



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS DO MAR**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MARINHAS TROPICAIS**

**ERICK JOAQUIN ARDON LARIOS**

**ANÁLISE HISTOLÓGICA E MOLECULAR DE AGENTES ETIOLÓGICOS  
CAUSADORES DE ENFERMIDADES EM CAMARÕES MARINHOS *Litopenaeus  
vannamei* CULTIVADOS EM DUAS FAZENDAS COM SISTEMA SEMI-INTENSIVO  
NO SUL DE HONDURAS**

**FORTALEZA**

**2022**

ERICK JOAQUIN ARDON LARIOS

ANÁLISE HISTOLÓGICA E MOLECULAR DE AGENTES ETIOLÓGICOS  
CAUSADORES DE ENFERMIDADES EM CAMARÕES MARINHOS *Litopenaeus*  
*vannamei* CULTIVADOS EM DUAS FAZENDAS COM SISTEMA SEMI-INTENSIVO NO  
SUL DE HONDURAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Ciências Marinhas Tropicais. Área de concentração: Ciência, tecnologia e gestão costeira e oceânica.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Maggioni.  
Coorientadora: Prof. Dra. Juliana de Carvalho Gaeta.

FORTALEZA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

L335a Larios, Erick Joaquin Ardon.  
Análise histológica e molecular de agentes etiológicos causadores de enfermidades em camarões marinhos *Litopenaeus vannamei* cultivados em duas fazendas com cultivos semi-intensivos no sul de Honduras / Erick Joaquin Ardon Larios. – 2022.  
92 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Instituto de Ciências do Mar, Programa de Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais, Fortaleza, 2022.

Orientação: Prof. Dr. Rodrigo Maggioni.

Coorientação: Profa. Dra. Juliana de Carvalho Gaeta.

1. América Central. 2. Carcinicultura. 3. Diagnóstico. 4. Enfermidades. 5. qPCR. I. Título.

CDD 551.46

---

ERICK JOAQUIN ARDON LARIOS

ANÁLISE HISTOLÓGICA E MOLECULAR DE AGENTES ETIOLÓGICOS  
CAUSADORES DE ENFERMIDADES EM CAMARÕES MARINHOS *Litopenaeus*  
*vannamei* CULTIVADOS EM DUAS FAZENDAS COM SISTEMA SEMI-INTENSIVO NO  
SUL DE HONDURAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Ciências Marinhas Tropicais. Área de concentração: Ciência, tecnologia e gestão costeira e oceânica.

Aprovada em: 24/05/2022.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Rodrigo Maggioni (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Alberto Jorge Pinto Nunes  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Rubens Galindo Feijó  
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará (IFC)

A minha mãe, Ana Patrícia Larios Corrales,  
obrigado pelo amor e apoio infinito.

A minha tia, Luz María Larios (*in memoriam*).

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais e especialmente a minha querida mãe, pelo apoio e todas essas ligações a distância que nunca faltaram dia após dia durante todo meu tempo no Brasil. Amo você!

A minha irmã, por estar disponível sempre que preciso de você.

Ao meu orientador prof. Dr Rodrigo Maggioni, obrigado por me receber no CEDECAM, pela orientação e conselhos para concluir meu mestrado.

A minha coorientadora Dra. Juliana de Carvalho Gaeta pela ajuda oferecida desde meu primeiro dia como membro do CEDECAM, como também pelas recomendações para a conclusão do mestrado.

Ao técnico do CEDECAM Dr. Rafael dos Santos Rocha pelo acompanhamento, conselho e ajuda oferecida no desenvolvimento do mestrado.

A técnica do CEDECAM Me. Maria das Graças Coelho pela disposição e apoio sempre que foi necessário.

A banca de defesa, prof. Dr. Alberto Jorge Pinto Nunes e prof. Dr. Rubens Galindo Feijó, agradeço pelas valiosas sugestões que com certeza engrandeceram este trabalho e minha formação.

A Organização dos Estados Americanos (OEA), pela bolsa concedida para cursar meu mestrado no Brasil e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) pelo apoio científico neste país.

“Dar a vida pela defesa dos rios, é dar a vida para a defesa da humanidade e do planeta.”  
(BERTA CÁCERES, 1971-2016).

## RESUMO

O cultivo do camarão branco, *Litopenaeus vannamei*, continua a crescer mais rápido do que outras espécies aquícolas, com maior parte da produção na Ásia. A produção de camarões marinhos em países da América Latina como Brasil, Honduras, México e Equador, é relevante no contexto econômico da aquicultura. As unidades produtivas em Honduras geram uma média anual de aproximadamente \$216 milhões de dólares de exportação. A incidência de doenças infecciosas na aquicultura é um dos fatores que mais afeta a sustentabilidade da indústria. No ano de 2017, em Honduras se reportou a presença de quatro das nove doenças de reporte obrigatório: Infecção com *Hepatobacter penaei* (Hepatopancreatite Necrosante NHP), Infecção Hipodermal e Necrose Hematopoiética (IHHNV), Vírus da Síndrome de Taura (TSV) e Vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV). Nesse sentido, o objetivo geral deste estudo foi identificar e caracterizar molecularmente agentes etiológicos causadores de enfermidades em camarões marinhos *L. vannamei* cultivados em Honduras, assim como analisar histologicamente camarões coletados na Reserva de Vida Silvestre Los Delgaditos. Neste trabalho, a análise da presença das principais doenças foi determinada através da PCR convencional e PCR em tempo real (qPCR), além da análise histológica para detectar a presença dos patógenos ou dos danos característicos das respectivas doenças nos tecidos do cefalotórax. Mediante as análises moleculares se identificaram a presença de IHHNV, NHP (qPCR) e WSSV (PCR convencional e qPCR) nas amostras oriundas de Honduras, que posteriormente os fragmentos plasmidiais respectivos para WSSV foram sequenciados. Após análises filogenéticas foi detectada a presença de três haplótipos com uma diferença entre as sequências de Honduras quando comparadas com isolados da Índia (MG702567.1) e da Coreia do Sul (JX515788.1). Finalmente, as qPCRs realizadas evidenciaram uma coinfeção entre a IHHNV e WSSV em duas das vinte e sete amostras e três das vinte e sete amostras com coinfeção entre IHHNV e NHP nas amostras oriundas de Honduras. Entretanto, as análises histológicas detectaram a presença de danos característicos de vibrioses sistêmica no hepatopâncreas dos camarões, assim como atrofia do hepatopâncreas além da presença de esferóides no órgão linfóide, necroses multifocal grau um nas brânquias e presença de sizígias de gregarinas no intestino médio. A importância do desenvolvimento desta dissertação resultou na obtenção da caracterização molecular das primeiras sequências nucleotídicas respectivas às linhagens de WSSV presentes em Honduras, assim como a identificação de coinfeções virais e bacterianas.

**Palavras-chave:** América Central; carcinicultura; diagnóstico; enfermidades; qPCR.



## ABSTRACT

The culture of white shrimp continues to grow faster than other species in aquaculture, with most shrimps being produced in Asia. Production of marine shrimp in Latin America countries such as Brazil, Honduras, Mexico and Ecuador are relevant in the economic context of aquaculture. The productions in Honduras generate an annual average of approximately \$216 million exportable. The incidence of infectious diseases in aquaculture is one of the factors that most affect the sustainability of the industry. In 2017 Honduras reported the presence of four to nine obligatory reporting diseases: Necrotizing Hepatopancreatitis (NHP), Infection with Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis (IHHNV), Infection with Taura Syndrome Virus (TSV) and finally Infection with White Spot Syndrome Virus (WSSV). It was drawn as a general objective: to identify and characterize molecularly etiological agents of causing diseases in marine shrimp *L. vannamei* cultivated in Honduras, as well as to analyze histopathological shrimp tissues collected in Reserva de Vida Silvestre Los Delgaditos. In this study, the presence of the main diseases was determined by molecular analysis through conventional PCR and real-time PCR (qPCR), in addition to histological analysis to detect the presence of pathogen agents or characteristic damages of respective diseases in the cephalothorax tissues. Due to molecular analysis was identify presence of IHHNV, NHP (qPCR) and WSSV (conventional and qPCR) in Honduran originated tissues, which subsequently respective fragments of WSSV were sequenced, showing after phylogenetic analyses the presence of three haplotypes with a difference in nucleotide sequence when compared with isolates from India (MG702567.1) and South Korea (JX515788.1). Finally, qPCR showed that there was a coinfection between IHHNV and WSSV in two of twenty-seven tissues and three of twenty-seven tissues were coinfecting with IHHNV and NHP in Honduran shrimp tissues. Nevertheless, when compared with histological analysis, the presence of damage characteristic of systemic Vibriosis and atrophic of the hepatopancreas in shrimp analyzed was detected, furthermore to the presence of spheroids in the lymphoid organ and multifocal necrosis gills and presence of gregarines in the midgut were documented. The importance of the development of this dissertation resulted in the molecular characterization of the first nucleotide sequences respective to the WSSV lineages present in Honduras, as well as the identification of viral and bacterial coinfections.

**Keywords:** Central America; diagnostic; diseases; shrimp culture; qPCR.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Anatomia do camarão branco *Litopenaeus vannamei*. .....22
- Figura 2 - Conceito hospedeiro-patógeno-ambiente como fatores interativos que determinam uma doença, como indicado pela área sombreada de sobreposição. ....26
- Figura 3 - Localização das duas fazendas de cultivos semi-intensivos de onde foram coletadas as amostras oriundas de Honduras na América Central. Ambas áreas se localizam no Golfo de Fonseca, sendo elas: a Reserva de Vida Silvestre Los Delgaditos e a Reserva de Vida Silvestre San Bernardo. ....34
- Figura 4 - Fazenda típica de cultivo de camarões em Honduras. A Figura mostra do lado esquerdo o viveiro de cultivo e o canal de abastecimento de água do lado direito...36
- Figura 5 - Árvore filogenética reticulada da VP28 do WSSV através dos primers 146F1/R1 e 146F2/R2 (Lo et al, 1996). Comparação das sequências de Honduras (WSSV-1e2-2021) com as sequências da Coreia do Sul (JX515788.1) e da Índia (MG702567.1) evidenciando a presença de três clados. ....55
- Figura 6 - Árvore de máxima verossimilhança da VP28 do WSSV através dos primers 146F1/R1 e 146F2/R2. ....56
- Figura 7 - Cortes histológicos para análise da presença de patógenos ou sinais destes em cefalotórax de *Litopenaeus vannamei*. a) Melanização multifocal grau 1 em brânquias; b) Bactérias filamentosas grau 1 em apêndices; c) Presença de cianofíceas grau 1 em intestino; d) Sizíguas de gregarinas em intestino e infiltrações de hemócitos grau 1 no tecido conectivo dos camarões. ....58
- Figura 8 - Cortes histológicos para análise da presença de patógenos ou sinais destes em cefalotórax de *Litopenaeus vannamei*. a) Presença de bactérias grau 1 em hepatopâncreas; b) Infiltrações de hemócitos grau 2 e presença de bactérias grau 2 no hepatopâncreas; c) Destruição celular grau 1 no hepatopâncreas; d) Infiltrações de hemócitos grau 1 no tecido conectivo. ....59
- Figura 9 - Cortes histológicos para análise da presença de patógenos ou sinais destes em cefalotórax de *Litopenaeus vannamei*. a) Presença de células basófilas grau 1, aglomerados de bactérias grau 1 e Infiltrações de hemócitos; b) Destruição celular grau 3 no hepatopâncreas; c) Corpos de inclusão grau 1 no hepatopâncreas 40x; d) Corpos de inclusão no hepatopâncreas observados a 100x. ....60
- Figura 10 - Cortes histológicos para análise da presença de patógenos ou sinais destes em

cefalotórax de <i>Litopenaeus vannamei</i> . a) Esferóides ectópicos na glândula antenal; b) Esferóides grau 1 no órgão linfoide; c) Esferóides e corpos de inclusão; d) Encapsulação bacteriana, presença de bactérias e infiltrações de hemócitos observados a 40x. ....	61
Figura 11 - Cortes histológicos para análise da presença de patógenos ou sinais destes em cefalotórax de <i>Litopenaeus vannamei</i> . a) Nódulo melanizado no hepatopâncreas, presença de bactérias e infiltrações de hemócitos; b) Atrofia do hepatopâncreas; c) Corpos de inclusão na glândula antenal, células eosinófilas e infiltrações de hemócitos; d) Corpos de inclusão (setas azuis) e bactérias (cabeças de seta) no hepatopâncreas observados a 40X. ....	62
Figura 12 - Eletroforeses WSSV – 146. Evidencia a amplificação dos fragmentos plasmídias correspondentes a aproximadamente 947 pb. ....	84
Figura 13 - Eletroforeses - IHHNV – 389. Evidencia a amplificação dos fragmentos plasmídias correspondentes a aproximadamente 300 pb. ....	84
Figura 14 - Amplificação do Plot - WSSV .....	85
Figura 15 - Curva Standard - WSSV .....	85
Figura 16 - Plot dos Multicomponentes - WSSV.....	86
Figura 17 - Plot Raw Data - WSSV .....	86
Figura 18 - Amplificação do Plot - IMNV.....	87
Figura 19 - Curva Standard - IMNV.....	87
Figura 20 - Plot dos Multicomponentes - IMNV.....	88
Figura 21 - Plot Raw Data - IMNV.....	88
Figura 22 - Amplificação do Plot - IHHNV.....	89
Figura 23 - Curva Standard - IHHNV.....	89
Figura 24 - Plot dos Multicomponentes - IHHNV.....	90
Figura 25 - Plot Raw Data - IHHNV. ....	90
Figura 26 - Amplificação do Plot - NHP.....	91
Figura 27 - Curva Standard - NHP. ....	91
Figura 28 - Plot dos Multicomponentes - NHP. ....	92
Figura 29 - Plot Raw Data - NHP. ....	92

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Taxonomia <i>Litopenaeus vannamei</i> .....	23
Quadro 2 - Identificação das regiões de coleta amostral. Sistemas de cultivo utilizado. Hectares de produção. Ciclos de cultivo por ano. Histórico clínico da região e origem da água coletada para o cultivo de camarão. ....	35
Quadro 3 - Descrição dos tecidos extraídos para a análise molecular. Número de indivíduos por amostra. Tipo de tecido analisado. Setor de coleta na fazenda. Peso médio dos camarões. Etapa de cultivo. Época de coleta. Origem de coleta dos organismos. Status sanitário das fazendas. Sinais Clínicos dos camarões e Região onde cada coleta foi realizada.....	37
Quadro 4 - Condições PCR AHPND .....	40
Quadro 5 - Condições PCR e qPCR para WSSV .....	44
Quadro 6 - Descrição dos tecidos extraídos para a análise histológica. Número de indivíduos analisados. Peso médio dos camarões. Viveiro e Setores dentro da fazenda. Etapa de cultivo. Origem de coleta dos organismos. Época de coleta. Status sanitário e Região da fazenda.....	47

## LISTA DE TABELA

Tabla 1 - Quantificação de DNA e RNA utilizando como aparelho de leitura o NanoDrop 2000c. ....	76
Tabla 2 - Quantificação carga viral WSSV após diagnóstico através da PCR em Tempo Real (qPCR).....	77

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANDAH	Associação Nacional de Aquicultores de Honduras.
AHPND	Doença da Necrose Hepatopancreática Aguda.
BLAST	Ferramenta Básica de Pesquisa de Alinhamento Local.
CAGR	Taxa de crescimento anual composta.
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico complementar.
CEDECAM	Centro de Diagnóstico de Enfermidades de organismos aquáticos.
CNA-E	Câmara Nacional da aquicultura – Equador.
CsCl	Cloreto de Césio
DNA	Ácido Desoxirribonucleico.
dNTP's	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados.
dsRNA	Ácido Ribonucleico de fita dupla.
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético.
EMS	Síndrome da Mortalidade Precoce.
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura.
hrs	Regiões homólogas.
IHHNV	Infecção Hipodermal e Necrose Hematopoiética.
IMNV	Mionecrose Infeciosa.
LABOMAR	Instituto de Ciências do Mar.
LPS	Lipopolissacarídeo.
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de magnésio.
NCBI	Centro Nacional de Informação em Biotecnologia.
NHP	Infecção com <i>Hepatobacter penaei</i> (Hepatopancreatite Necrosante).
NH <sub>3</sub> / NH <sub>4</sub>	Amônia / Amoníaco.
OIE	Organização Mundial de Sanidade Animal.
OIRSA	Organização Internacional Regional de Saúde Agropecuária.
ORF	Quadro de leitura aberto.
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase.
PRIPESCA	Processo de Integração da Pesca e da Aquicultura da América Central.
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real.
RNA	Ácido Ribonucleico.
RdRp	Ácido Ribonucleico dependente.

SENASA	Serviço Nacional De Saúde e Segurança Agroalimentar.
SDS	Dodecil sulfato de sódio.
SOD	Superóxido dismutase.
SPF	Reprodutores Livres de Patógenos Específicos.
Tris-HCL	Tris Cloridrato.
TSV	Vírus da Síndrome de Taura.
UFC	Universidade Federal do Ceará.
UICN	União Internacional para a Conservação da Natureza.
UTR	Região não traduzida.
WSSV	Vírus da Síndrome da Mancha Branca.
WTD	Infecção com <i>Macrobrachium rosenbergii nodavirus</i> (Doença da cauda branca).
YHV	Vírus da Síndrome da Cabeça Amarela.

## LISTA DE SÍMBOLOS

\$	Dólar dos Estados Unidos.
%	Porcentagem.
®	Marca registrada.
bp	Pares de bases.
kb	Kilobases.
kD	Kilodalton.
t	Tonelada.
µm	Micrômetro.
µL	Microlitro.
mM	Milimolar.



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>18</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>21</b>
2.1	<i>Carcinicultura .....</i>	21
2.2	<i>Litopenaeus vannamei .....</i>	22
2.2.1	<i>Aspectos gerais e Anatomia .....</i>	22
2.2.2	<i>Taxonomia.....</i>	23
2.2.3	<i>Habitat e Cultivo da espécie .....</i>	23
2.2.4	<i>Mecanismos de defesa do camarão a patógenos .....</i>	24
2.2.5	<i>Equilíbrio Ambiente: Hospedeiro: Patógenos .....</i>	24
2.3	<i>Patologias de Origem Bacteriana.....</i>	26
2.3.1	<i>Aspectos gerais.....</i>	26
2.3.2	<i>Hepatopancreatite Necrosante (NHP) .....</i>	27
2.3.3	<i>Doença da Necrose Hepatopancreática Aguda (AHPND).....</i>	27
2.4	<i>Patologias de Origem Viral.....</i>	28
2.4.1	<i>Aspectos gerais.....</i>	28
2.4.2	<i>Síndrome da Mancha branca (WSSV).....</i>	29
2.4.3	<i>Infecção Hipodermal e Necrose Hematopoiética (IHHNV).....</i>	30
2.4.4	<i>Mionecrose Infecciosa (IMNV).....</i>	30
2.4.5	<i>Síndrome do Vírus de Taura (TSV).....</i>	31
2.5	<i>Variabilidade viral.....</i>	32
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>34</b>
3.1	<i>Proveniência das amostras .....</i>	34
3.2	<i>Extração do Material Genômico .....</i>	38
3.2.1	<i>Extração do DNA.....</i>	38
3.2.2	<i>Extração do RNA.....</i>	38
3.2.3	<i>Síntese de cDNA.....</i>	39
3.3	<i>Quantificação e padronização do Material genômico.....</i>	39
3.4	<i>Reação em Cadeia da Polimerase PCR .....</i>	39

3.4.2	<i>Enfermidade da Necrose Hepatopancreática (NHP)</i> .....	41
3.4.3	<i>Vírus da Infecção Hipodermal e Necrose Hematopoiética (IHHNV)</i> .....	42
3.4.4	<i>Vírus da Mionecrose Infeciosa (IMNV)</i> .....	43
3.4.5	<i>Vírus do Síndrome da Mancha Branca (WSSV)</i> .....	43
3.4.6	<i>Vírus da Síndrome de Taura (TSV)</i> .....	45
3.5	<i>Eletroforeses</i> .....	45
3.6	<i>Sequenciamento</i> .....	45
3.6.1	<i>Purificação dos fragmentos</i> .....	45
3.6.2	<i>Sequenciamento e Alinhamento no BLAST</i> .....	45
3.7	<i>Análise Histológica</i> .....	46
4	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	48
4.1	<i>Tipo de tecidos analisados e quantificação do DNA e RNA</i> .....	48
4.2	<i>Análise molecular</i> .....	49
4.2.1	<i>Doenças bacterianas</i> .....	49
4.2.1.1	<i>Doença da Necrose Hepatopancreática Aguda (AHPND)</i> .....	49
4.2.1.2	<i>Hepatopancreatite Necrosante (NHP)</i> .....	49
4.2.2	<i>Doenças virais</i> .....	50
4.2.2.1	<i>Vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV)</i> .....	50
4.2.2.2	<i>Vírus da Infecção Hipodermal e Necrose Hematopoiética (IHHNV)</i> .....	52
4.2.2.3	<i>Vírus da Mionecrose Infeciosa (IMNV)</i> .....	53
4.2.2.4	<i>Vírus da Síndrome de Taura (TSV)</i> .....	54
4.2.3	<i>Alinhamento das sequências</i> .....	54
4.2.4	<i>Árvores filogenéticas</i> .....	54
4.2.5	<i>Composição Nucleotídica das sequências</i> .....	56
4.3	<i>Análise histológica</i> .....	57
5	<b>CONCLUSÕES</b> .....	63
6	<b>CONSIDERAÇÃO FINAL</b> .....	65
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	66
	<b>APÊNDICE A - QUANTIFICAÇÃO DE MATERIAL GENÔMICO</b> .....	76
	<b>APÊNDICE B - QUANTIFICAÇÃO DA CARGA VIRAL WSSV</b> .....	77

<i>APÊNDICE C – ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS.....</i>	<i>78</i>
<i>APÊNDICE D - ELETROFORESES.....</i>	<i>84</i>
<i>APÊNDICE E – PCR EM TEMPO REAL – qPCR WSSV.....</i>	<i>85</i>
<i>APÊNDICE F - PCR EM TEMPO REAL – qPCR IMNV.....</i>	<i>87</i>
<i>APÊNDICE G - PCR EM TEMPO REAL – qPCR IHHNV.....</i>	<i>89</i>
<i>APÊNDICE H - PCR EM TEMPO REAL – qPCR NHP.....</i>	<i>91</i>

## 1 INTRODUÇÃO

As doenças são uma séria ameaça para a produção aquícola do mundo assim como para todas as atividades agropecuárias. No cultivo dos crustáceos, são listadas seis doenças de origem viral de acordo com a lista divulgada pela Organização Mundial da Sanidade Animal (OIE, 2021). São elas: a Infecção Hipodermal e Necrose Hematopoiética (IHHNV); Vírus da Mionecrose Infeciosa (IMNV); Infecção com *Macrobrachium rosenbergii nodavirus* (Doença da cauda branca (WTD)); Vírus da Síndrome de Taura (TSV); Vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV) e Vírus da Síndrome da Cabeça Amarela (YHV) e duas doenças de origem bacteriana: Doença da Necrose Hepatopancreática Aguda (AHPND); Infecção com *Hepatobacter penaei* (Hepatopancreatite Necrosante (NHP)). Destas, cinco são oriundas das Américas ou se tornaram endêmicas após sua introdução de maneira contínua na região além de que são responsáveis por significativo impacto econômico na produção dos crustáceos (ARULMOORTHY et al, 2020; MILLARD et al, 2020; PARRILLA TAYLOR, 2018; SIQUEIRA, 2019). A incidência de doenças infecciosas na aquicultura é um dos fatores que mais afeta a sustentabilidade da indústria. Perdas significativas associadas a surtos de patógenos na carcinicultura foram documentadas em todo o mundo (CASTRO LARA, 2009).

Em 1990, com a Síndrome da Mancha Branca (WSSV) se revelou um desafio significativo para o setor aquícola causando temporariamente a interrupção do cultivo e conseqüentemente uma redução significativa na oferta de camarões. Desta forma, houve um aumento nos preços dos camarões. Um efeito semelhante foi induzido pela Doença da Necrose Hepatopancreática Aguda (AHPND), inicialmente conhecida como Síndrome da Mortalidade Precoce (EMS) que foi observado na década de 2010 (ASCHE et al, 2020). Os crustáceos são uma fonte importante de proteína alimentar aquática e exercem um papel importante na segurança alimentar. A produção global de organismos aquáticos estimada foi de 179 milhões de toneladas em 2018, dos quais 82 milhões de toneladas foram da produção aquícola (\$250 bilhões de dólares). A produção dos camarões marinhos dominou o setor dos crustáceos (9,4 milhões de toneladas em 2018, \$ 69,3 bilhões de dólares), sendo que os camarões peneídeos (*Litopenaeus vannamei* e *Penaeus monodon*) representaram mais de 60% do total de crustáceos produzidos (BLACKWELL, 2021; SARAVANAN et al., 2017).

A carcinicultura tornou-se uma das principais atividades na economia de Honduras. De acordo com o Apoio ao Processo de Integração da Pesca e da Aquicultura da América Central (PRIPESCA), o setor apresenta um forte crescimento desde a década de 1980, cuja produção tem aumentado ao longo dos anos. Segundo os dados do Banco Central de Honduras

(BCH, 2021), o cultivo de camarão alcançou o montante de 187,8 milhões de dólares em setembro de 2021; 27,5 milhões de dólares (17,1%) acima do reportado em setembro de 2020. Os principais destinos de exportação do camarão cultivado em Honduras no ano de 2021 foram União Europeia com aproximadamente 19.2 milhões, Taiwan com 15,4 milhões, México com 13,5 milhões, América Central com 8,2 milhões, Estados Unidos de América com 2,3 milhões e finalmente o Japão com 612,9 mil toneladas (ANDAH, 2022).

Muitas das doenças dos camarões peneídeos são causadas por organismos que formam parte da sua microbiota natural, que em condições de estresse tornam-se patogênicas (MORALES-COVARRUBIAS, 2013a). Segundo dados da OIE (2021a), no ano de 2017 Honduras reportou a presença de quatro das nove doenças de reporte obrigatórias pela OIE. São elas: NHP, IHHNV, TSV e WSSV.

O aumento da incidência de surtos infecciosos e o seu impacto sobre a produção levaram ao desenvolvimento gradual de diversas técnicas de diagnóstico, que responderam às necessidades específicas do momento de sua implementação. Portanto, os procedimentos básicos foram evoluindo para testes diagnósticos mais rigorosos e específicos, o que tem facilitado a abordagem e identificação precoce dos eventos infecciosos, sendo comum a combinação de técnicas. Entre estas, há técnicas e procedimentos para a análise clínica e a fresco, testes microbiológicos, histopatológicos, bioensaio, uso de anticorpos, hibridação *in situ*, imuno-histoquímica e técnicas moleculares de PCR (VARELA; CHOC-MARTÍNEZ, 2020).

Recentemente, o uso diagnóstico da reação em cadeia da polimerase (PCR) tem aumentado (PEÑA-NAVARRO et al., 2020). Este é considerado um método poderoso e versátil para amplificar DNA que fornece uma abordagem mais rápida e direta para amplificar fragmentos do DNA, particularmente de organismos cuja sequência genômica completa seja conhecida. A técnica pode amplificar qualquer sequência nucleotídica de forma seletiva e é toda realizada em um tubo de ensaio (ALBERTS et al., 2017).

Na aquicultura, o diagnóstico auxilia na identificação precoce e prevê complicações nos cultivos por ocorrência de surtos de doenças. Os primeiros passos para prevê-los são a identificação e isolamento dos patógenos, seguido do estabelecimento das diferentes ferramentas e plataformas de diagnóstico. As PCRs são ferramentas de detecção mais usadas para estudos que visam a identificação de patógenos (SANTOS et al., 2020).

A presença de variantes dos agentes etiológicos que afetam a aquicultura tem se tornado mais comum no dia a dia. Por exemplo, Marks et al. (2004) identificaram que as

amostras infectadas com WSSV isoladas de diferentes locais do sudeste asiático, apresentaram cinco diferentes categorias de variação genética (i) uma grande deleção de cerca de 13 kb presentes no genoma WSSV-TH em relação aos WSSV-CN e WSSV-TW, (ii) uma região variável propensa a recombinação, (iii) uma sequência de transposons presentes apenas em WSSV-TW, (iv) variação no número de unidades repetidas em regiões homólogas (hrs) e repetições diretas e (v) mutações de nucleotídeos individuais, incluindo deleções ou inserções e polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs). Do mesmo modo, Tan *et al.* (2009), identificaram dois genótipos diferentes do WSSV isolados das amostras oriundas da província de Hainan na China, que expressaram um genoma menor que continha 5657 e 11093 supressões de bp. Finalmente, Robles-Sikisaka *et al.* (2010), demonstraram que 61 das sequências que foram analisadas apresentaram 231 sítios polimórficos (24%), dos quais 194 eram parcimoniosos e que 5% mostraram grau de homoplasia (mutações convergentes) na árvore Bayesiana com 17 sítios inferidos para ter três ou mais mutações no seu genoma.

Dessa forma, a hipótese que norteia essa dissertação é a de que os agentes etiológicos presentes em amostras oriundas de Honduras poderão ser identificados e geneticamente comparados com aqueles reportados ao redor do mundo. Para isso, foi traçado como objetivo geral: identificar e caracterizar molecularmente agentes etiológicos causadores de enfermidades em camarões marinhos *L. vannamei* cultivados em Honduras, assim como analisar histologicamente camarões coletados na Reserva de Vida Silvestre Los Delgaditos. O trabalho teve como objetivos específicos: (a) verificar a ocorrência de agentes etiológicos bacterianos (AHPND e NHP) e virais (WSSV, IHNV, IMNV e TSV) em amostras de camarões obtidas em Honduras; (b) identificar variações nucleotídicas e realizar a comparação das sequências isoladas das amostras de Honduras com aquelas sequências já reportadas ao redor do mundo; c) identificar a presença de danos histológicos das principais doenças que afetam o cultivo de camarão branco.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Carcinicultura

O mercado global de camarão cultivado continua a crescer mais rápido do que o de outras espécies aquícolas, com a maior parte da produção advinda da Ásia. O principal mercado produtor fora da Ásia é a América Latina (KAKOOLAKI *et al.*, 2020), com o Equador recentemente ultrapassando a Tailândia para se tornar o quinto maior produtor de camarão do mundo (FAO, 2020). Afetada pela pandemia da COVID-19, a produção global de camarão marinho cultivado em 2020 foi quase 15% menor que no ano de 2019. O declínio foi de 20% de fontes asiáticas, mas a produção aumentou 22% na América Latina por causa do aumento significativo na produção do Equador (+ 19%; 705 mil toneladas) (FAO, 2021).

A Índia é um dos principais contribuintes para a produção aquícola de camarão no mundo e este único produto constitui mais de 70% do total de exportação de frutos do mar em termos de valor para o país. O total de produção de camarão na Índia aumentou de 102,940 toneladas entre 2001 e 2002 para 565,980 toneladas entre 2017 e 2018. Este aumento na produção foi devido à introdução do camarão branco do Pacífico na Índia em 2009 e a disponibilidade de reprodutores livres de patógenos específicos (SPF). No entanto, as doenças e os problemas de mortalidade também aumentaram com a intensificação dos cultivos (NAVANEETH *et al.*, 2020).

A produção da indústria do camarão em países da América Latina, como Brasil, Honduras, México e Equador, é relevante no contexto econômico da aquicultura na região (GAINZA; ROMERO, 2020). Honduras tem uma indústria constituída por aproximadamente 420 fazendas de camarão, ocupando uma área aproximada de 24.500 hectares. Estas unidades produtivas geram uma média anual de aproximadamente \$216 milhões de dólares exportáveis e 150.000 empregos diretos e indiretos, dos quais 52% são mão de obra feminina, beneficiando cerca de 500.000 pessoas (ANDAH, 2021).

Segundo os dados do Serviço Nacional de Saúde e Segurança Agroalimentar (SENASA, 2021), Honduras conta com Serviços de Quarentena agropecuária, os quais são responsáveis por estabelecer os procedimentos nacionais para prevenir o ingresso de pragas e/ou doenças de quarentena agropecuárias restritivas ao comércio agropecuário. Este sistema, na sua parte de inspeção e verificação, encontra-se localizado nos diferentes pontos de entrada do país. A Organização Internacional Regional de Saúde Agropecuária (OIRSA) foi delegada pelo Governo de Honduras como entidade encarregada de fazer cumprir a legislação, em

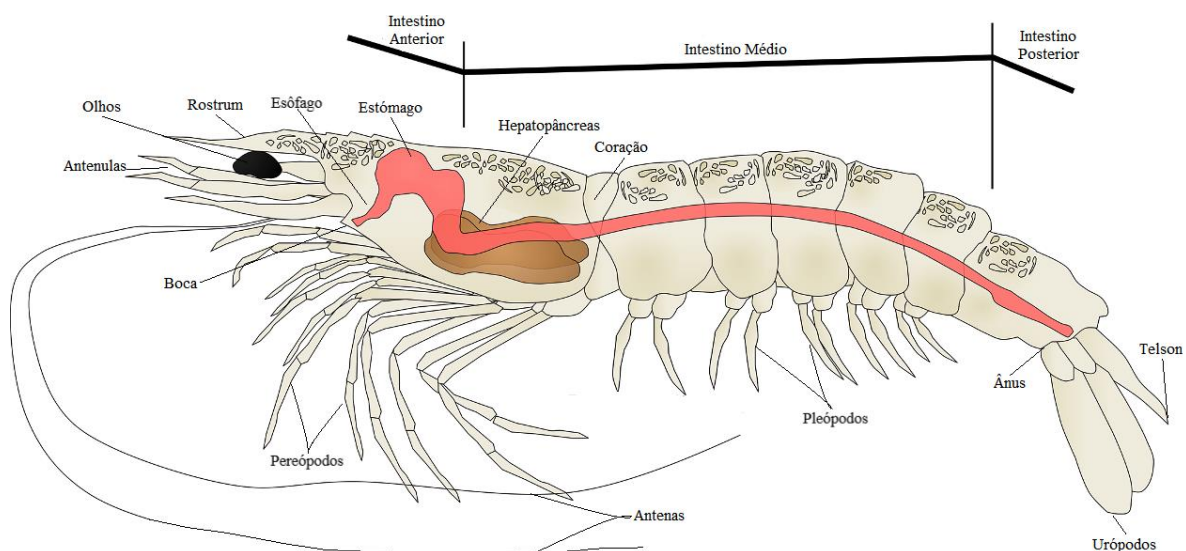
relação aos requisitos fitossanitários e normas internacionais. Estas regulam a mobilização dos bens agrícolas, constituindo-se na primeira barreira de defesa contra pragas e doenças potencialmente perigosas para o agronegócio nacional.

## 2.2 *Litopenaeus vannamei*

### 2.2.1 Aspectos gerais e Anatomia

O camarão branco *Litopenaeus vannamei* é conhecido como um dos mais cultivados devido a seu alto rendimento e por apresentar altos preços no mercado internacional (COBO; PÉREZ, 2018). Segundo o ranking de produção de camarão elaborado pela revista Aquaculture em 2021, o Equador liderou como o maior produtor seguido pela China, Vietnã, Índia, Indonésia, América do Sul, México, América Central, Estados Unidos e finalmente Europa (AQUACULTURE MAGAZINE, 2021; EL UNIVERSO, 2021). Os camarões são crustáceos da classe Malacostraca, externamente estão compostos por um cefalotórax e um abdômen. O órgão principal é o hepatopâncreas, porém, nesse órgão se desenvolvem as sínteses e absorção dos nutrientes para o seu crescimento (DIAZ; SOUZA; PETRIELLA, 2006).

Figura 1 - Anatomia do camarão branco *Litopenaeus vannamei*. Adaptado de: Holt et al. (2020).



Camarão branco  
*Litopenaeus vannamei*



### 2.2.2 Taxonomia

O camarão branco é membro do filo Crustacea, classe Malacostraca, ordem Decapoda e da família Penaeidae (Quadro 1). Seu gênero é *Litopenaeus* e a sua espécie é *vannamei* (Boone, 1993).

Quadro 1 - Taxonomia *Litopenaeus vannamei*. Adaptado de Holthuis, (1980).

Reino	Animalia
Sub-reino	Bilateria
Infra-reino	Protostomia
Superfilo	Ecdysozoa
Filo	Arthropoda
Subfilo	Crustacea
Classe	Malacostraca
Subclasse	Eumalacostraca
Superordem	Eucarida
Ordem	Decapoda
Subordem	Dendrobranchiata
Superfamília	Penaeoidea
Família	Penaeidae
Gênero	<i>Litopenaeus</i>
Espécie	<i>Litopenaeus vannamei</i> (Boone, 1931)

### 2.2.3 Habitat e Cultivo da espécie

O camarão branco é nativo da costa leste do Pacífico da América Central e do Sul se distribuindo desde Sonora ao norte do México, até Tumbes no sul do Peru. *L. vannamei* vive em habitats marinhos tropicais, áreas onde as temperaturas da água são normalmente superiores a 20 °C durante todo o ano. Os adultos vivem e desovam em oceano aberto, enquanto as pós-larvas migram para a costa para passar seus estágios juvenis, adolescentes e subadultos em estuários costeiros, lagoas ou áreas de mangue (FAO, 2001).

As espécies mais cultivadas dos recursos do mar, são os camarões; estes entram no mercado global, com cerca de um terço da produção mundial (ASTIYANI *et al.*, 2020; LIAO; CHIEN, 2011). Estima-se que, a partir de 2011, o camarão contribuiu com cerca de 1,5 bilhões de dólares americanos nas exportações, em comparação com cerca de 1,2 bilhões de dólares americanos nas exportações de peixe e algas. Além disso, o valor de exportação de camarão também exibiu um crescimento mais rápido em geral, crescendo 16,6% de taxa de crescimento anual composta (CAGR) no período de 2011 a 2014, enquanto que os peixes e as algas

criaram cerca de 1,4% e 12,8% CAGR, respectivamente, em um período de tempo semelhante (HALIM; JUANRI, 2016). Segundo os dados da Câmara Nacional da Aquicultura, as exportações dos camarões no Equador tiveram um crescimento de aproximadamente 199 milhões de dólares em janeiro de 2017 para 542 milhões de dólares em março de 2022, aportando aproximadamente 5,08 bilhões de dólares em ingressos de exportações em 2021 (CNA-E, 2022).

#### **2.2.4 Mecanismos de defesa do camarão a patógenos**

Os animais invertebrados não possuem anticorpos verdadeiros e, portanto, não apresentam uma resposta imune adaptativa (SÖDERHÄLL; CERENIUS, 1998). Dessa forma, além da barreira física passiva representada pelo rígido exoesqueleto quitinoso, os camarões possuem um sistema imunológico inato, composto por hemócitos, os quais estão presentes na hemolinfa (CORDEIRO, 2021). O sistema de defesa dos crustáceos é baseado em efetores celulares e humorais, que se conjugam para eliminar microrganismos potencialmente infecciosos. Os hemócitos são cruciais nestas reações imunitárias sendo capazes de fagocitose, encapsulação, formação de nódulos e de citotoxicidade (RENDÓN; BALCÁZAR, 2003).

Muitas outras atividades bioquímicas têm sido descritas nos hemócitos e seu papel na resposta imune parece ser importante para a eliminação de patógenos. Exemplo disso são as proteinases e seus inibidores, outros peptídeos antibacterianos (crustina, lisozima e fator anti-LPS) e enzimas oxidativas como superóxido dismutase (SOD), catalase e peroxidase (ABAD-ROSALES *et al.*, 2011). O trato digestivo desses animais, é a principal entrada dos microrganismos e este é revestido por uma camada quitinosa, propiciando um ambiente com pH próximo da neutralidade, sendo este ligeiramente ácido (VIJAYAKUMARAN, 1987) e repleto de enzimas capazes de inativar e digerir a maioria dos microrganismos que não fazem parte da microbiota natural. Quando essas barreiras são transpostas, não sendo suficientes para impedir a penetração dos patógenos, desencadeia-se no hospedeiro uma série de reações imunológicas complexas com o objetivo de neutralizar e eliminar os agentes invasores (BARRACO; PERAZZOLO; ROSA, 2007).

#### **2.2.5 Equilíbrio Ambiente: Hospedeiro: Patógenos**

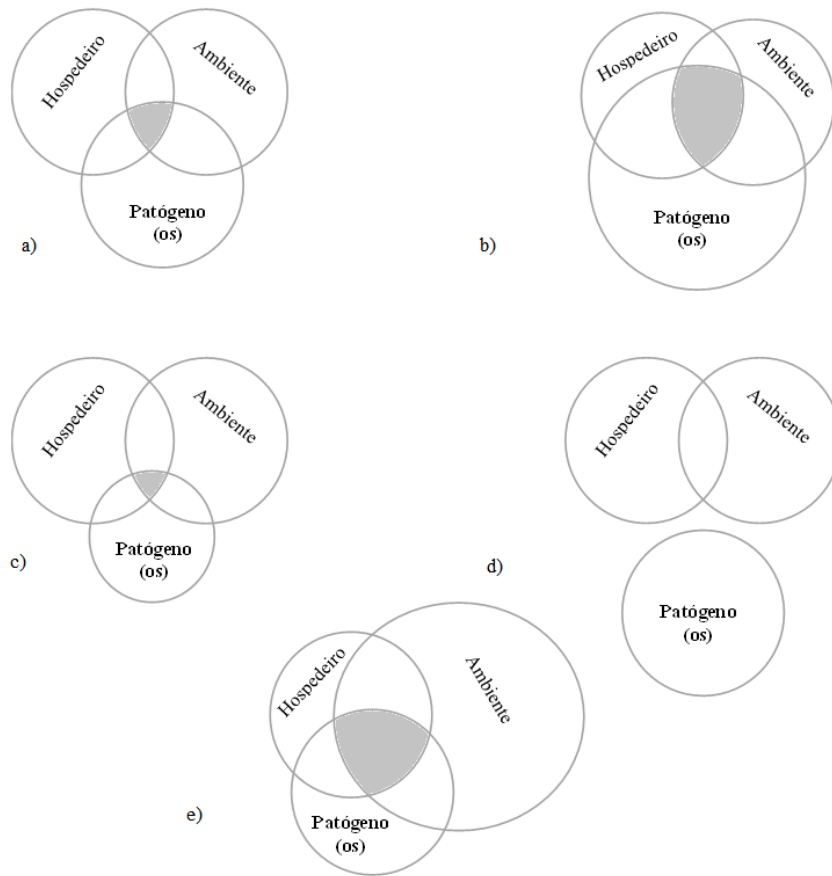
O ambiente aquático está intimamente relacionado com o crescimento e sobrevivência de organismos, especialmente para animais aquáticos que fornecem ao ser

humano proteínas de alta qualidade. A água é um tema interessante para investigar a relação entre os animais aquáticos e o ambiente. Portanto, a elevada concentração de nitrogênio e seus derivados ( $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ ) é um problema ambiental grave da água na aquicultura e que ameaça a sobrevivência dos animais aquáticos (ZHANG et al., 2021). Os processos de restrição alimentar ou estresse ambiental, como baixas temperaturas com posterior recuperação, também são acompanhados de mudanças fisiológicas, como alterações da dinâmica de reservas nutricionais, que podem afetar o sistema imunológico e, conseqüentemente, a suscetibilidade a patógenos (CORDEIRO, 2021).

A presença de doenças virais e bacterianas, combinadas com a baixa qualidade da genética das pós-larvas, da água e do solo dos viveiros de cultivo, são a principal causa de eventos de mortalidade no camarão. Isto porque as variações dos parâmetros físico-químicos da água podem afetar o metabolismo, o crescimento, a muda e a sobrevivência dos organismos cultivados, bem como reduzir a capacidade de resposta do sistema imunológico do camarão (ESPINOSA; BERMÚDEZ, 2012). Os agentes patogênicos, como parte do ecossistema natural, não causam surtos patológicos na ausência de alterações ambientais significativas. Apesar disso, condições subótimas e práticas de manejo inadequadas nas fazendas aquícolas (elevadas densidades de estocagem de camarões, alimentação em excesso ou desequilíbrio nutricional) podem induzir o estresse dos organismos cultivados, tornando-os assim mais susceptíveis a surtos patológicos (UICN, 2007).

A Figura 2 ilustra o conceito hospedeiro-patógeno-ambiente como fatores interativos que determinam o surgimento de uma enfermidade (Fig. 2a) (ABAD-ROSALES et al., 2011; LIGHTNER; REDMAN, 1998). Quando o efeito de qualquer aspecto é aumentado (por fatores como aumento da virulência de um patógeno, presença de múltiplos patógenos, perturbações do ambiente, desequilíbrios nutricionais), a incidência ou gravidade da doença aumenta. A Figura 2b ilustra o efeito de um agente etiológico com alta patogenicidade, enquanto que a Figura 2c ilustra o efeito de um agente etiológico com baixa patogenicidade. O conceito livre de agentes patogênicos específicos ilustra que uma determinada doença não pode ocorrer se o seu agente patogênico for excluído (Fig. 2d). Finalmente, a enfermidade pode se desenvolver devido a estressores ambientais, onde podem participar os patógenos e fatores abióticos adversos ao hospedeiro (Fig. 2e).

Figura 2 - Conceito hospedeiro-patógeno-ambiente como fatores interativos que determinam uma doença, como indicado pela área sombreada de sobreposição. Adaptado de: Abad-Rosales et al. (2011) e Lightner; Redman, (1998).



## 2.3 Patologias de Origem Bacteriana

### 2.3.1 Aspectos gerais

Entre os patógenos bacterianos que afetam o camarão, bactérias patogênicas do gênero *Vibrio* continuam a ser o agente etiológico mais relevante por causar enormes perdas econômicas para a indústria da aquicultura (VAIYAPURI *et al.*, 2021). As bactérias do gênero *Vibrio* foram muitas vezes registradas como patogênicas oportunistas para o camarão, tanto na fase larval como na fase de engorda (GÓMES; ROQUE; GUERRA, 2015). Dentro da lista de notificação obrigatória da OIE (2021), destacam-se duas principais doenças bacterianas de importância na indústria do cultivo dos camarões, a Hepatopancreatite Necrosante (*Hepatobacter penaei*) (NHP) e a doença da Necrose Hepatopancreática Aguda (AHPND).

### 2.3.2 *Hepatopancreatite Necrosante (NHP)*

A NHP é uma doença causada por uma alfa proteobactéria ( $\alpha$  proteobactéria), intracelular obrigatória do tipo *Rickettsia*, sob o nome proposto de *Hepatobacter penaei*. De acordo com diversos autores (JOHNSON, 1978; LIGHTNER, 1996; MORALES-COVARRUBIAS, 2010), trata-se de bactérias Gram negativas, pleomórficas e sua forma infecciosa é móvel através de flagelos (VARELA-MEJÍAS, 2018). A forma predominante é um organismo em forma de bastão (0,25 a 0,90  $\mu\text{m}$ ), enquanto a forma helicoidal (0,25 a 3,50  $\mu\text{m}$ ) possui oito flagelos no ápice basal. A análise genética de *Hepatobacter penaei* associada aos surtos na América do Norte e do Sul sugere que os isolados são idênticos ou subespécies muito próximas (OIE, 2021b).

A NHP é uma doença que foi relatada pela primeira vez por Johnson (1990) como hepatopâncreas granulomatoso, devido à formação de granulomas, causando elevada mortalidade nas fazendas da parte central e sul do Texas. Mais tarde foi relatada sua ocorrência no Peru, Costa Rica, Panamá, Brasil, Venezuela, Equador, México, Colômbia, Belize, Nicarágua e Honduras, provocando mortes entre 20% e 95% nos sistemas de cultivo de *L. vannamei* e *Litopenaeus stylirostris* (camarão azul) (MORALES-COVARRUBIAS; GÓMEZ-GIL, 2014). Em fazendas de camarão de Belize, Brasil, Guatemala, Honduras, México, Nicarágua e Venezuela, a prevalência de NHP em camarões *L. vannamei* de cultivo oscila entre 0,6% e 1,3% (CUÉLLAR-ANJEL, 2013a). Em fase aguda, as pós-larvas tardias, juvenis e adultos apresentam uma redução acentuada no consumo de alimentos até deixarem completamente de comer. Posteriormente, observa-se o aparecimento de camarões moribundos nadando perto da superfície, da comporta de saída e nas margens dos viveiros. Os camarões moribundos mostram palidez generalizada do corpo, com uma cor café amarelado, brânquias amarelo-pálido a café escuro e hepatopâncreas pode ou não ser atrofiado, com coloração amarelada a café escuro (MORALES-COVARRUBIAS; GÓMEZ-GIL, 2014). As causas principais de transmissão da NHP são canibalismo de camarões infectados e coabitação de camarões saudáveis e camarões infetados, porém, também pode ser por transmissão vertical (MORALES; CUÉLLAR-ANJEL; PANTOJA, 2015).

### 2.3.3 *Doença da Necrose Hepatopancreática Aguda (AHPND)*

A AHPND é uma das doenças, mais recentes na carcinicultura, a qual foi documentada pela primeira vez no ano de 2009 na China. Um ano depois, foi reportada no

Vietnã, em 2011 na Malásia e na Tailândia em 2012. Nas Américas, foi reportada pela primeira vez no ano de 2013 no México. A AHPND, durante os anos 2011 e 2012 ocasionou perdas estimadas entre \$570 mil e \$7,2 milhões no Vietnã. No México, em 2013 ocasionou perdas econômicas de \$118 milhões (ZORRIEHZAHRA, 2015).

É causada por cepas virulentas específicas de *Vibrio parahaemolyticus* (VpAHPND) que contêm um plasmídeo de 70 kbp com genes que codificam homólogos da toxina binária *Photorhabdus* inseto-relacionada (Pir), PirA e PirB (OIE, 2021c). Atualmente, muitas linhagens de *Vibrio* que transportam plasmídeos foram consideradas patogênicas e também capazes de causar essa doença como *Vibrio harveyi*, *Vibrio owensii*, *Vibrio campbelli* e *Vibrio punensis* (MAI-HOANG *et al.*, 2021). A AHPND é caracterizada por atrofia severa do hepatopâncreas (HP) dos camarões que exibem histopatologia única na fase aguda da doença, consistindo de descamação maciça de células epiteliais de hepatopâncreas na ausência de bactérias ou outros patógenos (JOSHI *et al.*, 2014). Os núcleos das células desprendidas parecem normais e há uma clara diminuição das reservas, iniciando assim a atrofia do órgão (VARELA-MEJÍAS, 2018). A VpAHPND foi transmitida experimentalmente por imersão, alimentação e gavagem reversa, simulando transmissão horizontal natural via oral e coinfeção (OIE, 2021c).

## **2.4 Patologias de Origem Viral**

### **2.4.1 Aspectos gerais**

Na carcinicultura, os principais vírus causadores de doenças são: Vírus da Mancha Branca (WSSV), Vírus da Síndrome de Taura (TSV), Vírus da Necrose Hipodérmica e Hematopoiética Infeciosa (IHHNV) e Vírus da Mionecrose Infeciosa (IMNV). Esses patógenos causam perdas nos cultivos, no número de empregos e nas receitas de exportação de camarões (MORALES-COVARRUBIAS, 2013b). Segundo Flegel (2012), 60% das doenças nos camarões são de origem viral, 20% atribuídas às bactérias e os 20% restantes, correspondem aos fungos e parasitas.

#### 2.4.2 Síndrome da Mancha branca (WSSV)

O cultivo de camarão marinho é uma importante atividade sendo o *L. vannamei* a espécie mais cultivada. Entretanto, várias patologias têm impactado os cultivos e entre essas patologias está a WSSV que se destaca como principal doença da carcinicultura mundial (CARVALHO, 2017). Segundo Escobedo-Bonilla *et al.* (2005) o WSSV é um vírus envelopado cujo genoma é composto por um longo DNA de dupla fita circular ( $\approx 305$  Kpb), que codifica para um total de 181 proteínas estruturais e não estruturais (RIBEIRO GAGLIARDI, 2020).

Esse vírus apresenta forma elíptica a cilíndrica, com membrana trilaminar e os vírus têm comprimento de 80 a 120 nm e largura de 250 a 380 nm. Nas misturas com coloração negativa, pode-se observar a presença de um apêndice ou cauda. O tamanho do genoma faz do WSSV um dos vírus mais complexos que podem infectar os camarões (PANTOJA; LIGHTNER, 2014b). Na América, a maior epidemia da Síndrome da Manchas Branca começou na Nicarágua, Honduras e Guatemala em 1999, sendo atualmente uma doença endêmica nos cultivos de camarão da América Central e do Sul (PEÑA-NAVARRO; VARELA-MEJÍAS, 2016). Quando os camarões estão doentes, estes se encontram letárgicos, com coloração avermelhada ou esbranquiçada, nadando muito lentamente ou estando imóveis nas margens dos tanques de cultivo. Ao tentar capturá-los com a mão, não apresentam resistência por perda do reflexo de fuga. Ao tirá-los da água, os camarões afetados pelo WSSV se sentem suaves ao toque e com a carapaça um pouco mole (deve estar rígido normalmente exceto durante a muda), seu estômago e intestino podem ser observados vazios (sem alimento) e os cromatóforos escuros estão geralmente expandidos. Alguns camarões também apresentam cor vermelha nos urópodos. Esporadicamente em camarões *L. vannamei* podem-se observar manchas brancas sob a carapaça da cabeça, ao separá-lo com uma unha e olhando contra a luz com um fundo escuro (CUELLAR-ANJEL, 2013). Segundo Lo; Kou, (1998) a infecção pelo WSSV pode ser transmitida horizontalmente através do consumo de tecido infectado (p. ex., canibalismo, predação, etc.), e também por vias aquáticas. Também pode ocorrer a partir de animais aparentemente saudáveis na ausência de doença (assintomáticos). Os animais mortos e moribundos podem ser uma fonte de transmissão de doenças (OIE, 2021d).

### **2.4.3 Infecção Hipodermal e Necrose Hematopoiética (IHHNV)**

O IHHNV é o menor dos vírus conhecido dos camarões peneídeos e possui cerca de 20 a 22 nm de diâmetro, possui formato icosaédrico não envelopado, com uma densidade de 1,40 g/ml em cloreto de cézio (CsCl). Seu genoma é linear de cadeia única de DNA de 3,9 kbp e tem um capsídeo com quatro polipeptídeos de peso molecular 74, 47, 39 e 37,5kD (OIE, 2021e). Após sua descoberta inicial em camarões cultivados no Havaí em 1981, o IHHNV foi amplamente observado em camarões cultivados nas Américas e em camarões selvagens coletados ao longo da costa do Pacífico com ocorrência desde o Peru ao México (LIGHTNER, 2011).

O genoma do IHHNV está sequenciado quase completamente (PARAJELES et al., 2021). Geneticamente, divide-se em três linhagens, I localizado na Austrália, II localizado no sul da Ásia e Canadá e III distribuída entre Ásia e as Américas. Além disso, reportam-se duas cepas não infecciosas compostas por isolados da Austrália (EU675312.1) e Madagascar (DQ228358.1) (SILVA *et al.*, 2014a). A síndrome das deformidades e nanismo ("Runt Deformity Syndrome" ou RDS) que afeta o *L. vannamei* foi relacionada ao IHHNV. Tipicamente, os juvenis afetados por RDS exibem faces dobradas ou deformadas, antenas enrugadas, casca áspera e outras deformidades. As populações de juvenis com RDS apresentam tipicamente uma distribuição de tamanhos relativamente ampla com uma proporção de tamanhos pequenos (anões) muito maior do que o normal (PANTOJA; LIGHTNER, 2014b).

Aparentemente os camarões sobreviventes de populações que foram infectadas pelo IHHNV podem se tornar portadores do vírus para toda a vida e transmiti-lo à sua descendência e a outras populações por meio de transmissão de tipo vertical e horizontal (PANTOJA; LIGHTNER, 2014a).

### **2.4.4 Mionecrose Infecciosa (IMNV)**

O IMNV é uma doença viral que causa mortalidade substancial em populações cultivadas de *L. vannamei*. O principal tecido alvo para a infecção por IMNV é o músculo estriado esquelético (e menos frequentemente o músculo cardíaco). Os camarões infectados pelo IMNV apresentam áreas necróticas brancas extensas nos músculos estriados, especialmente nos segmentos abdominais distais e nos urópodos. A doença já causou grandes



perdas aos produtores de camarão no Brasil, Indonésia, Índia e Malásia (TANG; BONDAD; ARTHUR, 2019).

O vírus IMN caracteriza-se por ser icosaédrico não envelopado de 40 nm de diâmetro e um genoma de dupla fita (dsRNA) composto por 8226 a 8230 bp (TANG; BONDAD-REANTASO; ARTHUR, 2019). Este contém dois quadros de leitura abertos (ORF), a ORF1 que codificam uma suposta proteína ligante de RNA e uma proteína capsídica e a ORF2 codifica para uma RNA polimerase dependente de RNA (Rdrp). O IMNV foi classificado na Família Totiviridae, que era um grupo similar com protozoários e vírus fúngicos (JHA et al., 2021). Deve suspeitar-se da presença de mionecrose infecciosa viral, quando os camarões de cultivo apresentarem áreas com coloração esbranquiçada ou avermelhada no músculo abdominal ("cauda"). Se estes animais forem retirados da água e se o abdômen for observado em luz translúcida, será possível notar a presença de áreas esbranquiçadas comuns em IMNV, facilmente distinguíveis das áreas normais do tecido que são translúcidas contrastando com a opacidade muscular da mionecrose. O estômago e o intestino desses camarões doentes são normalmente encontrados com alimentos, uma vez que os camarões continuam a comer apesar da sua doença (CUÉLLAR-ANJEL, 2015). A transmissão da doença pode ocorrer horizontalmente através da água e mediante o canibalismo. Assim como de forma vertical dos reprodutores as suas progênes, como também através das fezes das gaivotas que se alimentam dos camarões moribundos (MORALES; CUÉLLAR-ANJEL; PANTOJA, 2015).

Andrade *et al.* (2022) relataram a presença de um novo genótipo de IMNV no Brasil que está mais intimamente relacionado com as linhagens de IMNV da Indonésia com base na filogenia do genoma completo. Neste estudo os autores especulam a possibilidade que a reintrodução da estirpe de IMNV da Indonésia no Brasil poderia contribuir para o aparecimento de estirpes mais virulentas.

#### **2.4.5 Síndrome do Vírus de Taura (TSV)**

A TSV é uma alteração sistêmica de origem infecciosa, causada pelo vírus da mesma denominação (TSV) e que afeta várias espécies de camarão peneídeos a nível mundial, principalmente o *L. vannamei*, nos quais a mortalidade pode chegar a 90% com grandes perdas econômicas. A doença tem sido relatada em camarões na América Latina com prevalência de 15 a 70% e mortalidades médias de 10 a 60%, principalmente em organismos de 4 a 7 gramas (CUÉLLAR-ANJEL, 2013b).

As partículas do TSV têm 32 nm de diâmetro, são icosaedros não revestidos e com densidade de 1,338 g ml<sup>-1</sup> em CsCl. O genoma de TSV consiste em um RNA linear de fita simples, sentido positivo de 10,205 nucleotídeos do comprimento e contém dois quadros de leitura abertos (ORF) (OIE, 2021f). A ORF1 codifica uma poliproteína não estrutural contendo motivos para uma helicase, protease e uma RNA-polimerase (Rdrp). A ORF2 codifica três proteínas capsídicas, VP1 (40 kDa), VP2 (55 kDa) e VP3 (24 kDa) (CRUZ-FLORES; MAI; DHAR, 2021). Pelo menos quatro genótipos (variantes) de TSV foram documentados com base na sequência genética que codifica o VP1 maior e dominante nas três principais proteínas estruturais do vírus. Com base nas variações da sequência VP1, estes grupos genotípicos são: I o grupo das Américas; II o grupo do Sudeste Asiático; III o grupo de Belize; e IV o grupo venezuelano (OIE, 2021f). Na fase aguda observa-se os camarões moribundos, os sinais observáveis a olho nu incluem a expansão dos cromatóforos vermelhos, o que confere ao camarão uma coloração geral que varia de rosa a vermelho e aos urópodos uma coloração vermelha (daí o nome da doença da cauda vermelha). Na fase crônica, os camarões não apresentam lesões externas evidentes. Os camarões nesta fase da doença podem ou não apresentar cutícula suave (mole) e expansão dos cromatóforos vermelhos. É possível observar tais camarões comportando-se e alimentando-se normalmente (PANTOJA; LIGHTNER, 2014b). Foi demonstrada a transmissão horizontal por canibalismo ou por água contaminada. Além disso, a transmissão vertical é altamente suspeita, mas não foi confirmada experimentalmente (OIE, 2021f).

## 2.5 Variabilidade viral

Análises filogenéticas de segmentos genéticos amplificados de ORF1b do vírus da cabeça amarela (YHV) analisados por Wijegoonawardane et al. (2008) evidenciaram a presença de pelo menos seis linhagens genéticas distintas (genótipos) isoladas do *P. monodon*. O genótipo 1 (YHV) foi detectado apenas em camarões com a doença da cabeça amarela. O genótipo 2 (GAV) foi detectado em camarões doentes, com a condição menos grave descrita como síndrome de mortalidade média e em camarões saudáveis da Austrália, Tailândia e Vietnã. Outros genótipos ocorreram comumente em camarões saudáveis. Por sua vez, Silva et al. (2014b) analisaram a sequência genômica do IHNV isolados dos camarões *L. vannamei* onde identificaram que a sequência nucleotídica 5' da região não traduzida (UTR, pelas suas siglas no inglês) do IHNV brasileiro contém 431 nucleotídeos, apresentando 162 nucleotídeos a

menos quando comparadas com a sequência 5' isolada no Havaí. A respeito da sequência da região 3', os isolados brasileiros apresentaram 320 nucleotídeos, que quando comparados com a direção 3' dos isolados havaianos, apresentaram 8 nucleotídeos a menos. Desconsiderando as regiões ausentes no IHNV brasileiro, as diferenças entre as regiões de UTR do Brasil e do Havaí são uma transição de guanina para adenina no local 151 em 5' UTR e uma transição de adenina para guanina no local 27 na direção 3' UTR. Mesmo assim, demonstraram que apesar da sua variação na sequência, os isolados brasileiros são 99,7% similares aos isolados havaianos.

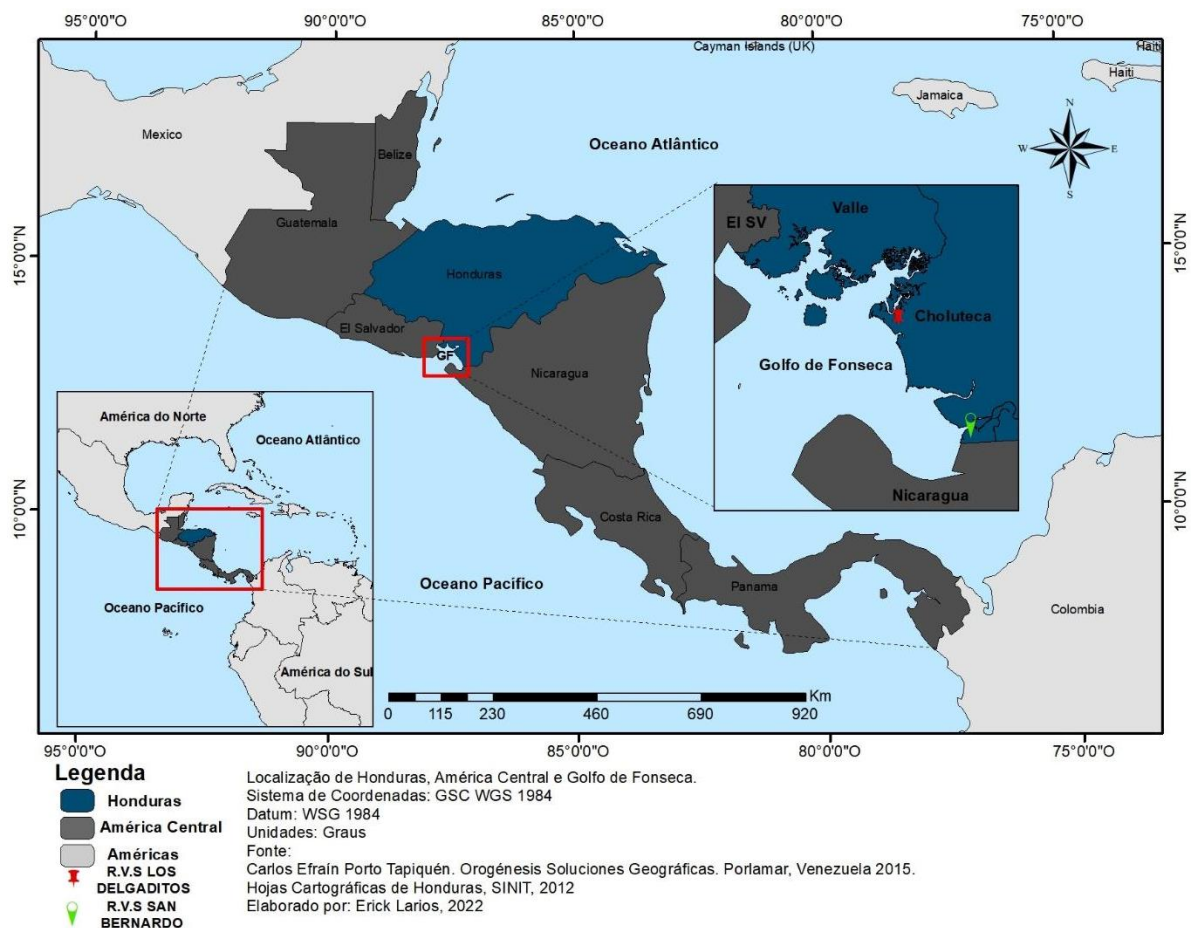
Mesmo que o genoma do WSSV ainda não tenha sido completamente sequenciado, (DANTAS et al., 2018), foram identificadas variações na região 14/15 do WSSV-BR que é muito semelhante a essa região do isolado da Tailândia, mostrando apenas um polimorfismo e uma pequena inserção de 6 pb como diferenças. Na região 23/24 do WSSV-BR ocorre uma deleção de 11.430 pb quando comparada ao genoma de Taiwan, enquanto os isolados da Tailândia e da Índia apresentam deleções de 13.210 pb e 10.970 pb, respectivamente. No entanto, em geral todas as sequências apresentaram alta identidade quando comparadas entre todos os genomas do WSSV, ultrapassando 91% em seis das nove regiões homólogas (hrs, pelas siglas no inglês). Dentre elas, a 4 hrs é a mais semelhante e a 8 hrs é a mais diversificada, mostrando identidades de 98,3% e 75,6%, respectivamente. A maior diferença entre eles está no número de repetições e não na sequência em si. Também, no mesmo estudo, se estabelece que existem eventos de recombinação recentes durante a evolução do WSSV-TH e WSSV-MX, o que poderia explicar sua maior proximidade quando comparado ao isolado brasileiro; mesmo este sendo muito semelhante aos isolados da Tailândia e do México. Estes três isolados compartilham uma história evolutiva comum, entretanto, se agruparam em diferentes abordagens filogenéticas, que estão medidas por eventos de recombinação, que podem, em algum nível, ser rastreados pelo número de unidades de repetição dentro das regiões homólogas.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Proveniência das amostras

Vinte e sete amostras de tecidos de hepatopâncreas, brânquias, proventrículo, pleópodos e pereópodos de camarão *L. vannamei* de cultivo foram coletadas na região do Golfo de Fonseca em Honduras no mês de março do ano de 2021 (Figura 3). Durante a época de coleta, a região apresentou condições ambientais secas com temperaturas aproximadas de entre 32°C a 35°C.

Figura 3 - Localização das duas fazendas de cultivos semi-intensivos de onde foram coletadas as amostras oriundas de Honduras na América Central. Ambas áreas se localizam no Golfo de Fonseca, sendo elas: a Reserva de Vida Silvestre Los Delgaditos e a Reserva de Vida Silvestre San Bernardo. Fonte: Elaborada pelo autor.



As características gerais dos pontos de coleta das amostras estão detalhadas no Quadro 2 e mostram o sistema de cultivo e a localização em que as amostras foram coletadas nas duas fazendas. Além disso, seguem no mesmo quadro outras informações a respeito do tamanho das fazendas, quantidade de ciclos de cultivo por ano em cada fazenda, e um relato breve do histórico clínico característico de cada região amostrada e o tipo de coleta da água que usam para abastecer a fazenda.

*Quadro 2 - Identificação das regiões de coleta amostral. Sistemas de cultivo utilizado. Hectares de produção. Ciclos de cultivo por ano. Histórico clínico da região e origem da água coletada para o cultivo de camarão.*

<b>Região</b>	<b>Sistema de cultivo</b>	<b>Hectares de cultivo</b>	<b>Ciclos cultivados por ano</b>	<b>Histórico clínico da região</b>	<b>Origem de água</b>
Reserva de Vida Silvestre Los Delgaditos.	Semi-intensivo	Aproximadamente 500 ha	3	A região é caracterizada por problemas de crescimento e mortalidades nas etapas larvais.	Coletada mediante bomba de sucção do estuário e distribuída nos viveiros pelo canal de abastecimento e com salinidades médias de 33 UPS.
Reserva de Vida Silvestre San Bernardo.	Semi-intensivo	Aproximadamente 1.000 ha	3	Essa região é caracterizada pela alta prevalência de doenças de origem bacteriana como a NHP-S NHP-B e vibrioses no ano.	Coletada mediante bomba de sucção de 3 estuários e distribuída nos viveiros pelo canal de abastecimento e com salinidades de entre 38 a 45 UPS.

Fonte: Elaboração própria.

A figura 4 mostra uma fazenda típica de carcinicultura localizada no departamento de Choluteca, ao sul de Honduras. Do lado esquerdo da figura, localiza-se o viveiro de cultivo e do lado direito, visualiza-se o canal de abastecimento de água da fazenda de onde se obtêm água para os cultivos.

*Figura 4 - Fazenda típica de cultivo de camarões em Honduras. A Figura mostra do lado esquerdo o viveiro de cultivo e o canal de abastecimento de água do lado direito.*



Fonte: Elaboração própria.

Em relação ao processamento das amostras, separaram-se as brânquias, hepatopâncreas, proventrículos, pleópodos e pereópodos dos organismos, conforme detalhado no Quadro 3. As amostras foram armazenadas em álcool 90%, em condições de refrigeração para o transporte até o Centro de Diagnósticos de Organismos Aquáticos (CEDECAM/LABOMAR - UFC) no Brasil.

Quadro 3 - Descrição dos tecidos extraídos para a análise molecular. Número de indivíduos por amostra. Tipo de tecido analisado. Setor de coleta na fazenda. Peso médio dos camarões. Etapa de cultivo. Época de coleta. Origem de coleta dos organismos. Status sanitário das fazendas. Sinais Clínicos dos camarões e Região onde cada coleta foi realizada. Fonte: Elaborada pelo autor.

Amostra	Número de indivíduos*	Tecido analisado	Setor da fazenda	Peso médio	Etapa de cultivo	Época de coleta	Origem de coleta dos organismos	Status sanitário	Sinais clínicos	Região	
01	1	Brânquias.	Não Identificado	6 g	Juvenis.	Não Identificado	Amostras obtidas por terceiros.	Suspeitas para a WSSV.	Amostras isoladas de surtos com características próprias de cada doença quando avaliadas pela análise à fresco.	Proporcionadas pelo órgão oficial de sanidade animal. Origem desconhecida.	
02	1	Pleópodos.						Suspeitas para a NHP.			
03	1	Pleópodos.									
04	1	Pleópodos.									
05	1	Brânquias.									
06	10	Hepatopâncreas.	Cada amostra foi coletada de um viveiro diferente.	30 g	Adultos.	Verão.	Amostras obtidas por terceiros.	Suspeitas para a NHP.	Foi feita amostragem dirigida, os animais apresentaram cor branca no estômago e hepatopâncreas, dilatação dos cromatóforos e músculo opaco.	Reserva de Vida Silvestre San Bernardo.	
07	10	Hepatopâncreas.						Tecidos de reserva			
08	10	Hepatopâncreas.						Desconhece-se presença de infecção.			
09	10	Hepatopâncreas.									
10	10	Hepatopâncreas.									
11	10	Pleópodos.									
12	10	Pleópodos.									
13	10	Hepatopâncreas.									
14	10	Hepatopâncreas.									
15	5	Brânquias.	1	8 g	Juvenis.	Verão.	Amostras coletadas pessoalmente.	Os camarões apresentavam retardo no crescimento.	Foi feita amostragem dirigida, os animais apresentaram coloração diferente da normal (translúcida) além daqueles que a sua resposta de escape foi mais lenta.	Reserva de Vida Silvestre Los Delgaditos.	
16	5	Brânquias.	2								
17	5	Pereópodos.	1								
18	5	Hepatopâncreas.	2								
19	5	Estômago.	1								
20	5	Hepatopâncreas.	1								
21	1	Pleópodos.	1								6 g
22	1	Pleópodos.									
23	1	Pleópodos.									
24	10	Pleópodos.									
25	10	Pleópodos.	Cada amostra foi coletada de um viveiro diferente.	30 g	Adultos.	Verão.	Amostras obtidas por terceiros.	Tecidos de reserva	-	Reserva de Vida Silvestre San Bernardo.	
26	10	Hepatopâncreas.									Desconhece-se presença de infecção.
27	10	Hepatopâncreas.									

\*Amostras individuais ou em pool (quando maior que 1 indivíduo).

## 3.2 Extração do Material Genômico

### 3.2.1 Extração do DNA

O DNA amostral foi extraído de 50 mg dos tecidos de acordo com os protocolos de extração recomendados pela OIE através da metodologia adaptada de Sambrook *et al.* (1989). Os tecidos foram lavados em microtubos de 1,5 mL com Tris-HCL 10 mM, pH 7,5 durante 5 minutos; após o tempo, foi drenada a solução e o tecido foi macerado e adicionado em outro microtubo estéril de 1,5 mL, adicionaram-se 700 µL de Tampão de Extração (Tris-HCl 100 mM, SDS 1%) e 30 µL de Proteinase K (30 µg/mL), misturando por inversão. Os microtubos foram incubados a 65°C por 3 horas em banho Maria. Após o período de incubação, foram adicionados 350 µL de Fenol puro e 350 µL de 24:1 Clorofórmio: Álcool Isoamílico e misturado por inversão durante 5 minutos e, posteriormente, centrifugados a 7.000 rpm por 5min. Passada a centrifugação, recuperaram-se 650 µL da fase aquosa que foram adicionados em um microtubo estéril. Posteriormente, adicionaram-se 650 µL de 24:1 Clorofórmio: Álcool Isoamílico e misturado por inversão durante 5 minutos e novamente centrifugado a 7.000 rpm por 5min. Finalizada a centrifugação, recuperaram-se 500 µL da fase aquosa que foram adicionados em outro microtubo estéril, e foram adicionados 1 mL de etanol absoluto e 50 µL de Acetato de Sódio 3M, este foi incubado no freezer a -70°C por 15 min para depois, serem centrifugados a 10.000 rpm por 15min. Finalizada a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado novamente em 500 µL de álcool etílico 70% (v/v) gelado e centrifugado a 10.000 rpm por 5min; após a o processo de centrifugação, o álcool etílico, foi descartado e os microtubos que continham o DNA foram secados num hot-block a 70°C por 10 min. Finalmente, os pellets com DNA foram reidratados com 50 µL de Tampão de Eluição (Tris-HCl 10 mM e EDTA 1 mM).

### 3.2.2 Extração do RNA

Para a extração do RNA, foram usadas 50 mg dos tecidos que foram macerados num microtubo estéril de 1,5 mL e adicionados 500 µL de Trizol com 200 µL de clorofórmio, os quais foram misturados num vórtex por 15 s. Depois, foram incubados a 30°C por 15 min. Finalizada a incubação, foram centrifugados, sob refrigeração a 4°C, a 12.000 rpm por 15 min. Logo após da centrifugação, foram transferidos 100 µL do sobrenadante para um microtubo



estéril contendo 500  $\mu\text{L}$  de álcool isopropílico e foram incubados novamente por 15 min por 30°C. Após a incubação, foram centrifugadas, sob refrigeração a 4°C, a 12.000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi descartado e adicionaram-se 500  $\mu\text{L}$  de álcool etílico a 75% (v/v) para novamente, serem misturadas num vórtex e centrifugadas, sob refrigeração a 4°C, a 7.500 rpm por 5 min. Finalmente, o sobrenadante foi descartado e os microtubos contendo os pellets foram secados a 30°C por 10 min, após a secagem, os pellets foram reidratados com 50  $\mu\text{L}$  de água ultrapura.

### **3.2.3 Síntese de cDNA**

A síntese do cDNA foi realizada utilizando-se o kit comercial High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems®) em termociclador Applied Biosystems modelo Veriti®. Para o preparo da reação foram utilizados: 2,0  $\mu\text{L}$  de 10 x RT Buffer, 0,8  $\mu\text{L}$  de 25 x dNTP Mix (100 mM), 2,0  $\mu\text{L}$  de 10 x RT Random Primers, 1,0 de MultiScribe™ Reverse Transcriptase, 3,7  $\mu\text{L}$  de água livre de nuclease e finalmente, 0,5  $\mu\text{L}$  do DNA das amostras. As condições para síntese de cDNA foram: 1 ciclo 25°C por 10 min, seguido de 1 ciclos de 37°C por 120 min e, seguido por 1 ciclo final a 85°C por 5 min.

### **3.3 Quantificação e padronização do Material genômico**

As quantificações dos ácidos nucleicos foram feitas usando 2  $\mu\text{L}$  do material extraído num espectrofotômetro NanoDrop 2000c usando como branco o último eluente usado para cada material genômico. No caso do DNA, o eluente usado foi TE (Tris-HCl 10 mM e EDTA 1 mM) e para o RNA o eluente usado foi água ultrapura. Finalmente, os ácidos nucleicos foram padronizados para 50 ng de DNA/ $\mu\text{L}$  amostral.

### **3.4 Reação em Cadeia da Polimerase PCR**

#### **3.4.1 Doença da Necrose Hepatopancreática Aguda (AHPND)**

Para a detecção da AHPND, foram utilizados os protocolos recomendados pela OIE, (2021c). As reações de PCR foram realizadas através da plataforma Veriti® 96 Well Thermal Cycler, com um volume final de amplificação de 10  $\mu\text{L}$ , usando o Kit Platinum® Taq

DNA Polimerase da Invitrogen, com concentrações de: 1 X de Tampão 10 X, 1,5 nM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 nM de dNTP, 0,2 μM de cada primer, 1 U da Taq P e o volume de água ultrapura necessário para chegar aos 10 μL finais da PCR. Finalmente, o volume de DNA amostral usado foi de 1,0 μL. Foi usado como controle negativo, um tubo contendo unicamente os reagentes sem a aplicação de amostra contendo material genético. As condições e primers para realizar as reações das PCR foram de acordo com os autores Flegel e Lo. (2014), Sirikharin *et al.* (2015), Han *et al.* (2015), Tinwongger *et al.* (2014) e Dangtip *et al.* (2015), descritos no quadro 4.

Quadro 4 - Condições PCR AHPND Fonte: Elaborada pelo autor.

Passo PCR	Primer	Condições	Referência
<b>AP1 (700 bp) Plasmídeo</b>	AP1F: 5'CCTTGGGTGTGCTTAGAGGATG3'  AP1R: 5'GCAAACCTATCGCGCAGAACACC3'	Ciclo inicial: 94°C por 4 min  30 ciclos: 94°C por 30 s 60°C por 30 s 72°C por 60 s	(FLEGEL; LO, 2014)
<b>AP2 (700 bp) Plasmídeo</b>	AP2F: 5'TCACCCGAATGCTCGCTTGTGG3'  AP2R: 5'CGTCGCTACTGTCTAGCTGAAG3'	Ciclo final: 72°C por 10 min	
<b>AP3 (333 bp) Toxinas VpPir</b>	AP3-F: 5'ATGAGTAACAATATAAAACATGAAAC3'  AP3-R: 5'GTGGTAATAGATTGTACAGAA3'	Ciclo inicial: 94°C por 5 min  30 ciclos: 94°C por 30 s 53°C por 30 s 72°C por 40 s  Ciclo final: 72°C por 5 min	(SIRIKHARIN et al., 2014, 2015)
<b>VpPirA-284 (284 bp)</b>	VpPirA-284F: 5'TGACTATTCTCACGATTGGACTG3'  VpPirA-284R: 5'CACGACTAGCGCCATTGTTA3'	Ciclo inicial: 94°C por 3 min  30 ciclos: 94°C por 30 s 60°C por 30 s 72°C por 30 s	(HAN et al., 2015)

<b>VpPirB-392 (392 bp)</b>	VpPirB-392F: 5'TGATGAAAGTGATGGGTGCTC3'  VpPirB-392R: 5'TGTAAGCGCCGTTTAACTCA3'	Ciclo final: 72°C por 7 min	
<b>TUMSAT-Vp3 (360 bp)</b>  <b>Toxinas VpPir</b>	TUMSAT-Vp3 F: 5'GTGTTGCATAATTTTGTGCA3'  TUMSAT-Vp 3 R: 5'TTGACAGAAACCACGACTA3'	Ciclo inicial: 95°C por 2 min  30 ciclos: 95°C por 30 s 56°C por 30 s 72°C por 30 s	(TINWONGGER et al., 2014)
<b>AP4 STEP 1 (1269 bp)</b>  <b>Bactérias</b>	AP4-F1: 5'ATGAGTAACAATATAAAAACATGAAAC3'  AP4-R1: 5'ACGATTCGACGTTCCCAA3'	Ciclo inicial: 94°C por 2 min  30 ciclos: 94°C por 30 s 55°C por 30 s 72°C por 90 s  Ciclo final: 72°C por 2 min	(DANGTIP et al., 2015)
<b>AP4 STEP 2 (230 bp)</b>  <b>Bactérias</b>	AP4-F2: 5'TTGAGAATACGGGACGTGGG3'  AP4-R2: 5'GTTAGTCATGTGAGCACCTTC3'	Ciclo inicial: 94°C por 2 min  30 ciclos: 94°C por 20 s 55°C por 20 s 72°C por 20 s	

### 3.4.2 *Enfermidade da Necrose Hepatopancreática (NHP)*

Foram realizadas PCR convencional e PCR em Tempo Real (qPCR), através das plataformas Veriti®; 96 Well Thermal Cycler e *ABI 7500 Real-time PCR system* (Applied Biosystems®), respectivamente. Usaram-se os protocolos recomendado pela OIE, (2021b), para a PCR convencional se usaram os primers descritos a continuação: NHPF2: 5'CGTTGGAGGTTTCGTCCTTCAGT3' e NHPR2: 5'GCCATGAGGACCTGACATCATC3' que geram um amplicon de 379 bp. Com um volume final de amplificação de 10 µL, usando o Kit Platinum® Taq DNA Polimerase da Invitrogen, com concentrações de: 1 X de Tampão 10 X, 1,5 nM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 nM de dNTP, 0,2 µM de cada primer, 1 U da Taq P e o volumem de água ultrapura necessário para completar o volume final da reação. Finalmente, o volume de DNA amostral usado foi de 1,0 µL. Foi usado como controle negativo, um tubo contendo unicamente os reagentes do kit sem inclusão de amostra de material genético. As condições para realizar as reações de PCR foram de acordo com Aranguren; Tang; Lightner, (2010): um

ciclo a 95°C por 5 min, seguido de 35 ciclos a 95°C por 30 s, 60°C por 30 s e 72°C por 30 s, seguido de extensão final a 60°C por 1 min e 72°C por 2 min.

Finalmente, a qPCR, foi realizada com o kit da Invitrogen®, conforme recomendações do fabricante e usando as sequências dos primers NHP1300F e NHP1366R: 5'CGTTCACGGGCCTTGTACAC3' e 5'GCTCATCGCCTTAAAGAAAAGATAA3', respectivamente. O volume de DNA amostral usado foi de 1,0 µL. Foi usado como controle negativo, um tubo contendo unicamente os reagentes do kit. Todas as amostras foram realizadas em duplicatas sendo considerada positiva apenas com a amplificação de ambas. As condições para realizar as reações de PCR foram de acordo com Aranguren; Tang; Lightner, (2010): um ciclo a 95°C por 3 min, seguido de 40 ciclos a 95°C por 15 s, seguido de extensão a 60°C por 1 min.

### 3.4.3 *Vírus da Infecção Hipodermal e Necrose Hematopoiética (IHHNV)*

Para a detecção da IHHNV, foram realizadas PCR convencional e PCR em Tempo Real (qPCR), através das plataformas Veriti®; 96 Well Thermal Cycler e *ABI 7500 Real-time PCR system* (Applied Biosystems®), respectivamente. Os protocolos usados foram os recomendados pela OIE, (2021d), utilizando os primers descritos a continuação: VNHHI 1608F: 5'TACTCCGCACACCCAACCA3' e VNHHI 1688R: 5'GGCTCTGGCAGCAAAGGTAA3', que gerou um amplicon de 81 bp para qPCR e 389F: 5'CGG-AAC-ACA-ACC-CGA-CTT-TA-3' e 389R: 5'GGC-CAA-GAC-CAA-AAT-ACG-AA-3' que gerou um amplicon de aproximadamente 300 bp na PCR convencional.

No caso da PCR convencional, o volume final de amplificação foi de 10 µL, usando o Kit Platinum® Taq DNA Polimerase da Invitrogen, com concentrações de: 1 X de Tampão 10 X, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de dNTP, 0,2 µM de cada primer, 1 U da Taq P e o volume de água ultrapura necessário. O volume de DNA amostral usado foi de 1,0 µL e foi usado como controle negativo, um tubo contendo unicamente os reagentes do kit. As condições para realizar as reações de PCR foram de acordo com Nunan; Poulos; Lightner, (2000) e Tang; Navarro; Lightner, (2007): um ciclo a 95°C por 5 min, seguido de 35 ciclos a 95°C por 30 s e 60°C por 30 s e uma extensão final a 72°C por 5 minutos. Para gerar um amplicon de melhor qualidade, foi realizada uma re-amplificação com as mesmas condições.

Finalmente, a qPCR, foi realizada com o kit da Invitrogen®, conforme recomendações do fabricante. O volume de DNA amostral usado foi de 1,0 µL. Foi usado como controle negativo, um tubo contendo unicamente os reagentes do kit, e como controle positivo, 3 tubos com diluições conhecidas ( $10^2$ ,  $10^3$  e  $10^4$ ) para realizar a construção da curva padrão de quantificação do vírus. Todas as amostras foram realizadas em duplicatas sendo considerada positiva apenas com a amplificação de ambas. As condições para realizar as reações de PCR foram de acordo com Tang; Lightner, (2001): um ciclo a 95°C por 20 s, seguido de 40 ciclos a 95°C por 1 s, seguido de extensão final a 60°C por 20 s.

#### **3.4.4 *Vírus da Mionecrose Infeciosa (IMNV)***

Para a investigação da presença de IMNV foi utilizado o protocolo de quantificação de Reação em Cadeia da Polimerase de Transcrição Reversa (RT-PCR) em Tempo Real, descrito pela OIE (2021f), através da plataforma *ABI 7500 Real-time PCR system* (Applied Biosystems®), usando os primers: IMNV412F: 5'GGACCTATCATAACATAGCGTTTGCA3' e IMNV545R: 5'AACCCATATCTATTGTCGCTGGAT3', que geraram um amplicon de 134 bp. Além disso, adicionou-se a sonda TaqMan: MNVp1: 5'-6FAMCCACCTTTACTTTCAATACTACATCATCCCCGGTAMRA3', correspondente aos nucleotídeos 467-500, marcada pelos corantes fluorescentes: 5-carboxifluoresceína (FAM) no extremo 5' e com N,N,N',N'tetrametil-6-carboxiroadamina (TAMRA) no extremo 3'. As condições da qPCR foram de acordo com o recomendado pelo kit da Invitrogen®. Finalmente, volume de DNA amostral usado foi de 1,0 µL. Foi usado como controle negativo, um tubo contendo unicamente os reagentes do kit, e como controle positivo, 5 tubos com diluições conhecidas ( $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  e  $10^6$ ) para realizar a construção da curva padrão de quantificação do vírus. Todas as amostras foram realizadas em duplicatas sendo considerada positiva apenas com a amplificação de ambas. As condições para realizar as reações de PCR foram de acordo com Andrade *et al.* (2007) e Poulos *et al.* (2006): um ciclo a 50°C por 3 min e 95°C por 20 s, seguido de 40 ciclos a 95°C por 3 s e 60°C por 30 s.

#### **3.4.5 *Vírus do Síndrome da Mancha Branca (WSSV)***

Foram realizados para detectar a presença da WSSV a PCR convencional e a PCR em Tempo Real (qPCR), através das plataformas Veriti®; 96 Well Thermal Cycler e *ABI 7500*

*Real-time PCR system* (Applied Biosystems®), respectivamente, usando os protocolos recomendados pela OIE (2021g), descritos a continuação.

O primeiro e segundo passo da PCR convencional foi feito usando o Kit Taq DNA Polimerase da Invitrogen®, com um volume final de amplificação de 10 µL, usando o Kit Platinum® Taq DNA Polimerase da Invitrogen, com concentrações de: 1 X de Tampão 10 X, 1,5 nM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 nM de dNTP, 0,2 µM de cada primer, 1 U da Taq P e o volume de água ultrapura necessário. Foi usado como controle negativo, um tubo contendo unicamente os reagentes do kit. As condições e primers para realizar as PCR foram de acordo com Lo *et al.* (1996a e 1996b) e estão descritas no quadro 4.

Finalmente, a qPCR para a quantificação da Síndrome da Mancha Branca, foi realizada usando o Kit TaqMan da Invitrogen®, conforme recomendações do fabricante. Por fim, o volume de DNA amostral usado foi de 1,0 µL. Foi usado como controle negativo, um tubo contendo unicamente os reagentes do kit, e como controle positivo, 7 tubos com diluições conhecidas (10<sup>1</sup>, 10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup> e 10<sup>7</sup>), para realizar a construção da curva padrão de quantificação do vírus. Todas as amostras foram realizadas em duplicatas sendo considerada positiva apenas com a amplificação de ambas. As condições e primers para realizar as PCR foram de acordo com Durand; Lightner, (2002) e estão descritas no quadro 4.

Quadro 5 - Condições PCR e qPCR para WSSV. Fonte: Elaborada pelo autor.

Passo PCR	Primer	Condições	Referência
PCR Step 1 (1447 pb)	146F1: 5'ACTACTAACTTCAGCCTATCTAG3' 146R1: 5'TAATGCGGGTGTAATGTTCTTACGA3'	Ciclo inicial: 94°C por 4 min 55°C por 1 min 72°C por 2 min	(LO <i>et al.</i> , 1996a, 1996b)
PCR Step 2 (941 pb)	146F2: 5'GTAAGTCCCCCTTCCATCTCCA3' 146R2: 5'TACGGCAGCTGCTGCACCTTGT3'	39 ciclos: 94°C por 1 min 55°C por 1 min 72°C por 2 min  Ciclo final: 72°C por 5 min	
qPCR (69 bp)	WSS1011F: 5'TGGTCCCGTCCTCATCTCAG3'  WSS1079R: 5'GCTGCCTTGCCGGAATTA3'  Sonda TaqMan: 5'AGCCATGAAGAATGCCGTCTATCACACA3'	Ciclo inicial: 50°C por 2 min 95°C por 10 min  40 ciclos: 95°C por 15 s 60°C por 1 min	(DURAND; LIGHTNER, 2002)

### **3.4.6 *Vírus da Síndrome de Taura (TSV)***

Finalmente, para a detecção da TSV, foi utilizado o protocolo da Reação em Cadeia da Polimerase de Transcrição Reversa (RT-PCR), descrito pela OIE, (2021e), através da plataforma Veriti®; 96 Well Thermal Cycler, usando os primers: 9992F: 5'AAGTAGACAGCCGCGCTT3'; 9195R: 5'TCAATGAGAGCTTGGTCC3' e 7171F: 5'CGACAGTTGGACATCTAGTG3'; 7511R: 5'GAGCTTCAGACTGCAACTTC3', que geram amplicons de 231 e 341 bp respectivamente. O volume final de amplificação foi de 10 µL, usando o Kit Platinum® Taq DNA Polimerase da Invitrogen, com concentrações de: 1 X de Tampão 10 X, 1,5 nM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 nM de dNTP, 0,2 µM de cada primer, 1 U da Taq P e o volume de água ultrapura necessário. Finalmente, volume de DNA amostral usado foi de 1,0 µL. Foi usado como controle negativo, um tubo contendo unicamente os reagentes do kit. As condições para realizar a reação de PCR foram de acordo com Nunan; Poulos e Lightner, (1998): 40 ciclos a 94°C por 45 s e 60°C por 45 s, seguido de extensão final a 60°C por 7 min.

## **3.5 Eletroforeses**

Os produtos amplificados através das PCRs convencionais foram colocados em géis de agarose a concentração de 2% para verificar a presença dos amplicons específicos e relativos aos agentes etiológicos procurados, a fim de confirmar a presença ou ausência da respetiva doença a cada par de primer utilizado nas PCRs.

## **3.6 Sequenciamento**

### **3.6.1 *Purificação dos fragmentos***

Uma vez confirmada a presença do amplicon respectivo, o produto amplificado foi cortado do gel de agarose e purificado segundo com as instruções da Invitrogen® no PureLink™ Quick Gel Extraction Kit para o posterior sequenciamento do produto purificado.

### **3.6.2 *Sequenciamento e Alinhamento no BLAST***

Os fragmentos plasmidiais foram sequenciados no sequenciador automático capilar 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems®) adaptando a metodologia Sanger; Nicklen;

Coulson (1977). Posteriormente, a análise dos dados gerados, foram realizadas através da ferramenta BLAST da NCBI (National Center of Biotechnology Information), para confirmar as sequências do material sequenciado comparando-lhes com sequências depositadas no próprio banco de dados da NCBI. Finalmente, foram utilizados os softwares MEGA 11 e PopArt para realizar os alinhamentos das sequências e elaboração das árvores filogenéticas.

### **3.7 Análise Histológica**

Com o objetivo de identificar lesões características das principais doenças que afetam os cultivos, foi realizada uma análise histológica nos tecidos do cefalotórax de doze camarões Reserva de Vida Silvestre Los Delgaditos, descritos no quadro 5, utilizando a coloração de Hematoxilina & Eosina conforme o procedimento descrito por Cuéllar-Anjel (2014) com adaptações: para a fixação dos tecidos foi utilizada a solução Davidson, logo o processo de desidratação foi feito utilizando álcool 95% durante 24 h. Passada a desidratação, as amostras foram colocadas em Xilol durante 2 h para depois serem incluídas em duas cubas com parafina durante 1 hora cada uma e dessa forma procedeu o emblocamento dos tecidos em parafina. Uma vez que a parafina foi solidificada, foram realizados os cortes no micrótomo; após a recuperação dos tecidos, foram colocadas em mais duas cubas com Xilol durante 5 min cada uma delas, posteriormente, foram transferidas para 3 cubas contendo álcool a 95% durante 5 min cada uma. A coloração utilizada foi Hematoxilina e Eosina, os tecidos foram colocados em hematoxilina durante 20 s, após o período, foram colocadas em álcool ácido (ácido acético + etanol) durante 10 s para lavagem do excedente de coloração. Em seguida foi feita mais uma lavagem com água para depois serem colocadas em eosina durante 1 min; para eliminar o excedente de corante, os tecidos foram lavados em uma solução de álcool a 95% e água destilada. Finalmente foi realizada uma lavagem final em álcool 95% durante 2min e 30 s. Após, foram colocadas em três cubas contendo Xilol durante 5 min em cada uma. Para segurar os tecidos, foi utilizado o fixador Permout. Finalmente, os tecidos foram analisados por microscopia de luz utilizando um microscópio Leica®. O processamento das lâminas com os tecidos, foi realizado em um laboratório de uma companhia hondurenha, localizado na cidade de Choluteca para finalmente, serem transportadas e analisadas no Centro de Diagnóstico de Enfermidades de Organismos Aquáticos (CEDECAM) em Fortaleza, Brasil.



Quadro 6 - Descrição dos tecidos extraídos para a análise histológica. Número de indivíduos analisados. Peso médio dos camarões. Viveiro e Setores dentro da fazenda. Etapa de cultivo. Origem de coleta dos organismos. Época de coleta. Status sanitário e Região da fazenda. Fonte: Elaborada pelo autor.

Amostra*	Número de indivíduos	Tecido analisado	Código de análise**	Peso médio	Viveiro	Setor da fazenda	Etapa de cultivo	Época de coleta	Origem de coleta dos organismos	Status sanitário	Região
C1	1	Cefalotórax	01-02	8 g	Viveiro 1	2	Juvenis	Verão	Amostras coletadas pessoalmente de uma fazenda típica hondurenha.	Os camarões apresentavam retardo no crescimento.	Reserva de Vida Silvestre Los Delgaditos
C2	1	Cefalotórax	03-04								
C3	1	Cefalotórax	05-06								
C4	1	Cefalotórax	07-08								
C5	1	Cefalotórax	09-10	8 g	Viveiro 2	1					
C6	1	Cefalotórax	11-12								
C7	1	Cefalotórax	13-14								
C8	1	Cefalotórax	15-16	8 g	Viveiro 3						
C9	1	Cefalotórax	17-18								
C10	1	Cefalotórax	19-20	6 g	Viveiro 4						
C11	1	Cefalotórax	21-22								
C12	1	Cefalotórax	23-24								

\*Para realizar a análise histológica foram coletados camarões da Reserva de Vida Silvestre Los Delgaditos diferentes dos analisados pelas técnicas moleculares que foram coletados na mesma região e viveiros do que os camarões analisados pelas PCR convencionais e PCR em Tempo Real.

\*\*As análises de cada amostra foram realizadas em duplicada e o corte foi feito na transversal do tecido analisado.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Tipo de tecidos analisados e quantificação do DNA e RNA

Dentre os tecidos analisados destaca-se que foram utilizados para a extração de material genômico os seguintes tecidos: 11 pools de hepatopâncreas, 10 amostras de pleópodos (6 pools e 4 amostras individuais), um pool de pereópodos, 4 amostras de brânquias (duas amostras individuais e dois pools) e um pool de estômago. Sendo os tecidos utilizados os recomendados pela OIE (2021) para a análise e detecção das principais doenças que afetam a carcinicultura.

Dos vinte e sete tecidos analisados, dezoito apresentaram quadros de infecção por diferentes agentes patológicos. Para o IHHNV sete tecidos infetados foram do hepatopâncreas, seis tecidos de pleópodos, três de brânquias e um tecido de estômago e pereópodos. Quanto a investigação por WSSV foi detectada a presença do material genômico do vírus em três amostras de tecidos distintos, sendo eles: pleópodos, brânquias e hepatopâncreas, respectivamente. Adicionalmente se detectou a presença de NHP em dois tecidos hepatopancreáticos e um tecido branquial.

Ao comparar a presença de cada agente etiológico detectado neste trabalho versus a região analisada, se determinou que IHHNV foi mais frequente na Reserva de Vida Silvestre San Bernardo com 55,55%, seguida da Reserva de Vida Silvestre Los Delgaditos que foi de 27,77%. Para o NHP a frequência de infecção foi maior na Reserva de Vida Silvestre San Bernardo com 11,11% no caso da Reserva de Vida Silvestre Los Delgaditos a frequência de infecção foi de 0%. E finalmente para o WSSV a frequência de infecção apresentada na Reserva de Vida Silvestre San Bernardo foi de 5,55% e 0% na Reserva de Vida Silvestre Los Delgaditos.

A baixa frequência do WSSV e NHP nas amostras analisadas, poderiam estar influenciadas pelo fenômeno de interferência viral devido a maior frequência do IHHNV (MELENA, 2005) como também pelas temperaturas em que o vírus da síndrome da mancha branca é mais susceptível que geralmente são aquelas inferiores a 29°C (ESPARZA-LEAL et al., 2012; MALDONADO; RODRÍGUEZ; DE BLAS, 2004). Durante este estudo, as amostras foram coletadas na época em que as temperaturas eram superiores a 30°C. Já no caso de NHP a baixa frequência de infecção também poderia estar atribuída a combinação de fatores ambientais de temperatura e salinidades onde outros estudos reportam maiores frequências desta infecção em regiões com salinidades de entre 35 a 42 UPS combinadas com temperaturas

superiores a 28°C (IBARRA-GÓMEZ; GALAVÍZ-SILVA; MOLINA-GARZA, 2007) conforme as ocorridas durante as coletas deste estudo.

## 4.2 Análise molecular

### 4.2.1 Doenças bacterianas

#### 4.2.1.1 Doença da Necrose Hepatopancreática Aguda (AHPND)

Os resultados obtidos através das PCR convencionais, não revelaram a presença do patógeno nas amostras analisadas. No entanto, não se pode excluir a presença deste na região a partir da abordagem realizada.

#### 4.2.1.2 Hepatopancreatite Necrosante (NHP)

Os resultados obtidos através da PCR convencional, indicam que as amostras oriundas de Honduras, não apresentam a quantidade suficiente para a amplificação por PCR convencional do material genômico de patógeno causador da enfermidade. Porém através da qPCR resultaram positivas três amostras que são: 01, 07 e 08. O que poderia se relacionar com a especificidade de ambas técnicas, sendo a qPCR uma técnica muito mais sensível quando comparada com a PCR convencional. Aranguren; Tang; Lightner, (2010) comparam a efetividade de ambas técnicas de detecção molecular (PCR convencional e qPCR), e encontraram que 75% das amostras resultaram positivas mediante a PCR convencional, mas quando comparadas com as qPCR 100% destas foram positivas. Isto foi associado as quantidades de cópias amplificadas nas qPCR evidenciado mediante um teste de diluições seriadas (de  $\times 10^7$  até  $\times 10^{-1}$ ) feitas com uma amostra positiva para NHP-B com um número de cópias conhecidas ( $8,7 \times 10^7$  cópias  $\mu\text{g}^{-1}$  de DNA) e corridas em ambas técnicas, estas resultaram positivas na qPCR em todas as diluições, entretanto na PCR convencional foram positivas aquelas amostras que o número de cópias amplificadas foi maior que  $8,7 \times 10^4$ .

Outro acontecimento importante é que a NHP está presente nas regiões de cultivo mais importantes das Américas, a doença aparece tipicamente em lugares onde as temperaturas das águas oscilam entre 29 e 35°C e as salinidades que variam de 30 a 40 UPS (LIGHTNER et al., 2012). Isto é de relevância já que as temperaturas da água no Golfo de Fonseca oscilam entre 29 e 34°C ao longo do ano com épocas onde as águas podem apresentar temperaturas

mínimas de 26°C na estação mais fria da região (novembro-janeiro) e as salinidades variam de entre 30 a 35 UPS dependendo da época do ano, pelo que se determina que essas águas proporcionam ao patógeno as condições ótimas para ocorrer nas fazendas hondurenhas. O que está de acordo com o reportado por Morales-Covarrubias *et al.* (2011) que documentaram a presença de Hepatopancreatite Necrosante mediante histopatologia em Honduras. Assim como também argumentam que epizootias por NHP-B são apresentadas em regiões com temperaturas entre 29°C a 30°C e salinidades de 20 a 40 UPS.

#### **4.2.2 Doenças virais**

##### *4.2.2.1 Virus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV)*

Este estudo comprova a ocorrência do WSSV em cultivos semi-intensivos de *L. vannamei* em duas fazendas de Honduras através de técnicas moleculares de PCR convencional e PCR em Tempo Real.

Os resultados obtidos da PCR convencional para WSSV, possibilitaram a identificação da presença do material genômico respectivo ao patógeno causador da doença em 2 amostras, 05 e 06, e que foram purificadas e enviadas para sequenciamento com o fim de conhecer a sequência genômica desses fragmentos e compará-los com os reportados no GENBANK. Esses resultados foram confirmados através da qPCR que deu positiva para as amostras 04, 05 e 06, em que os resultados das quantificações da carga viral para cada amostras estão registradas no Apêndice B. Segundo Lightner *et al.* (2012), a presença do WSSV já tinha sido reportada na maioria das fazendas de carcinicultura em países da Ásia, Oeste Médio, Norte, Centro e Sul América. Outros reportes falam da presença do vírus da síndrome da mancha branca em Honduras (MEJÍA-RUIZ *et al.*, 1999). Pantoja e Lightner (2003) reportaram a presença de WSSV em camarões *L. stylirostris* e *L. vannamei* oriundos de Honduras e outros países da América Latina mediante histopatologia e hibridação *in situ*. Assim como também Morales-Covarrubias *et al.* (2011) reportaram mediante PCR e histopatologia a presença do WSSV em camarões coletados em fazendas hondurenhas com uma prevalência de 40% quando comparadas com outras regiões da América Latina.

Neste estudo evidencia-se que o hepatopâncreas é um tecido susceptível a infecção por WSSV visto que se observou mediante PCR convencional e PCR em Tempo Rea a presença do patógeno na amostra 06 em que o material genômico provém deste tecido. Esta observação

também foi reportada em outro estudo, onde identificaram mediante técnicas histológicas a susceptibilidade do hepatopâncreas a ser infetado pelo vírus da Síndrome da Mancha Branca (PAZIR et al., 2011).

Enquanto que as amostras 04 e 05 foram extraídas dos tecidos de pleópodos e brânquias, respectivamente, e também foram positivas para o WSSV. Esses dados corroboram com os sugeridos pela OIE em que os principais tecidos alvos para identificação do WSSV são de origem embrionária ectodérmica e mesodérmica, especialmente o epitélio cuticular e os tecidos conjuntivos subcuticulares, mas também é possível a infecção do tecido conjuntivo subjacente nos hepatopâncreas e intestino médio dos camarões, porém o diagnóstico da doença através desses órgãos não é o ideal (OIE, 2021d). Rajendran *et al.* (2005), selecionaram na sua pesquisa como tecidos de identificação o pedúnculo ocular e os pleópodos por duas razões, a primeira porque ambos tecidos estão constituídos por tecidos epitelial subcuticular o que permite que sejam tecidos alvos ideais para detectar presença do patógeno e a segunda porque a extração desses tecidos pode não ser nociva para o animal, pelo que podem ser considerados tecidos de diagnóstico não letais.

O WSSV é o agente infeccioso mais importante para o cultivo dos crustáceos por sua patogenicidade, virulência, impacto econômico e distribuição. Esse patógeno tem sido reportado em diversas espécies silvestres com alta prevalência nessas populações (VAN HULTEN et al., 2001; VARELA-MEJÍAS; PEÑA-NAVARRO, 2017). De tal modo, Yang *et al.* (2001) isolaram de tecidos de *Marsupenaeus japonicus* moribundos e mortos o material genômico do WSSV de amostra oriunda da província de Xiamen, na China. Assim como também Osejo Baca; Ubeda Cruz, (2005) reportaram a presença do WSSV em camarões *L. vannamei* silvestres em Chinandega, Nicarágua com prevalências de 15,33% durante a estação seca e 1,97% na estação chuvosa. Adicionalmente, a presença de WSSV tem sido reportada na região centro-americana em espécies de *L. vannamei* cultivada em países como Costa Rica (PEÑA-NAVARRO; VARELA-MEJÍAS, 2016; VARELA MEJÍAS; PEÑA NAVARRO, 2010), Nicarágua, Guatemala e Belize (MORALES-COVARRUBIAS et al., 2011). Desta forma, sugere-se que seja feita uma vigilância maior em relação à presença de WSSV nas fazendas hondurenhas com o intuito de intervir e manejar com antecedência e cautela os cultivos para evitar grandes mortalidades causadas por este vírus como ocorreu em outros países anteriormente.

#### 4.2.2.2 *Vírus da Infecção Hipodermal e Necrose Hematopoiética (IHHNV)*

Ao realizar PCR convencional foi obtido um fragmento plasmidial de aproximadamente 300 pb (Figura 14 – Apêndice D), mas que no sequenciamento não obtivemos uma sequência de qualidade para realizar as análises genéticas necessárias para comparações com outras sequências existentes. No entanto, as amplificações do material genômico de IHHNV através da qPCR resultaram positivas para um total de 18 amostras, sendo elas: 01, 03, 04, 06, 07, 08, 10, 11, 14, 15, 16, 17, 19, 23, 24, 25, 26 e 27. Anteriormente, quadros de IHHNV já tinham sido reportados mediante histologia e hibridação *in situ* em Honduras (MORALES-COVARRUBIAS *et al.*, 2011).

Os resultados obtidos através da PCR convencional, indicam que as amostras oriundas de Honduras, não apresentam a quantidade suficiente para a amplificação do material genômico de patógeno causador da enfermidade. Um fato relacionado poderia estar de acordo com o relatado por Teixeira *et al.* (2010) que demonstraram que o uso das sequências do par de primers recomendados pela OIE (77012F/77353R) não foi suficientemente robusto para diferenciar entre IHHNV infeccioso ativo e genoma IHHNV não infeccioso integrado. Devido a isto, realizaram duas estratégias para determinar uma técnica mais específica para a identificação da doença, a primeira baseada nas sequências de primers para a ORF2 completa do genoma do vírus e uma sequência de proteínas não estrutural para o vírus, ambas as sequências foram adequadas para distinguir entre vírus ativos/infecciosos e inativos/não infecciosos. Conseqüentemente, as amostras suspeitas de camarão moribundo que obtiveram resultados positivos para o IHHNV, utilizando essa estratégia, situaram-se entre 34 e 38%. A segunda foi uma amplificação usando a sequência universal dos primers 77012F/77353R, esta estratégia continha etapas adicionais onde detecta exclusivamente réplicas do vírus ativas, que produziram transcrições que foram diferencial e efetivamente diagnosticados através da RT-PCR. Concluindo que as amostras suspeitas que pontuaram positivo para IHHNV estavam entre 23% (Rio Grande do Norte) e 36% (Ceará).

Esta detecção de IHHNV em amostras oriundas de Honduras indicam uma coinfeção entre os Vírus das Manchas Brancas e a Infecção Hipodermal e Necrose Hematopoiética nas amostras 04 e 06 que são dos tecidos de pleópodos e hepatopâncreas, os quais estão classificados como os órgãos recomendados pela OIE (2021) para detectar a presença desses vírus. Pazir *et al.* (2011), identificaram mediante histologia a presença de coinfeção entre IHHNV e WSSV em camarões *L. vannamei*.

Além disso, as amostras analisadas também apresentam coinfeção entre a Hepatopancreatite Necrosante e a Infecção Hipodermal e Necrose Hematopoiética nas amostras 01, 07 e 08 obtidos de tecidos de brânquias e hepatopâncreas, respectivamente.

Segundo Mello Junior (2010), IHHNV é altamente letal, causando mortalidades de até 90% em populações de espécies susceptíveis como os camarões do gênero *Penaeus*. Entretanto, Saraiva De Negreiros; Santos (2015) argumentam que *L. vannamei*, responde a infecção, apresentando sinais da enfermidade crônica conhecida como “Síndrome da deformidade e do nanismo” (RDS), caracterizada pela redução do crescimento e pode causar deformidade no rostro e alterações cuticulares sem, contudo, provocar elevados índices de mortalidade. As mesmas características são tipicamente identificadas em Honduras quando se apresentam a incidência da IHHNV.

As amostras oriundas de Honduras apresentam frequências de ocorrência de IHHNV em 67% das amostras coletadas neste estudo, o que poderia se relacionar com fatores ambientais como as temperaturas e salinidades que proporcionam ao patógeno as condições ótimas para a incidência de surtos na região de acordo com o relatado por Lightner *et al.* (2012).

Os resultados encontrados foram elevados quando comparados com os encontrados por Hareen Nita *et al.* (2012) em que evidenciam que a prevalência de infecção por IHHNV em fêmeas reprodutoras silvestres em que a incidência foi bastante alta (20%). Na região da América Central o IHHNV já foi reportado na Costa Rica (PEÑA-NAVARRO; VARELA-MEJÍAS, 2016), Belize, Guatemala, Honduras (MORALES-COVARRUBIAS *et al.*, 2011) e Nicarágua (MORALES-COVARRUBIAS *et al.*, 2011; OSEJO BACA; UBEDA CRUZ, 2005). Desta maneira, sugere-se que uma estratégia de amostragem seja levada em consideração para monitorar a presença deste patógeno, assim como medidas de manejo sejam propostas a fim de evitar surtos de IHHNV com mortalidade elevada e que possa levar a perdas econômicas em Honduras.

#### 4.2.2.3 *Vírus da Mionecrose Infeciosa (IMNV)*

Os resultados obtidos através da PCR em tempo real (qPCR), não revelaram a presença do vírus nas amostras analisadas. No entanto, não se pode excluir a presença do vírus na região a partir da abordagem realizada.

#### 4.2.2.4 *Vírus da Síndrome de Taura (TSV)*

Os resultados obtidos através da qPCR convencional, não revelaram a presença do vírus nas amostras analisadas. No entanto, não se pode excluir a presença do vírus na região a partir da abordagem realizada.

#### 4.2.3 *Alinhamento das sequências*

Foram obtidas duas sequências lineares de WSSV, sendo uma de 809pb e a outra de 807 pb, provenientes dos tecidos 06 e 05 de camarões da região da Reserva de Vida Silvestre San Bernardo. Foi feito o alinhamento dessas sequências (Apêndice C) do WSSV, baseado na região VP28 do genoma do WSSV através dos primers 146F1/R1 e 146F2/R2, com sequências obtidas no banco de dados GENE BANK e foi possível determinar que as sequências provenientes das amostras de Honduras não apresentaram variações.

As sequências de Honduras apresentaram 100% de similaridade com a sequência de referência (NC\_003225.3) e a maioria das sequências depositadas no GenBank (Figura 5 e 6) indicando que estas pertencem a linhagem do WSSV descrita inicialmente para a China. Entretanto, as sequências de Honduras apresentaram variações, 99% de similaridade, em relação as sequências MG702567.1 e JX515788.1 da Índia e Coreia do Sul. Expressaram-se a inserção de uma T nas sequências oriundas de Honduras, inserção de uma C nas sequências oriundas de Honduras, variações de nucleotídeos de A para G, inserção de T A T nas sequências de Honduras, deleção de uma A nas sequências oriundas de Honduras, a inserção de uma C nas sequências de Honduras, a inserção de uma G nas sequências oriundas de Honduras, inserção de uma C nas sequências de Honduras e finalmente a deleção de uma T na sequências de Honduras, quando comparadas com os sequenciado da Índia (MG702567.1) (vide Apêndice C). Entretanto, as sequências de Honduras apresentaram uma variação de A para C quando comparadas com as sequências da Coreia do Sul (JX515788.1).

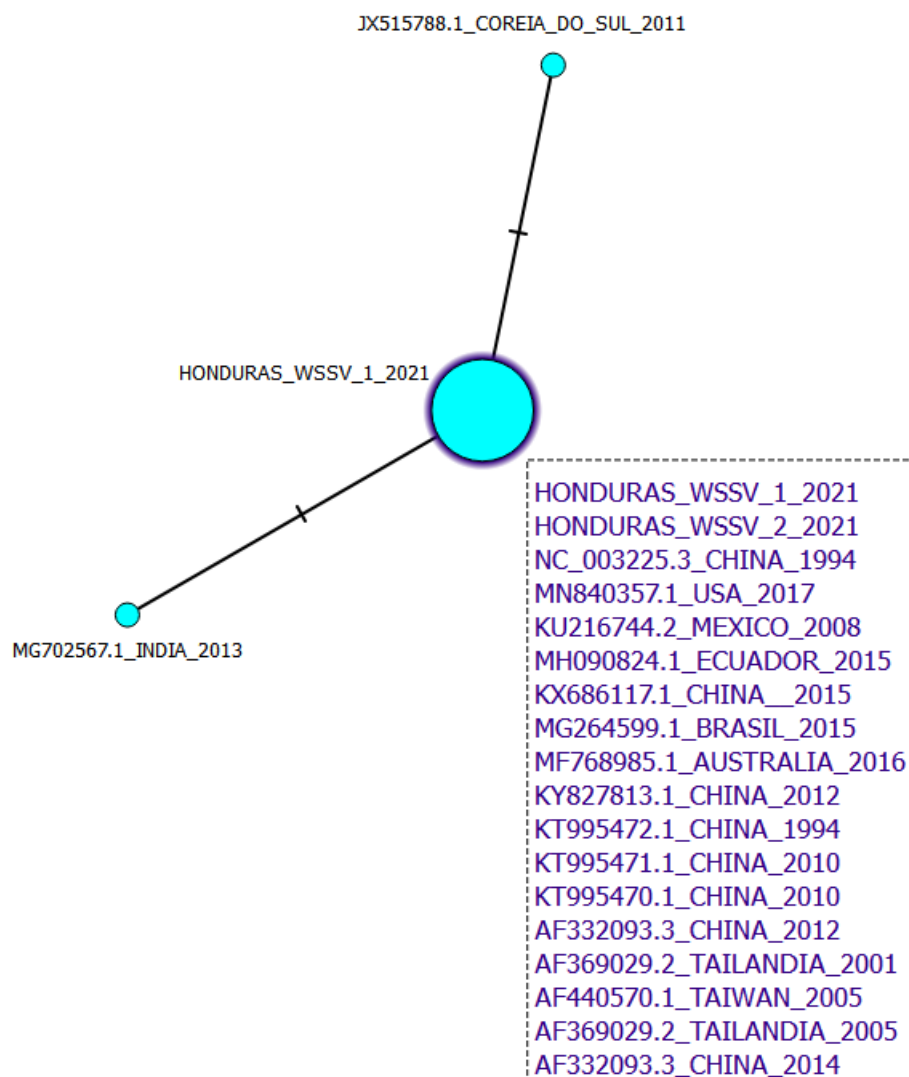
#### 4.2.4 *Árvores filogenéticas*

A árvore filogenética reticulada evidência que as amostras oriundas de Honduras diferiram quando comparadas molecularmente com os isolados da Índia (MG702567.1) e da Coreia do Sul (JX515788.1) mostrando uma diversidade nucleotídica de  $\pi = 0,00319308$ . Pode-



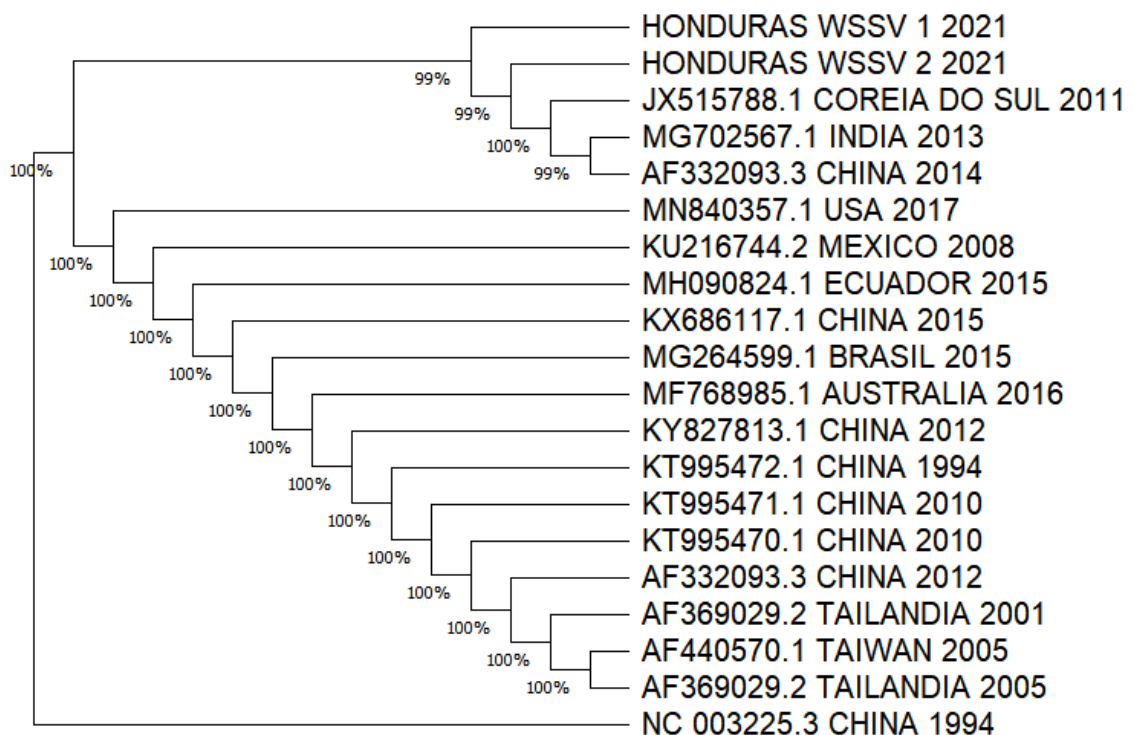
se observar a presença de três haplótipos para o WSSV entre as sequências analisadas (Figura 5). Observa-se que as sequências oriundas de Honduras apresentam pouca diferenciação em relação aos outros dois haplótipos. Esses resultados, também evidenciam que as amostras oriundas de Honduras são geneticamente similares com as isoladas na China 1994 (NC\_003225.3), Estados Unidos de América 2017 (MN840357.1), México 2008 (KU216744.2), Ecuador 2015 (MH090824.1), China 2015 (KX686117.1), Brasil 2015 (MG264599.1), Austrália 2016 (MF768985), China 2012 (KY827813.1), China, 1994 (KT995472.1), China 2010 (KT995471.1), China 2010 (KT995470.1), China 2012 (AF332093.3), Tailândia 2001 (AF369029.2) e Taiwan 2005 (AF440570.1).

Figura 5 - Árvore filogenética reticulada da VP28 do WSSV através dos primers 146F1/R1 e 146F2/R2 (Lo et al, 1996). Comparação das sequências de Honduras (WSSV-1e2-2021) com as sequências da Coreia do Sul (JX515788.1) e da Índia (MG702567.1) evidenciando a presença de três cladros.



A árvore filogenética de máxima verossimilhança organizou as amostras em três cladogramas que evidenciam 100% de semelhança entre as amostras oriundas de Honduras e a amostra de referência (NC\_003225.3\_CHINA\_1994) colocando-as numa linhagem que não apresentou variações nas sequências nucleotídicas e 99% de similaridade em relação às amostras de Coreia do Sul (JX515788.1\_COREIA\_DO\_SUL\_2011) e Índia (MG702567.1\_INDIA\_2013) obtidas do banco de dados genético (Figura 6).

Figura 6 - Árvore de máxima verossimilhança da VP28 do WSSV através dos primers 146F1/R1 e 146F2/R2 (Lo et al., 1996).



#### 4.2.5 Composição Nucleotídica das sequências

Finalizada a filoanálise, se determinou que a composição nucleotídica das sequências de WSSV oriundas de Honduras expressam os seguintes valores: T= 21,9% e 21,7%, C = 25,6% e 25,7%, A = 31,5% e G = 21,0% e 21,2% para as sequências HONDURAS\_WSSV\_1\_2021 e HONDURAS\_WSSV\_2\_2021, respectivamente. Quando comparadas com as sequências depositadas no GenBank da NCBI evidenciam pequenas alterações nas porcentagens de T = 21,8% em 94,44% das sequências comparadas e 21,7% em 5,55% apresentada na sequência MG702567.1 da INDIA. C = 25,7% em 88,88% das

sequências e 25,6% em 11,11% dividido pelas sequências JX515788.1 e MG702567.1 da Coreia do Sul e Índia. A = 31,4% em 88,88% das sequências, 31,5% na sequência da Coreia do Sul (JX515788.1) e 31,8% na sequência MG702567 da Índia. Entretanto as porcentagens de G foram de 21,1% em 94,44% das sequências e 21,0% na sequência MG702567 da Índia.

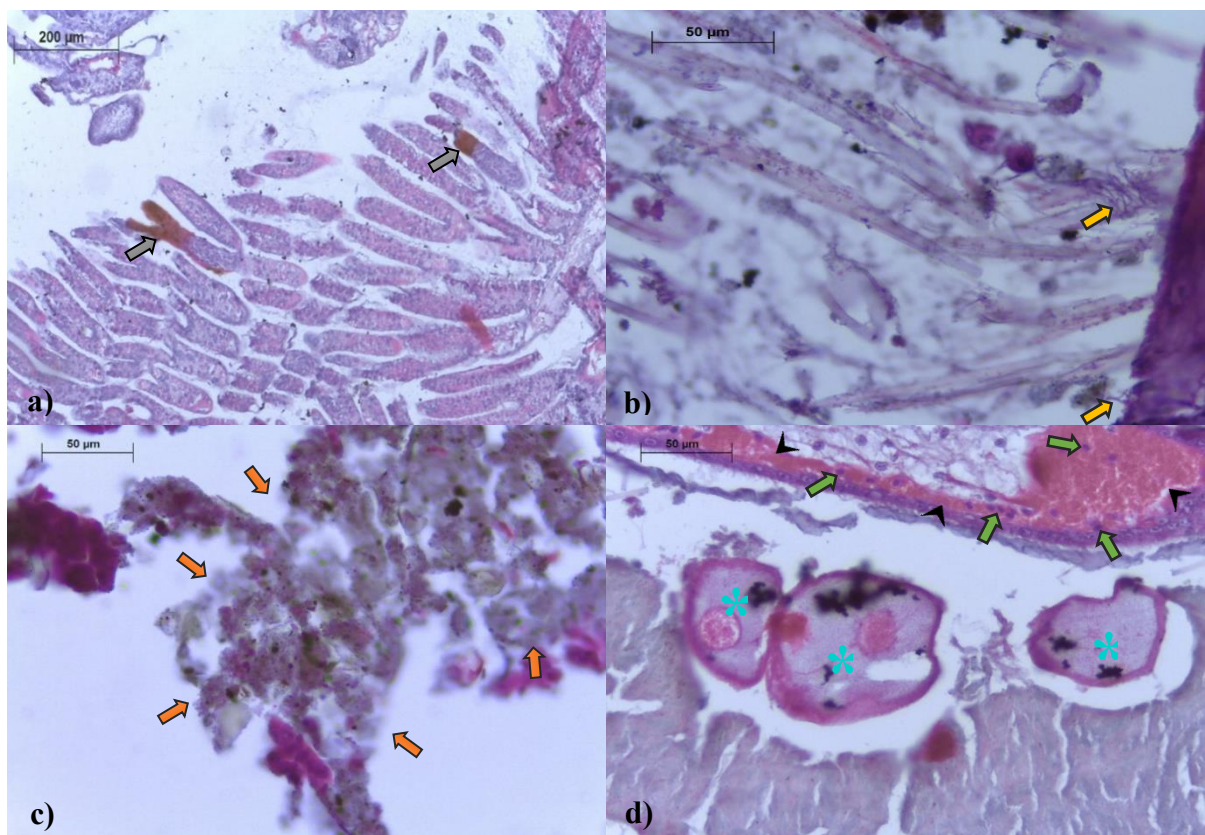
	T(U)	C	A	G	Total
HONDURAS WSSV 1 2021	21.9	25.6	31.5	21.0	809
HONDURAS WSSV 2 2021	21.7	25.7	31.5	21.2	807
NC 003225.3 CHINA 1994	21.8	25.7	31.4	21.1	812
MN840357.1 USA 2017	21.8	25.7	31.4	21.1	812
KU216744.2 MEXICO 2008	21.8	25.7	31.4	21.1	812
MH090824.1 ECUADOR 2015	21.8	25.7	31.4	21.1	812
KX686117.1 CHINA 2015	21.8	25.7	31.4	21.1	812
MG264599.1 BRASIL 2015	21.8	25.7	31.4	21.1	812
MF768985.1 AUSTRALIA 2016	21.8	25.7	31.4	21.1	812
KY827813.1 CHINA 2012	21.8	25.7	31.4	21.1	812
KT995472.1 CHINA 1994	21.8	25.7	31.4	21.1	812
KT995471.1 CHINA 2010	21.8	25.7	31.4	21.1	812
KT995470.1 CHINA 2010	21.8	25.7	31.4	21.1	812
AF332093.3 CHINA 2012	21.8	25.7	31.4	21.1	812
AF369029.2 TAILANDIA 2001	21.8	25.7	31.4	21.1	812
AF440570.1 TAIWAN 2005	21.8	25.7	31.4	21.1	812
JX515788.1 COREIA DO SUL 2011	21.8	25.6	31.5	21.1	812
MG702567.1 INDIA 2013	21.7	25.6	31.8	21.0	806
AF369029.2 TAILANDIA 2005	21.8	25.7	31.4	21.1	812
AF332093.3 CHINA 2014	21.8	25.7	31.4	21.1	812
Avg.	21.8	25.7	31.4	21.1	811.3

### 4.3 Análise histológica

Ao analisar histologicamente a região do cefalotórax dos camarões oriundos da Reserva de Vida Silvestre Los Delgaditos observaram-se a presença de necroses multifocal grau 1 nas brânquias amplificadas em 10x representadas pelas setas cinza (Figura 7a). As setas amarelas da Figura 7b evidenciam a presença de bactérias filamentosas (*Leucothrix mucor*) grau 1 nos apêndices dos camarões observadas com amplificação de 40x (MORALES-COVARRUBIAS, 2013b). Nas setas laranja da figura 7c se evidenciam a presença de cianofíceas grau 1 no intestino do camarão, observadas com amplificação de 40x. No entanto nos asteriscos da Figura 7d evidenciam-se a presença de sizígias de gregarinas grau 1 no intestino do camarão; as setas verdes confirmam infiltrações de hemócitos no tecido conectivo dos camarões; em seguida às cabeças das setas exibem presença de bactérias no tecido

conectivo, todos apreciados com amplificação de 40x em corte transversal (MORALES-COVARRUBIAS; GÓMEZ-GIL, 2014; PANTOJA; LIGHTNER, 2014a; VARELA-MEJÍAS, 2018). As necroses nos tecidos dos camarões, tem sido responsável por grandes perdas econômicas para a carcinicultura de várias partes do mundo, afetando principalmente a espécie de *L. vannamei* (BORGES MAGAÑA; MENDOZA FALCÓN; CARBONELL CASTRO, 2012). Por outra parte, a presença de epibiontes nas pós-larvas de camarões afeta a qualidade do produto, que pode vir a ser rejeitado para ser comercializado e provocar perdas econômicas significativas aos produtores, como também podem ocasionar mortalidades no cultivo (ROSABAL; SOLA; OCAÑA, 2020).

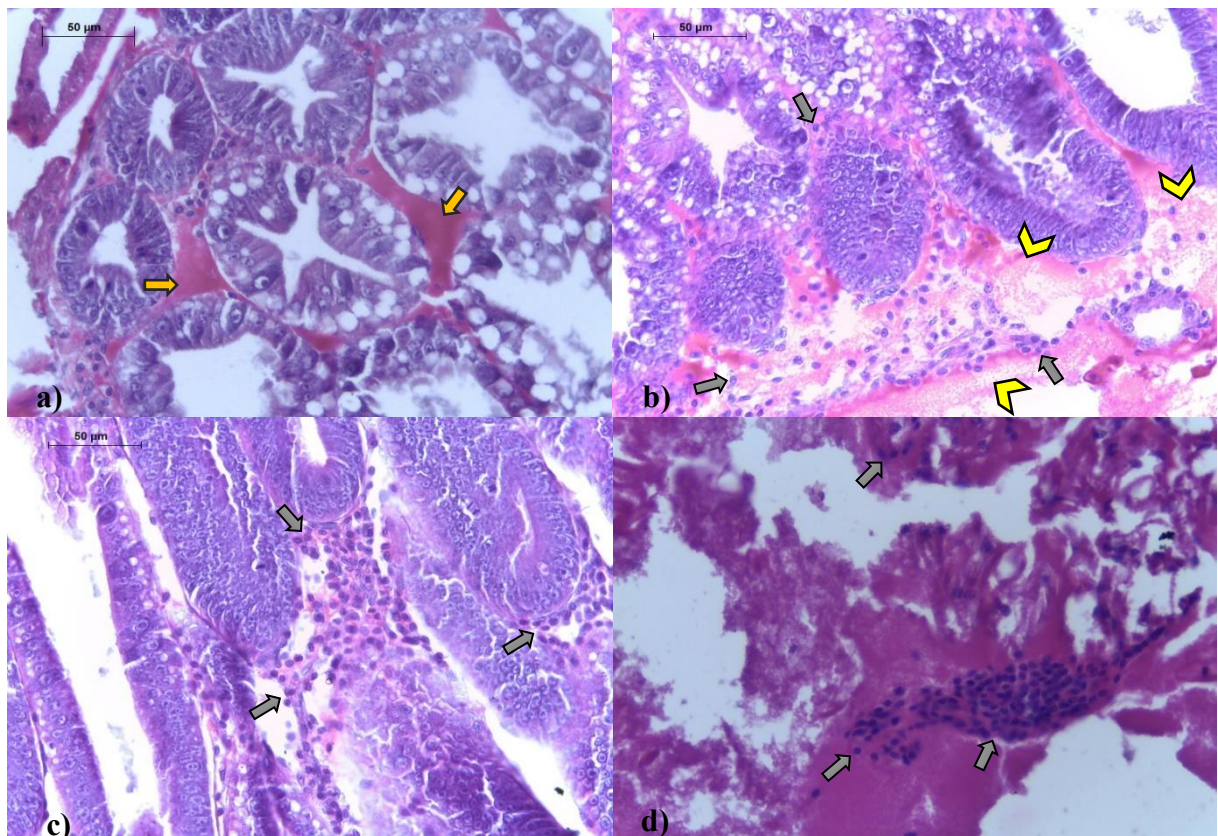
Figura 7 - Cortes histológicos para análise da presença de patógenos ou sinais destes em cefalotórax de *Litopenaeus vannamei*. a) Melanização multifocal grau 1 em brânquias; b) Bactérias filamentosas grau 1 em apêndices; c) Presença de cianofíceas grau 1 em intestino; d) Sízígias de gregarinas em intestino e infiltrações de hemócitos grau 1 no tecido conectivo dos camarões.



Pode-se observar presença de bactérias no hepatopâncreas dos camarões em aumento de 40x evidenciado pelas setas amarelas (Figura 8a). Na Figura 8b as setas pretas mostram infiltrações hemocíticas grau 2 nos túbulos hepatopancreáticos, as cabeças de setas amarelas evidenciam a presença de bactérias no hepatopâncreas grau 2 em aumento de 40x. As

setas mostradas na Figura 8c evidenciam destruição celular grau 1 nos túbulos do hepatopâncreas em aumento de 40x. Em seguida na Figura 8d as setas mostram a presença das infiltrações hemocíticas no tecido conectivo dos camarões, amplificados a 40x corte transversal (MORALES-COVARRUBIAS; GÓMEZ-GIL, 2014; PANTOJA; LIGHTNER, 2014a; VARELA-MEJÍAS, 2018). Tanto a presença de hemócitos quanto a acumulação de bactérias nos tecidos dos hepatopâncreas são sintomatologias características atribuídas a infecções por vibrioses nos camarões, esses danos foram documentados neste trabalho assim como por Esteve; Herrera (2000), que argumentam que a presença de infiltrações de hemócitos evidenciam os rápidos mecanismos de defesa imunológica dos camarões frente a ações bacterianas.

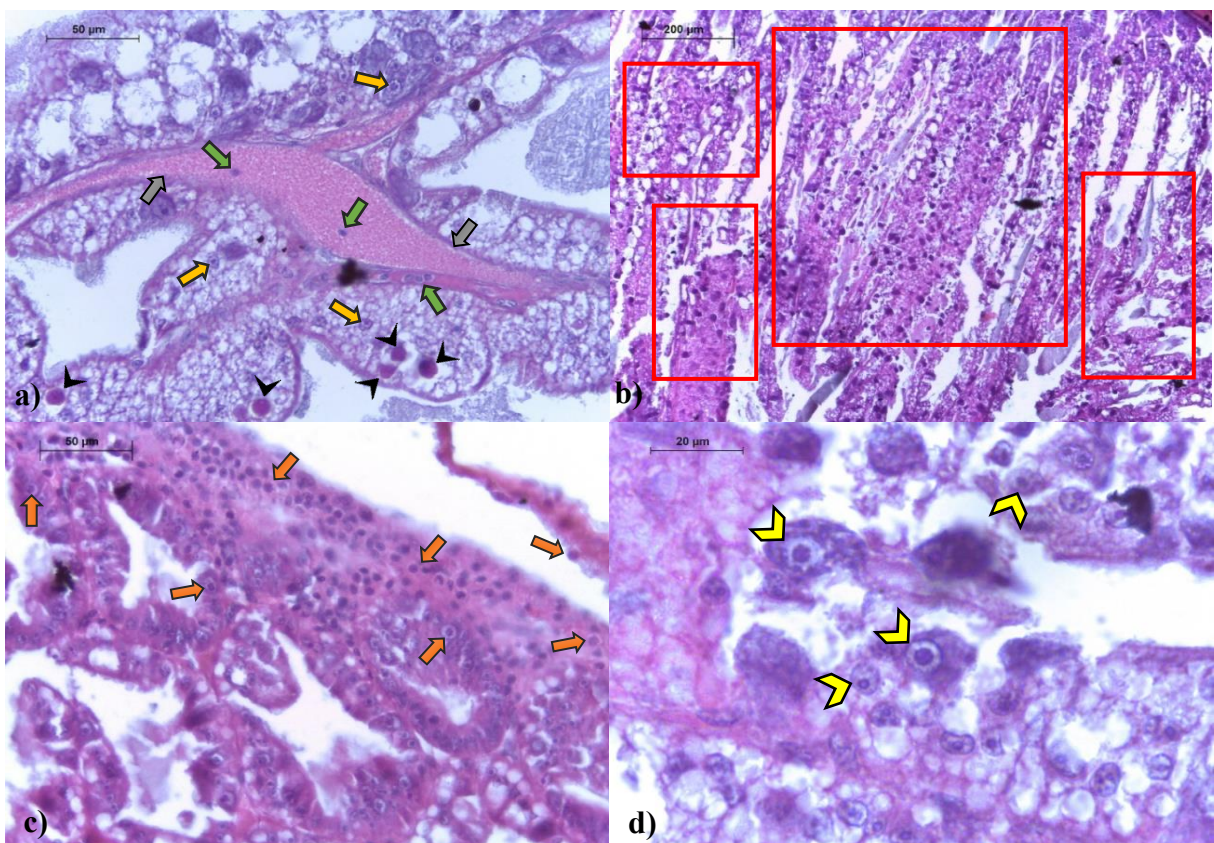
*Figura 8 - Cortes histológicos para análise da presença de patógenos ou sinais destes em cefalotórax de Litopenaeus vannamei. a) Presença de bactérias grau 1 em hepatopâncreas; b) Infiltrações de hemócitos grau 2 e presença de bactérias grau 2 no hepatopâncreas; c) Destruição celular grau 1 no hepatopâncreas; d) Infiltrações de hemócitos grau 1 no tecido conectivo.*



Na Figura 9a as setas cinzas mostram a presença de bactérias grau 1 nos túbulos dos hepatopâncreas, as setas verdes apresentam infiltrações de hemócitos grau 1, as setas amarelas evidenciam a presença de células basófilas e às cabeças de setas representam a presença

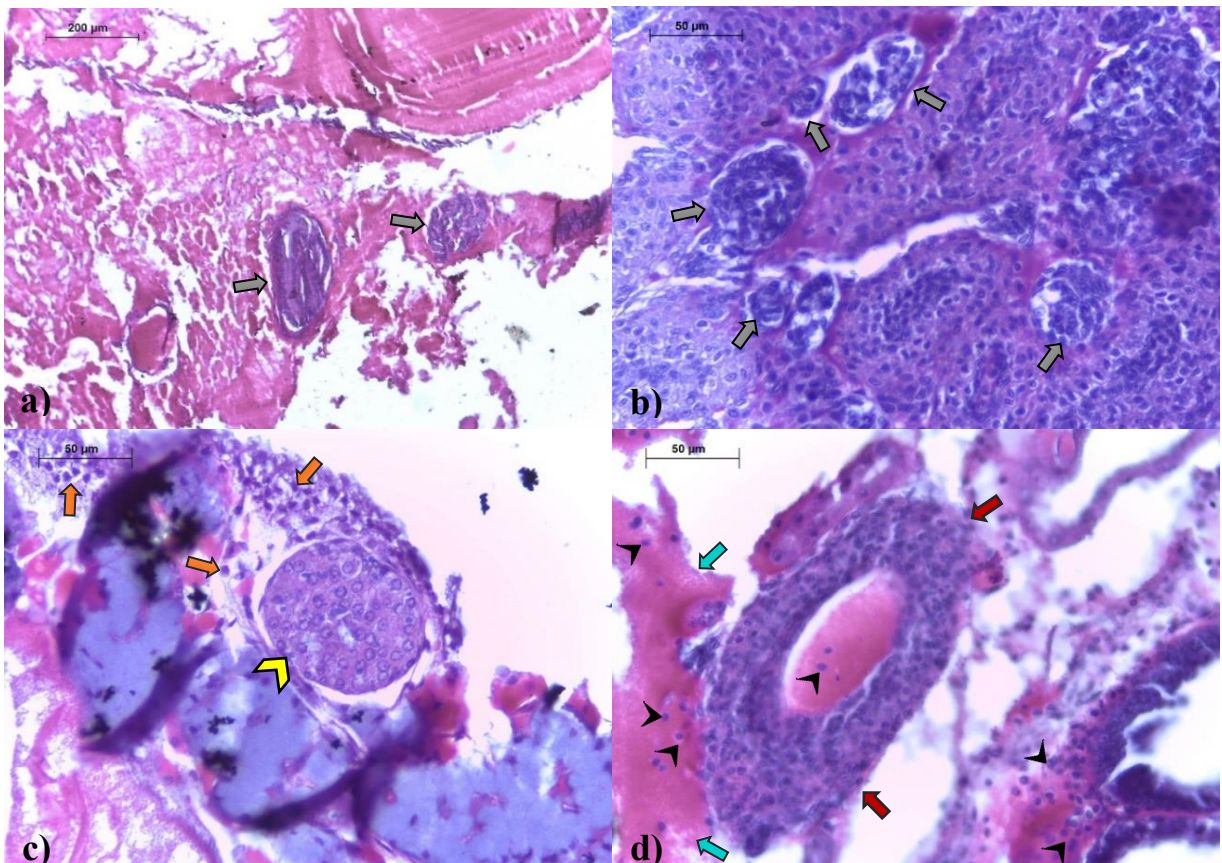
de corpos de inclusão nos túbulos hepatopancreáticos observados em aumento de 40x. Os quadros vermelhos da Figura 9b evidenciam destruição dos túbulos do hepatopâncreas grau 3 em aumento de 10x. As setas laranjas da Figura 9c evidenciam a presença de corpos de inclusão grau 1 no hepatopâncreas em aumento de 40x. No entanto, na Figura 9d as cabeças de setas evidenciam a presença de corpos de inclusão nos túbulos do hepatopâncreas, observados em aumento de 100x e cortados transversalmente (MORALES-COVARRUBIAS; GÓMEZ-GIL, 2014; PANTOJA; LIGHTNER, 2014a; VARELA-MEJÍAS, 2018). O desprendimento celular nos túbulos dos hepatopâncreas poderia dever-se a danos causados por NHP, porém para evitar falsos diagnósticos é recomendado realizar análises moleculares (PCR) para confirmar a presença do patógeno como foi discutido por Rubio *et al.* (2011). Assim como os corpos de inclusão poderiam estar atribuídos a infecções por IHNV (OLIVAS VALDEZ; CÁCERES MARTÍNEZ; YEÓMANS, 2010). No entanto, o ideal seria realizar análises histológicas e moleculares das mesmas amostras para confirmar que os danos histológicos apresentados correspondem aos respectivos das doenças que podem ser suspeitas de ocasioná-los.

Figura 9 - Cortes histológicos para análise da presença de patógenos ou sinais destes em cefalotórax de *Litopenaeus vannamei*. a) Presença de células basófilas grau 1, aglomerados de bactérias grau 1 e Infiltrações de hemócitos; b) Destruição celular grau 3 no hepatopâncreas; c) Corpos de inclusão grau 1 no hepatopâncreas 40x; d) Corpos de inclusão no hepatopâncreas observados a 100x.



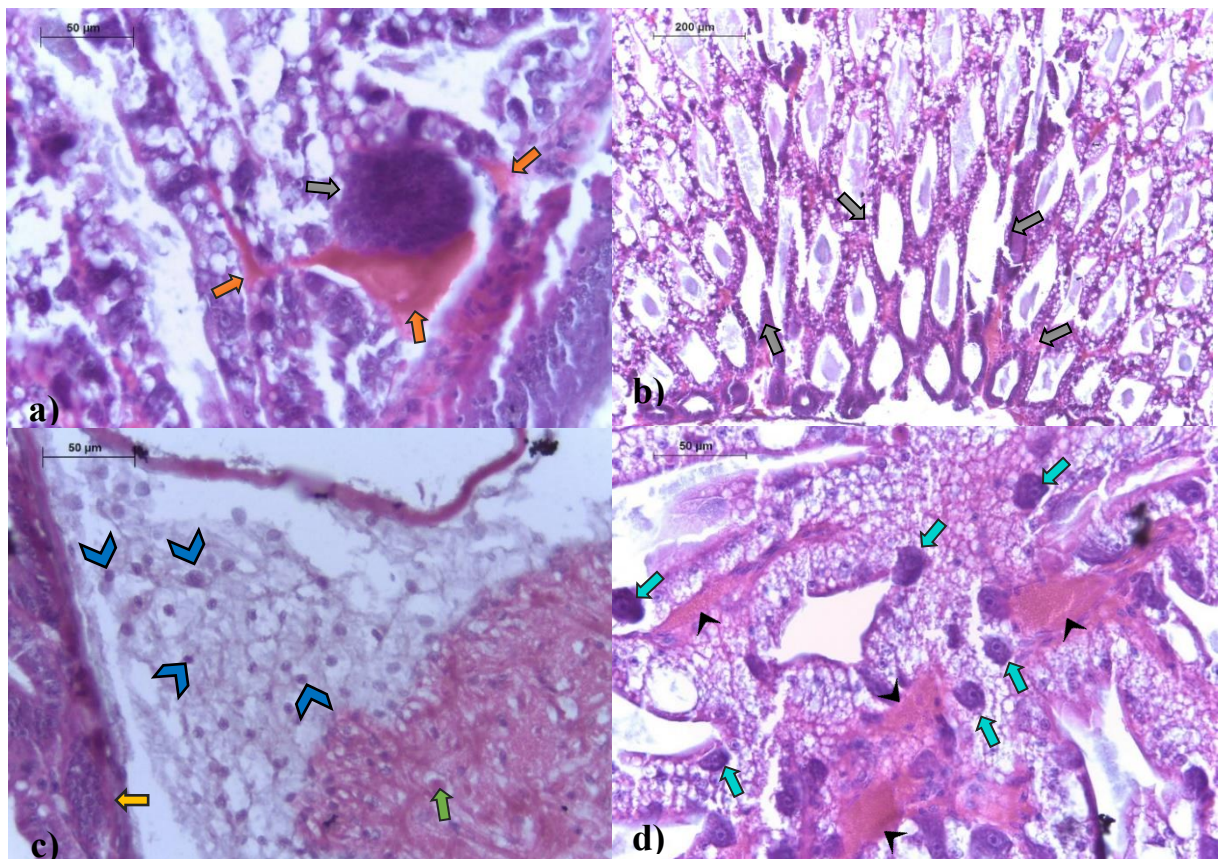
As setas da Figura 10a mostram a presença de esferóides ectópicos, evidenciando núcleos picnóticos na glândula antenal amplificados em aumento de 10x. As setas da Figura 10b evidenciam a presença de esferóides no órgão linfóide observados em 40x de aumento. Na Figura 10c evidencia-se mediante a cabeça da seta a presença de esferóide, a setas laranjas mostram a presença de corpos de inclusão em aumento de 40x. No entanto, na Figura 10d as setas vermelhas evidenciam encapsulação bacteriana, as setas azuis mostram a presença de bactérias e finalmente as cabeças de setas mostram a presença de infiltrações de hemócitos em aumento de 40x com corte transversal (MORALES-COVARRUBIAS; GÓMEZ-GIL, 2014; PANTOJA; LIGHTNER, 2014a; VARELA-MEJÍAS, 2018). Tanto os esferóides presentes no órgão linfóide, quanto os ectópicos, devem ser considerados como indicadores de exposição atual ou passada a infecções por agentes patogênicos, mas a sua observação em cortes histopatológicos com colorações de rotina, não permite identificar o agente causador de tais lesões hiperplásicas, gerando uma limitante como suporte no diagnóstico (VARELA-MEJÍAS; CUÉLLAR-ANJEL, 2020) pelo que para complementar seu diagnóstico devem ser acompanhado o histórico clínico do cultivo além do uso de técnicas de diagnóstico moleculares.

Figura 10 - Cortes histológicos para análise da presença de patógenos ou sinais destes em cefalotórax de *Litopenaeus vannamei*. a) Esferóides ectópicos na glândula antenal; b) Esferóides grau 1 no órgão linfóide; c) Esferóides e corpos de inclusão; d) Encapsulação bacteriana, presença de bactérias e infiltrações de hemócitos observados a 40x.



A seta cinza na Figura 11a evidencia a presença de nódulo melanizado no hepatopâncreas e as setas laranjas mostram presença de bactérias, as cabeças de setas denotam infiltrações de hemócitos nos túbulos do hepatopâncreas amplificados a 40x. A seta azul na Figura 11b evidenciam atrofia grau 1 do hepatopâncreas observado com 10x de aumento. As cabeças de setas azuis da Figura 11c mostra corpos de inclusão grau 1 na glândula antenal, a seta laranja evidencia a presença de infiltrações de hemócitos grau 1 e a seta verde mostra a presença de células eosinófilas observadas a 40x de aumento. Finalmente, na figura 12d as setas azuis evidenciam a presença de corpos de inclusão e as cabeças de setas, mostram a presença de bactérias nos túbulos dos hepatopâncreas observados a 40x de aumento em corte transversal (MORALES-COVARRUBIAS; GÓMEZ-GIL, 2014; PANTOJA; LIGHTNER, 2014a; VARELA-MEJÍAS, 2018). Tanto a presença de melanização nos hepatopâncreas quanto a atrofia do mesmo poderia indicar uma infecção por NHP (IBARRA-GÁMEZ; GALAVÍZ-SILVA; MOLINA-GARZA, 2007; RUBIO et al., 2011). Porém, para confirmar este diagnóstico é recomendado realizar análises moleculares.

*Figura 11 - Cortes histológicas para análise da presença de patógenos ou sinais destes em cefalotórax de Litopenaeus vannamei. a) Nódulo melanizado no hepatopâncreas, presença de bactérias e infiltrações de hemócitos; b) Atrofia do hepatopâncreas; c) Corpos de inclusão na glândula antenal, células eosinófilas e infiltrações de hemócitos; d) Corpos de inclusão (setas azuis) e bactérias (cabeças de seta) no hepatopâncreas observados a 40X.*





## 5 CONCLUSÕES

Este estudo comprovou a ocorrência do WSSV em cultivos semi-intensivos de *L. vannamei* em duas fazendas de duas regiões diferentes de Honduras através de técnicas moleculares de PCR convencional e PCR em Tempo Real. As sequências de WSSV presentes nas amostras analisadas de Honduras apresentaram pouca variação genética quando comparadas com as sequências depositadas no GenBank, evidenciando diferenças nucleotídicas entre elas e os isolados da Coreia do Sul e da Índia. Desta forma, foi possível caracterizar molecularmente duas amostras de camarões *L. vannamei* infectadas pelo WSSV, obtendo duas sequências nucleotídicas da linhagem presente em Honduras, sendo uma delas composta por 809 pares de base e a outra por 807 pb.

Não se detectou a presença das enfermidades: Doença da Necrose Hepatopancreática Aguda (AHPND), Vírus da Síndrome de Taura (TSV) e Vírus da Mionecrose Infecciosa (IMNV) nas amostras provenientes de Honduras que foram analisadas neste estudo. Portanto, sugere-se que sejam feitas amostragens periódicas para monitorar a presença de patógenos a fim de diagnosticar precocemente o aparecimento de qualquer destas enfermidades em cultivos de camarões já que o fato de não haver encontrado estes agentes patogênicos não exclui a presença deste em outras localidades do país ou mesmo em outro período nas mesmas fazendas amostradas.

Observou-se também neste estudo a presença de IHHNV através de PCR em tempo real (qPCR) com frequência de 67% nas amostras coletadas em Honduras. Assim como também a presença de NHP através de PCR em tempo real (qPCR), mas em uma frequência menor (11%) do que para IHHNV. Além disso, foi possível mediante técnicas moleculares (PCR convencional e PCR em Tempo Real - qPCR) se confirmar a coinfeção entre WSSV e IHHNV detectado nas amostras 04 e 06 (Quadro 3). Assim como também se observou a coinfeção entre NHP e IHHNV nas amostras 01, 07 e 08 (Quadro 3).

As análises histológicas das amostras oriundas da Reserva de Vida Silvestre Los Delgaditos, localizada em Honduras evidenciaram com maior frequência danos característicos das doenças de origem bacteriana (vibrioses) que aqueles de origem viral, sendo que o único dano característico de vírus foi a presença dos esferóides no órgão linfóide e glândula antenal.

Desta forma, sugere-se a necessidade de se ampliar o estudo para todas as regiões de cultivo de camarão em Honduras como também para as populações silvestres de camarões presentes tanto no Golfo de Fonseca quanto no Mar do Caribe hondurenho com a finalidade de diagnosticar e comparar as possíveis doenças que afetam os camarões tanto cultivados quanto

silvestres. Sendo possível agira de forma precoce e realizar o manejo necessário a fim de evitar perdas econômicas significativas no país.

## **6 CONSIDERAÇÃO FINAL**

Como perspectiva futura, se recomenda realizar um monitoramento preventivo e frequente em fazendas distribuídas nas diferentes regiões do país a fim de avaliar a presença e ocorrência de enfermidades e propor medidas de manejo eficazes para evitar altas mortalidades e perdas econômicas nos cultivos de camarões em Honduras.

## REFERÊNCIAS

- ABAD-ROSALES, S. *et al.* Interacción de factores físicos, químicos y biológicos en el cultivo de camarón. *In: AVANCES en Acuicultura y Manejo Ambiental*. Tarragona: Editorial Trillas, 2011. p. 123–134.
- ALBERTS, B. *et al.* Analizando células, moléculas y sistemas: Métodos de secuenciamento de DNA. *In: ELISA, A. et al.* (ed.). **Biología Molecular da Célula**. 1. ed. São Paulo: ARTMED, 2017. p. 439-528.
- ANDAH. **Camarón de Honduras – ANDAH**. Disponível em: <https://andah.hn/camaron-de-honduras/>. Acesso em: 16 out. 2021.
- ANDAH. **Exportaciones de Camarón Honduras – ANDAH**. Honduras: ANDAH, 2022. Disponível em: <https://andah.hn/exportaciones-de-camaron-honduras/>. Acesso em: 24 abr. 2022.
- ANDRADE, T. *et al.* Real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay using TaqMan probe for detection and quantification of infectious myonecrosis virus (IMNV). **Aquaculture**, Ottawa. 264, p. 9-15, 2007.
- ANDRADE, T. P. D. *et al.* Novel infectious myonecrosis virus (IMNV) variant is associated with recent disease outbreaks in *Penaeus vannamei* shrimp in Brazil. **Aquaculture**, Ottawa. v. 554, p. 738159, 2022.
- AQUACULTURE MAGAZINE. **Aquaculture Magazine on Twitter**. 2021. Disponível em: <https://twitter.com/AquacultureMag/status/1475676238098440197>. Acesso em: 25 maio 2022.
- ARANGUREN, L. F.; TANG, K. F. J.; LIGHTNER, D. V. Quantification of the bacterial agent of necrotizing hepatopancreatitis (NHP-B) by real-time PCR and comparison of survival and NHP load of two shrimp populations. **Aquaculture**, Ottawav. 307, n. 3–4, p. 187–192, set. 2010.
- ARULMOORTHY, M. P. *et al.* Major viral diseases in culturable penaeid shrimps: a review. **Aquaculture International**, Switzerland, v. 28, n. 5, p. 1939–1967, 2020.
- ASCHE, F. *et al.* The economics of shrimp disease.pdf. **Journal of Invertebrate Pathology**, United States, v. 186, p. 107397, 2020.
- ASTIYANI, W. *et al.* An Economic Analysis Ecoshrimp White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) Concept on Shrimp Culture with Plastic pound, Indonesia. **Aquacultura Indonesiana**, Indonesia, v. 21, n. 2, p. 68–73, 2020.
- BANCO CENTRAL DE HONDURAS. **Informe de Comercio Exterior de Mercancías Generales a septiembre 2021**. Tegucigalpa, 2022. Disponível em: <https://www.bch.hn/estadisticos/EME/Informe%20de%20Mercancias%20Generales/Informe%20de%20Comercio%20Exterior%20de%20Mercanc%3%ADas%20Generales%20a%20septiembre%202021.pdf#search=acuicultura%202021>. Acesso em: 24 abr. 2022.

BARRACO, M.; PERAZZOLO, L.; ROSA, R. **Imunologia de Crustáceos com ênfases em camarões**. Florianópolis: UFSC, 2007.

BLACKWELL, W. **Studies in Viral Ecology**. Cincinnati: John Wiley ed. 2021. v. 2.

BORGES MAGAÑA, R. O.; MENDOZA FALCÓN, Y. J.; CARBONELL CASTRO, N. M. Necrosis en postlarvas de camarón. **REDVET**, Málaga, v. 13, n. 2, p. 1-4, 2012.

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**. 2017. Tese (Doutorado) – Universidade federal do Ceará, Fortaleza, 2017.

CASTRO LARA, J. L. **Desarrollo Y Análisis Del Sistema Conjunto PCR/Dot Blot Para La Detección Del Virus De La Necrosis Hipodérmica Y Hematopoyética Infecciosa**. 2009. Tesis de grado (Ingeniería Acuicultura) – Escuela Superior Politécnica del Litoral, Guayaquil, 2009.

CNA-E. **Estadísticas – Cámara Nacional de Acuicultura**. Guayaquil: CNA-E, 2022. Disponível em: <https://www.cna-ecuador.com/estadisticas/>. Acesso em: 5 maio. 2022.

COBO, R.; PÉREZ, L. Aspectos generales del cultivo y la genética del camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). **Revista Cubana de Investigaciones Pesqueras**, Cuba, v. 35, n. 1, p. 18-23, 2018.

CORDEIRO, E. **Crescimento Compensatório No Camarão-Branco Do Pacífico *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931), Cultivado Em Diferentes Temperaturas Sob Restrição Alimentar Em Sistema De Bioflocos**. 2021 Dissertação (Mestrado) - Instituto de Oceanografia, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2021.

CRUZ-FLORES, R.; MAI, H. N.; DHAR, A. K. Complete genome reconstruction and genetic analysis of Taura syndrome virus of shrimp from archival Davidson's-fixed paraffin embedded tissue. **Virology**, Auckland, v. 553, p. 117-121, 2021.

CUÉLLAR-ANJEL, J. **Hepatopancreatitis necrotizante (NHP)**. Iowa: Iowa State University, 2013. Disponível em: <https://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/necrotizing-hepatopancreatitis-es.pdf>. Acesso em: 15 nov. 2021a.

CUÉLLAR-ANJEL, J. **Enfermedad de las manchas blancas**. Iowa: Iowa State University, 2013. Disponível em: <https://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/white-spot-disease-es.pdf>. Acesso em: 2 nov. 2021.

CUÉLLAR-ANJEL, J. **Síndrome de taura**. Iowa: Iowa State University, 2013. Disponível em: <https://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/taura-syndrome-es.pdf>. Acesso em: 22 nov. 2021.

CUÉLLAR-ANJEL, J. Métodos para el diagnóstico de enfermedades en camarones penaeidos. In: MORALES, V.; CUÉLLAR-ANJEL, J. (ed.). **Guía técnica: patología e inmunología de camarones penaeidos**. 2. ed. Panamá: CYTED, 2014. p. 21-98.

CUÉLLAR-ANJEL, J. **Mionecrosis infecciosa**. Iowa: Iowa State University, 2013.  
Disponível em: <https://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/infectious-myonecrosis-es.pdf>.  
Acesso em: 2 nov. 2021.

DANGTIP, S. et al. AP4 method for two-tube nested PCR detection of AHPND isolates of *Vibrio parahaemolyticus*. **Aquiculture Reports**, [s. l.], v. 2, p. 158–162, 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**, Amsterdam, v. 245, p. 52–61, 2 fev. 2018.

DIAZ, C.; SOUZA, L. G.; PETRIELLA, A. M. Morfología e histología del aparato digestivo en los diferentes estadios de vida de los camarones Peneidos. *In*: DIAZ, C. *et al.* **Estado actual y perspectivas de la nutrición de los camarones Peneidos cultivados en Iberoamérica**. México: Rosa Socarrás Lage ed., 2006. p. 8–105.

DURAND, S. V; LIGHTNER, D. V. Quantitative real time PCR for the measurement of white spot syndrome virus in shrimp. **Journal of Fish Diseases**, United Kingdom, v. 25, p. 381–389, 2002.

EL UNIVERSO. **Economía | Noticias | El Universo**. [s.l], 2021 Disponível em: <https://www.eluniverso.com/noticias/economia/ecuador-es-el-mayor-productor-mundial-de-camaron-segun-revista-aquaculture-nota/>. Acesso em: 25 maio. 2022.

ESCOBEDO-BONILLA, C. M. *et al.* In vivo titration of white spot syndrome virus (WSSV) in specific pathogen-free *Litopenaeus vannamei* by intramuscular and oral routes. **Dis. Aquat. Org.**, [s. l.], v. 66, p. 163-170, 2005.

ESPARZA-LEAL, H. M. *et al.* Región endémica y regímenes de infección con el Virus del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV) en las granjas camaronícolas del Noroeste de México. **Ra Ximhai**, México, v. 8, n. 3, p. 2012, 2012.

ESPINOSA, A.; BERMÚDEZ, M. DEL C. La acuicultura y su impacto al medio ambiente. **Redalyc**, Argentina, p. 221-232, mar. 2012.

ESTEVE, M.; HERRERA, F. C. Alteraciones histológicas del hepatopáncreas en juveniles de *Farfantepenaeus brasiliensis* (Latreille, 1817) (Crustacea: Penaeidae) experimentalmente infectados con *Vibrio alginolyticus*. **Saber**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 14–20, 2000.

FAO. **Cultured Aquatic Species Information Programme: *Penaeus vannamei* (Boone, 1931)**. Roma: FAO, 2201.

FAO. **Towards sustainability in the shrimp industry**. [s. l.], 2020. Disponível em: <https://www.fao.org/in-action/globefish/market-reports/resource-detail/en/c/1261310/>. Acesso em: 15 out. 2021.

FAO. **2020 farmed shrimp production declined in Asia but increased in Latin America**. [s. l.], 2021. Disponível em: <https://www.fao.org/in-action/globefish/market-reports/resource-detail/en/c/1416629/>. Acesso em: 15 out. 2021.

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

FLEGEL, T. W.; LO, C. F. **Announcement regarding free release of primers for specific detection of bacterial isolates that cause acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND)**. [s. l.], 2014.

GAINZA, O.; ROMERO, J. Effect of mannan oligosaccharides on the microbiota and productivity parameters of *Litopenaeus vannamei* shrimp under intensive cultivation in Ecuador. **Scientific Reports**, United States, v. 10, n. 1, p. 2719, 2020.

GÓMEZ, G.; ROQUE, A.; GUERRA, A. **Enfermedades Infecciosas más Comunes en la Camaronicultura en México y el Impacto del Uso de Antimicrobianos**. Mazatlán: [s. n.], 2015. Disponível em: <http://cesaibc.org/pdf/infointeres/crustaceos/enfermedadesmexico.pdf>. Acesso em: 21 out. 2021.

HALIM, D.; JUANRI. **Indonesia's Aquaculture Industry**. Indonesia Ipsos Business Consulting, 2016. Disponível em: <https://www.ipsos.com/sites/default/files/2016-08/indonesia-aquaculture-industry.pdf>. Acesso em: 30 out. 2021.

HAN, J. E. *et al.* Photorhabdus insect related (Pir) toxin-like genes in a plasmid of *Vibrio parahaemolyticus*, the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) of shrimp. **Dis. Aquat. Org.**, [s. l.], v. 113, p. 33–40, 2015.

HAREEN NITA, M. K. *et al.* Detection and genetic profiling of infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus (IHHNV) infections in wild berried freshwater prawn. **Mol. Biol. Rep.**, [s. l.], v. 39, n. 1, p. 3785–3790, 2012.

HOLT, C. C. *et al.* Understanding the role of the shrimp gut microbiome in health and disease. **Journal of Invertebrate Pathology**, United States, v. 186, p. 107387, 2020.

HOLTHUIS, L. B. ***Litopenaeus vannamei***. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1980. v. 1.

IBARRA-GÁMEZ, J. C.; GALAVÍZ-SILVA, L.; MOLINA-GARZA, Z. J. Distribución de la bacteria causante de la necrosis hepatopancreática (NHPB) en cultivos de camarón blanco, *Litopenaeus vannamei*, en México. **Ciencias Marinas**, Mexico, v. 33, n. 1, p. 1-9, 2007.

IBARRA-GÓMEZ, J. C.; GALAVÍZ-SILVA, L.; MOLINA-GARZA, Z. J. Distribución de la bacteria causante de la necrosis hepatopancreática (NHPB) en cultivos de camarón blanco, *Litopenaeus vannamei*, en México. **Ciencias Marinas**, Mexico, v. 33, n. 1, p. 1-9, 2007.

JHA, R. K. *et al.* Managing infectious myonecrosis virus (IMNV) in *Vannamei* shrimp culture: Learning by doing. **International Journal of Fisheries and Aquatic Studies**, Delhi, v. 9, n. 1, p. 385-391, 1 jan. 2021.

JOSHI, J. *et al.* Variation in *Vibrio parahaemolyticus* isolates from a single Thai shrimp farm experiencing an outbreak of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). **Aquaculture**, Ottawa, v. 428-429, p. 297-302, 2014.

- KAKOOLAKI, S. et al. Socio-economic impacts of Coronavirus (COVID-19) outbreak on world shrimp aquaculture sector. **Iranian Journal of Aquatic Animal Health**, v. 6, n. 1, p. 1–18, 2020.
- LIAO, I. C.; CHIEN, Y.-H. The Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, in Asia: The World's Most Widely Cultured Alien Crustacean. **Series in Invasion Ecology**, Netherlands, v. 6, p. 489-519, 2011.
- LIGHTNER, D. V.; REDMAN, R. M. Shrimp diseases and current diagnostic methods. **Aquaculture**, Ottawa, v. 164, p. 201-220, 1998.
- LIGHTNER, D. V. Virus diseases of farmed shrimp in the Western Hemisphere (the Americas): A review. **Journal of Invertebrate Pathology**, United States, 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**, United States, v. 110, n. 2, p. 174–183, jun. 2012.
- LO, C.-F. *et al.* Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimps using polymerase chain reaction. **Dis. Aquat. Org.**, [s. l.], v. 25, p. 133–141, 1996a.
- LO, C.-F. *et al.* White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods. **Dis. Aquat. Org.**, [s. l.], v. 27, p. 215–225, 1996b.
- LO, C.-F.; KOU, G.-H. Virus-associated white spot syndrome of shrimp in Taiwan: A review. **Fish Pathology**, Japan, v. 33, n. 4, p. 365-371, 1998.
- MAI-HOANG, T. D. *et al.* A novel PCR method for simultaneously detecting Acute hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) and mutant-AHPND in shrimp. **Aquaculture**, v. 534, p. 736336, 2021.
- MALDONADO, M.; RODRÍGUEZ, J.; DE BLAS, I. El camarón de cultivo frente al WSSV, su principal patógeno. **Revista AQUATIC**, Spain, v. 21, p. 78-91, 2004.
- MARKS, H. *et al.* Genetic variation among isolates of White spot syndrome virus. **Archives of Virology**, Auckland, v. 149, p. 673-697, 2004.
- MEJÍA-RUIZ, C. H. *et al.* **Detección del Virus de “Mancha Blanca” en camarón de granja mediante la técnica PCR**. Cuernavaca: Inapesca, 1999. Disponível em: <https://inapesca.gob.mx/portal/Publicaciones/Memorias/1999-Memorias-redes-acuacultura.pdf#page=207>. Acesso em: 28 maio. 2022.
- MELENA, J. Estudio de la Co-infección viral IHHNV-WSSV en el camarón blanco *L. vannamei*. **Revista Aquatic**, [s. l.], 2005. Disponível em: <http://www.revistaaquatic.com/documentos/docs/bquinc130.pdf>. Acesso em: 28 maio. 2022.
- MELLO JUNIOR, C. C. DE. **Seleção de reprodutores de *Litopenaeus vannamei* livres da Síndrome da Mancha Branca (WSSV), da Necrose Infeciosa Hipodermal e**



**Hematopoiética (IHHNV) para produção de pós-larvas livres destes patógenos virais.** 2010. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

MILLARD, R. S. *et al.* How do abiotic environmental conditions influence shrimp susceptibility to disease? A critical analysis focused on White Spot Disease. **Journal of Invertebrate Pathology**, United States, p. 107369, 2020.

MORALES, V.; CUÉLLAR-ANJEL, J.; PANTOJA, C. **Enfermedades endémicas del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* en las Américas.** Panamá, 2015.

MORALES-COVARRUBIAS, M. S. *et al.* Prevalencia de enfermedades de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) cultivado en ocho regiones de Latinoamérica. **Revista Científica**, [s. l.], v. XXI, n. 5, p. 434–446, set. 2011.

MORALES-COVARRUBIAS, M. S. **Camaronicultura en Aguas de Baja Salinidad.pdf.** México: Trillas, Ed., 2013.

MORALES-COVARRUBIAS, M. S. **Camarón Análisis en Fresco, herramienta de diagnóstico.** Guatemala: Editorial Impresos Unión Maya, 2013. v. 1.

MORALES-COVARRUBIAS, M. S.; GÓMEZ-GIL, B. Enfermedades bacterianas de los camarones. *In*: MORALES, V.; CUÉLLAR-ANAJEL, J. (ed.). **Guía técnica: patología e inmunología de camarones penaeidos.** 2. ed. Panamá: CYTED, 2014. p. 386.

NAVANEETH, K. A. *et al.* Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* isolates from shrimp farms of Southeast coast of India with special reference to Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) status. **Aquaculture**, Ottawa, v. 518, p. 734813, 2020.

NUNAN, L. M.; POULOS, B. T.; LIGHTNER, D. V. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) used for the detection of Taura Syndrome Virus (TSV) in experimentally infected shrimp. **Dis. Aquat. Org.**, [s. l.], v. 34, p. 87-91, 1998.

NUNAN, L. M.; POULOS, B. T.; LIGHTNER, D. V. Use of Polymerase Chain Reaction for the Detection of Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus in Penaeid Shrimp. **Marine Biotechnology**, [s. l.], v. 2, p. 319-328, 2000.

OIE. **OIE - World Animal Health Information System (WAHIS).** [s. l.]: OIE, 2001a. Disponível em: <https://wahis.oie.int/#/dashboards/country-or-disease-dashboard>. Acesso em: 9 nov. 2021a.

OIE. Infection with *Hepatobacter Penaei* (Necrotising Hepatopancreatitis). *In*: OIE. **Manual of diagnostic test for aquatic animals.** [S. l.]: OIE, 2021. p. 127-137.

OIE. Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease. *In*: OIE. **Manual of diagnostic test for aquatic animals.** [s. l.]: OIE, 2021. p. 97-108.

OIE. Infection with White Spot Syndrome Virus. *In*: OIE. **Manual of diagnostic test for aquatic animals.** [s. l.]: OIE, 2021. p. 194-208.

OIE. Infection with infectious hypodermal and haematopoietic Necrosis Virus. *In*: OIE. **Manual of diagnostic test for aquatic animals**. [s. l.]: OIE, 2021. p. 138-153.

OIE. Infection with Taura Syndrome Virus. *In*: OIE. **Manual of diagnostic test for aquatic animals**. [s. l.]: OIE, 2021. p. 178-193.

OIE. Infection with Infectious Myonecrosis Virus. *In*: OIE. **Manual of diagnostic test for aquatic animals**. [s. l.]: OIE, 2021. p. 154–164.

OLIVAS VALDEZ, J. Á.; CÁCERES MARTÍNEZ, J.; YEÓMANS, R. V. Patógenos que afectan el cultivo de *Litopenaeus vannamei* en ambiente marino y dulceacuícola en el estado de Baja California, México. **REDVET**, Málaga, v. 11, n. 3, p. 1–25, 2010.

OSEJO BACA, R. A.; UBEDA CRUZ, I. S. **Monitoreo de los Virus del Síndrome de Mancha Blanca (WSSV), Virus del Síndrome de Taura (TSV) y Virus de la Necrosis Hipodérmica y Hematopoyética Infecciosa (IHHNV) en camarones Peneidos silvestres que circulan en las aguas de Estero Real del sector camaronero de Puerto Morazán, Chinandega, en temporada seca y lluviosa en los años 2003 al 2004**. Monografía — Managua: Universidad Centroamericana, nov. 2005.

PANTOJA, C.; LIGHTNER, D. V. Enfermedades virales. *In*: VIELKA, M.; CUELLAR-ANJEL, J. (ed.). **Guía técnica: patología e inmunología de camarones penaeidos**. 2. ed. Panamá: CYTED, 2014. p. 99-164.

PANTOJA, C. R.; LIGHTNER, D. V. Similarity between the histopathology of white spot syndrome virus and yellow head syndrome virus and its relevance to diagnosis of YHV disease in the Americas. **Aquaculture**, Ottawa, v. 218, n. 1, p. 47-54, 27 mar. 2003.

PANTOJA, C. R.; LIGHTNER, D. V. Enfermedades virales de los camarones. *In*: VIELKA, M.; CUELLAR-ANJEL, J. (ed.). **Guía técnica: patología e inmunología de camarones penaeidos**. 2. ed. Panamá: CYTED, 2014b. p. 386.

PARAJELES, J. *et al.* Detección de IHHNV en el cultivo de *Litopenaeus vannamei* en Costa Rica. **Agronomía Mesoamericana**, Costa Rica, v. 32, n. 2, p. 587–598, 2021.

PARRILLA TAYLOR, D. **caracterización genómica del Virus del Síndrome de la Mancha Blanca (wssv) en camarón blanco del pacífico (*Litopenaeus vannamei*) del noroeste de México**. La Paz, 2018.

PAZIR, M. K. *et al.* Detection and identification of White Spot Syndrome Virus (WSSV) and Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus (IHHNV) of *Litopenaeus vannamei* from Bushehr and Sistan and Baloochestan provinces, Iran, during 2009-2010. **Iranian Journal of Fisheries Sciences**, [s. l.], v. 10, n. 4, p. 708–726, 2011.

PEÑA-NAVARRO, N. *et al.* Molecular detection of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in *Penaeus vannamei* shrimps in Costa Rica. **Aquaculture**, Ottawa, v. 523, p. 735190, 2020.

PEÑA-NAVARRO, N.; VARELA-MEJÍAS, A. Prevalence of the principal infectious diseases in cultured white shrimp *Penaeus vannamei* in Nicoya Gulf, Costa Rica. **Revista de Biología Marina y Oceanografía**, Chile, v. 51, n. 3, p. 553–564, 1 dez. 2016.

POULOS, B. et al. Purification and characterization of infectious myonecrosis virus of penaeid shrimp. **Journal of General Virology**, United Kingdom, v. 87, p. 987-996, 2006.

RAJENDRAN, K. V. et al. White spot syndrome virus WSSV infection in tiger shrimp *Penaeus monodon*: A non-lethal histopathological rapid diagnostic method using paraffin and frozen sections. **Aquaculture International**, Switzerland, v. 13, n. 1, p. 341–349, 2005.

RENDÓN, L.; BALCÁZAR, J. Inmunología de camarones: Conceptos básicos y recientes avances. **AquaTIC**, [s. l.], v. 19, p. 27–33, 2003.

RIBEIRO GAGLIARDI, T. **Imunidade intestinal em camarões *Litopenaeus vannamei*: expressão gênica espacial e o efeito da via de infecção pelo WSSV**. 2020. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2020.

ROBLES-SIKISAKA, R. et al. Genetic Signature of Rapid IHHNV (Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus) Expansion in Wild *Penaeus* Shrimp Populations. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 5, n. 7, p. 1-11, 2010.

ROSABAL, D.; SOLA, M.; OCAÑA, A. Prevalence of epibionts in *Litopenaeus vannamei* shrimp larvae (Boone, 1931) in the Manzanillo Shrimp Spawning Center. **Revista Cubana de Investigaciones Pesqueras**, Cuba, v. 37, n. 1, p. 1-7, 2020.

RUBIO, M. et al. Hepatopancreatitis necrotizante (NHP). Identificación etiológica por métodos histopatológicos y moleculares en el camarón de cultivo *Litopenaeus vannamei*. **Revista Cubana de Investigaciones Pesqueras**, Cuba, v. 28, n. 2, p. 67–73, 2011.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, United States, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

SANTOS, H. et al. Diagnosis and potential treatments for acutehepatopancreatic necrosis disease (AHPND) a review.pdf. **Aquaculture International**, Switzerland, v. 28, p. 169-185, 2020.

SARAIVA DE NEGREIROS, L. M.; SANTOS, D. B. Doenças Microbianas na Carcinicultura Brasileira: Uma Revisão. **Rev Cult Cienc UNIFACEX**, v. 13, n. 1, p. 107–124, 2015.

SARAVANAN, K. et al. Investigation and confirmation of white spot syndrome virus (WSSV) infection in wild caught penaeid shrimps of Andamanand Nicobar Islands, India.pdf. **India. VirusDis.**, v. 28, p. 368–372, 2017.

SENASA. **Manual de procedimientos para la autorización de puestos de control cuarentenario**. Tegucigalpa: SENASA, 2021.

SILVA, D. C. D. et al. Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus from Brazil: Sequencing, comparative analysis and PCR detection. **Virus Research**, Netherlands, v. 189, p. 136–146, 30 ago. 2014a.

SILVA, D. C. D. *et al.* Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus from Brazil: Sequencing, comparative analysis and PCR detection. **Virus Research**, Netherlands, v. 189, p. 136–146, 30 ago. 2014b.

SIQUEIRA, I. **Caracterização do vírus da síndrome da mancha branca (WSSV) prevalente no período de 2012, 2016 e 2018 no Município de Aracati (CE)**. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 2019.

SIRIKHARIN, R. *et al.* **A new and improved PCR method for detection of AHPND bacteria**. Thailand: Enaca, 2014. Disponível em: <https://enaca.org/?id=96>. Acesso em: 24 out. 2021.

SIRIKHARIN, R. *et al.* Characterization and PCR detection of binary, pir-like toxins from vibrio parahaemolyticus isolates that cause acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in Shrimp. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 10, n. 5, 1 maio 2015.

SÖDERHÄLL, K.; CERENIUS, L. Role of the prophenoloxidase-aditive system in invertebrate immunity. **Current Opinion in Immunology**, [s. l.], v. 10, p. 23-28, 1998.

TAN, Y. *et al.* Molecular detection of three shrimp viruses and genetic variation of white spot syndrome virus in Hainan Province, China, in 2007. **Journal of Fish Diseases**, United Kingdom, v. 32, p. 777–784, 2009.

TANG, K.; BONDAD, M.; ARTHUR, R. **Shrimp infectious myonecrosis strategy manual**. Roma: FAO, 2019. (FAO Fisheries and Aquaculture Circular No. 1187).

TANG, K.; BONDAD-REANTASO, M.; ARTHUT, J. R. **Shrimp infectious myonecrosis strategy manual**. Arizona, 2019.

TANG, K.; LIGHTNER, D. Detection and quantification of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in penaeid shrimp by real-time PCR. **Dis Aquat Org**, v. 44, p. 79–85, 2001.

TANG, K.; NAVARRO, S.; LIGHTNER, D. A PCR assay for discriminating between infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) and the virus-related sequences in the genome of *Penaeus monodon*. **Dis. Aquat. Org.**, [s. l.], v. 74, p. 165–170, 2007.

TEIXEIRA, M. A. *et al.* Differential diagnosis of active hypodermal and hematopoietic necrosis virus based on gene choice and reverse transcription coupled with PCR. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 9, n. 4, p. 2025-2031, 2010.

TINWONGGER, S. *et al.* Development of PCR diagnosis method for shrimp acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) Strain of *Vibrio parahaemolyticus*. **Fish Pathology**, v. 49, n. 4, p. 159–164, 2014.

UICN. **Interacciones entre la acuicultura y el medio ambiente**: guía para el desarrollo sostenible de la acuicultura mediterránea. Gland e Málaga: UICN e Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación de España, 2007.

- VAIYAPURI, M. *et al.* Antimicrobial resistance in Vibrios of shrimp aquaculture: Incidence, identification schemes, drivers and mitigation measures. **Aquaculture Research**, United States, v. 52, n. 7, p. 2923–2941, 1 jul. 2021.
- VAN HULTEN, M. C. W. *et al.* The white spot syndrome virus DNA genome sequence. **Virology**, Auckland, v. 286, n. 1, p. 7-22, 20 jul. 2001.
- VARELA, A.; CHOC-MARTÍNEZ, L. F. Técnicas diagnósticas para enfermedades bacterianas en camarones. **Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú**, Lima, v. 31, n. 3, p. e18165, 2020.
- VARELA MEJÍAS, A.; PEÑA NAVARRO, N. El Virus del Síndrome de las Manchas Blancas (WSSV): Una revisión y su impacto en la camaronicultura costarricense. **Revista de Ciencias Veterinarias**, Portugal, v. 28, n. 2, p. 51-69, 2010.
- VARELA-MEJÍAS, A. Patologías del hepatopáncreas en camarones marinos cultivados en América y su diagnóstico diferencial mediante histopatología Introducción. **AquaTIC. Sociedad Española de Acuicultura**, Espana, v. 50, n. November, p. 13-30, 2018.
- VARELA-MEJÍAS, A.; CUÉLLAR-ANJEL, J. Formación de esferoides en camarones penaeidos: Implicaciones patológicas y valor diagnóstico. **AquaTechnica**, Spanish, v. 2, n. 2, p. 61–75, 2020.
- VARELA-MEJÍAS, A.; PEÑA-NAVARRO, N. Transfronterización de enfermedades infecciosas en la camaronicultura. Una Revisión. **Repertorio Científico**, Costa Rica, v. 20, n. 1, p. 1-11, 2017.
- VIJAYAKUMARAN, M. **Digestive system and digestion of food in cultivable Finfish and Crustaceans**. Madras, 1987.
- WIJEGONAWARDANE, P. K. M. *et al.* Genetic diversity in the yellow head nidovirus complex. **Virology**, Auckland, v. 380, n. 2, p. 213-225, 25 out. 2008.
- YANG, F. *et al.* Complete Genome Sequence of the Shrimp White Spot Bacilliform Virus. **Journal of Virology**, v. 75, n. 23, p. 11811–11820, dez. 2001.
- ZHANG, X. *et al.* Effects of crustacean hyperglycemic hormone (CHH) RNA interference on regulation of glucose metabolism in *Litopenaeus vannamei* after ammonia-N exposure. **British Journal of Nutrition**, United States, p. 1-40, 2021.
- ZORRIEHZAHRA, M. J. Early Mortality Syndrome (EMS) as new Emerging Threat in Shrimp Industry. **Advances in Animal and Veterinary Sciences**, Pakistan, v. 3, n. 2s, p. 64-72, 2015.

## APÊNDICE A - QUANTIFICAÇÃO DE MATERIAL GENÔMICO

*Tabla 1 - Quantificação de DNA e RNA utilizando como aparelho de leitura o NanoDrop 2000c.*

DNA			RNA		
Amostra	Tipo de tecido	Valor (ng/μl)	Amostra	Tipo de tecido	Valor (ng/μl)
<b>Controle Negativo</b>	-	<b>-0,3</b>	<b>Controle Negativo</b>	-	<b>-0,2</b>
<b>01</b>	Brânquias	28,0	<b>01</b>	Brânquias	21,4
<b>02</b>	Pleópodos	86,8	<b>02</b>	Pleópodos	82,1
<b>03</b>	Pleópodos	100,7	<b>03</b>	Pleópodos	41,1
<b>04</b>	Pleópodos	139,3	<b>04</b>	Pleópodos	287,9
<b>05</b>	Brânquias	16,4	<b>05</b>	Brânquias	128,2
<b>06</b>	Hepatopâncreas	2.146,1	<b>06</b>	Hepatopâncreas	227,9
<b>07</b>	Hepatopâncreas	3.478,3	<b>07</b>	Hepatopâncreas	1.760,6
<b>08</b>	Hepatopâncreas	2.618,1	<b>08</b>	Hepatopâncreas	1.344,6
<b>09</b>	Hepatopâncreas	2.441,7	<b>09</b>	Hepatopâncreas	1.562,6
<b>10</b>	Hepatopâncreas	1.148,6	<b>10</b>	Hepatopâncreas	831,6
<b>11</b>	Pleópodos	1.130,2	<b>11</b>	Pleópodos	849,9
<b>12</b>	Pleópodos	548,4	<b>12</b>	Pleópodos	905,3
<b>13</b>	Hepatopâncreas	6.040,4	<b>13</b>	Hepatopâncreas	3.489,6
<b>14</b>	Hepatopâncreas	2.669,2	<b>14</b>	Hepatopâncreas	2.177,2
<b>15</b>	Brânquias	303,0	<b>15</b>	Brânquias	96,1
<b>16</b>	Brânquias	595,6	<b>16</b>	Brânquias	146,0
<b>17</b>	Pereópodos	218,6	<b>17</b>	Pereópodos	190,0
<b>18</b>	Hepatopâncreas	6.678,0	<b>18</b>	Hepatopâncreas	1.703,5
<b>19</b>	Estômago	443,1	<b>19</b>	Estômago	267,4
<b>20</b>	Hepatopâncreas	5.747,0	<b>20</b>	Hepatopâncreas	1.934,5
<b>21</b>	Pleópodos	269,8	<b>21</b>	Pleópodos	28,2
<b>22</b>	Pleópodos	219,3	<b>22</b>	Pleópodos	27,7
<b>23</b>	Pleópodos	428,2	<b>23</b>	Pleópodos	117,8
<b>24</b>	Pleópodos	3.149,7	<b>24</b>	Pleópodos	5.614,2
<b>25</b>	Pleópodos	1.283,2	<b>25</b>	Pleópodos	4.610,7
<b>26</b>	Hepatopâncreas	4.543,6	<b>26</b>	Hepatopâncreas	2.839,6
<b>27</b>	Hepatopâncreas	8.562,4	<b>27</b>	Hepatopâncreas	2.245,1

Fonte: Elaboração própria

## APÊNDICE B - QUANTIFICAÇÃO DA CARGA VIRAL WSSV

Tabla 2 - *Quantificação carga viral WSSV após diagnóstico através da PCR em Tempo Real (qPCR).*

<b>Amostra</b>	<b>QDNA ng/ul</b>	<b>No. De cópias</b>	<b>QDNA ug/uL</b>	<b>No de cópias WSSV</b>	<b>Cópias de WSSV ug/uL</b>
04	139,3	25,0956573	0,1393	180,155473	1,80E <sup>+02</sup>
05	16,4	1,64017344	0,0164	100,010575	1,00E <sup>+02</sup>
06	2345,0	1,64321172	2,345	0,70072995	7,01E <sup>-01</sup>

Fonte: Elaboração própria











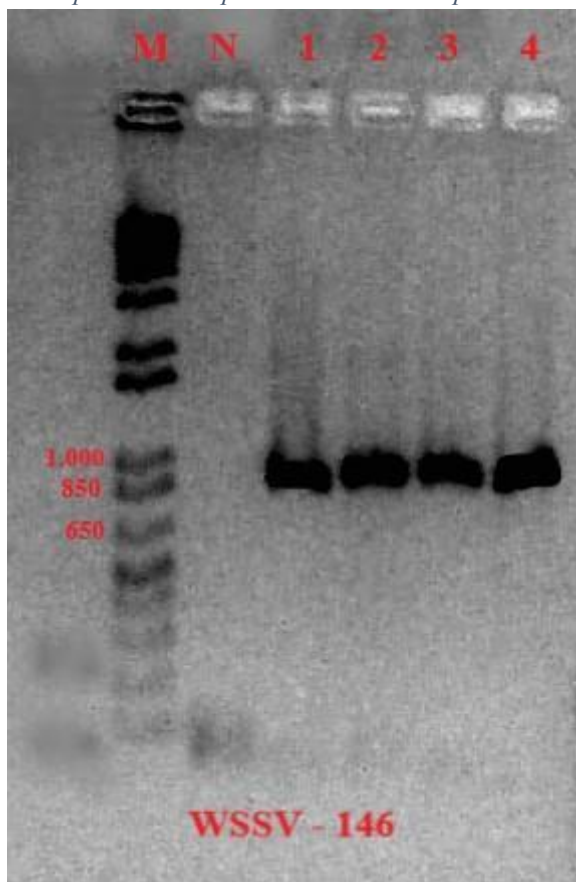


HONDURAS WSSV 1 2021	C	G	G	C	-	C	C	T	C	T	C	-	-	-
HONDURAS WSSV 2 2021	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	G	C	C
NC 003225.3 CHINA 1994	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	G	C	C
MN840357.1 USA 2017	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	G	C	C
KU216744.2 MEXICO 2008	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	G	C	C
MH090824.1 ECUADOR 2015	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	G	C	C
KX686117.1 CHINA 2015	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	G	C	C
MG264599.1 BRASIL 2015	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	G	C	C
MF768985.1 AUSTRALIA 2016	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	G	C	C
KY827813.1 CHINA 2012	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	G	C	C
KT995472.1 CHINA 1994	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	G	C	C
KT995471.1 CHINA 2010	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	G	C	C
KT995470.1 CHINA 2010	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	G	C	C
AF332093.3 CHINA 2012	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	G	C	C
AF369029.2 TAILANDIA 2001	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	G	C	C
AF440570.1 TAIWAN 2005	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	G	C	C
JX515788.1 COREIA DO SUL 2011	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	G	C	C
MG702567.1 INDIA 2013	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	G	C	C
AF369029.2 TAILANDIA 2005	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	G	C	C
AF332093.3 CHINA 2014	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	G	C	C

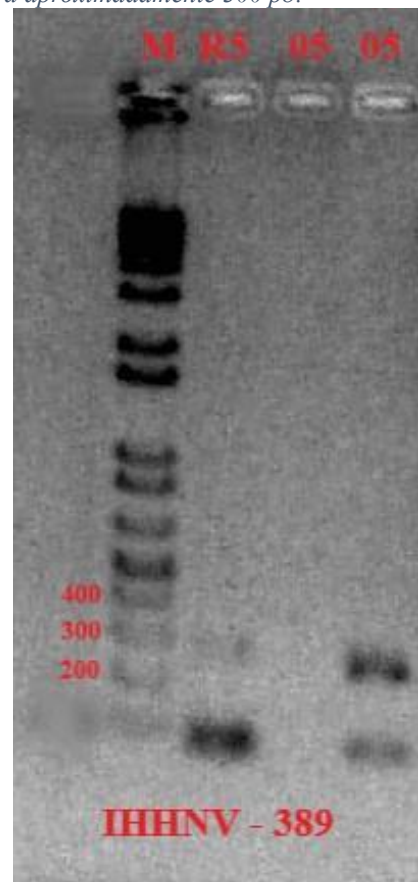
Fonte: Elaboração própria.

**APÊNDICE D - ELETROFORESES**

*Figura 12 - Eletroforeses WSSV – 146. Evidencia a amplificação dos fragmentos plasmídias correspondentes a aproximadamente 947 pb.*



*Figura 13 - Eletroforeses - IHHNV – 389. Evidencia a amplificação dos fragmentos plasmídias correspondentes a aproximadamente 300 pb.*



Fonte: Elaboração própria.

## APÊNDICE E – PCR EM TEMPO REAL – qPCR WSSV

Figura 14 - Amplificação do Plot - WSSV

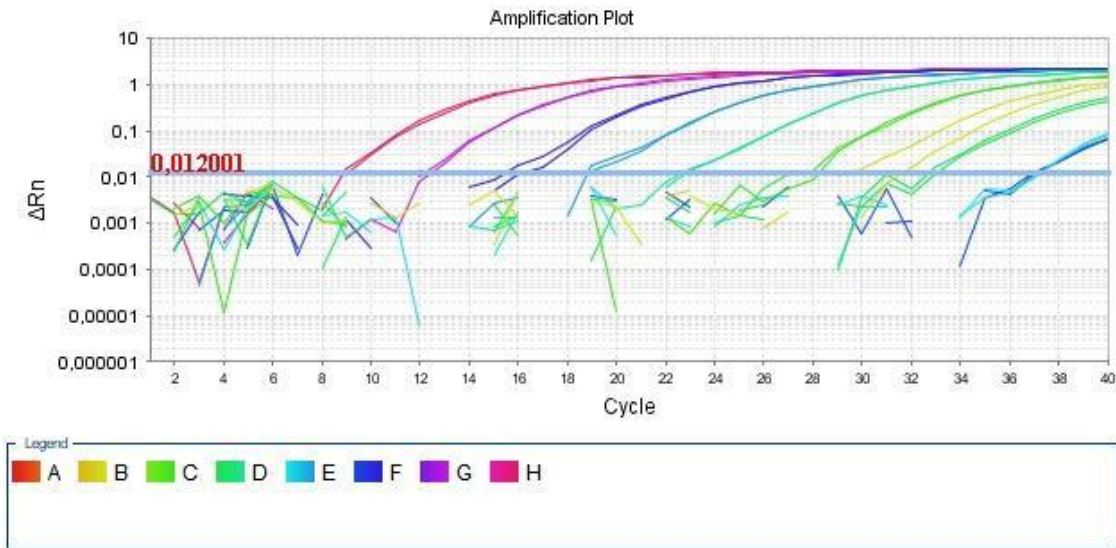
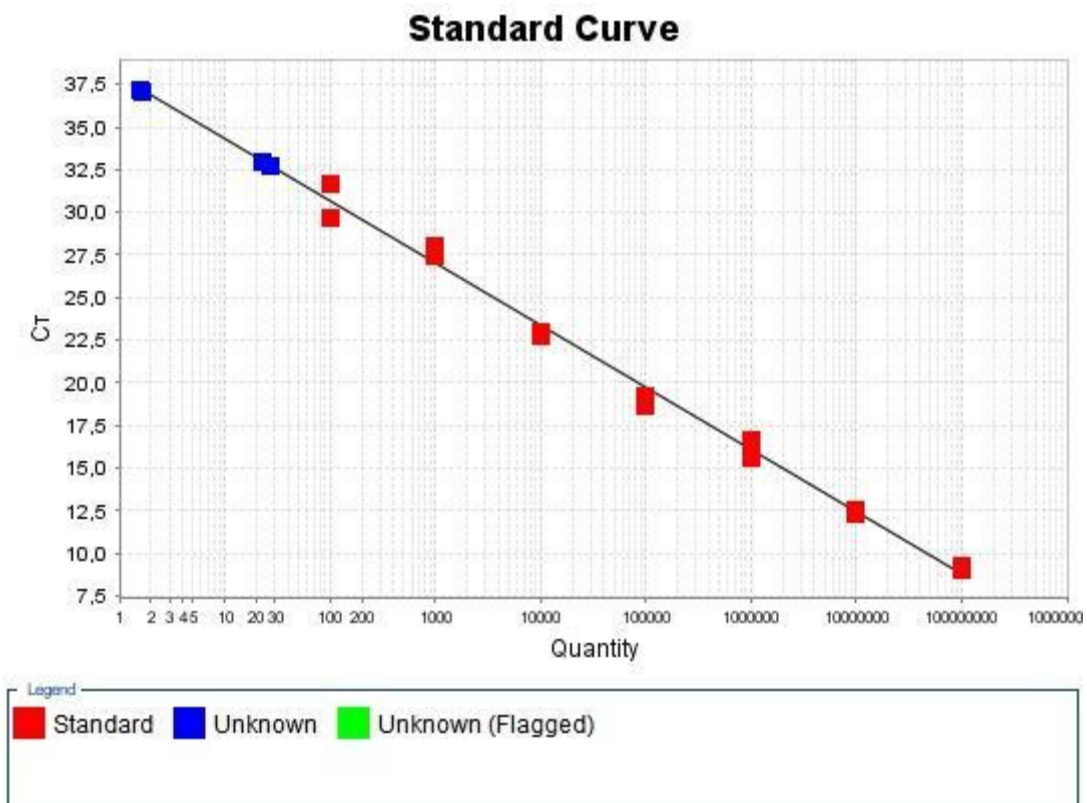


Figura 15 - Curva Standard - WSSV



Fonte: Elaboração própria.

Figura 16 - Plot dos Multicomponentes - WSSV.

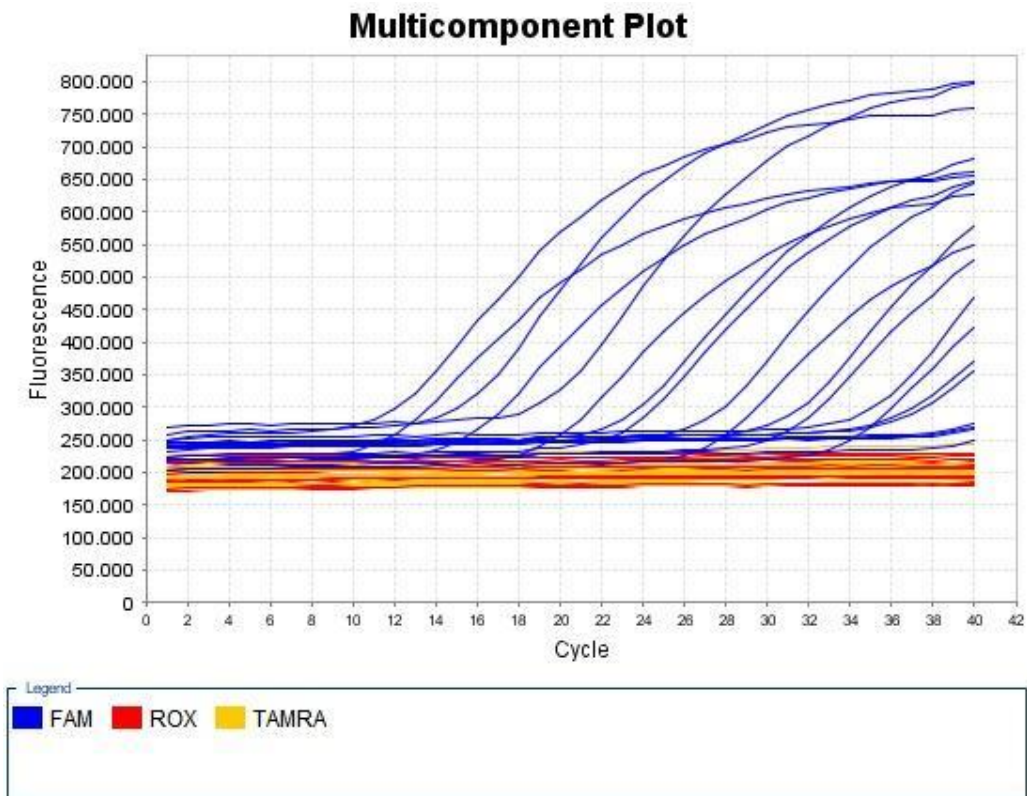
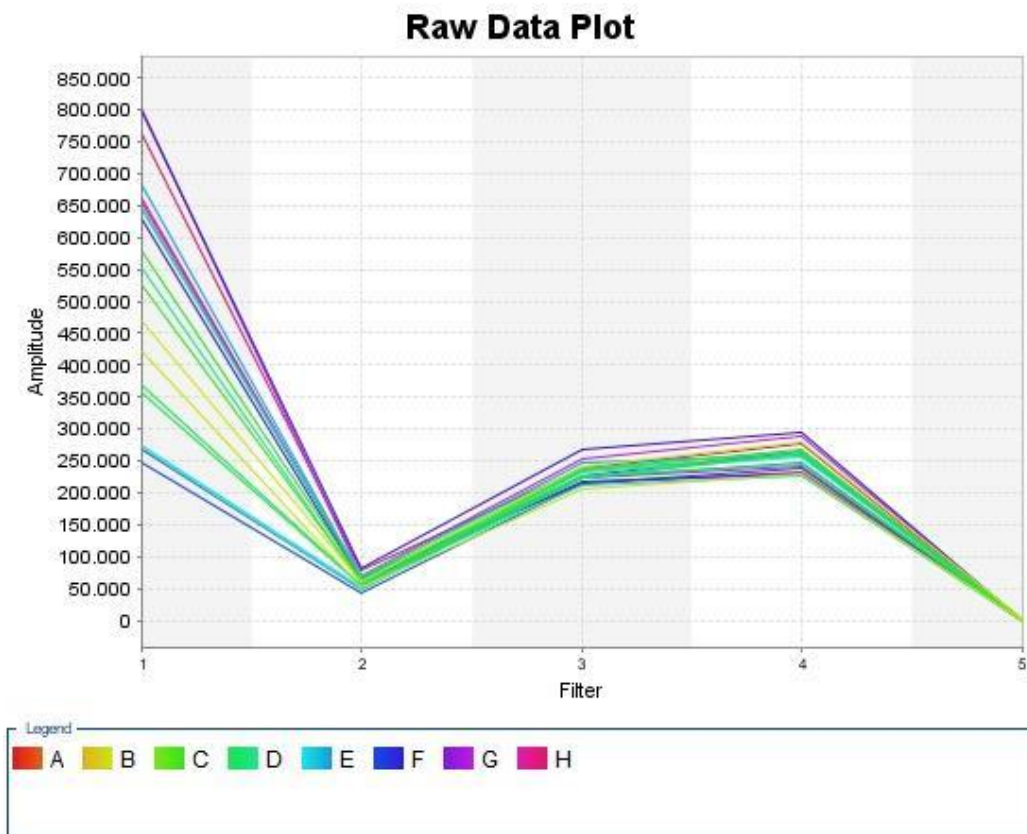


Figura 17 - Plot Raw Data - WSSV



Fonte: Elaboração própria.



### APÊNDICE F - PCR EM TEMPO REAL – qPCR IMNV

Figura 18 - Amplificação do Plot - IMNV.

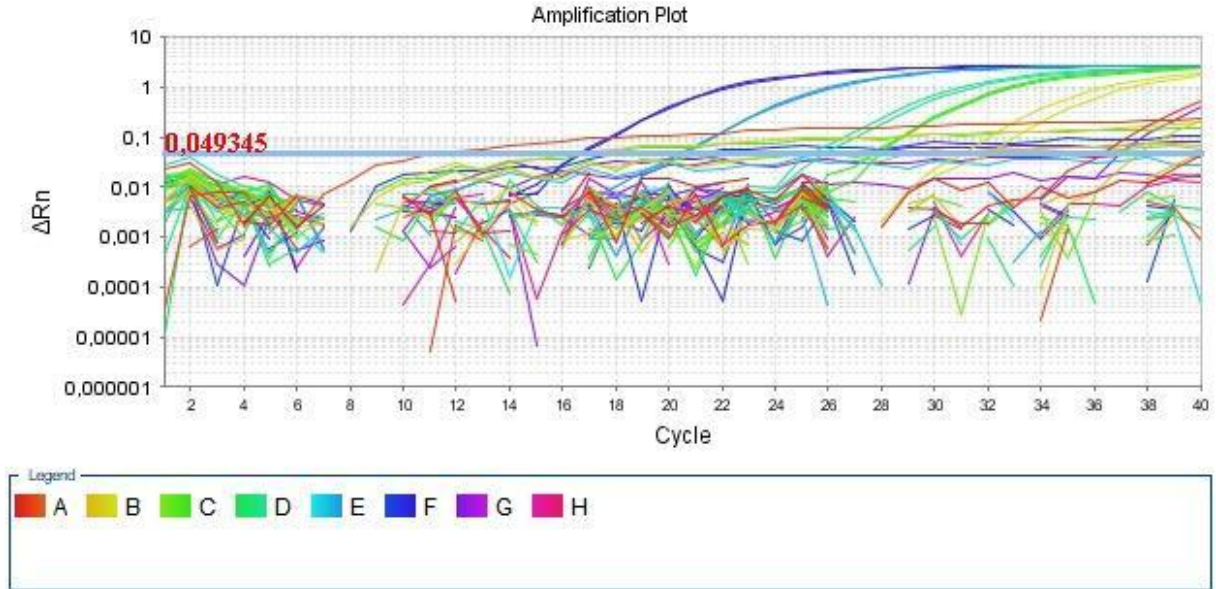
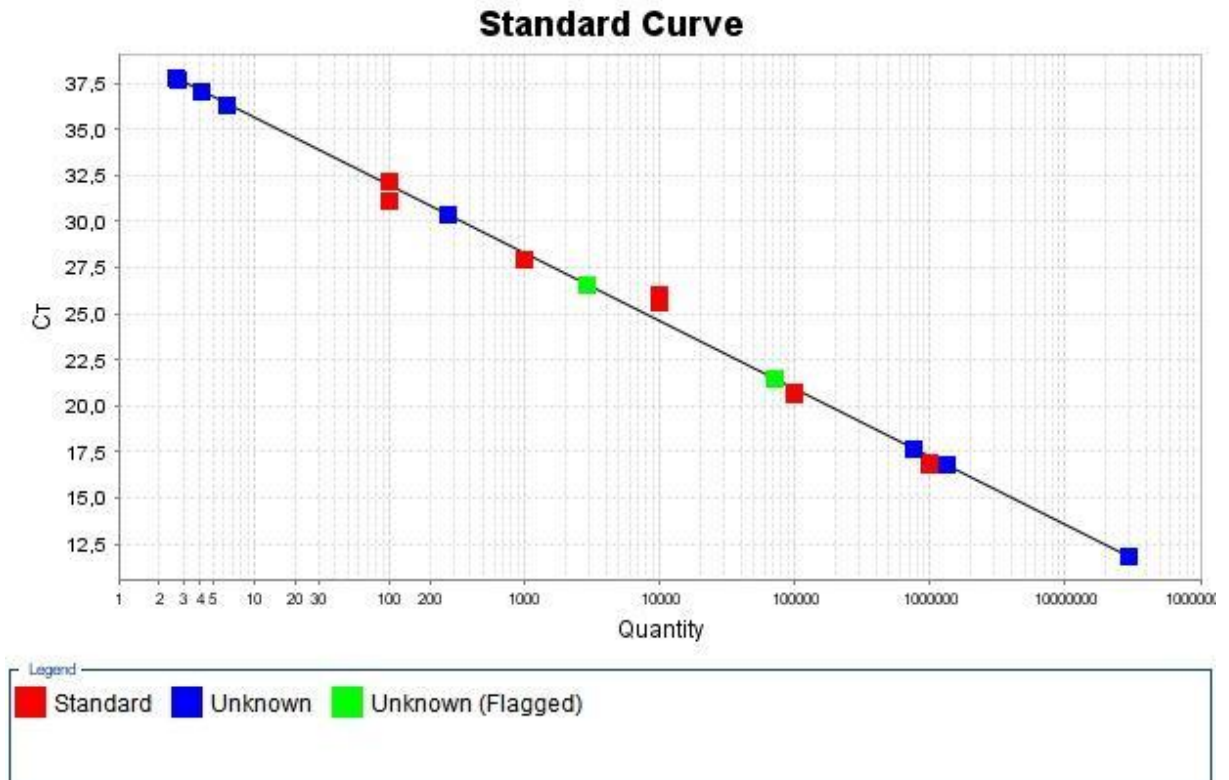


Figura 19 - Curva Standard - IMNV.



Fonte: Elaboração própria.

Figura 20 - Plot dos Multicomponentes - IMNV.

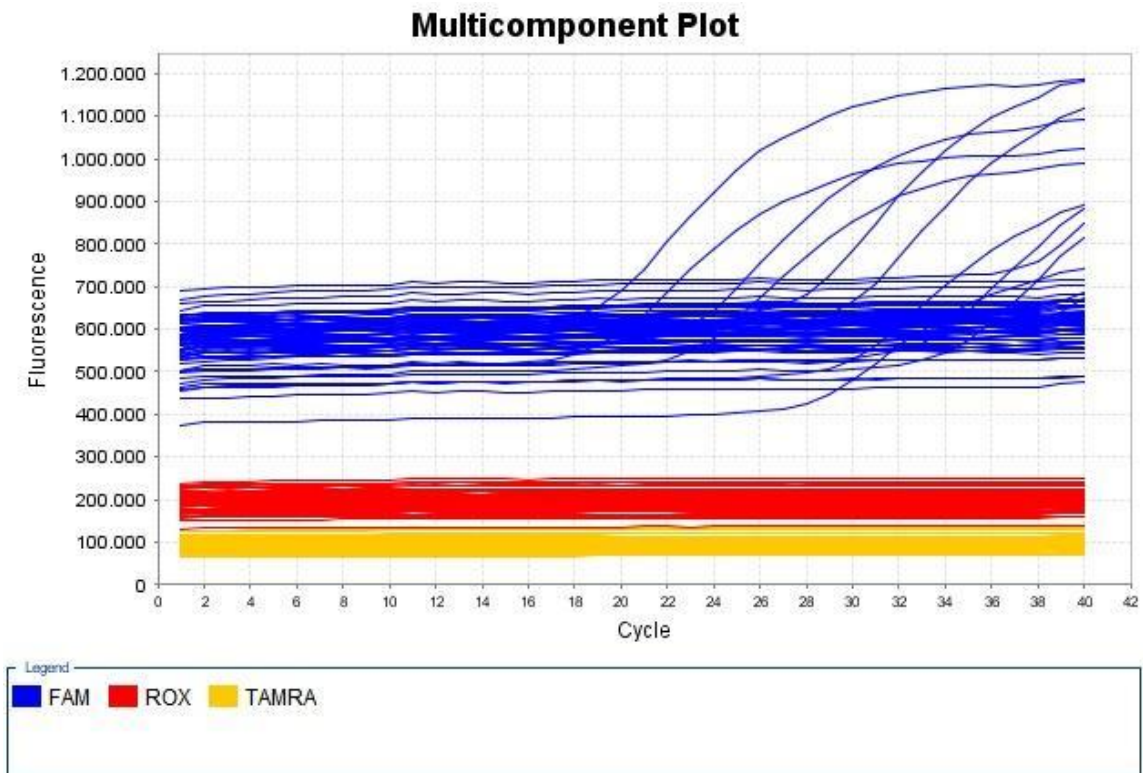
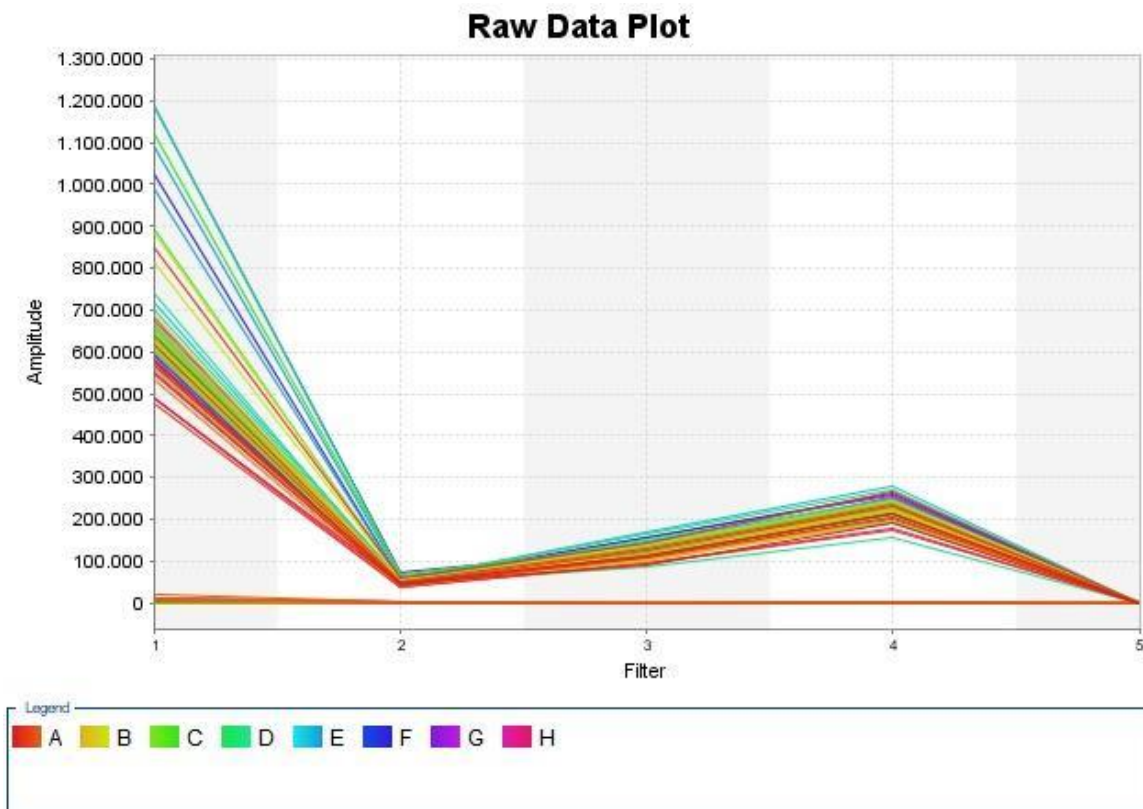


Figura 21 - Plot Raw Data - IMNV.



Fonte: Elaboração própria.

## APÊNDICE G - PCR EM TEMPO REAL – qPCR IHHNV

Figura 22 - Amplificação do Plot - IHHNV.

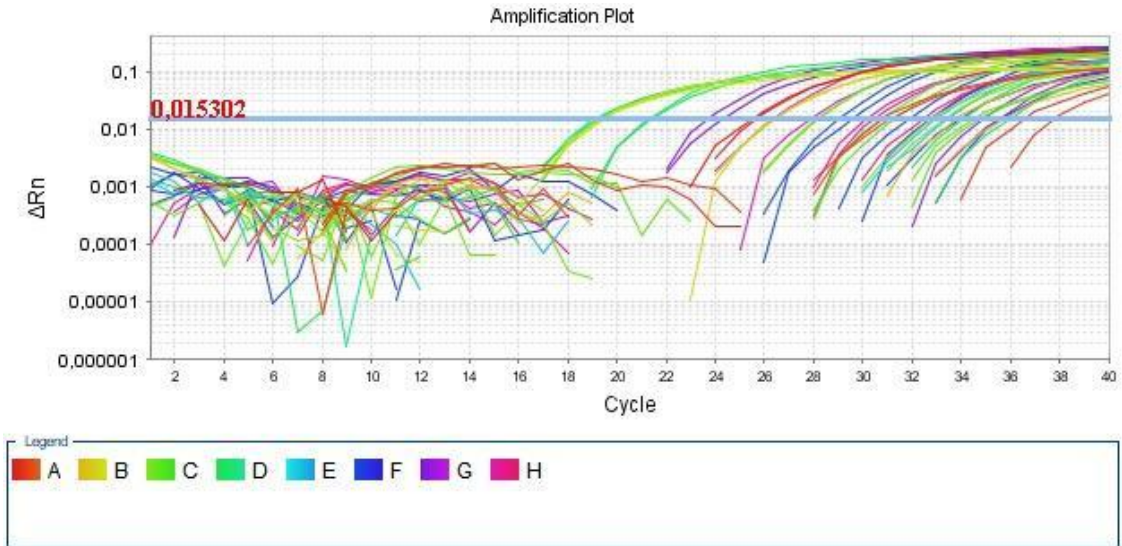
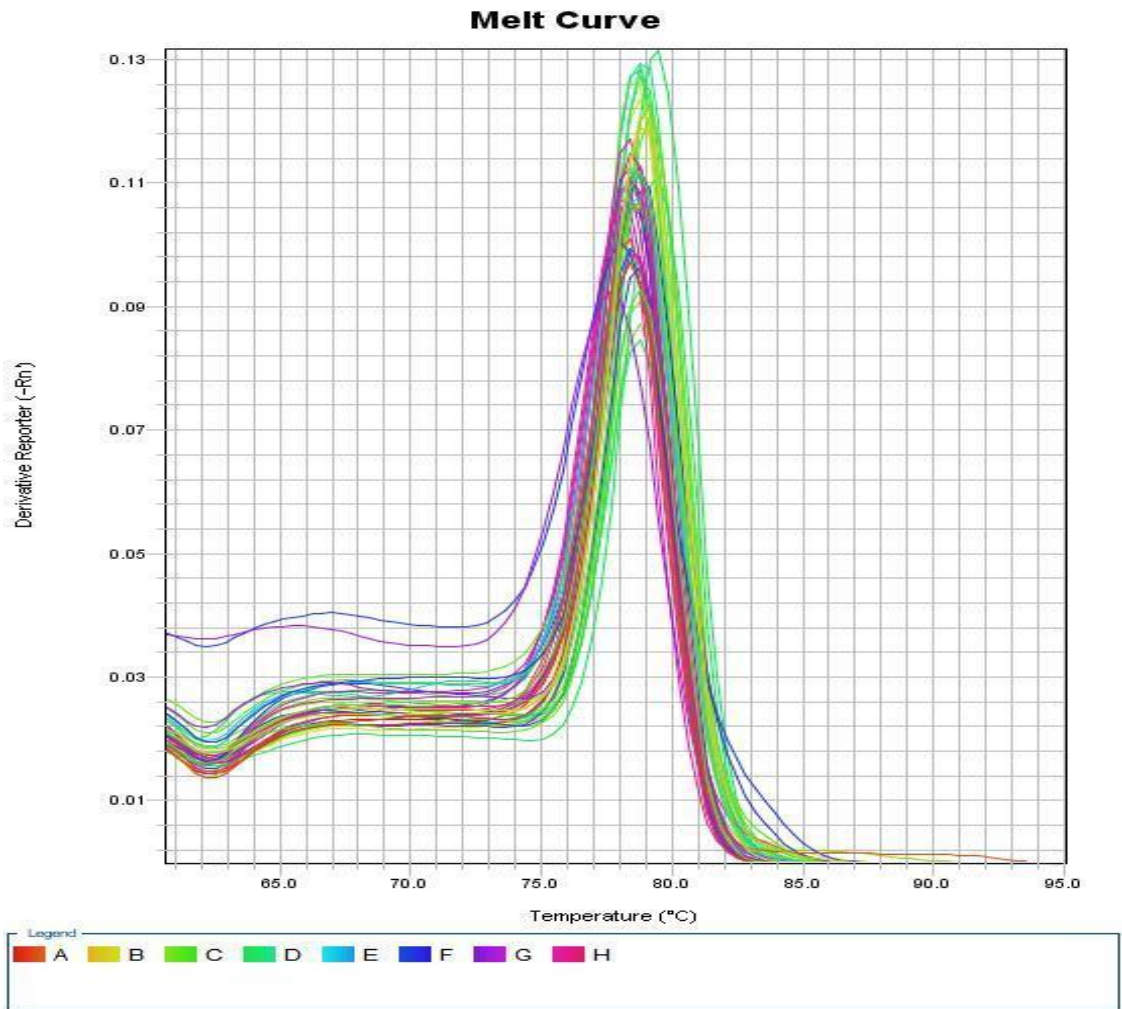


Figura 23 - Curva Standard - IHHNV.



Fonte: Elaboração própria.

Figura 24 - Plot dos Multicomponentes - IHHNV.

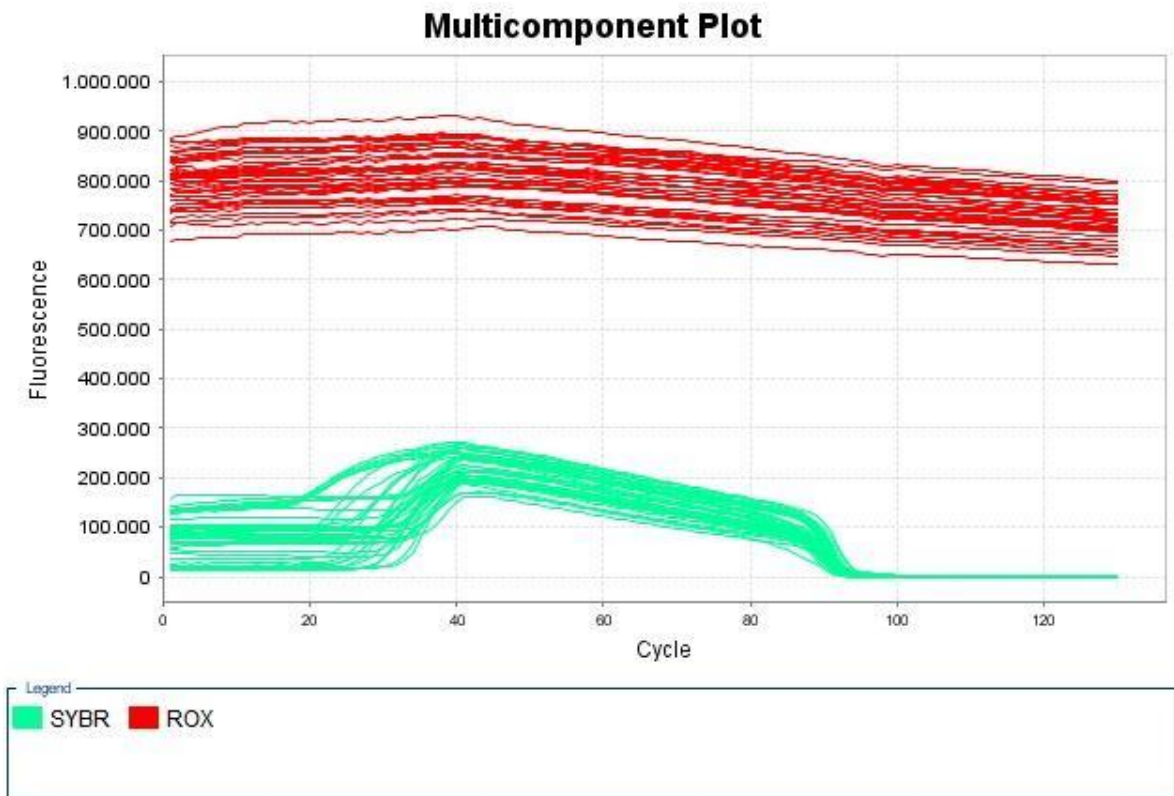
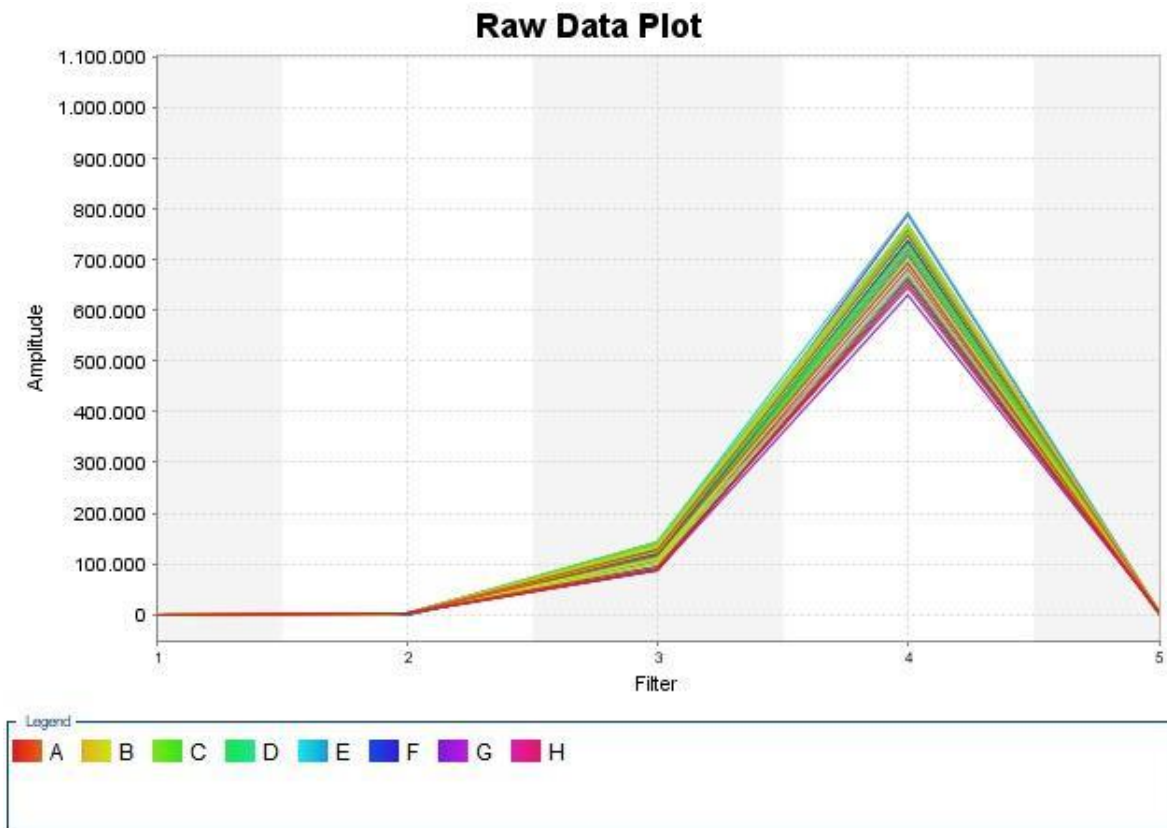


Figura 25 - Plot Raw Data - IHHNV.



Fonte: Elaboração própria.

## APÊNDICE H - PCR EM TEMPO REAL – qPCR NHP

Figura 26 - Amplificação do Plot - NHP.

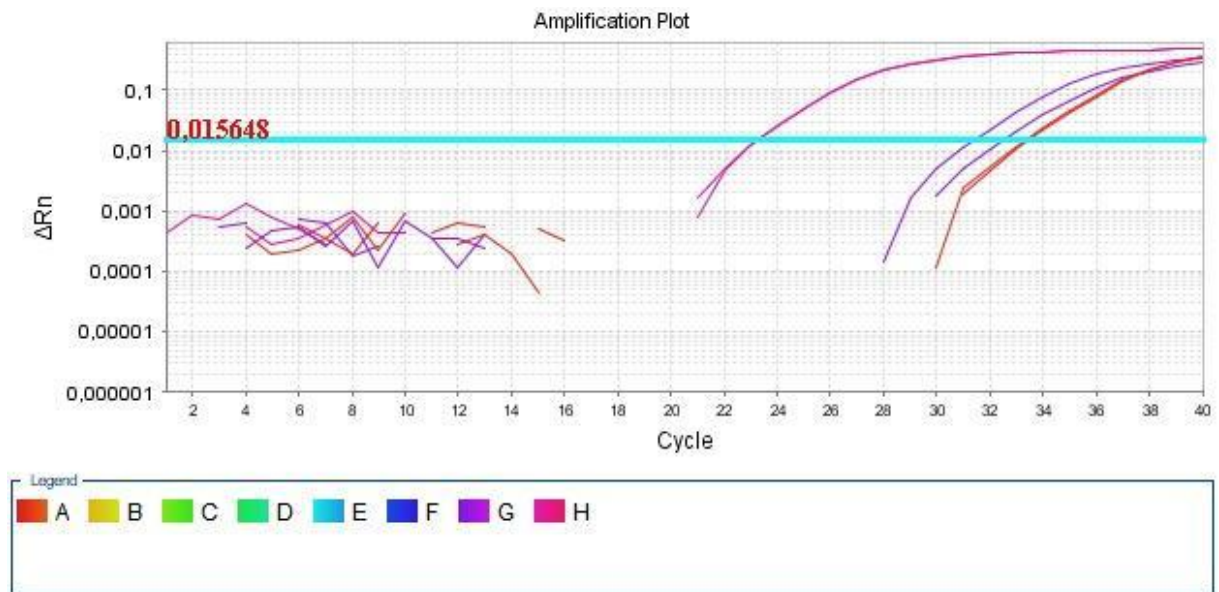
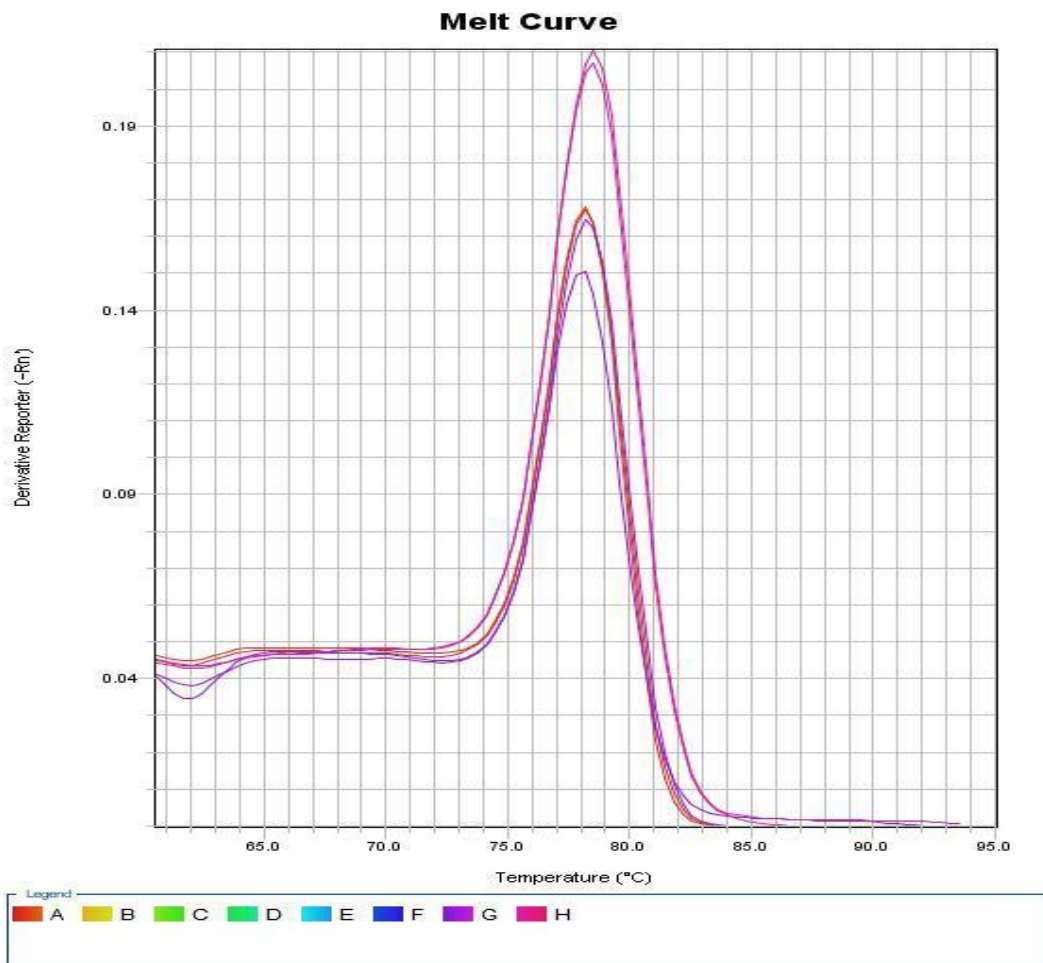


Figura 27 - Curva Standard - NHP.



Fonte: Elaboração própria.

Figura 28 - Plot dos Multicomponentes - NHP.

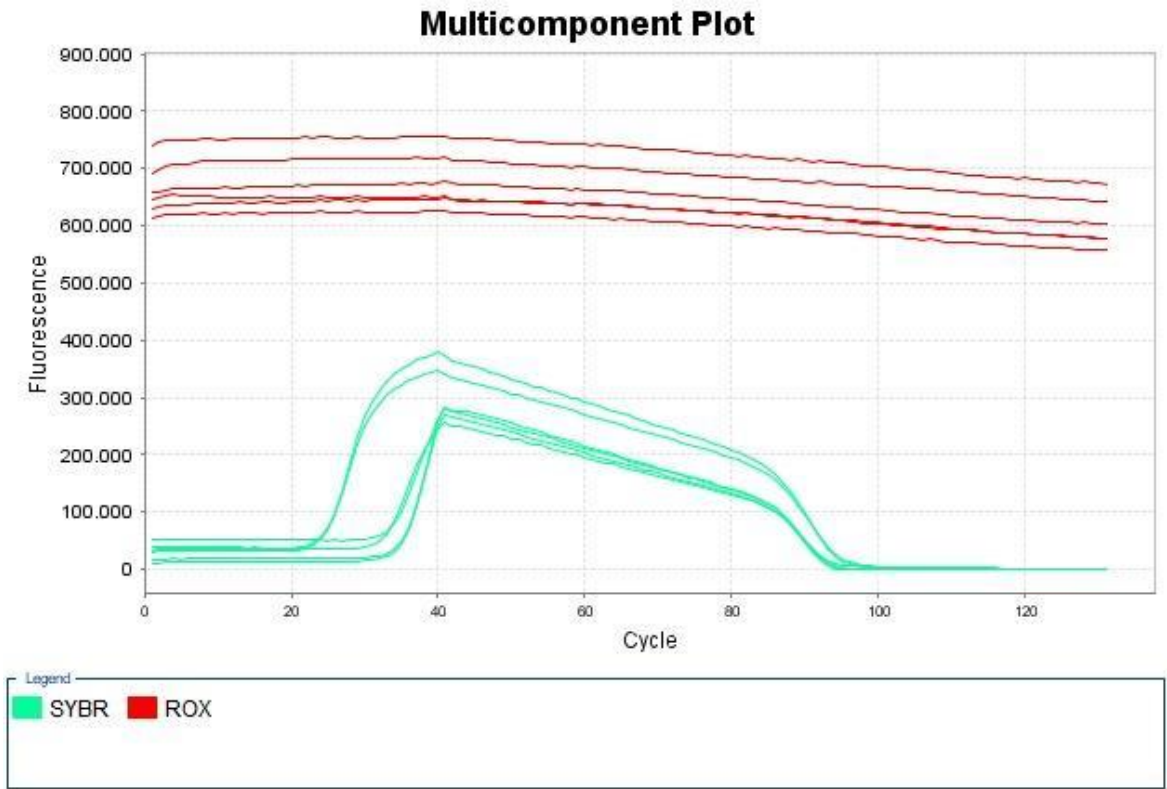
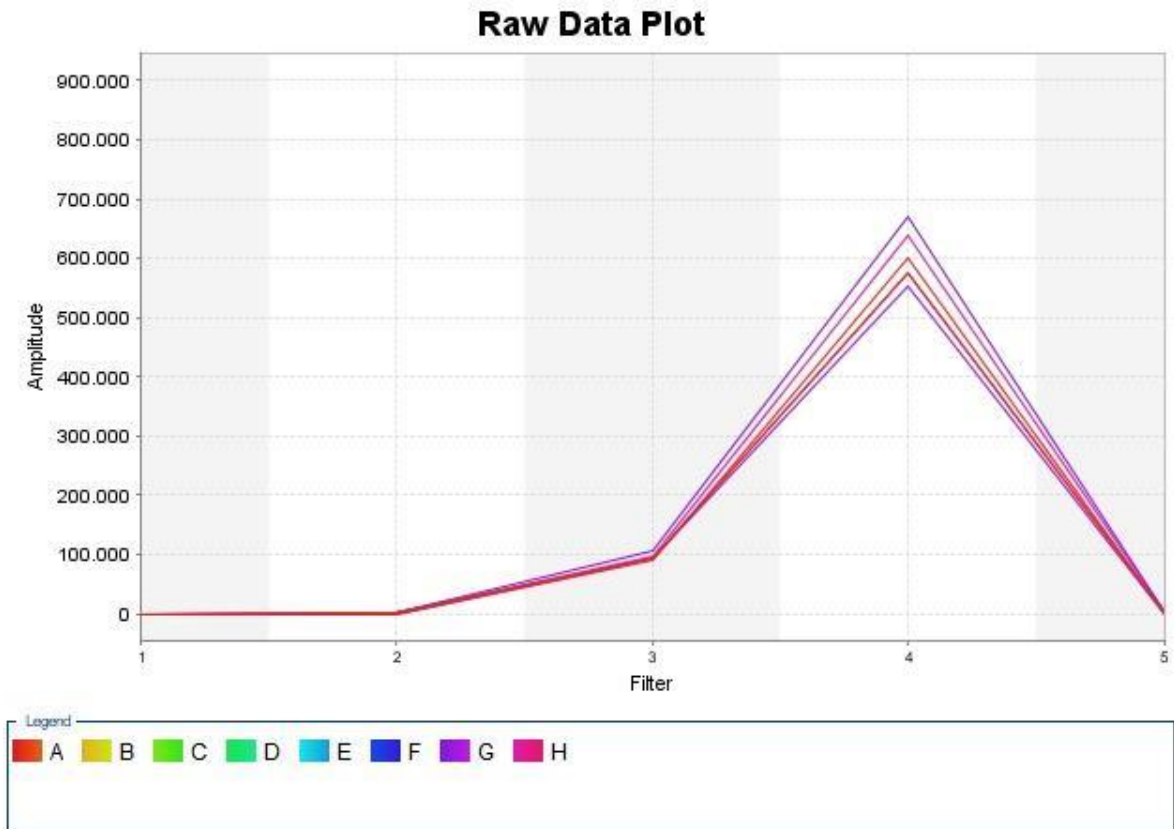


Figura 29 - Plot Raw Data - NHP.



Fonte: Elaboração própria.