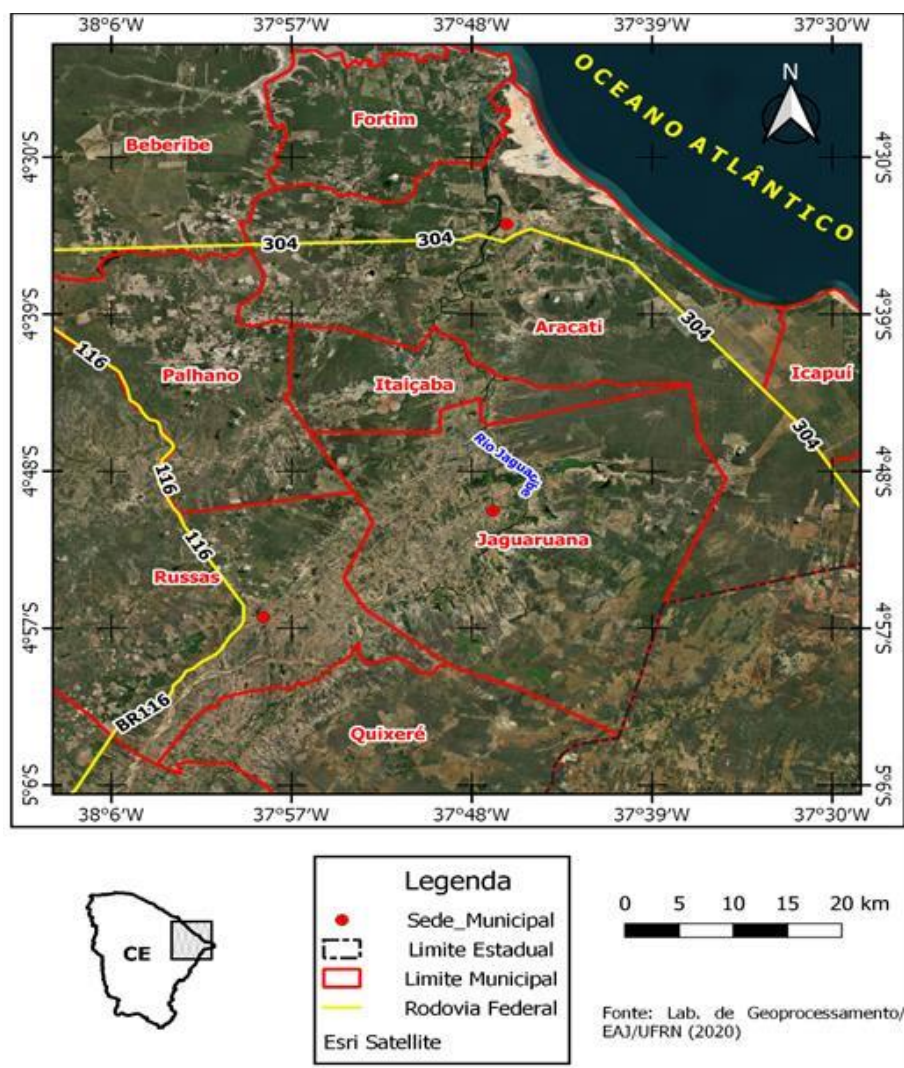
Uma das principais características do Vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV) é sua capacidade de replicação viral sob condições de estresse (Lo et al., 2005). Desta forma, alterações nos parâmetros de cultivo como variações bruscas de temperatura e salinidade têm sido associados à presença de altas mortalidades por WSSV nas fazendas de cultivo (FEGAN; CLIFFORD, 2001) O que justifica nosso estudo sobre a influência de parâmetros técnicos e sanitários na incidência do WSSV em fazendas do Estado do Ceará.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Área de Estudo e Seleção das fazendas

Um total de 17 Fazendas situadas nos municípios de Aracati, Jaguaruana e Russas (Figura 1) foram selecionadas para este estudo, onde o primeiro e o segundo representam os dois principais polos produtores do Estado do Ceará de acordo com o Censo da Carcinicultura do Litoral Sul do Estado do Ceará e Zonas Interioranas Adjacentes 2015/2016 (ABCC, 2017) e o terceiro município escolhido pela proximidade com esses dois grandes polos.

Figura 1 - Localização dos municípios do Estado do Ceará que compõem a área de estudo



As fazendas foram identificadas a partir de informações obtidas diretamente com os produtores, através de vendedores de rações, de engenheiros de pesca e de responsáveis técnicos, buscando alcançar o maior número de empreendimentos em atividade nos municípios em estudo. Após esta etapa de identificação e visita aos locais, as fazendas foram selecionadas mediante presença de mortalidades e histórico de enfermidades (Tabela 1).

Tabela 1 – Número de fazendas estudadas por ano de coleta.

Municípios	Ano de coleta e Identificação das Fazendas					
	2017	Fazendas	2018	Fazendas	2019	Fazendas
Aracati	3	F3, F4, F7	3	F3, F4, F7	5 (-)1	F3, F4, F12, F13, F14
Jaguaruana	3	F2, F5, F8	2(-)1	F2, F5	8	F2, F5, F8, F10, F11, F15, F16, F17
Russas	2	F1, F6	2	F1, F6	2(-)1	F1, F9
Total =	8	-	7	-	15	-

F= Fazenda (-) = fazenda não analisada neste ano; Fonte: Elaboração do autor, 2020.

4.2.2 Caracterização Técnica e Sanitária

Foi aplicado um questionário semiestruturado desenvolvido utilizando o software Epi infoTM 7, contendo 22 questões com perguntas de caráter técnico e sanitário. Os questionamentos envolveram assuntos desde o ano que a fazenda começou a operar, seu tamanho, densidade de cultivo (camarão/m²), forma de captação de água, sistema de renovação de água, acompanhamento dos parâmetros físico-químicos, além do histórico de doenças (anexo 1).

De acordo com as informações obtidas nos questionários as fazendas foram classificadas quanto ao porte do empreendimento seguindo as categorias adotadas pela ABCC, 2017: micro ($\leq 5,0$ hectares), pequeno ($>5,0 \leq 10,0$ hectares), médio ($>10,0 \leq 50,0$ hectares) e grande ($>50,0$ hectares). Tendo sido também adotada a metodologia de Boyd (2001) para classificar as fazendas quanto à salinidade da água que abastece os cultivos (Tabela 2). As informações levantadas pela aplicação dos questionários foram tabuladas em planilhas do Excel e analisadas por estatística descritiva.

4.2.3 Análise Presuntiva

No total, foram amostradas 17 fazendas a partir de três coletas, realizadas em julho de 2017, maio e julho de 2018 e agosto e setembro de 2019. Foram coletadas amostras de 10 camarões de cada uma das 17 fazendas analisadas, tendo sido de 8 fazendas em 2017, 7 fazendas em 2018 e 15 fazendas em 2019, totalizando 300 animais durante os três anos de coleta. Os animais coletados possuíam gramaturas entre 2 e 10g e foram capturados diretamente das bordas dos viveiros com o auxílio de tarrafas e transportados em recipientes plásticos com gelo para o Laboratório de Sanidade Aquática da Universidade Federal Rural do Semi-árido – UFERSA.

A análise presuntiva ou a fresco é uma técnica empregada para monitorar o estado de saúde dos organismos por meio da identificação de características morfológicas típicas de diversas patologias que acometem o camarão de cultivo. Porém, este trabalho restringiu-se a avaliar a influência dos sintomas apresentados para a incidência do Vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV). A princípio foi realizada uma observação macroscópica para identificar características visuais e em seguida procedeu-se a montagem das lâminas e observação direta de tecidos em microscópio óptico com objetivas de 10, 20, 50 e 100 X (LIGHTNER, 1996; AGUIRRE-GUSZMÁN; SÁNCHEZ-MARTÍNEZ, 2005).

Para a pesquisa de sintomas típicos da infecção por WSSV, fragmentos do exoesqueleto são mais indicados para o estudo. Sintomas indicativos da presença do vírus incluem: a presença de manchas brancas no exoesqueleto dos camarões, apêndices avermelhados, cutícula solta,

redução na taxa de alimentação e letargia (LO et al., 1996; LIGHTNER et al., 1998).

Os animais foram analisados individualmente e tiveram o grau de severidade dos sinais clínicos classificados de acordo com o score de 0 a 4, estabelecido por Lightner (1996) e descrito também por Cuéllar-Anjel (2008), conforme exposto no Quadro 1.

Quadro 1 - Classificação quantitativa do grau de severidade da infecção.

Grau de Severidade	Sinais Clínicos
0	Não apresenta sinais de infecção por patógenos, parasitas ou epicomensais. Não apresentam lesões características de síndrome.
1	Presença baixa de patógenos, parasitas ou epicomensais. Quantidade acima do padrão de limite normal (quando existe). São observadas poucas lesões características da síndrome.
2	É observada a presença em pequena e moderada quantidade de patógenos, parasitas ou epicomensais. São observadas muitas lesões características da síndrome. Aumento da mortalidade se não existe um tratamento (quando existe).
3	É observada presença de moderada quantidade de patógenos, parasitas ou epicomensais. Observam-se muitas lesões características da síndrome. Potencialmente letal se não se aplica tratamento (quando existe).
4	São observadas grande quantidade de patógenos, parasitas ou epicomensais. São observadas severas lesões causadas pela síndrome. Letal, apresentando alta mortalidade.

Fonte: Lightner (1996)

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No ano seguinte ao surto de 2016 (ABCC, 2017), este trabalho iniciou suas pesquisas com a visita técnica aos empreendimentos dos municípios de maior representatividade econômica para a carcinicultura do Estado do Ceará, Aracati e Jaguaruana. De acordo com o Censo da Carcinicultura do Litoral Sul do Estado do Ceará e Zonas Interioranas Adjacentes 2015/2016, esta região possui 148 e 202 fazendas ativas respectivamente. Buscou-se assim delimitar áreas de estudos que apresentavam melhor acessibilidade, e onde se concentrava maior numero de empreendimentos que se disponibilizaram a participar deste estudo, incluindo fazendas do município vizinho, Russas, com três fazendas ativas.

Neste estudo, 30 % das fazendas coletadas em 2017 e 2018 descreveram no momento da coleta, problemas associados a variações de temperatura entre 27 e 29°C. Em todas as fazendas essa margem de temperatura esteve relacionada ao momento de maior mortalidade. Essas observações corroboram com as observações dos parâmetros de cultivo analisados por Costa et al. (2010) em fazendas de Santa Catarina, onde as temperaturas costumam ser mais

amenas, e, talvez por isso, seja onde a doença ocorre de forma mais expressiva causando sérios prejuízos econômicos para o Estado.

De acordo com Oidtmann e Stentiford (2011), os principais fatores de risco para o desenvolvimento da Doença da Síndrome da Mancha Branca (WSSD) em fazendas, é a presença de alterações na qualidade da água, principalmente em relação a mudanças bruscas em parâmetros como salinidade e temperatura. Em condições experimentais, à temperatura controlada de 32°C, ocorre inibição da multiplicação viral, mas à 25°C a letalidade da doença pode alcançar 100%. Esse fenômeno explica a predominância da doença em épocas mais frias do ano (LIGHTNER, 2011).

Dentre as oito fazendas visitadas em julho de 2017, a fazenda 8, situada no município de Jaguaruana apresentou 90% de mortalidade em seus cultivos, possivelmente provocadas por WSSV segundo os produtores responsáveis. A fazenda capta água de poço, com salinidade em torno de 0 g/l, não tendo sido constatado o monitoramento de parâmetros de cultivo neste ano, bem como a existência de técnico especializado, que associado ao período de chuvas no momento do cultivo, especificamente em maio deste ano, pode ter afetado o desenvolvimento e sanidade dos animais de cultivo que no momento da coleta possuíam peso médio de 4,7g.

O município de Jaguaruana assim como, os municípios de Aracati e Russas são englobados de acordo com a classificação climática definida pela UNEP (BARROW, 1992) (Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente) da ONU, como pertencentes ao clima Semi-árido, que possui os maiores índices de precipitações nos meses de março, abril e maio. Nos meses de julho a dezembro o tempo fica seco, podendo haver precipitações na Região de Aracati por sua posição próxima ao mar (FUNCEME, 2020). Sugerindo que a fazenda 8 possa ter sido afetada por intensas chuvas, resultando na redução da temperatura dos viveiros e tornando o ambiente favorável a infecção por WSSV. Já que chuvas fortes foram relacionadas ao aumento da carga viral em *L. vannamei*, ocasionando 80% de mortalidade (PEINADO GUEVARA; LOPEZ-MEYER, 2006).

Diante disso, a fazenda foi encontrada inoperante no ano de 2018. Ao retornarmos ao campo em agosto de 2019, verificamos o retorno das atividades dessa propriedade que passou a contar com um técnico habilitado e com a análise diária dos parâmetros físico-químicos (oxigênio, temperatura e salinidade) para um maior controle da sanidade animal.

A fazenda 6, amostrada em 2017, no município de Russas, tem como fonte de água o rio Jaguaribe, com salinidade de 0,5 g/l. A fazenda é de pequeno porte e não possui histórico de mancha branca, porém, apresentou incidência de mortalidade e só realizava o acompanhamento dos parâmetros de cultivo apenas 1x na semana, dificultando o manejo adequado em caso de discrepâncias nesses parâmetros que podem ocorrer diariamente e serem gatilhos para instalação de enfermidades (LIU et al., 2006). Neste mesmo ano, a fazenda 7, localizada no município de Aracati e cuja captação de água é proveniente do estuário do rio Jaguaribe, com

salinidade de 40 g/l, e que também avaliava somente semanalmente estes parâmetros, apresentou mortalidade. Fatores que levaram a diminuição da produção e grandes prejuízos econômicos, que culminaram na paralização da atividade tanto da fazenda 6 quanto da fazenda 7 em 2019 (Tabela 1).

Os responsáveis técnicos das fazendas 7 e 8, relataram em 2017 que os viveiros de cultivo foram acometidas pelo surto de WSSV que atingiu o Estado do Ceará no ano de 2016, confirmado na fazenda 7 a partir de análises presuntivas realizadas na própria fazenda e na fazenda 8 através do envio de amostras para realização de diagnóstico molecular pela técnica de reação em cadeia pela polimerase (PCR).

É importante relatar a resistência encontrada por fazendas de grande porte, com maior capacidade tecnológica, em participar desta pesquisa, algo que se configurou na proibição inclusive de seu acesso. Situações que ocorreram mesmo que mais raramente, também, em fazendas de micro e pequeno porte. Assim, em sua maioria, 52,9% das fazendas incluídas neste estudo, foram classificadas quanto ao tamanho, em fazendas de médio porte (Tabela 2).

Tabela 2 – Número e porcentagem das fazendas estudadas em relação ao porte do empreendimento e área ocupada

Categoria	Número de Fazendas	Fazendas	%	Área (há)	%
Micro	2	F13, F10	11,8	10,0	2,0
Pequeno	4	F6, F7, F12, F15	23,5	37,8	7,6
Médio	9	F1, F2, F5, F8, F9, F11, F14, F16, F17	52,9	330,0	66,3
Grande	2	F3, F4	11,8	120,0	24,10
Total	17	-	100	497,80	100

Fonte: Elaboração do autor, 2020.

De acordo com o questionário aplicado, a maior parte das fazendas (47%) realiza a captação de água direto do rio Jaguaribe, enquanto 41,2% capta a água de poços e apenas 11,8% das fazendas deste estudo possuem como fonte o estuário do rio Jaguaribe, o que confere diferenças na salinidade da água utilizada no cultivo dos camarões *Litopenaeus vannamei* entre as fazendas (Tabela 3). As unidades que produzem em água doce estão localizadas nos municípios de Jaguaruana e Russas, regiões com menor disponibilidade de água e nutrientes, com água proveniente de poços e do rio. Já as de água salgada são aquelas localizadas no município de Aracati, estuário do rio Jaguaribe que tem influência marinha, tendo um maior aporte de nutrientes e geralmente entrada da água da maré.

O camarão *Litopenaeus vannamei* cultivado em 100% das fazendas estudadas, são nativos de ambientes marinhos com salinidade superior a 30 g/l. No Brasil, os primeiros relatos

da aclimação com sucesso dessa espécie em águas com baixas salinidades são descritos desde 1998, porém é indispensável o monitoramento deste parâmetro, pois alterações na qualidade física e química da água podem ocasionar estresse, afetando a imunidade e tornando-os suscetíveis ao ataque de patógenos (KAUTSKY et al., 2000; MENDES; PEDRESCHI, 1998).

L. vannamei é uma espécie tipicamente eurialina (FONSECA et al., 2009), comprovada pela sua elevada capacidade de osmorregulação à carcinicultura do Estado do Ceará, onde se podem observar três grupos distintos quanto à salinidade da água utilizada nos cultivos: doce, oligohalina e eurialina (Tabela 3).

Tabela 3– Número de fazendas em relação a categoria de águas adotada por Boyd (2001)

Categorias	Salinidade (g/l)	Aracati	Jaguaruana	Russas	Total
Doce	≤ a 0,5	F12	F5, F8, F10, F15, F16, F17	0	7
Oligohalina	0,5 – 3,0	F4, F13, F14	F2, F11	F1, F6, F9	8
Mesohalina	3,1 – 16,5	0	0	0	0
Polihalina	16,6 – 30	0	0	0	0
Eurialina	30,1 – 40	F3, F7	0	0	2
Hiperhalina	≥ a 40,1	0	0	0	0

Fonte: Elaboração do autor, 2020.

De acordo com as respostas dos questionários verificou-se que a análise dos parâmetros físico-químicos era realizada diariamente em 50% das fazendas analisadas no ano de 2017, em 71,4% das fazendas de 2018 e em 41, 2% das fazendas de 2019. As demais fazendas analisavam os parâmetros apenas 1x por semana ou ocasionalmente quando diante de alguma problemática no manejo do cultivo. No entanto, 64,7% de todas as fazendas analisadas não observaram alterações nessas variáveis durante os eventos de mortalidade. A recirculação de água é uma medida adotada por 100% das fazendas, embora o tratamento desses efluentes seja realizado em apenas 30% delas, por calagem e/ou desinfecção com cloro, fazendo com que 70% das fazendas que captam água do rio Jaguaribe despejem seus efluentes diretos na sua fonte de captação. Nakano et al. (1994) e Wu, Wang e Zhang (2005) afirmam que o despejo de águas não tratadas nos efluentes é considerado um dos principais meios de contaminação de cultivos.

Em 100% das fazendas foi relatado a presença constante de animais invasores como aves, caramujos e camarões nativos do ambiente, chamando atenção para os estudos de Sánánchez-Martínez, Aguirre-Guzmán e Mejía-Ruíz (2007) que descrevem a influência de aves na transmissão de WSSV entre fazendas de cultivo.

Em relação ao Histórico de enfermidades, 95% das fazendas afirmaram já terem sido

acometidas por uma ou mais das três doenças comuns aos viveiros de cultivo da região nordeste do Brasil: Mionecrose infecciosa (NIM), Vibriose (*Vibrio sp.*) e Síndrome da Mancha Branca (WSSD). Tendo sido estas as únicas doenças relatadas por estes produtores dentre as doenças incluídas no questionário. A presença de WSSV só foi confirmada em 35,3% das fazendas, com 23,52% sendo confirmada por análise presuntiva (F3, F4, F6, F7) e 11,8% por análise molecular (PCR) (F5, F8), nos anos de 2017 e 2018. Esse levantamento constata que a grande maioria das fazendas não realizavam qualquer diagnóstico confirmatório para o WSSV e que os relatos da sua presença em anos anteriores não podem ser comprovados, o que reitera a importância deste trabalho em associar os parâmetros de cultivo com a incidência de WSSV no Estado do Ceará.

Um total de 64,7% das fazendas, associam suas mortalidades no ano de 2016 ao surto de WSSV, o que levou a paralisação da atividade por algumas fazendas e o enfrentamento de severas crises econômicas para aqueles que continuaram produzindo mesmo diante das dificuldades. Porém, 41,1% afirmam que passaram a adotar medidas preventivas após este surto, tais como diminuição da densidade que variou entre 8 e 10 camarões/m², medida importante já que segundo relatos na literatura, o aumento da densidade influencia no aumento do desenvolvimento de doenças (SPAARGAREN, 1998; BELAK et al., 1999;). Além disso, aumentou-se a utilização de probióticos, a contratação de mão de obra qualificada e a busca por melhores rações.

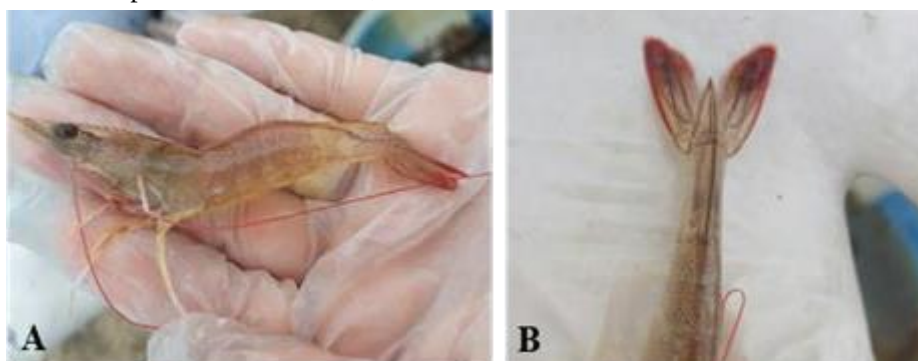
A eficácia dessas medidas preventivas no controle de enfermidades foi notada em uma das fazendas deste estudo (fazenda 5) que foi visitada nos anos de 2017 e 2018 e constatou-se intensas mortalidades em ambos os períodos. Nestes anos, foi possível identificar sintomatologias características da presença de WSSV nesta fazenda, tais como letargia, apêndices avermelhados e animais moribundos. A fazenda localiza-se no município de Jaguaruana com captação da água de poços e salinidade próxima a 0 g/l. Em 2017 a fazenda encontrava-se devastada, com índice de sobrevivência de menos de 20%, tendo sido uma barreira até mesmo para captura dos animais. Em maio de 2018 a fazenda ainda enfrentava problemas de mortalidade, confirmado por análise molecular com infecção de WSSV. Porém, em 2019 a fazenda se apresentou bem estruturada pela aplicação de medidas de controle da temperatura, salinidade e adoção de probióticos com evidente recuperação dos viveiros de cultivo. Em 2019, o índice de sobrevivência foi de 80% segundo o produtor e não observou-se sinais clínicos característicos de WSSV nos animais de cultivo, divergindo dos anos anteriores.

Diante da presença de mortalidade e do histórico de enfermidades apresentados pelas fazendas deste estudo, considerou-se relevante a realização de um diagnóstico presuntivo para WSSV em amostragens de camarões *Litopenaeus vannamei*, que em trabalhos posteriores serão utilizadas para confirmação molecular.

A primeira etapa da análise presuntiva, consistiu na visualização macroscópica dos camarões coletados no campo, imediatamente após a captura desses animais e alguns dos

sintomas observados podem ser visualizados na Figura 1, que se refere a fotos obtidas de animais coletados no ano de 2017 da fazenda 5 deste estudo. Esta foi a única fazenda no qual os animais apresentaram sinais clínicos de possível infecção por WSSV, as demais foram assintomáticas. Na Figura 2A nota-se a presença de cromatóforos expandidos e antenas e urópodos avermelhados, indicando estresse, que também pode ser evidenciado na Figura 2B com urópodos sugerindo elevado estresse animal. Alterações nos parâmetros sanitários resultantes da exposição a fatores ambientais, podem provocar modificações na homeostase e causar estresse animal, que funciona como gatilho para o desenvolvimento de doenças nos sistemas de cultivo (LEE e WICKINS, 1992; DE LA VEGA et al., 2004; LIU et al., 2006).

Figura 2 - Análise macroscópica de camarões com a presença de cromatóforos expandidos e antenas e urópodos avermelhados, indicando estresse.



Acervo do autor, 2017.

Para a realização da segunda etapa foi feita a dissecação dos camarões para exame do hepatopâncreas (deformidades e quantidade de lipídios), do cefalotórax (depósito de calcário na carapaça), do trato digestivo (repleção), de epicomensais (sujeiras e protozoários nas brânquias) e da presença de necrose (musculatura esbranquiçada, opaca ou manchas negras) (anexo 1). Para cada item avaliado foi atribuído um grau de severidade seguindo a escala de 0 a 4 descrita por Lightner (1996) e Cuéllar-Anjel (2008). Os resultados estão expostos na Tabela 4 pelas medianas obtidas de 10 camarões coletados por fazenda, para cada um dos parâmetros avaliados.

Os resultados do exame a fresco demonstraram haver presença de alterações na quantidade de lipídios, que pode ser observado na Figura 3A, que demonstra baixo preenchimento de lipídeos nos túbulos do hepatopâncreas. Esta característica é indicativa de baixa nutrição animal e presença de microrganismos patogênicos (MENDES et al., 2007). Na Figura 3B é possível visualizar a presença de deposições de calcário na região do cefalotórax, e ambos os sinais clínicos podem sugerir presença de WSSV. Trata-se de fotomicrografias obtidas no ano de 2018 em animais da fazenda 2.

F1	6,2	1	2	3	1	0
F2	4,8	4	3	3	2	0
F3	7,4	1	2	2	1	0
F4	3	4	3	3	1	0
F5	3,4	4	4	4	2	0
F6	8,5	2	2	3	1	0
F7	6,1	1	3	3	1	0
F8	NA	NA	NA	NA	NA	NA
2019						
F1	2,8	3	3	3	2	0
F2	7,8	1	3	3	1	0
F3	6,9	1	3	3	3	0
F4	4,6	1	4	4	1	0
F5	5,9	1	4	4	2	0
F6	NA	NA	NA	NA	NA	NA
F7	NA	NA	NA	NA	NA	NA
F8	3,8	4	4	3	1	0
F9	2,3	3	2	3	2	0
F10	6,4	1	4	3	1	0
F11	9,5	1	4	4	2	0
F12	2,4	3	3	3	1	0
F13	7,6	1	3	3	1	0
F14	4,2	3	4	4	1	0
F15	9,9	1	1	0	0	0
F16	4,1	3	4	1	2	0
F17	10	1	1	0	0	0

NA = não analisado; Elaboração do autor, 2020.

As informações levantadas mediante aplicação de questionários e visita aos locais das fazendas, associadas aos resultados encontrados por nossas análises a fresco, presumem um diagnóstico positivo para WSSV em 58,8% (F4, F5, F7 e F8 em 2017; F2, F4 e F5 em 2018 e

F1, F8, F9, F12, F14 e F16 em 2019) das 17 fazendas analisadas nos três anos de coleta. Constatou-se também que fazendas com relatos de surto por WSSV em 2016 (F5, F7 e F8) podem ter sido acometidas novamente nos anos posteriores ao surto. Contudo, estes dados não excluem a necessidade de realização de exames confirmatórios (análises moleculares) para uma maior confiabilidade e segurança diagnóstica, porém levantam dados importantes sobre a influência de parâmetros técnicos e sanitários na incidência de WSSV, informações úteis na compreensão dos entraves encontrados para o desenvolvimento da carcinicultura do Estado do Ceará.

4.4 CONCLUSÃO

Foi possível inferir que a salinidade não foi determinante para incidência de WSSV, pois ambientes com diferentes salinidades parecem ter sido acometidos. No entanto, o clima e as alterações de temperatura da água em períodos mais frios do ano, mostraram ter forte influência na presença de mortalidades e os sinais clínicos encontrados em alguns animais revelaram ser bem característicos de infecção por WSSV. Foi observado um elevado índice de fazendas que despejam seus efluentes não tratados no rio Jaguaribe, sugerindo alto risco de transmissão de WSSV entre as fazendas e levantando a necessidade de um sistema de comunicação de lançamento de efluentes e coleta de água na região. Além disso, os dados obtidos sugeriram que animais com gramaturas abaixo de 5g podem ser mais susceptíveis. Constatou-se ainda a importância da aplicação da técnica de diagnóstico presuntivo na rotina das fazendas de cultivo, pois, embora menos sensíveis do que as técnicas confirmatórias de diagnóstico, mostrou ser um método importante no controle de enfermidades. Assim, as análises a fresco associado ao monitoramento dos parâmetros de cultivo podem auxiliar na tomada de decisões de forma mais rápida, possibilitando ao produtor traçar estratégias para um melhor controle do WSSV.

REFERÊNCIAS

ABCC – Associação Brasileira de Criadores de Camarão. **Censo da carcinicultura do litoral sul do Estado do Ceará e zonas interioranas adjacentes 2015/2016**. Convênio ABCC/MAPA. Natal-RN, Novembro, 2017. 12 p.

AGUIRRE-GUSZMAN, G.; SÁNCHEZ MARTÍNEZ, G. Análisis en fresco de camarón, un proceso rápido para el diagnóstico presuntivo de enfermedades. **Panorama Acuicola Magazine**, v.19, p.59-65, 2005.

BARROW, C. J. World atlas of desertification (United nations environment programme), edited by N. Middleton and D. S. G. Thomas. Edward Arnold, London, 1992. **Land Degradation & Development**, v. 3, n. 4, p. 249–249, 1992.

BELAK, J et al., Prevalence of viral diseases (IHHNV and WSSV) in *Penaeus monodon* from the Philippines and its association with mangrove status and shrimp culture systems. In: **Alcivar-Warren A (ed) Proceedings of the Aquaculture and Conservation of Marine**

Shrimp Biodiversity Symposium. Tufts University School of Veterinary Medicine, North Grafton, MA, (1999).

BOYD, C. E. Manejo da qualidade de água na aquicultura e no cultivo do camarão marinho (Rodrigues, J. Trad.). Associação Brasileira de Criadores de Camarão. (ABCC), 2001. p.157.

CORSIN, F. et al. Risk factors associated with white spot syndrome virus infection in a Vietnamese rice-shrimp farming system. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.47, p.1-12, 2001.

COSTA, S. W. DA et al. Parâmetros de cultivo e a enfermidade da mancha-branca em fazendas de camarões de Santa Catarina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, n. 12, p. 1521–1530, dez. 2010.

CUÉLLAR-ANJEL, J. Métodos de diagnóstico de enfermedades en camarones marinos de cultivo. In: MORALES, V.; CUÉLLAR-ANJEL (Ed.). **Guía técnica: patología e inmunología de camarones penaeidos: programa CYTED Red II-D Vannamei**. Panamá: New Concept Publications, 2008. p.15-54

DE LA VEGA, E. et al. Quantitative real-time RT-PCR demonstrates that handling stress can lead to rapid increases of gill-associated virus (GAV) infection levels in *Penaeus monodon*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 59, n. 3, p. 195–203, 11 jun. 2004.

FEGAN, D.F.; CLIFFORD III, H.C. Health management for viral diseases in shrimp farms. In: SPECIAL SESSION ON SUSTAINABLE SHRIMP CULTURE, AQUACULTURE, 2001, Baton Rouge. **Proceedings**. Baton Rouge: The World Aquaculture Society, 2001. p.168-198.

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, 4 mar. 2013.

FONSECA, S. B. DA et al. Cultivo do camarão marinho em água doce em diferentes densidades de estocagem. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 10, p. 1352–1358, out. 2009.

FUNCEME. Fundação Cearense de Meteorologia e Recursos Hídricos. **Índice de Aridez para o Ceará**. 2020. Disponível em: < <http://www.funceme.br/app/radar> >. Acesso em: 8 mai. 2020.

KAUTSKY, N. et al. Ecosystem perspectives on management of disease in shrimp pond farming. **Aquaculture**, v. 191, n. 1, p. 145–161, 20 nov. 2000.

LEE D.O.; WICKINS JF. **Crustacean farming**. Oxford, UK: Blackwell Scientific Publications, p. 464, 1992.

LIGHTNER, D. V. et al. Experimental Infection of Western Hemisphere Penaeid Shrimp with Asian White Spot Syndrome Virus and Asian Yellow Head Virus. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 10, n. 3, p. 271–281, 1 set. 1998.

LIGHTNER, D. V. Virus diseases of farmed shrimp in the Western Hemisphere (the Americas): a review. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 106, n. 1, p. 110–130, jan. 2011.

LIGHTNER, D. V. (ED). A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp. 1996.

LIU, B. et al. The effect of acute salinity change on white spot syndrome (WSS) outbreaks in *Fenneropenaeus chinensis*. **Aquaculture**, v. 253, n. 1, p. 163–170, 31 mar. 2006.

LO, C. F. et al. Detection of baculovirus associated with Withe Spot Syndrome Virus (WSSV) in penaeid shrimps using polymerase chain reaction. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 25, p. 133-141, 1996.

LO, C. F. et al. **White spot syndrome - what we have learned about the virus and the disease**. In: Diseases in Asian Aquaculture V. Proceedings of the 5th Symposium on Diseases in Asian Aquaculture. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila. 2005. p. 421-433.

MENDES, E.S. et al. Avaliação do exame a fresco em camarões marinhos *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) associado à contagem e identificação de *Vibrio* spp. em água de cultivo. **Medicina Veterinária**, v.1, p.7-15. 2007.

MENDES, G. N.; PEDRESCHI, O. **Aclimação de juvenis de *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) à água doce**. In: Simpósio Brasileiro de Aquicultura, 10., 1998, Recife. 27 **Anais...Recife: ABCC**, 1998. p.309-313

NAKANO, H. et al. Mass Mortalities of Cultured Kuruma Shrimp, *Penaeus japonicus*, in Japan in 1993 : Epizootiological Survey and Infection Trials. **Fish Pathology**, v. 29, n. 2, p. 135–139, 15 jun. 1994.

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, n. 6, p. 469–482, 2011.

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

SÁNCHEZ-MARTÍNEZ, J. G.; AGUIRRE-GUZMÁN, G.; MEJÍA-RUIZ, H. White Spot Syndrome Virus in cultured shrimp: A review. **Aquaculture Research**, v. 38, n. 13, p. 1339–1354, 2007.

SPAARGAREN, D. H. Cultivation of Tiger Prawns, *Penaeus monodon* Fabricius, 1798 (Decapoda, Natantia) in Hainan, P. R. China. **Crustaceana**, v. 71, n. 2, p. 144–157, 1998.

SUPLICY, F. et al. World Food Giant – Brazil Aiming to be One of the Top Five Aquaculture Producers in 2020. **World Aquaculture**, v. 48, p. 31–37, 1 set. 2017.

WU, W.; WANG, L.; ZHANG, X. Identification of white spot syndrome virus (WSSV) envelope proteins involved in shrimp infection. **Virology**, v. 332, n. 2, p. 578–583, 20 fev. 2005.

**5 CAPÍTULO III – DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE VARIANTES
GENOTÍPICAS DO WSSV NO ESTADO DO CEARÁ, NORDESTE DO BRASIL**

5 CAPÍTULO III – DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE VARIANTES GENOTÍPICAS DO WSSV NO ESTADO DO CEARÁ, NORDESTE DO BRASIL

RESUMO – A caracterização molecular do Vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV) tem sido utilizada para determinar sua dispersão entre regiões geográficas e ajudado na busca pela associação entre diferentes genótipos e sua virulência, porém, nenhum estudo foi publicado até o momento sobre os genótipos do vírus e sua variabilidade no Estado do Ceará. Diante disso, objetivou-se com este trabalho detectar e caracterizar variantes genotípicas do WSSV presentes em fazendas do estado do Ceará. No total, 1500 animais de 17 fazendas diferentes foram submetidos a detecção do WSSV por PCR e *nested*-PCR, e as fazendas positivas investigadas quanto a presença de variações genotípicas a partir dos marcadores moleculares: VNTRs (ORF 75, 94 e 125) - da amplificação dessas regiões foi determinado o número de unidades de repetição - Rus, VRs (14/15 e 23/24) e o marcador para o gene de uma transposase. O WSSV foi detectado em seis das 17 fazendas estudadas e não foi detectada amplificação para a ORF 125 nas amostras de WSSV de fazendas do Estado do Ceará, sugerindo a necessidade de estudos que confirmem sua presença, através do desenvolvimento de novos marcadores, ou que identifiquem a deleção total dessa região. Constatou-se ainda a amplificação para as ORFs 75 e 94, validando-os para estudos epidemiológicos do WSSV no Estado. A presença de regiões deletérias e com recombinações foi detectado pela amplificação das VRs (14/15 e 23/24) e a ausência da região da transposase no genoma das amostras positivas para WSSV foram evidenciados. Os resultados foram comparados com isolados de outras regiões geográficas, sugerindo pouca variação gênica entre os genótipos brasileiros e um padrão de unidades de repetição (Rus) que divergiram entre isolados de outros países, além da hipótese de co-infecção por mais de um genótipo em uma mesma fazenda ter sido levantada. Dessa forma, nossos resultados introduzem novos dados sobre a caracterização genética do WSSV que circula em fazendas do estado do Ceará, nordeste do Brasil.

Palavras-chave: Transposase, Vírus da Síndrome da Mancha Branca, VNTRs, VR 14/15, VR 23/24.

5.1 INTRODUÇÃO

O Vírus da Síndrome da Mancha Branca (*White Spot Syndrome Virus* – WSSV) foi relatado pela primeira vez na província de Fujian na China em 1991, e desde então tem sido identificado em fazendas de cultivo em todo o mundo (ESCOBEDO-BONILLA et al., 2008; MULLER et al., 2010; TAN; SHI, 2011; FEIJÓ et al., 2013; PEREIRA et al., 2019). Sua disseminação ocorreu

exponencialmente por todo o continente asiático, chegando à América do Norte em 1995, causando severas mortalidades aos camarões cultivados e grandes perdas econômicas (SALEHI, 2010; LIGHTNER, 2011; FLEGEL, 2012; LIGHTNER et al., 2012).

Isolados geográficos do WSSV compartilham características similares em seus genomas (WSSV-TW (GenBank nº AF440570), WSSV-CN (GenBank nº AF332093) e WSSV-TH (GenBank nº AY864668)). No entanto, regiões genômicas polimórficas foram identificadas e desde então têm sido amplamente estudadas em estudos epidemiológicos e evolutivos. As principais diferenças incluem as regiões minissatélites (ORF, 75, 94 e 125), contendo um número variável de sequências repetidas e enfileiradas (*Variable Number of Tandem Repeats* – VNTR) que são caracterizadas por variações nos números de unidades de repetição (RUs) dentro de regiões homólogas, uma região favorável à recombinação (VRs 14/15), uma região com uma grande deleção (VR 23/24) e uma sequência de uma transposase presente apenas no WSSV-TW (MARKS et al., 2004).

Diante disso, este trabalho investigou a presença dessas regiões variáveis do WSSV em camarões *Litopenaeus vannamei* cultivados em fazendas de municípios do estado do Ceará. E, apesar da identificação do patógeno já ter sido realizada por outros estudos, nenhum estudo foi publicado até o momento sobre os genótipos do vírus e sua variabilidade genética no Estado do Ceará.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Área de estudo e seleção das fazendas

Durante o período de três anos (2017-2019), foram objetos desse estudo um total de 17 fazendas situadas nos municípios de Aracati (6), Jaguaruana (8) e Russas (3) no Estado do Ceará. As fazendas foram selecionadas mediante histórico de enfermidades, relatos de mortalidade e alerta de surtos.

5.2.2 Coleta das amostras de camarões *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931)

Um total de 1500 animais foram amostrados, sendo 400 animais coletados de 8 fazendas em 2017, 350 animais de 7 fazendas em 2018 e 750 animais de 15 fazendas em 2019. A coleta foi realizada diretamente das bordas dos viveiros com o auxílio de tarrafas, os animais eram submetidos a dessensibilização por choque térmico através da imersão em recipientes com gelo e transferidos em álcool 96% (Merck®) para o Laboratório de Multiusuários do Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA.

Um par de pleópodos de cada um dos animais coletados foram retirados com auxílio de pinças previamente esterilizadas e organizados em pools de 50 animais por amostra, preservados em álcool etílico 70% e mantidos em freezer – 80 até a realização da etapa de extração do DNA genômico.

5.2.3 Extração e quantificação de DNA

As amostras foram inicialmente pesadas em balança analítica para padronização da gramatura necessária a realização do protocolo de extração. A extração do DNA total foi realizada seguindo o protocolo de lise com isotiocianato de guanidina proposto por Ruibal (2009) (adaptado de CHOMKZYNSHI, 1993). Foi utilizado 25 mg da amostra mais 900 µL de GT (60g de isotiocianato de guanidina + 5 mL de TRIS-HCl 1M pH 7,5 + 10 mL de EDTA 0,25 M pH 8,0 + 100 mL de fenol + ddH₂O q.s.p. 100 mL) em um microtubo de 1500 µL. O material foi agitado em vórtex por 15 segundos com intervalo de 10 minutos, e uma nova agitação ao final. Em seguida foi acrescentado 200 µL de clorofórmio com conseguinte vórtex de 15 segundos. Após 10 minutos incubando em temperatura ambiente (37°C), foi centrifugado a 12000 x g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi recuperado em novo microtubo e adicionado igual volume de propanol com o intuito de insolubilizar o DNA. Após a precipitação o material foi incubado por 2 horas a -20°C com posterior centrifugação a 12000 x g por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado com cuidado e o pellet resultante foi ressuspensionado em 500 µL de etanol a 70% e agitado manualmente. Posteriormente, o foi centrifugado a 12000 x g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* ressuspensionado em 30 µL de TE com vórtex e spin rápido. Por fim, o DNA genômico foi submetido a um banho seco a 56° C por 15 minutos.

O DNA total obtido de cada amostra foi quantificado por espectrofotometria, utilizando-se o aparelho NanoDrop 2000 (Thermo Scientific®). Em seguida as amostras foram padronizadas para a concentração de 100 ng de DNA/µl e acondicionadas à -20° C até a realização das análises moleculares para a detecção do WSSV.

5.2.4 Análises Moleculares

Todos os iniciadores e as condições de ciclagem utilizadas neste estudo para detecção e caracterização de variantes genotípicas do Vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV) estão descritos previamente na Tabela 1 e na Tabela 2.

Tabela 1 – Iniciadores para detecção e caracterização molecular de WSSV.

<i>Primer</i>		<i>Sequência (5'-3')</i>	<i>Amplicon (pb)</i>	<i>Fonte</i>
Detecção de WSSV				
143F/145R	Forward	TGCCTTATCAGCTNTCGATTGTAG	848	Lo et al., 1996
	Reverse	TTCAGNTTTGCAACCATACTTCCC		
VP26	Forward	AATTTGGCAACCTAACAAACCTG	304	Lo et al., 1996
	Reverse	GGGCTGTGACGGTAGAGATGAC		
146F1-E	Forward	ACTACTAACTTCAGCCTATCTAG	1447	Dieu et al., 2004
146R1-E	Reverse	TAATGCGGGTGTAATGTTCTTACGA		
146F2-I	Forward	GTAAGTCCCCCTTCCATCTCCA	941	
146R2-I	Reverse	TACGGCAGCTGCTGCACCTTGT		
Regiões Variáveis de WSSV				

ORF75	Forward	GCCAGATTTCTTCCCCTACC	Variável	Pradeep et al., 2008
	Reverse	CTCCATGTAGAGGCAAAGCA		
ORF94	Forward	TCTACTCGAGGAGGTGACGAC	Variável	Pradeep et al., 2008
	Reverse	AGCAGGTGTGTACACATTTTCATG		
ORF125 ^a	Forward	TGGAAACAGAGTGAGGGTCA	Variável	Pradeep et al., 2008
	Reverse	CATGTGCGACTATACGTTGAATCC		
ORF125 ^b	Forward	ACAGTGACCACACGATAATACCA	Variável	Ho et al., 2011
	Reverse	TCGTTCAACCATATCCATTGCCCT		
VR 14/15	Forward	GAGATGCGAACCACTAAAAG	Variável	Dieu et al., 2004
	Reverse	ATGGAGGCGAGACTTGC		
VR 23/24	Forward	ATGGGCTCTGCTAACTTG	Variável	Dieu et al., 2004
	Reverse	ATGATTGTATTTCGTCTGAAGG		
Transposase	Forward	GTGGATAATATTCGTCTTCAAC	1489/151	Dieu et al., 2004
	Reverse	CTCAAAGACAACGACATTAG		

Fonte: Elaboração do autor, 2020.

Tabela 2 – Condições de termociclagem para detecção e caracterização molecular de WSSV.

Condições de termociclagem				
Detecção WSSV/Regiões variáveis	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Nº de ciclos
143F/145R	94°C - 1min	55°C - 1min	72°C - 2min	39
VP26	95°C - 5min	52°C - 50s	72°C - 1min e 30s	40
146F1-E/146R1-E	94°C - 1min	55°C - 1min	72°C - 2min	39
146F2-I/146F2-I	94°C - 1min	55°C - 1min	72°C - 2min	39
ORF 75	95°C - 45s	52°C - 45s	72°C - 45s	35
ORF 94	95°C - 45s	55°C - 45s	72°C - 45s	35
ORF 125 ^a	95°C - 30s	60°C - 30s	72°C - 30s	35
ORF 125 ^b	95°C - 30s	56°C por 20s	72°C por 100s	40
VR 14/15	95°C - 45s	60°C - 1min e 15s	72°C - 1min	35
VR 23/24	94°C - 40s	55°C - 1min	70°C - 1min	35
Transposase	95°C - 30s	55°C - 1min	72°C - 4min	35

Fonte: Elaboração do autor, 2020.

5.2.5 Marcadores moleculares para detecção de WSSV por PCR e *nested*-PCR

Para verificar a eficiência da extração e excluir resultados de PCR falso - negativos um gene para ordem decápoda foi amplificado utilizando o *primer* 143F e 145R que amplifica um fragmento de 848pb, proveniente de uma região altamente conservada do RNA ribossômico 18S (LO et al., 1996, KIM et al., 2015).

A detecção do WSSV foi realizada utilizando a técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase - PCR e *nested*-PCR. Para os ensaios foram utilizados o *primer* VP26 descrito por Dieu et al. (2004) e dois pares de *primers* padronizados pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE – *World Organization For Animal Health*). Resultados positivos no Step 1 da *nested*-PCR caracterizam uma infecção grave por WSSV, enquanto um resultado positivo apenas no Step 2 indica uma infecção latente ou estado de portador. A sequência dos *primers* e os produtos de amplificação estão descritos na Tabela 1 e 2. Em ambas as reações foram usados como controle positivo para o WSSV plasmídeos confirmados por sequenciamento pelo Laboratório de Ciências do Mar (LABOMAR) e uma amostra isenta de DNA como controle negativo.

As reações em cadeia pela polimerase (PCR) foram realizadas num volume de 25µL, contendo 12,5 µL de pré-mix 2x My Taq Red Mix (Bioline) (1.5 unidades de Taq DNA polimerase, 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP e estabilizadores), 1,0 µL de cada *primer* (10µM), 9,5 µL de água DEPC e 1 µL de DNA molde. As reações de PCR foram realizadas em um termociclador T100 thermal cycler (Bio-Rad) utilizando as condições de ciclagem descritas na tabela 6.

5.2.6 Análise de repetições em tandem de número variável (VNTRs)

As amostras positivas na etapa de identificação do WSSV, foram submetidas a investigação quanto a presença de três regiões minissatélites: ORF 75 (repetições de 45 e 102 pb), ORF 94 (repetições de 54 bp) e ORF 125 (repetições de 69 bp), descritas na Tabela 1.

A partir da amplificação dessas regiões foi determinado o número de repetições (unidades de repetição - Rus) presentes na ORF 94 calculado com a fórmula: $[\text{tamanho do produto de PCR} - (171 + 12)]/54$ e da ORF125 com a fórmula: $(\text{tamanho do produto de PCR} + 35 - 92)/69$ (PRADEEP et al., 2008). Para a ORF 75, que apresenta repetições variáveis foi utilizado o tamanho do produto de PCR para análise. Em seguida as VNTRs foram utilizadas para comparação com amostras de outras regiões geográficas.

5.2.7 Análise das Regiões Variáveis VR 14/15 e VR 23/24

Investigou-se a presença das regiões variáveis VR 14/15 e VR 23/24 nas amostras positivas para WSSV. A presença dessas regiões permite identificar possíveis eventos de recombinação e deleções nas regiões genômicas, respectivamente (Tabela 1 e 2).

5.2.8 Amplificação da sequência de uma transposase

Foi realizada a identificação de um gene de uma transposase por PCR com os iniciadores e as condições descritas nas Tabelas 1 e 2.

5.2.9 Análise dos fragmentos amplificados

Todos os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose (1,5%). Os tamanhos dos fragmentos foram determinados utilizando um marcador de peso molecular de 100 pb (Sinapse) ou 1 kb (Sinapse) e os produtos visualizados sob um transluminador ultravioleta e fotodocumentados.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Amostras de todas as 17 fazendas estudadas amplificaram um fragmento de 848pb, proveniente de uma região altamente conservada do RNA ribossômico 18S de decápoda, indicando ausência de inibidores de PCR. Após esta etapa de triagem, as amostras foram submetidas a pesquisa do WSSV que foi prevalente em 62,5% das fazendas analisadas durante os anos de 2017 e 2018. Em 2019, foram incluídas novas fazendas para tentar levantar mais dados sobre a presença de WSSV na região, que se configurou na sua não detecção e na reincidência de infecção por WSSV em uma das fazendas estudadas em 2017.

A detecção de WSSV a partir do *primer* VP26 descrito por Lo et al. (1996) identificou cinco fazendas positivas, enquanto os *primers* padronizados pela OIE de Dieu et al. (2004) detectou seis fazendas positivas. O maior número de amostras positivas encontradas a partir da aplicação da técnica de *nested*-PCR, demonstra uma maior sensibilidade do conjunto de *primers* utilizados em relação a PCR convencional, corroborando com a análise de diferentes métodos de PCR para detecção de WSSV realizadas por Pan et al. (2017), que demonstraram em seus estudos que a *nested*-PCR melhorou a sensibilidade de detecção para ~10-100 vezes em relação a PCR de rotina. A descrição das fazendas quanto ao número de amostras positivas por município e ano de coleta estão expostos na Tabela 3.

Tabela 3 – Resultados da detecção molecular de WSSV por PCR e nested-PCR.

Ano de Coleta	Fazendas	Municípios	PCR (VP26)	<i>nested</i> -PCR (Step 1)	<i>nested</i> -PCR (Step 2)
---------------	----------	------------	---------------	--------------------------------	--------------------------------

2017	F1	Russas	-	-	-
	F2	Jaguaruana	-	-	-
	F3	Aracati	-	-	-
	F4	Aracati	-	-	-
	F5	Jaguaruana	+	+	+
	F6	Russas	-	-	-
	F7	Aracati	+	+	+
	F8	Jaguaruana	ND	+	+
2018	F1	Russas	-	-	-
	F2	Jaguaruana	+	+	+
	F3	Aracati	-	-	-
	F4	Aracati	-	-	-
	F5	Jaguaruana	+	+	+
	F6	Russas	-	-	-
	F7	Aracati	-	-	-
	F8	NA	NA	NA	NA
2019	F1	Russas	-	-	-
	F2	Jaguaruana	-	-	-
	F3	Aracati	-	-	-
	F4	Aracati	-	-	-
	F5	Jaguaruana	-	-	-
	F6	NA	NA	NA	NA
	F7	NA	NA	NA	NA
	F8	Jaguaruana	+	+	+
	F9	Russas	-	-	-
	F10	Jaguaruana	-	-	-
	F11	Jaguaruana	-	-	-
	F12	Aracati	-	-	-
	F13	Aracati	-	-	-
	F14	Aracati	-	-	-
	F15	Jaguaruana	-	-	-
	F16	Jaguaruana	-	-	-
	F17	Jaguaruana	-	-	-

F = fazenda, ND = não detectado, NA = não analisado, (-) = resultado negativo para WSSV, (+) = resultado positivo para WSSV; Fonte: Elaboração do autor, 2020.

Em 2017 oito fazendas foram visitadas para investigação da situação epidemiológica e coleta das amostras para pesquisa de WSSV, no ano seguinte as mesmas fazendas foram

visitadas com exceção da fazenda 8 que estava fechada. Em 2019 as fazendas 6 e 7 visitadas nos anos de 2017 e 2018 também paralisaram suas atividades. No ano de 2017, foi verificada a presença de WSSV na fazenda 7, com resultados positivos para ambas as variações da técnica de PCR. Todas as amostras positivas na detecção de WSSV, apresentaram resultados positivos desde o Step 1 da *nested*-PCR, que de acordo com a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE – *World Organization For Animal Health*), representa uma infecção grave por WSSV (OIE, 2020).

A fazenda 5, localizada no município de Jaguaruana no Estado do Ceará, principal polo produtor do Estado, foi acompanhada nos três anos de coleta e observou-se reincidência de contaminação da fazenda por WSSV nos anos de 2017 e 2018. Esses achados reiteram a importância de um estudo mais aprofundado sobre as possíveis variantes virais circulantes na região Nordeste do Brasil.

A variabilidade genética do Vírus da Síndrome da Mancha Branca na região Nordeste do Brasil até o momento não é conhecida. Este trabalho assim como outros trabalhos que vêm sendo desenvolvidos nos últimos anos em estados da região, têm contribuído para a identificação de variantes genotípicas desse vírus na principal região produtora de camarão do Brasil (CARVALHO, 2017; PEREIRA et al., 2019; SIQUEIRA, 2019).

As seis fazendas positivas na etapa de detecção de WSSV foram submetidas a pesquisa de VNTRs e VRs. A análise de VNTRs gerou amplificação para as ORFs 75 e 94, amplificados para todas as seis amostras foram encontrados para a ORF 75 e cinco amostras amplificaram para a ORF 94. A ORF 125 não gerou amplicon para nenhum dos dois conjuntos de primers testados (DIEU et al., 2004; HOA et al., 2011) (Tabela 4).

A falha na caracterização genotípica da ORF 125 pode estar associada a variações nas sequências nos locais de ligação dos iniciadores utilizados, a baixas concentrações de DNA ou ainda a presença da deleção completa dessa região (PRADEEP et al., 2008; TANG; LE GROUMELLE; LIGHTNER, 2013). Porém, é mais provável que a ausência de amplificação esteja relacionada a variações gênicas do que ao baixo limiar de detecção, visto que houve amplificação eficiente para as ORFs 75 e 94. Nesse caso deve-se considerar os achados de Pradeep et al. (2008), em isolados da Índia, que há mais de 10 anos relataram a ORF 125 como sendo a ORF com menor falha de amplificação, o que não corrobora com estudos mais atuais (CARVALHO, 2017; PEIXOTO et al., 2020; PEREIRA et al., 2019), levantando a hipótese da necessidade do desenvolvimento de novos primers, devido á possíveis mutações ou incidência de novas variantes, além de investigar a ausência da ORF 125 nestas amostras, para a genotipagem de WSSV presente no Estado do Ceará, bem como em outros estados do nordeste do Brasil.

Origem Geográfica	Variedade de Rus em loci de VNTR						Referências
	ORF75		ORF94		ORF125		
	Amplicon (pb)	RUs (45, 57pb/45,102 pb)	Amp licon (pb)	RUs (54 pb)	Ampli con (pb)	RUs (69 pb)	
WSSV-TW	1842	21**	507	6	249	8	Tsai et al., 2000
WSSV-TH	1323	12**	682	6	141	6	Van Hulten et al., 2001
WSSV-CN	1515	15**	831	12	141	6	Yang et al., 2001
Tailândia	ND	NA	506 1262	6-20	ND	NA	Kiatpathomechai et al., 2005
Índia	320 778	2 -7*	291 1047	2-16	195 1023	2-14	Pradeep et al., 2008
Vietnam	NE	5– 14*	309, 1101	4-17	219, 633	4-10	Dieu et al., 2010
USA	492 1171	6–14**	480 627	5-8	767 826	10-11	Muller et al., 2010
México	1084	14 **	1242	19	559	7	Muller et al., 2010
China	ND	NA	682 1157	6-14	ND	NA	Tan; Shi, 2011
Brasil							
Santa Catarina/ RS 2005	786	10**	1100	16	684	8	Muller, et al., 2010
Santa Catarina/RS 2007	783	10**	1002	16	659	8	Muller, et al., 2010
Santa Catarina/RS 2008	784	10**	1015	16	659	8	Muller, et al., 2010
Bahia 2008	928	11**	417	4	728	9	Muller, et al., 2010
Açu/RN 2012	631	7**	292 670	2-9	ND	NA	Carvalho, 2017
Açu/RN 2012	631	7**	292 670	2-9	ND	NA	Carvalho, 2017
Rio Grande do Norte/ RN	~600	10*	362 902	5-15	~900	5	Pereira et al., 2019
São Gonçalo do Amarante/ RN	~700	9*		10	ND	NA	Peixoto et al., 2020
Aracati/CE 2017 – F7	~700	-	~700	10	ND	NA	Este estudo
Jaguaruana/C E 2017 – F5	~600	-	~600	8	ND	NA	Este estudo
Jaguaruana/C E 2017 – F8	~600	-	~600	8	ND	NA	Este estudo
Jaguaruana/C E 2018 – F2	~600	-	~600 ~700	8, 10	ND	NA	Este estudo
Jaguaruana/C E 2018 – F5	~800	-	ND	NA	ND	NA	Este estudo

Jaguaruana/C	~600	-	~700	10	ND	NA	Este estudo
E							
2019 – F8							

NE – não encontrado na literatura

NA – não analisado, ND – não detectado

*RUs calculados baseados em repetições de 45 e 57pb

** Rus calculados baseados em repetições de 45 e 102 pb

~ tamanho aproximado do amplicon

- RUs não calculados

Para a ORF 75 houve amplificação em 100% das amostras positivas para WSSV, produzindo amplicons que variaram entre ~600pb e ~800pb. Este padrão de amplificação foi o mesmo relatado por todos os estudos realizados no Brasil descritos na Tabela 4, divergindo apenas do padrão de 928pb encontrado por Muller et al. (2010) em amostras do Estado da Bahia. Esse padrão pode significar pouca variação gênica entre os genótipos Brasileiros. No entanto, a avaliação da variabilidade genética existente na região da ORF 75 só pode ser determinada mediante o cálculo do número de unidades de repetição, valores que não puderam ser calculados para a ORF 75, pois seria necessário a realização da técnica de sequenciamento de DNA para determinação das RUs constantes. Pradeep et al. (2008) após realização do sequenciamento dessa ORF revelaram repetições de 49pb intercaladas por repetições de 57pb em suas amostras, corroborando com Shekar et al. (2005) e Pereira et al. (2019) mas divergindo do padrão de 49pb e 102pb encontrado por Dieu et al. (2004), Muller et al. (2010) e Carvalho, (2017).

Na fazenda 5 não foi detectado amplicons para a ORF 94, que foi identificada em todas as demais fazendas com bandas de ~600pb e ~700pb. A ausência de amplificação para amostras provenientes dessa fazenda pode significar alterações genotípicas pela deleção dessa região, levando em consideração a eficiência da reação para as demais amostras. Estudos anteriores classificam a ORF 94 como o melhor marcador comparado às ORFs 75 e 125 na epidemiologia do WSSV (PRADEEP et al., 2008). As RUs calculadas nas diferentes regiões geográficas (Tabela 4) variaram de 2 a 20 RUs, enquanto, neste estudo, predominaram dois genótipos de 8 e 10 RUs. A PCR dessa ORF gerou ainda outras informações relevantes para este estudo, pois a fazenda 2 apresentou os dois padrões de RU encontrados, sugerindo uma co-infecção por múltiplos genótipos do WSSV (TAN; SHI, 2011). Hoa et al. (2011) acreditam que infecções simultâneas por duas ou mais estirpes podem estar relacionados com a virulência.

Além das regiões minissatélites (ORF, 75, 94 e 125), este trabalho buscou identificar a presença de regiões variáveis (VRs 14/15, 23/24) e o gene de uma Transposase. As variações associadas com as ORFs 14/15 e 23/24 são utilizadas na identificação de mudanças evolutivas no WSSV (MARKS et al., 2005). Foi verificada a amplificação de 100% das amostras para a ORF 14/15, com amplicons que variaram entre ~1000-1500pb, essa região foi identificada no genoma de WSSV-TH nas amostras caracterizadas por Van Hulten et al. (2001) e confirmada como uma região propensa a recombinação (DIEU et al., 2004; MARKS et al., 2004; PRADEEP et al., 2008). Pereira et al. (2019) identificaram a presença dessa ORF em regiões

do Estado do Rio Grande do Norte, produzindo amplicons de tamanhos similares ~1200pb.

A VR 23/24 foi detectada em três fazendas deste estudo (F5, F7 e F2), caracterizando a presença de deleções no genoma do WSSV encontrados em fazendas dos municípios de Jaguaruana e Aracati. Este resultado é bastante significativo no que se refere a variabilidade genética desse organismo, já que Pereira et al. (2019), utilizando os mesmo primers descritos por Dieu et al. (2004) para esta ORF, não amplificaram essa região em nenhuma das suas amostras obtidas de fazendas do estado do Rio Grande do Norte, sugerindo uma possível exclusão dessa região. Estes resultados demonstram, portanto, divergências no genoma de amostras dos estados vizinhos e principais produtores de camarão do Nordeste, Ceará e Rio Grande do Norte.

A sequência de uma transposase foi detectada apenas no genoma completo do WSSV-TW (GenBank nº AF440570), não sendo verificado a presença desse gene no WSSV-CN (GenBank nº AF332093) ou WSSV-TH (GenBank nº AY864668). A análise da sua presença ou ausência é importante no estudo da diversidade genética desse vírus. A amplificação de um produto de cerca de 1489 pb caracteriza esta sequência como presente na amostra estudada, e ausente quando o produto de PCR tem aproximadamente 151 pb. Neste trabalho, todas as amostras amplificaram um fragmento de 151pb, confirmando a ausência dessa região nas amostras de fazendas do Estado do Ceará, Nordeste do Brasil.

Assim, constatou-se que a região de transposase continua restrita ao genoma do WSSV-TW e que regiões deletérias e de recombinação estão presentes e podem estar associadas a diferenças na virulência dos diferentes genótipos, que reiteram a necessidade do sequenciamento das regiões variáveis detectadas para um melhor estudo dos padrões do WSSV no espaço e no tempo.

5.4 CONCLUSÃO

Os achados deste trabalho sugerem mudanças evolutivas no WSSV, pela possível ocorrência de mutações, incidência de novos genótipos no Estado do Ceará ou da extinção de variantes, pois a ORF 125 anteriormente considerada um marcador eficiente, deixou de ser útil na identificação de possíveis fontes de infecção e rastreamento do WSSV. Os primers existentes para identificação da ORF 125, não vêm tendo sucesso na amplificação para amostras da Região Nordeste do Brasil em relação a outras regiões geográficas, não existindo até o momento informações sobre amostras de WSSV do Estado do Ceará que apresentaram amplificação para este marcador, sugerindo a necessidades de estudos que confirmem a presença ou deleção dessa região. A hipótese de co-infecção por mais de um genótipo de WSSV também foi levantada por este estudo, podendo existir em uma mesma fazenda diferentes variantes do vírus circulantes. Com isso, os dados gerados com este estudo são relevantes na compreensão da genética e

comportamento do WSSV nas fazendas de cultivo do estado do Ceará, proporcionando informações úteis para o controle e mitigação deste vírus no estado.

REFERÊNCIAS

- ABCC - Associação Brasileira de Criadores de Camarão. 2017. **Censo da carcinicultura do litoral sul do estado do Ceará e zonas interioranas adjacentes 2015/ 2016**. Natal: ABCC/MAPA.
- BOONE, L. Anomuran, macruran Crustacea from Panama and Canal Zone. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 63, n. 2, p. 137–189, 1931.
- CARVALHO, R. A. A. **Diagnóstico e Caracterização Molecular do Vírus da Mancha Branca (WSSV) em Camarões *Litopenaeus Vannamei* (BOONE, 1931) Cultivados no Vale do Rio Açu, Rio Grande do Norte, Brasil**. Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Marinhas Tropicais da Universidade Federal do Ceará, 2017.
- CHOMCZYNSKI, P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. **BioTechniques**, v. 15, n. 3, p. 532–534, 536–537, set. 1993.
- DIEU, B. T. M. et al. Molecular epidemiology of white spot syndrome virus within Vietnam. **The Journal of General Virology**, v. 85, n. Pt 12, p. 3607–3618, dez. 2004.
- DIEU, B. T. M. et al. Evaluation of white spot syndrome virus variable DNA loci as molecular markers of virus spread at intermediate spatiotemporal scales. **The Journal of General Virology**, v. 91, n. Pt 5, p. 1164–1172, maio 2010.
- ESCOBEDO-BONILLA, C. M. et al. A review on the morphology, molecular characterization, morphogenesis and pathogenesis of white spot syndrome virus. **Journal of Fish Diseases**, v. 31, n. 1, p. 1–18, jan. 2008.
- 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, 4 mar. 2013.
- FLEGEL, T. W. Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in Asia. **Journal of Invertebrate Pathology**, Diseases in Aquatic Crustaceans: Problems and Solutions for Global Food Security. v. 110, n. 2, p. 166–173, 1 jun. 2012.
- HO, M. C. W. et al. Disruption of the Abdominal-B Promoter Tethering Element Results in a Loss of Long-Range Enhancer-Directed Hox Gene Expression in Drosophila. **PLOS ONE**, v. 6, n. 1, p. e16283, 21 jan. 2011.
- HOA, T. T. T. et al. Mixed-genotype white spot syndrome virus infections of shrimp are inversely correlated with disease outbreaks in ponds. **The Journal of General Virology**, v. 92, n. Pt 3, p. 675–680, mar. 2011.
- KIATPATHOMCHAI, W. et al. Target for standard Thai PCR assay identical in 12 white spot syndrome virus (WSSV) types that differ in DNA multiple repeat length. **Journal of Virological Methods**, v. 130, n. 1, p. 79–82, 1 dez. 2005.

KIM, W. et al. Linked references are available on JSTOR for this article : **Molecular phylogeny of selected decapod crustaceans based on 18S Rna Nucleotide Sequences** Won Kim and Lawrence G. Abele In the past two decades molecular techniques have been of great value i. v. 10, n. 1, p. 1–13, 2015.

LIGHTNER, D. V. Virus diseases of farmed shrimp in the Western Hemisphere (the Americas): a review. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 106, n. 1, p. 110–130, jan. 2011.

LIGHTNER, D. V. et al. Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in the Americas. **Journal of Invertebrate Pathology**, Diseases in Aquatic Crustaceans: Problems and Solutions for Global Food Security. v. 110, n. 2, p. 174–183, 1 jun. 2012.

LO, C. F. et al. Detection of baculovirus associated with White Spot Syndrome Virus (WSSV) in penaeid shrimps using polymerase chain reaction. **Diseases of Aquatic Organisms**. v. 25, p. 133–141, 1996.

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

MARKS, H. et al. Fitness and virulence of an ancestral White Spot Syndrome Virus isolate from shrimp. **Virus Research**, v. 110, n. 1, p. 9–20, 1 jun. 2005.

MULLER, I. C. et al. Genotyping of white spot syndrome virus (WSSV) geographical isolates from Brazil and comparison to other isolates from the Americas. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 88, n. 2, p. 91–98, 25 jan. 2010.

NUNES, A. J. P; FEIJÓ, R. G. Convivência com o vírus da mancha branca no cultivo de camarão marinho no Brasil. **Revista da ABCC – Associação Brasileira dos Criadores de Camarão**. Natal, Ano XVIII Nº 2, 2016.

OIE – World Organisation For Animal Health. **Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals** - Chapter 2.2.6. — White spot disease. 2020. Disponível em: <https://www.oie.int/index.php?id=2439&L=0&htmfile=chapitre_wsd.htm> Acessado em 10 de jul de 2020.

PAN, X. et al. Highly Sensitive Detection of Low-Abundance White Spot Syndrome Virus by a Pre-Amplification PCR Method. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 3, p. 471–479, 28 mar. 2017.

PEIXOTO, E. C. R. et al. Identification and genotyping of white spot syndrome virus (WSSV) isolated from *Litopenaeus vannamei* in the state Rio Grande do Norte / Identificação e genotipagem do vírus da síndrome da mancha branca (WSSV) isolado de *Litopenaeus vannamei* no estado do Rio Grande do Norte. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 7, p. 45379–45385, 10 jul. 2020.

PEREIRA, J. M. P. et al. Alternative PCR primers for genotyping of Brazilian WSSV isolates. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 162, p. 55–63, 2019.

PRADEEP, B. et al. Genotyping of white spot syndrome virus prevalent in shrimp farms of India. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 78, n. 3, p. 189–198, 24 jan. 2008.

RUIBAL, M. P. V. **Avaliação de diferentes protocolos de extração de DNA para detecção de *Brucella abortus* a partir de diferentes tecidos de vacas infectadas experimentalmente com a cepa 2308.** Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2009.

SALEHI, H. The economic impacts of WSSV on shrimp farming production and export in Iran. **Aquaculture Asia Magazine**, v. 15, n. 2, p. 29–31, 2010.

SHEKAR, M.; KARUNASAGAR, I.; KARUNASAGAR, I. A computer-based identification of variable number tandem repeats in White spot syndrome virus genomes. **Current Science**, v. 89, n. 5, p. 882–887, 2005.

SIQUEIRA, I. L. DA S. Caracterização do vírus da síndrome da mancha branca (WSSV) prevalente no período de 2012, 2016 e 2018 no Município de Aracati (CE). 2019.

TAN, Y.-W.; SHI, Z. Genotyping of white spot syndrome virus in Chinese cultured shrimp during 1998-1999. **Virologica Sinica**, v. 26, p. 123–30, 1 abr. 2011.

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, 24 set. 2013.

TSAI, M. F. et al. Identification and characterization of a shrimp white spot syndrome virus (WSSV) gene that encodes a novel chimeric polypeptide of cellular-type thymidine kinase and thymidylate kinase. **Virology**, v. 277, n. 1, p. 100–110, 10 nov. 2000.

VAN HULTEN, M. C. W. et al. White Spot Syndrome Virus Envelope Protein VP28 Is Involved in the Systemic Infection of Shrimp. **Virology**, v. 285, n. 2, p. 228–233, 5 jul. 2001.

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.

**6 CAPÍTULO IV – ANÁLISE *IN SILICO* DE REGIÕES VARIÁVEIS NO GENOMA
DO WSSV NO ESTADO DO CEARÁ, NORDESTE DO BRASIL**

6 CAPÍTULO IV – ANÁLISE *IN SILICO* DE REGIÕES VARIÁVEIS NO GENOMA DO WSSV NO ESTADO DO CEARÁ, NORDESTE DO BRASIL

RESUMO – O genoma do vírus da síndrome da mancha branca (WSSV) possui aproximadamente 300 kbp, contendo 184 possíveis janelas de leitura aberta (*Open Reading Frames* - ORFs), e nove sequências de repetição em tandem. A comparação de sequências de diferentes isolados do WSSV revelou que o vírus de diferentes regiões possui similaridade de 95%, divergindo quanto a presença de regiões variáveis. Assim, este trabalho teve como objetivo o estudo *in silico* das regiões variáveis ORFs (75 e 94) e VRs (14/15 e 23/24) de amostras de WSSV obtidas de camarões *Litopenaeus vannamei* cultivados em fazendas do Estado do Ceará, nordeste do Brasil. Foi realizada o sequenciamento e alinhamento das regiões estudadas, que em seguida foram utilizadas para a construção de árvores filogenética com o intuito de estabelecer relações de parentesco com estirpes de outras regiões geográficas e, por fim, foram elaborados modelos de relógios moleculares para analisar as divergências genéticas ao longo do tempo. Os resultados do alinhamento usando a Ferramenta de Pesquisa de Alinhamento Local Básico (BLAST) revelaram maior percentual de identidade das regiões contendo VNTRs, com estirpes do Irã e que eventos de recombinação na VR 14/15 podem ter ocorrido apesar da similaridade entre as suas sequências. Em relação a VR 23/24, a mesma não alinhou com nada. A análise filogenética presumiu entre outras questões, que a introdução do WSSV no mundo ocorreu em meados de 1960. Sugerindo que o WSSV esteja presente no mundo anos antes da sua primeira detecção na província de Fujian na China em 1991, e que no Brasil sua introdução deu-se em meados de 2017, esta informação marca do início de nossos estudos, levantando a hipótese de que o genótipo circulante nos anos de 2017 a 2019 no estado do Ceará, não é o mesmo do surto de 2016 que acometeu o Estado. Diante disso, este estudo foi o primeiro a relatar afiliações filogenéticas de estirpes de WSSV do Estado do Ceará em relação a outras regiões geográficas no espaço e no tempo.

Palavras-chave: Vírus da Síndrome da Mancha Branca, *Litopenaeus vannamei*, Genoma.

6.1 INTRODUÇÃO

A atividade de Carcinicultura desenvolvida mundialmente, tem como principal desafio barrar a ocorrência de doenças, principalmente as de etiologia viral (DHAR; ROBLES-SIKISAKA, 2012). Dentre essas enfermidades, a causada pelo vírus da síndrome da mancha branca (WSSV) é considerada a mais devastadora para as fazendas de cultivo da espécie *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931), podendo provocar até 100% de mortalidade, em um período de três a sete dias contados do início dos primeiros sinais clínicos (LIGHTNER, 2011; SITHIGORNGUL et al., 2011).

O genoma do WSSV possui um tamanho de aproximadamente 300 kbp, contendo 184 possíveis janelas de leitura aberta (*Open Reading Frames* - ORFs), e regiões variáveis incluindo nove sequências de repetição em tandem (HULTEN et al., 2001). O genoma completo do WSSV foi depositado pela primeira vez nas bases de dados do *GenBank* entre os anos de 2000 e 2001, obtidos a partir de três isolados geográficos, oriundos da Tailândia (WSSV-TH; VAN HULTEN et al., 2001; Acc. No. AF369029), China (WSSV-CN; YANG et al., 2001; Acc. No. AF332093) e Taiwan (WSSV-TW; TSAI et al., 2000; Acc. No. AF440570).

A comparação de sequências desses isolados do WSSV revelou que o vírus de diferentes regiões possui similaridade de 95%, divergindo quanto a presença de regiões variáveis (MULLER et al., 2010). Algumas das principais regiões variáveis consistem em uma região propensa a recombinação VR 14/15, uma região com uma grande deleção VR 23/24 e três regiões minissatélites com repetições em tandem de número variável (*variable number of tandem repeats* - VNTRs) denominadas ORF 75, 94 e 125 (MARKS et al., 2004).

As regiões minissatélites que apresentam VNTRs são caracterizadas por um elevado grau de polimorfismo, tornando estas regiões adequadas para estudos de pequena e média escalas espaço-temporais, enquanto as regiões variáveis VR 14/15 e 23/24 podem ser utilizadas em abordagens evolucionárias em escalas continental e global (DIEU et al., 2004, 2010; MULLER et al., 2010; PRADEEP et al., 2008).

Até o momento pouco se sabe sobre a funcionalidade da maioria das regiões variáveis presentes no genoma do WSSV, porém, alguns estudos recentes indicam que essas regiões podem ter relação com o fenótipo da doença (GAO et al., 2014; LI et al., 2017). Embora uma correlação direta entre genótipo e fenótipo ainda não tenha sido possível, o que demonstra a necessidade de abordagens como a caracterização *in silico* para tentar obter novas informações a respeito destas sequências.

Análises *in silico* podem funcionar como ferramentas complementares as informações adquiridas em abordagens experimentais, ou fornecendo conteúdo que não poderiam ser obtidos por abordagens *in vitro* (KHOR et al., 2015; PETREY; HONIG, 2005).

Essas análises só são possíveis graças a tecnologias como o sequenciamento gênico, que vem sendo amplamente utilizado na aquicultura para a obtenção de genomas completos de uma espécie de interesse, auxiliando na compreensão da sua biologia, a decifrar mecanismos moleculares e na busca por marcadores genéticos e funcionais (YU et al., 2015; YUE, 2014).

Diante disso, e de nenhuma análise filogenética ter sido realizada até agora para o genoma do WSSV de um isolado de campo da região do Estado do Ceará, maior produtor nacional (ABCC, 2017), este estudo realizou uma análise *in silico* de regiões variáveis do WSSV detectados em fazendas do Estado do Ceará, para estabelecer afiliações filogenéticas aproximadas entre isolados de diferentes regiões geográficas e estimar a diversidade genética do WSSV ao longo do tempo e do espaço.

6.2 MATERIAL E MÉTODOS

6.2.1 Seleção das amostras de regiões variáveis do WSSV

Foram utilizados amplificadores de regiões variáveis de seis amostras positivas para o WSSV extraídas de camarões *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931). Analisadas entre os anos de 2017 e 2019 e tendo sido provenientes de cinco fazendas dos municípios de Aracati (1) e Jaguaruana (4) no Estado do Ceará, essas amostras foram processadas e conservadas a -20°C no Laboratório de Multiusuários do Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA, onde foram submetidas à amplificação das regiões variáveis (ORF 75, ORF 94, VR14/15 e VR 23/24) que em seguida foram selecionadas mediante a qualidade e quantidade do material amplificado. A integridade e o tamanho aproximado do DNA genômico foram analisados através de eletroforese em gel de agarose 1,5% e a quantidade de DNA total verificada utilizando o Qubit Fluorometer (Thermo Fisher). Após essa avaliação foram consideradas aptas para o sequenciamento genômico três amostras da ORF 75, duas da ORF 94, seis da VR 14/15 e três da VR 23/24 (Tabela 1).

Tabela 1 – Amostras selecionadas para o sequenciamento de acordo com a origem e as regiões variáveis amplificadas.

Fazendas	Município	Ano de coleta	ORF75	ORF94	VR 14/15	VR 23/24
F1 ^a	Jaguaruana	2017	X	X	X	X
F1 ^b	Jaguaruana	2018	X		X	
F2	Aracati	2017	X	X	X	X
F3 ^a	Jaguaruana	2017			X	X
F3 ^b	Jaguaruana	2019			X	
F4	Jaguaruana	2018			X	

6.2.2 Sequenciamento de DNA

Os produtos de PCR foram submetidos a purificação enzimática antes do sequenciamento de DNA utilizando o ABI 3500 DNA Analyzer do Laboratório de Biologia Molecular e Genômica (LBMG/NUGEN/UFRN), um sistema de análise de DNA de 8 capilares com a tecnologia ThermoFisher. As reações de sequenciamento foram realizadas com o BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (código 4337455), e as corridas efetuadas em capilares de 50 cm utilizando o polímero POP7. A análise das sequências obtidas realizaram-se pelo software Sequencing Analysis v.6 utilizando o Base Caller KB.

6.2.3 Alinhamento das Regiões Variáveis

A partir das amostras sequenciadas foram criadas sequências consensos com auxílio do software BioEdit, que foram comparadas com estirpes de referência obtidas em bancos de dados disponíveis usando a Ferramenta de Pesquisa de Alinhamento Local Básico (BLAST).

Em seguida, foi construída uma ferramenta de tipagem para o WSSV, através da preparação de conjuntos de dados (datasets) de referência, que incluem publicamente sequências codificantes das ORFs 75, 94 e VRs 14/15 e 23/24 dos bancos de dados. Todos os datasets foram alinhados independentemente pelo método MUSCLE (EDGAR, 2004), utilizando o software MEGA X (STECHER; TAMURA; KUMAR, 2020) e adotando como referência a sequência completa AF440570.1. (TSAI et al., 2000).

6.2.4. Análise Filogenética

Após o alinhamento foi realizado a construção de uma árvore filogenética para cada dataset, utilizando o método Neighbour-joining (SIMONSEN et al., 2008), com bootstrap de 1000, para uma identificação rápida da similaridade das amostras sequenciadas neste trabalho. Em seguida, o melhor modelo de substituição de nucleotídeos foi estimado pelo jModelTest (DARRIBA et al., 2015). Foram então construídas árvores de máxima verossimilhança (ML), utilizando o RAxML v8 com 1000 réplicas (STAMATAKIS, 2014), sendo uma árvore filogenética para cada dataset supracitado, afim de colocar as amostras em um contexto global.

6.2.5 Construção de um modelo de Relógio Molecular

Para a realização de análises de divergência genética ao longo do tempo, foi definido o melhor modelo de relógio molecular, utilizando o software *TempEst* versão 1.5.3 (RAMBAUT et al., 2016). Tendo sido adotado o modelo *relaxed clock model*, indicando que cada ramo tem sua própria taxa independente extraída de uma única distribuição de taxa paramétrica compartilhada. Em seguida, foram construídas árvores filogenéticas escalonadas no tempo usando inferência filogenética bayesiana, utilizando o modelo GTR com distribuição *gamma*, cadeia de comprimento de dez milhões de gerações e consenso de árvores com eliminação de 10% das árvores iniciais. A ESS e a convergência estatística foram analisadas usando o programa Tracer 1.6. conforme implementado no BEAST v 1.8.4 (DRUMMOND et al., 2006), e a visualização das árvores foi realizada pelo software FigTree v1.4.4.

Ainda no software BEAST, utilizando a amostragem de cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC), realizamos uma inferência da dinâmica populacional ao longo do tempo usando o modelo coalescente não paramétrico, *Skyride*, assumindo que o tamanho da população muda suavemente ao longo do tempo, estimando dessa forma, a diversidade do WSSV ao longo do tempo.

6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dos alinhamentos realizados com a Ferramenta de Pesquisa de Alinhamento Local Básico (BLAST), revelaram porcentagem de identidade para cada uma das regiões variáveis estudadas, em relação a outras regiões geográficas. Para a ORF 75 foram obtidas três sequências, duas com tamanhos de 469pb e uma com 471pb, que quando

submetidas ao alinhamento apresentaram percentual de identidade de 85% com a estirpe IRWSSVKH4 do Irã (KF157839.1), 82% com uma estirpe isolada de Taiwan (AF440570.1) e outra do Brasil (MG264599.1), além de identidade de 84% com uma estirpe chinesa (KT995470.1). Estes resultados diferem dos alinhamentos realizados por Carvalho (2017) e Siqueira (2019), que ao comparar estirpes do Estado do Rio grande do Norte e Ceará, respectivamente, obtiveram 97,5% e 96% de similaridade com a estirpe TH-96-II (E value = 0) (GenBank no AY864668.1).

Para a ORF 94 foram obtidas duas sequências com 434pb cada, e que apresentaram percentual de identidade de 96% com estirpes do Irã (KP640278.1), México (HQ007032.1) e Estados Unidos (MN840357.1). As regiões VNTRs de nossas sequências de WSSV do Estado do Ceará apresentaram elevada similaridade com estirpes do Irã e México, a identidade com a estirpe do México, corrobora com 100% de identidade descrito por Carvalho (2017) e Siqueira (2019) em seus estudos.

Todas as seis sequências geradas para a VR 14/15 tiveram tamanhos de 650 pb e apresentaram percentual de identidade de, aproximadamente, 85% com estirpes isoladas do Brasil (MF784752.1) e da Tailândia (AF399029.1) e 84% com estirpes do Egito (KR083844.1) e dos EUA (KF771902.1). A maior similaridade foi com a estirpe brasileira (MF784752.1) que se refere ao primeiro genoma completo do WSSV depositado do Brasil, no ano de 2015. Essa estirpe tem origem no Estado do Rio Grande do Norte, segundo maior produtor do Brasil e estado vizinho do Estado do Ceará (DANTAS et al., 2015; ABCC, 2017). Mostrando que este patógeno pode ter ingressado no estado do Ceará através do limite entre os estados e que eventos de recombinação podem estar mediando a evolução do WSSV.

As amostras referentes a VR 23/24 apresentaram muita variação e a sequência consenso não alinhou com nada, nem quando tentamos a menor similaridade do Blast (Somewhat similar sequences (blastn)). E, portanto, não foram analisadas neste estudo.

Com isso, foram preparados três conjuntos de dados de referência que incluem publicamente sequências codificantes das ORFs 75 (dataset A), ORF 94 (dataset B) e da VR 14/15 (dataset dos bancos de dados:

- Dataset A: Três sequências do gene que codifica a ORF 75 do WSSV descritas no trabalho (n=3), juntamente com trinta e oito sequências provenientes de surtos do WSSV descritos no mundo (n=38).

- Dataset B: Duas sequências do gene que codifica a ORF 94 do WSSV descritas no trabalho (n=2), juntamente com cinquenta e duas sequências provenientes de surtos do WSSV descritos no mundo (n=54).
- Dataset C: Seis sequências do gene que codifica a região variável 14/15 do WSSV descritas no trabalho (n=6), juntamente com onze sequências provenientes de surtos do WSSV descritos no mundo (n=11).

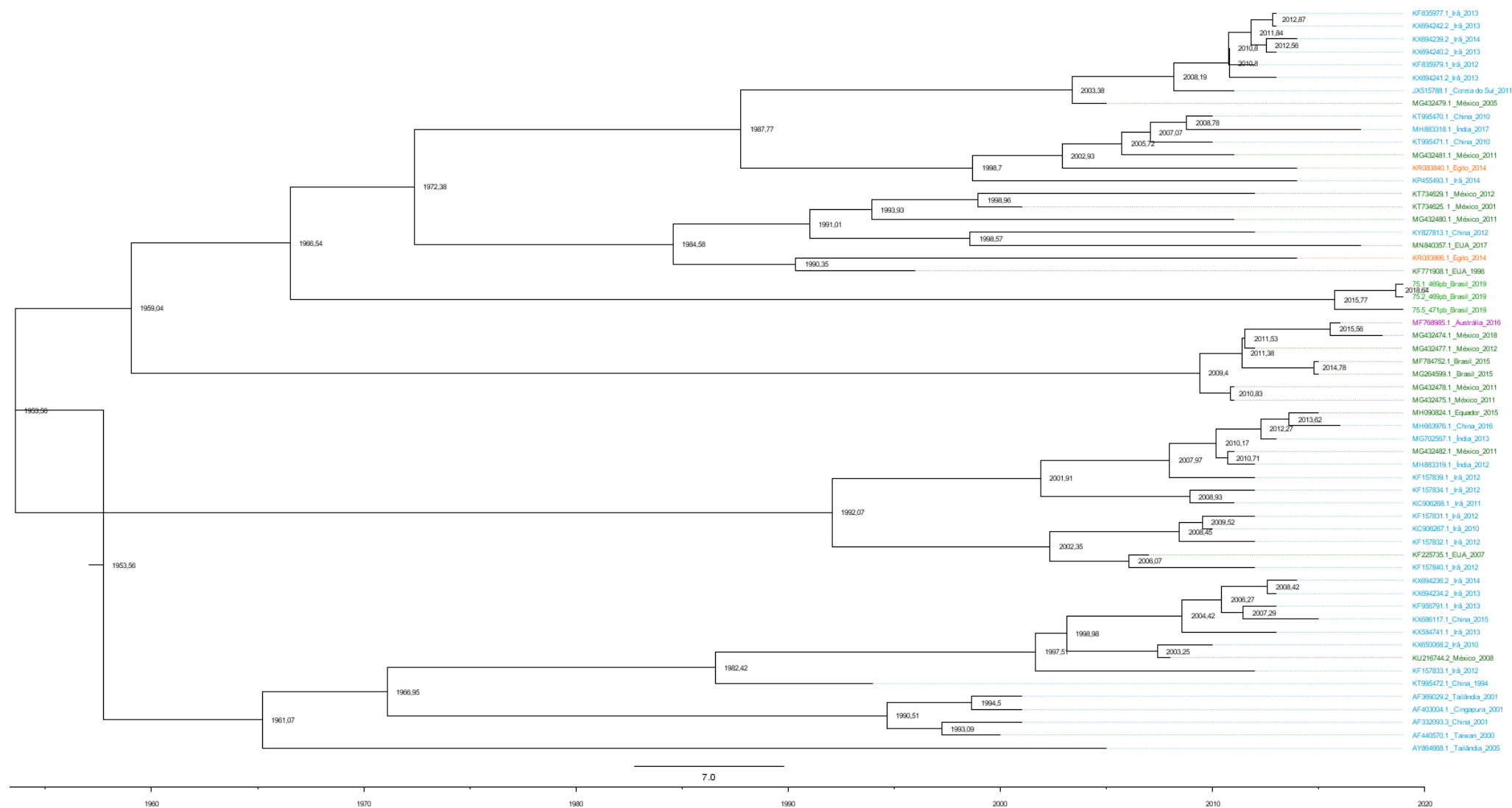
A relação encontrada entre a divergência raiz a ponta e as datas de amostragem (em anos) apoiou o uso da análise do relógio molecular relaxado neste estudo. Os resultados estatísticos obtidos suportam um sinal temporal significativo: ORF 75 ($r^2 = 0,12$, $pvalue = 0,34$), ORF 94 ($r^2 = 0,04$, $pvalue = -0,18$) e VR 14/15 ($r^2 = 0,45$, $pvalue = -0,67$). Todas as correlações mostraram que ainda que fraco, há sinais temporais, valendo fazer a análise.

As análises filogenéticas bayesianas das regiões gênicas estimam que a introdução do WSSV no mundo surgiu em meados de 1960. Sugerindo que o WSSV esteja presente no mundo anos antes da sua primeira detecção na província de Fujian na China em 1991 (LIGHTNER, 2011). Já no Brasil, foi estimado que as estirpes isoladas neste trabalho, tenham sido introduzidas no Brasil em meados de 2017, esta informação marca do início de nossos estudos, levantando a hipótese de que o genótipo circulante nos anos de 2017 a 2019 no estado do Ceará não é o mesmo do surto de 2016 que acometeu o Estado.

6.3.1 ORF 75

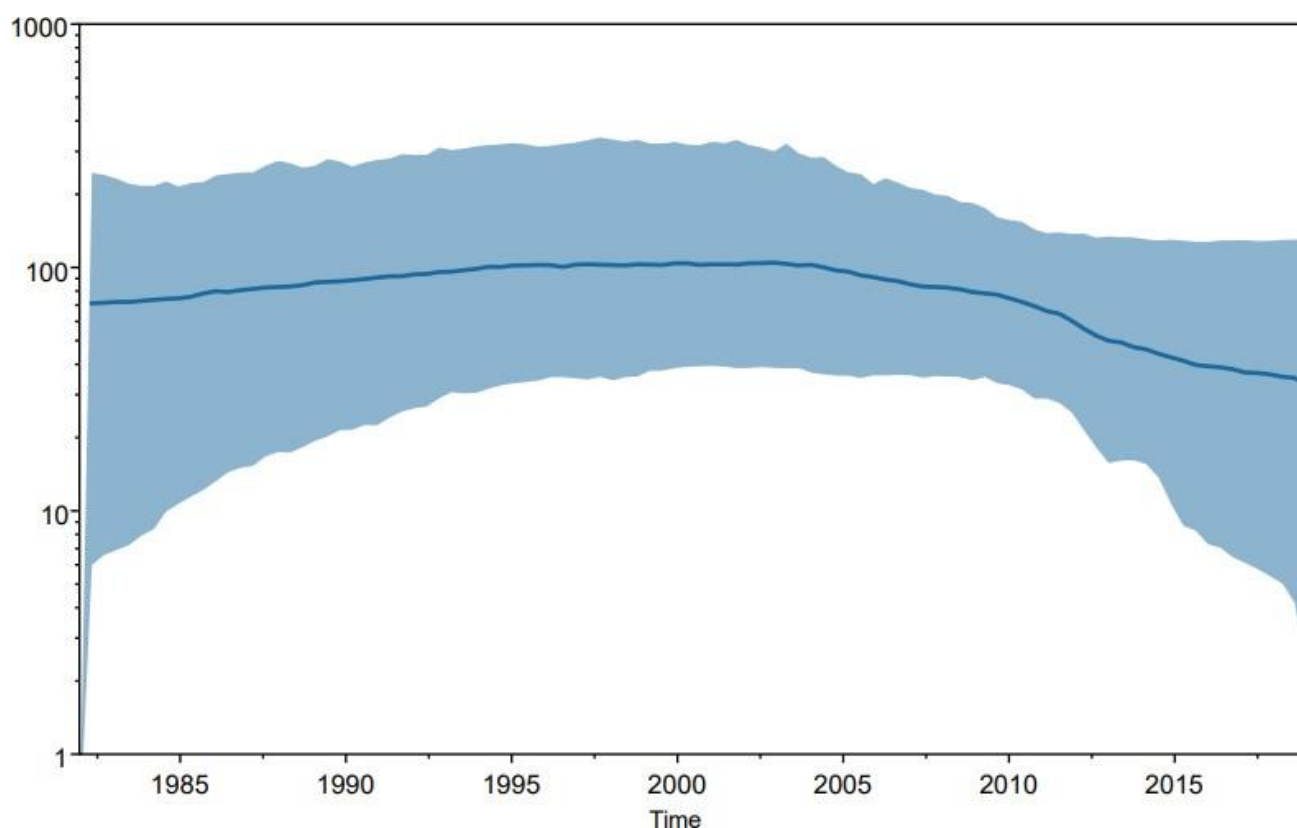
A distribuição da ORF 75 (Figura 1) se divide em dois grandes grupos monofiléticos onde o primeiro grupo é composto basicamente de sequências provenientes das Américas, como México e Estados Unidos, bem como as amostras isoladas neste estudo, representando o Brasil e uma sequência da Austrália. Já o segundo grupo monofilético contém basicamente sequências de países asiáticos como Irã, China, Tailândia, Cingapura e Índia. Isso indica que, baseado na ORF 75, embora proveniente de um ancestral em comum, as estirpes virais que chegaram as Américas evoluíram independente das estirpes que circulam no continente asiático, isso pode ser em reflexo a diversidade climática (LIGHTNER, 2011) de ambos os continentes que podem influenciar na incidência e propagação do WSSV nas espécies de camarão cultivadas em cada região e consequentemente para adaptação do WSSV ao seu hospedeiro local. Com isso, o vírus circulante nas espécies asiáticas diverge do vírus adaptado as espécies de camarões americanos.

Figura 1 - Árvore Filogenética baseada nas sequências obtidas da ORF 75 do WSSV



As análises de diversidade genética da ORF 75 ao longo do tempo (Gráfico 1) indicou um padrão constante na variabilidade genética viral, com uma ligeira queda em meados de 2012, que pode ser atribuída ao surgimento de uma doença nova / emergente do camarão conhecida como síndrome da necrose hepatopancreática aguda (AHPNS), que foi relatado na China em 2009 e no Vietnã e Malásia em 2012 (NACA, 2012), que pode ter ocasionado a mortalidade em massa de camarões e consequentemente diminuído a população de WSSV.

Gráfico 1 – Modelo de Relógio Molecular para a ORF 75.

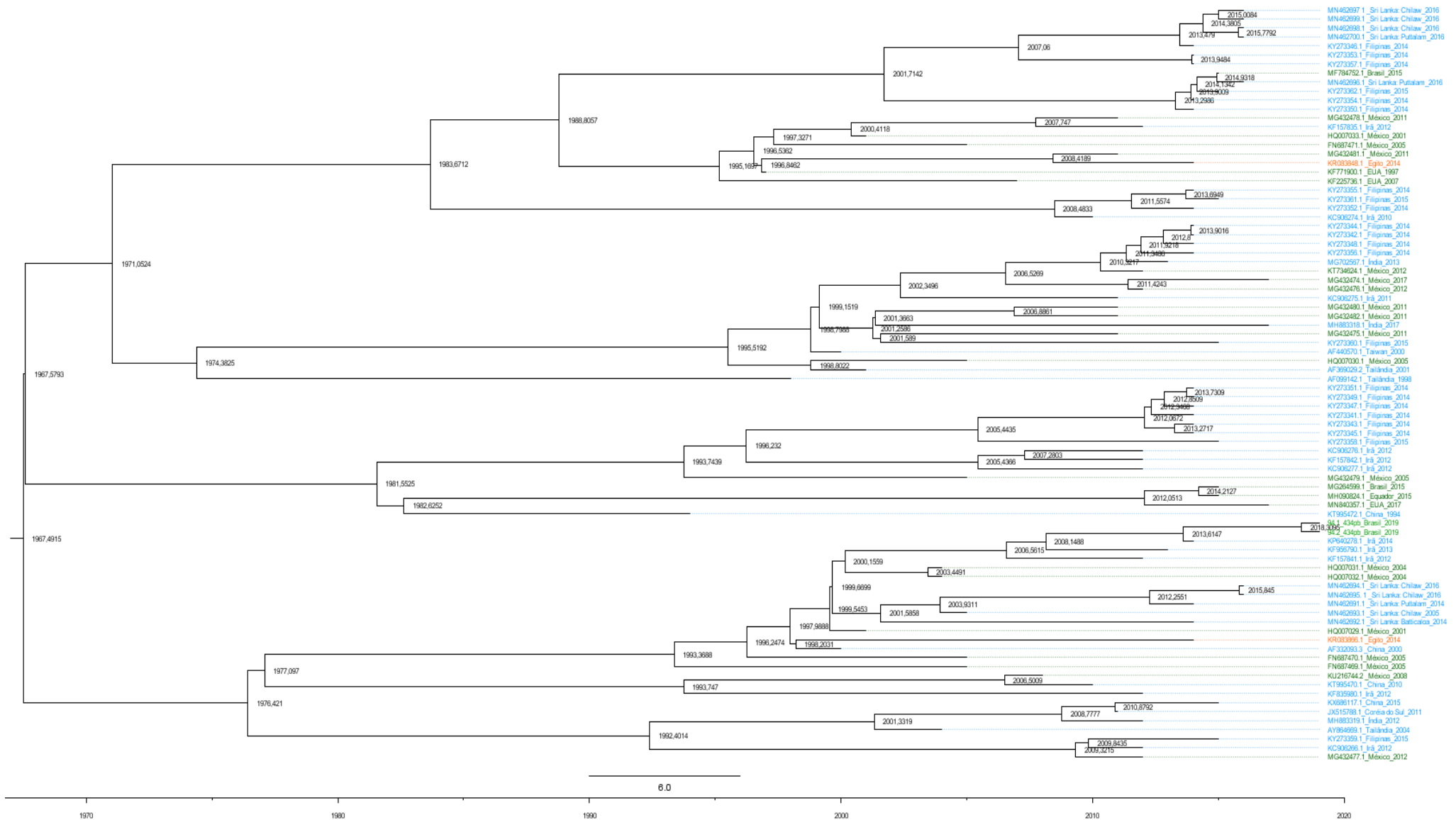


Fonte: Elaboração do autor, 2020.

6.3.2 ORF 94

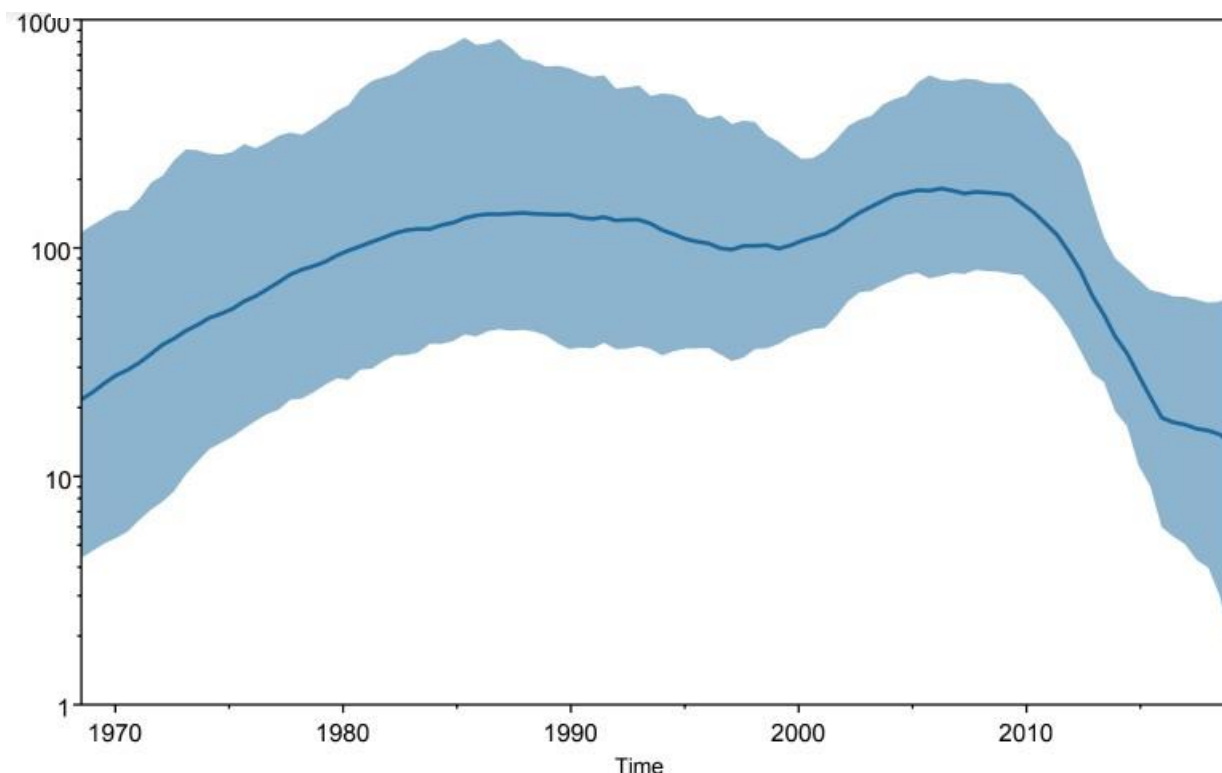
Com relação a ORF 94 (Figura 2), segundo a análise filogenética bayesiana, as sequências disponíveis para esse gene se dividem em três grupos monofílicos. O primeiro grande grupo agrupa amostras de Sri-Lanka (2016), Filipinas, México em surtos que ocorreram em 2001 e 2005, Estados Unidos (1997-2007), Egito e um isolado que ocasionou um surto no Brasil em 2015. O segundo grupo monofílico agrupa amostras provenientes das Filipinas, Irã (2010-2011), Tailândia e México nos anos de 2005, 2011 e 2017. O último grupo monofílico

compreende sequências do Irã (2012, 2013 e 2014), Equador, Estados Unidos (2017), México (2004), algumas amostras das Filipinas e Sri-Lanka (2005, 2014 e 2016), bem como as amostras sequenciadas neste estudo. O que indica que o vírus que ocasionou a infecção de camarões no Ceará nos anos de 2017 a 2019 é diferente do vírus que circulou no Brasil em 2015.



Com relação as análises de diversidade genética da ORF 94 (Gráfico 2) ao longo do tempo, diferente da ORF 75 que se manteve constante, a ORF 94 teve a sua diversidade genética em ascendência desde 1970, atingindo o maior pico entre 2004 - 2005, entretanto, desde 2010 uma queda acentuada na população de hospedeiros devido a emergência de doenças infecciosas, bem como surtos de WSSV que dizimou a população de camarões em diversos países produtores, como México (DURÁN-AVELAR et al., 2015), a falta de hospedeiros ocasionou a perda na variabilidade genética viral.

Gráfico 2 - Modelo de Relógio Molecular para a ORF 94.



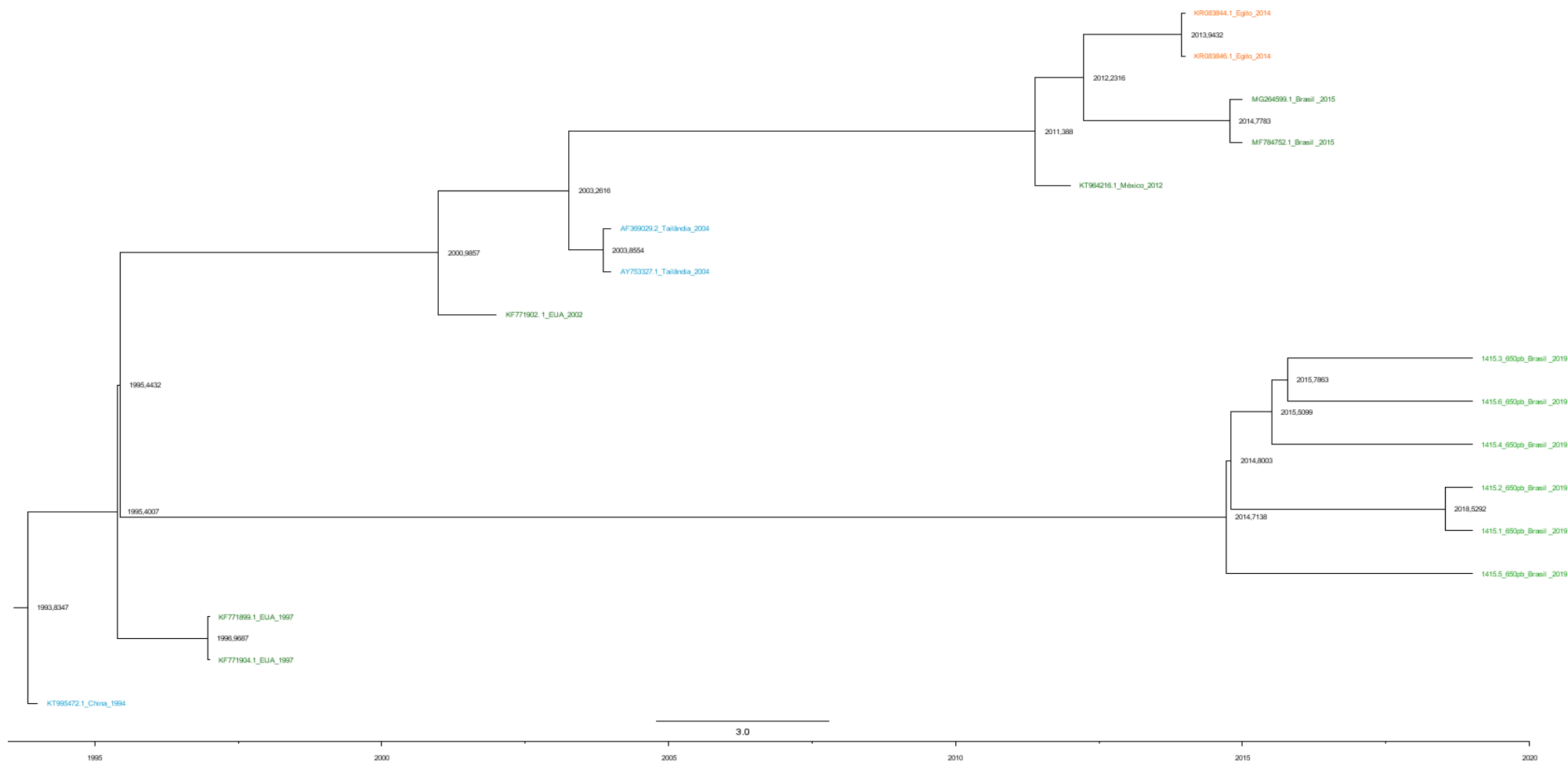
Fonte: Elaboração do autor, 2020.

6.3.3 VR 14/15

Em relação a região variável 14/15 (Figura 3), poucas foram as sequências referentes a esse gene encontradas nos bancos de dados públicos, devido a isso, a introdução do WSSV, acabou enviesada pela escassez de informações. Grande parte dos isolados encontrados são das Américas. Com isso, as sequências obtidas nesse trabalho formaram um grupo monofilético independente, com ancestralidade em comum com amostras proveniente de surtos que acometeram o Estados Unidos (2002), mas, assim como o gene menos variável ORF 94, as amostras brasileiras de 2017 a 2019, diferem quanto a origem evolutiva das

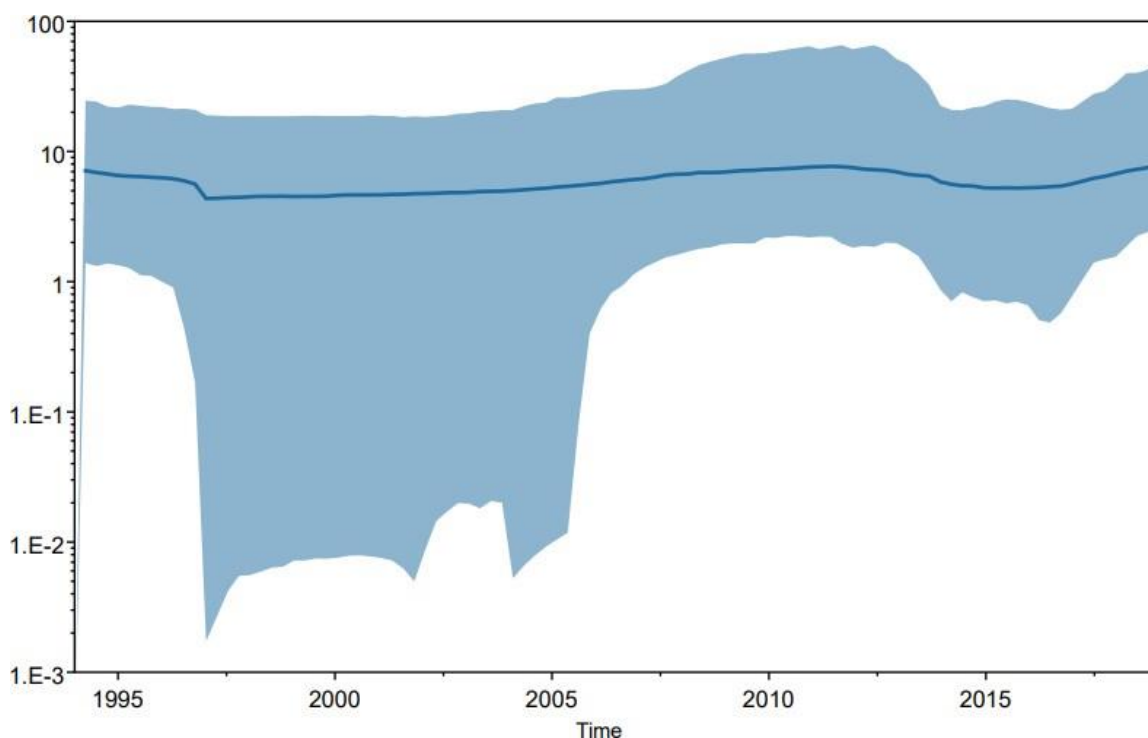
sequências isoladas no Brasil em anos anteriores, corroborando com afirmativa de que o WSSV responsável pelo surto que acometeu o Ceará em 2016 é diferente do vírus introduzido no país em meados de 2017 e é diferente da estirpe que ocasionou o surto de 2015 no país.

Figura 3- Árvore Filogenética baseada nas sequências obtidas da VR 14/15 do WSSV.



O relógio molecular da VR 14/15 (Gráfico 3), demonstrou que apesar de ser uma região hipervariável, a diversidade genética da ORF 14/15 ao longo do tempo obteve um padrão constante de variabilidade, mantendo o tamanho populacional do WSSV estável.

Gráfico 3 - Modelo de Relógio Molecular para a VR 14/15.



Fonte: Elaboração do autor, 2020.

6.4 CONCLUSÃO

Este estudo atrelado a tecnologia de sequenciamento permitiu uma avaliação das regiões variáveis do WSSV, estabelecendo suas divergências evolutivas no tempo e no espaço. Foi observado afiliações filogenéticas aproximadas entre os isolados geográficos do WSSV, principalmente com as estirpes do Irã. Estimou-se que o WSSV tenha sido introduzido no mundo em 1960, data anterior a da primeira vez que foi identificado e, por fim, foi possível inferir que as estirpes circulantes não são as mesmas do surto de 2016 que acometeu o Estado do Ceará, nem parece ser a mesma estirpe responsável pelo surto de 2015 no Estado do Rio Grande do Norte. Levantando a hipótese de existirem diferentes variantes genotípicas do vírus no Estado do Ceará, assim como no Nordeste do país.

REFERÊNCIAS

- ABCC - Associação Brasileira de Criadores de Camarão. 2017. **Censo da carcinicultura do litoral sul do estado do Ceará e zonas interioranas adjacentes 2015/ 2016**. Natal: ABCC/MAPA.
- BOONE, L. Anomuran, macruran Crustacea from Panama and Canal Zone. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 63, n. 2, p. 137–189, 1931.
- CARVALHO, R. A. A. **Diagnóstico e Caracterização Molecular do Vírus da Mancha Branca (WSSV) em Camarões *Litopenaeus Vannamei* (BOONE, 1931) Cultivados no Vale do Rio Açu, Rio Grande do Norte, Brasil**. Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Marinhas Tropicais da Universidade Federal do Ceará, 2017.
- DANTAS, M. D. A. et al. Analysis of new isolates reveals new genome organization and a hypervariable region in infectious myonecrosis virus (IMNV). **Virus Research**, v. 203, p. 66–71, 4 maio 2015.
- DARRIBA, D. et al. jModelTest 2: more models, new heuristics and high-performance computing Europe PMC Funders Group. **Nature Methods**, v. 9, n. 8, p. 772, 2015.
- DHAR, A.; ROBLES-SIKISAKA, R. Functional Genomics in Shrimp Disease Control. In: **Functional Genomics in Aquaculture**. [s.l: s.n.]. p. 361–375.
- DIEU, B. T. M. et al. Molecular epidemiology of white spot syndrome virus within Vietnam. **The Journal of General Virology**, v. 85, n. Pt 12, p. 3607–3618, dez. 2004.
- DIEU, B. T. M. et al. Evaluation of white spot syndrome virus variable DNA loci as molecular markers of virus spread at intermediate spatiotemporal scales. **The Journal of General Virology**, v. 91, n. Pt 5, p. 1164–1172, maio 2010.
- DRUMMOND, A. J. et al. Relaxed phylogenetics and dating with confidence. **PLoS Biology**, v. 4, n. 5, p. 699–710, 2006.
- DURÁN-AVELAR, M. et al. Genotyping WSSV isolates from northwestern Mexican shrimp farms affected by white spot disease outbreaks in 2010-2012. **Diseases of aquatic organisms**, v. 114, p. 11–20, 11 maio 2015.
- EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 5, p. 1792–1797, 2004.
- GAO, M. et al. White spot syndrome virus strains of different virulence induce distinct immune response in *Cherax quadricarinatus*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 39, n. 1, p. 17–23, 1 jul. 2014.

HULTEN, M. C. VAN et al. **White spot syndrome virus envelope protein VP28 is involved in the systemic infection of shrimp.**

KHOR, B. Y. et al. General overview on structure prediction of twilight-zone proteins. **Theoretical Biology & Medical Modelling**, v. 12, 4 set. 2015.

LI, F. et al. Comparative genomic analysis of three white spot syndrome virus isolates of different virulence. **Virus Genes**, v. 53, n. 2, p. 249–258, 1 abr. 2017.

LIGHTNER, D. V. Virus diseases of farmed shrimp in the Western Hemisphere (the Americas): a review. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 106, n. 1, p. 110–130, jan. 2011.

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

MULLER, I. C. et al. Genotyping of white spot syndrome virus (WSSV) geographical isolates from Brazil and comparison to other isolates from the Americas. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 88, n. 2, p. 91–98, 25 jan. 2010.

NACA- Network of Aquaculture Centres in Asia Pacific. **Diseases of crustaceans - Acute Hepatopancreatic Necrosis Syndrome (AHPNS)**. Thailand, on 9–10 August 2012.

PETREY, D.; HONIG, B. Protein structure prediction: inroads to biology. **Molecular Cell**, v. 20, n. 6, p. 811–819, 22 dez. 2005.

PRADEEP, B. et al. Genotyping of white spot syndrome virus prevalent in shrimp farms of India. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 78, n. 3, p. 189–198, 24 jan. 2008.

RAMBAUT, A. et al. Exploring the temporal structure of heterochronous sequences using TempEst (formerly Path-O-Gen). **Virus Evolution**, v. 2, n. 1, p. vew007, 2016.

SIMONSEN, M.; MAILUND, T.; PEDERSEN, C. N. S. Rapid neighbour-joining. In: **International Workshop on Algorithms in Bioinformatics**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2008. p. 113–122.

SIQUEIRA, I. L. DA S. Caracterização do vírus da síndrome da mancha branca (WSSV) prevalente no período de 2012, 2016 e 2018 no Município de Aracati (CE). 2019.

SITHIGORNGUL, P. et al. Simultaneous and rapid detection of white spot syndrome virus and yellow head virus infection in shrimp with a dual immunochromatographic strip test. **Journal of Virological Methods**, v. 173, n. 1, p. 85–91, 1 abr. 2011.

STAMATAKIS, A. RAxML version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. **Bioinformatics**, v. 30, n. 9, p. 1312–1313, 2014.

STECHER, G.; TAMURA, K.; KUMAR, S. Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) for macOS. **Mol Biol Evol**, p. 1237–1239, 2020.

TSAI, M. F. et al. Identification and characterization of a shrimp white spot syndrome virus (WSSV) gene that encodes a novel chimeric polypeptide of cellular-type thymidine kinase and thymidylate kinase. **Virology**, v. 277, n. 1, p. 100–110, 10 nov. 2000.

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.

YU, Y. et al. Genome survey and high-density genetic map construction provide genomic and genetic resources for the Pacific White Shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 15612, 27 out. 2015.

YUE, G. H. Recent advances of genome mapping and marker-assisted selection in aquaculture. **Fish and Fisheries**, v. 15, n. 3, p. 376–396, 2014.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A Doença da Síndrome da Mancha Branca (WSSD), possui grande relevância econômica para o Estado do Ceará, pois pode acabar com cultivos inteiros em poucos dias, portanto, é necessário a adoção de medidas de biossegurança rigorosas de modo a evitar sua introdução nas fazendas de cultivo do Estado.

A escassez de informações referentes a variabilidade genética do WSSV na região Nordeste do Brasil, dificulta a compreensão da dispersão e evolução do vírus no país, e nossos resultados apresentados aqui podem servir de base para futuras discussões sobre a utilização das ORFs 75, 94 e 125 e VRs 14/15 e 23/24, além de uma sequência para o gene de uma transposase como marcadores para genotipagem do WSSV.

Além disso, nosso estudo foi o primeiro a relatar afiliações filogenéticas de estirpes de WSSV do Estado do Ceará em relação a outras regiões geográficas no espaço e no tempo. Informações que permitem ampliar o conhecimento sobre o comportamento e origem do WSSV. Auxiliando na tomada de decisões pelos carcinicultores para o melhor controle e mitigação do WSSV nas fazendas de cultivo do Estado do Ceará.

APÊNDICE

QUESTIONÁRIO TÉCNICO E SANITÁRIO

Data

Nº

Questionário Técnico e Sanitário

Nome da propriedade

Contato

Localização

1. De acordo com a área de viveiros (ha) como a fazenda pode ser classificada (CENSO, 2004)?

☐ Pequena (<10 ha)☐ Média (>10 ha < 50 ha)☐ Grande (> 50 ha)

2. Número de viveiros

3. Tamanho dos viveiros

4. Data que começou a operar

5. Qual a fonte de água?

☐ Mar☐ Estuário☐ Rio☐ Poço

6. Qual a forma de captação?

☐ Bomba☐ Gravidade☐ Outro - Especifique7. Qual a densidade (camarão/m²)?

8. Qual o tamanho médio dos camarões para despesa?

9. Qual o tempo médio de cultivo?

10. Quantos viveiros são povoados simultaneamente?

11. É realizado um intervalo para repovoamento dos viveiros?

☐ Sim☐ Não

12. Se sim, quais tipos de procedimentos costumam adotar durante este intervalo?

☐ Calagem☐ Desinfecção☐ Fertilização☐ Outros - Especifique

13. Como ocorre a renovação de água?

14. É realizado o monitoramento dos parâmetros físico-químicos da água?

- ☐ Sim ☐ Não

15. Se sim, com qual frequência?

- ☐ Diariamente
☐ Semanalmente
☐ Mensalmente
☐ Ocasionalmente - Especifique _____

16. Qual o sistema de alimentação adotado?

- ☐ Natural
☐ Artificial
☐ Natural/Artificial

17. Há ocorrência de animais invasores no ambiente de cultivo? Quais?

- ☐ Aves
☐ Caranguejos
☐ Siris
☐ Caramujos
☐ Outras espécies de Camarões
☐ Outros - Especifique _____

18. A fazenda possui um técnico responsável com formação superior?

- ☐ Sim ☐ Não

19. Possui histórico de doenças?

- ☐ Sim ☐ Não

20. Quais?

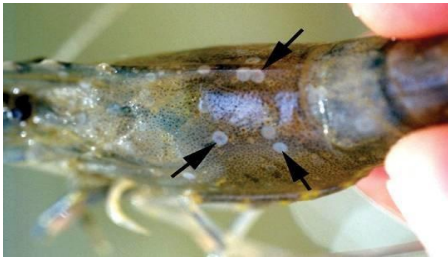
- ☐ Síndrome da Mancha Branca (WSSV)
☐ Mionecrose Infecciosa (NIM)
☐ Necrose Hipodérmica e Hematopoiética Infecciosa (IHN)
☐ Síndrome de Taura (ST)
☐ Hepatopancreatite necrosante (NHP)
☐ Vibriose (*Vibrio* sp.)

21. Como o diagnóstico foi realizado?

- ☐ Análise molecular (PCR; qPCR..)
☐ Análise histológica
☐ Análise presuntiva
☐ Outros - Especifique _____

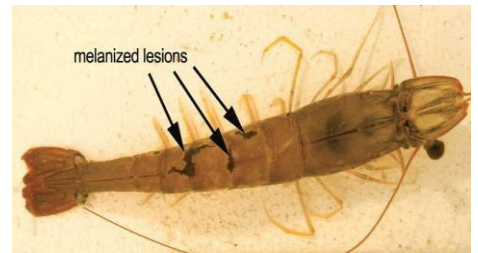
22. Dentre os sinais clínicos apresentados abaixo, quais já foram observados?

☐



q

☐



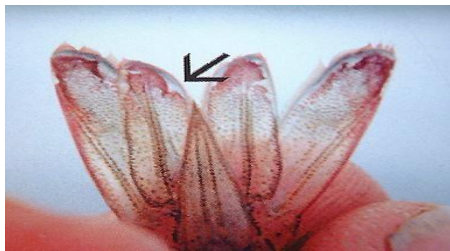
☐



☐



☐



☐



ANEXO
PLANILHA PARA ANÁLISE PRESUNTIVA

Viveiro: _____ Data: ____/____/____

Nº	Peso	Hlinfo cog.	Ctórax	Hepatopâncreas túbulos / lipídeos	Trato digestivo conteúdo/ repleção	Epicomensais brânquias/epipodito	Necrose IMNV/blackspot	Observações
1								Deformidade S N onde? Antenas () Rugosas S N Urópodos (/) Pigmentação () Pleópodos ()
2								Deformidade S N onde? Antenas () Rugosas S N Urópodos (/) Pigmentação () Pleópodos ()
3								Deformidade S N onde? Antenas () Rugosas S N Urópodos (/) Pigmentação () Pleópodos ()
4								Deformidade S N onde? Antenas () Rugosas S N Urópodos (/) Pigmentação () Pleópodos ()
5								Deformidade S N onde? Antenas () Rugosas S N Urópodos (/) Pigmentação () Pleópodos ()
6								Deformidade S N onde? Antenas () Rugosas S N Urópodos (/) Pigmentação () Pleópodos ()
7								Deformidade S N onde? Antenas () Rugosas S N Urópodos (/) Pigmentação () Pleópodos ()
8								Deformidade S N onde? Antenas () Rugosas S N Urópodos (/) Pigmentação () Pleópodos ()
9								Deformidade S N onde? Antenas () Rugosas S N Urópodos (/) Pigmentação () Pleópodos ()
10								Deformidade S N onde? Antenas () Rugosas S N Urópodos (/) Pigmentação () Pleópodos ()
Média								

Hepatopâncreas: Morfologia – Score 1 a 4, > deformidade dos túbulos
Lipídeos - Score 1 A 4, > gotículas de gordura.
Trato digestivo: Conteúdo – Gregarinas & gametócitos/trofozoítos, Score: 1-4
Repleção – Score 1 a 4, > cheio.
Epicomensais: Brânquias – Score 1 a 4, > sujeira e protozoário (identificar);
Epipodito - Score 1 a 4, > sujeira e protozoário (identificar).
Necrose: Vírus (IMN) - Score 1 a 4, > sinais de necrose (musculatura esbranquiçada, opaca);
Black spot – Score de 1 a 4, > manchas negras ou "black spot".

Pleópodos: Score 1 a 4, > vermelhas.
Urópodos: Score 1 a 4, > vermelhas / Cor: VerDe
Deformidades: Sim / Não
Antenas Score 1 a 4, > vermelhas Rugosas: Sim / Não
Pigmentação corpo: Score: 1 a 4, > pigmentado.
Cefalotórax: 1 a 4, > depósito calcário carapaça.