



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PESCA

PEDRO ANDERSON DE PAIVA DOS SANTOS

CARACTERIZAÇÃO DE POSSÍVEIS SÍTIOS POLIMÓRFICOS NO VÍRUS DA
MIONECROSE INFECCIOSA (IMNV), PATÓGENO DO CAMARÃO *Litopenaeus*
vannamei

FORTALEZA

2022

PEDRO ANDERSON DE PAIVA DOS SANTOS

CARACTERIZAÇÃO DE POSSÍVEIS SÍTIOS POLIMÓRFICOS NO VÍRUS DA
MIONECROSE INFECCIOSA (IMNV), PATÓGENO DO CAMARÃO *Litopenaeus*
vannamei

Monografia apresentada ao Departamento de
Engenharia de Pesca da Universidade Federal
do Ceará, como requisito parcial à obtenção do
título de Bacharel em Engenharia de Pesca.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Maggioni.

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)

- S237c Santos, Pedro Anderson de Paiva dos.
Caracterização de possíveis sítios polimórficos no vírus da mionecrose infecciosa (Imnv), patógeno do camarão *Litopenaeus Vannamei* / Pedro Anderson de Paiva dos Santos. – 2022.
48 f. : il. color.
- Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Curso de Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2022.
Orientação: Prof. Dr. Rodrigo Maggioni.
1. Carcinicultura. 2. Vírus. 3. Polimorfismo. I. Título.

CDD 639.2

PEDRO ANDERSON DE PAIVA DOS SANTOS

CARACTERIZAÇÃO DE POSSÍVEIS SÍTIOS POLIMÓRFICOS NO VÍRUS DA
MIONECROSE INFECCIOSA (IMNV), PATÓGENO DO CAMARÃO *Litopenaeus*
vannamei

Monografia apresentada ao Departamento
de Engenharia de Pesca da Universidade
Federal do Ceará, como requisito parcial
à obtenção do título de Bacharel em
Engenharia de Pesca.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Maggioni.

Aprovada em: 15/07/2022

BANCA EXAMINADORA

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

Dr. Rafael dos Santos Rocha
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dra. Francisca Gleide Rodrigues de Menezes
Universidade Federal do Ceará (UFC)

M. Sc. Juliana Oliveira de Freitas
Universidade Federal do Ceará (UFC)

“A verdadeira motivação vem de realização, desenvolvimento pessoal, satisfação no trabalho e reconhecimento” (Frederick Herzberg).

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por sempre ter me dado forças para nunca desistir.

Agradeço a meus pais Angela de Paiva e Paulo Francinildo por sempre terem ficado ao meu lado durante toda a graduação. Ao meu irmão Paulo Angelo que me ajudou sempre, me aconselhando.

Aos professores do departamento por todo o conhecimento e apoio que deram durante toda a minha caminhada, principalmente ao Prof. Rodrigo Maggioni meu orientador, ao Dr. Rafael Rocha que me ajudou bastante e a Prof. Silvana Saker que me aconselhou e me ajudou a me encontrar no curso.

Aos meus amigos que estiveram do meu lado durante toda minha graduação, em especial o Davi Cerqueira que me ajudou durante todos esses anos, a Carolina Tibúrcio e a Raysa Sena.

E agradeço a UFC pelo apoio financeiro durante minha graduação, sem ele não conseguiria ter me formado.

RESUMO

A carcinicultura é umas das áreas que mais cresce na aquicultura nos últimos anos. Devido a demanda a necessidade de uma alta densidade de estocagem para aumentar a produção se tornou necessário, junto com as mudanças climáticas, diferentes temperaturas e mudanças no pH, começou a ocorrer o aparecimento de patógenos, devido a baixa imunidade dos camarões nesse estado adverso. Dentre esses patógenos, o IMNV (Vírus da Mionecrose Infecciosa) vem causando perdas econômicas na carcinicultura, tanto no Brasil país de origem da doença como na Indonésia. Esses dois países mostraram possuir sequências diferentes do genoma do vírus, e os *primers* sugeridos pela OIE / WOAHA não conseguem identificar todas essas sequências, acabando gerando falsos negativos. Estes acontecem devido a presença de polimorfismos nas sequências existentes quando comparado com a sequência original, devido os *primers* não conseguirem se anelarem com as amostras testadas. Sendo assim o objetivo do trabalho foi realizar o alinhamento entre as sequências depositadas no banco de dados do Genbank com os *primers* sugeridos pela OIE / WOAHA para ver a compatibilidade das sequências com os *primers* e ver qual região é a melhor para realizar as análises polimórficas para ser possível identificar a qual variante cada amostra testada pertence. Com isso utilizando a técnica de PCR *in silico* foi possível comprovar que somente um dos pares de primers indicados consegue se alinhar com todas as sequências depositadas no Genbank, mas não podendo ser utilizado para diferenciar as sequências entre si. Com isso foi escolhido uma região que apresentava o maior número de sítios polimórficos para ser desenhado um par de *primer* que fosse capaz de identificar o vírus e ser utilizado como avaliação dos sítios polimórficos dentro do genoma do IMNV para realizar a diferenciação das sequências.

Palavras Chaves: Carcinicultura; Vírus; Polimorfismo.

ABSTRACT

Shrimp farming is one of the fastest growing areas in aquaculture in recent years. Due to demand, the need for a high stocking density to increase production became necessary, along with climate change, different temperatures and changes in pH, pathogens began to appear, due to the low immunity of shrimp in this adverse state. Among these pathogens, IMNV (Infectious Myonecrosis Virus) has been causing economic losses in shrimp farming, both in Brazil, the country of origin of the disease, and in Indonesia. These two countries were shown to have different sequences of the virus genome, and the primers suggested by the OIE / WOAHA cannot identify all these sequences, resulting in false negatives. These happen due to the presence of polymorphisms in the existing sequences when compared to the original sequence, due to the primers not being able to anneal with the samples tested. Therefore, the objective of the work was to perform the alignment between the sequences deposited in the Genbank database with the primers suggested by the OIE / WOAHA to see the compatibility of the sequences with the primers and to see which region is the best to perform the polymorphic analysis for be possible to identify to which variant each tested sample belongs. With this, using the *in silico* PCR technique, it was possible to prove that only one of the indicated primer pairs can align with all the sequences deposited in Genbank, but cannot be used to differentiate the sequences from each other. Thus, a region that had the highest number of polymorphic sites was chosen to design a primer pair capable of identifying the virus and to be used as an evaluation of the polymorphic sites within the IMNV genome to perform the sequence differentiation.

Keywords: Shrimp Farming; Vírus; Polymorphism

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fluxograma metodológico de trabalho.....	19
Figura 2 – PCR in sílico do 1º passo da PCR convencional	24
Figura 3 – PCR in sílico do 2º passo da PCR convencional.	27
Figura 4 – PCR em tempo real in sílico.....	32
Figura 5 – Alinhamento sonda IMNV.....	35
Figura 6 – Desenho do <i>primer</i> (Primer3 Plus)	37
Figura 7 – Alinhamento 2º passo PCR convencional.	38
Figura 8 – PCR in silico <i>primer</i> teste	40
Figura 9 – Alinhamento do novo <i>primer</i>	43

LISTA DE QUADRO

Quadro 1 – *Primers* da OIE / WOAH utilizados no teste.

21

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sequências genômicas obtidas.

23

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

RNA	Ácido Ribonucleico
pH	Potencial Hidrogeniônico
IMNV	Vírus da Mionecrose Infecciosa
WSSV	Vírus da Mancha Branca
IHHNV	Vírus da Infecção Hipodermal e Necrose Hematopoiética
OIE / WOA / WOA	Organização Mundial da Saúde Animal
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
pb	Pares de Base
ISH	Hibridização in situ

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 Aquicultura	15
2.2 Patógenos Virais em Camarões Peneídeos	15
2.3 Vírus da Mionecrose Infecciosa (IMNV)	16
2.4 Diagnóstico Viral do IMNV	17
2.5 Polimorfismo	17
3 MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1 Fluxograma Metodológico	19
3.2 Obtenção das Sequências Genômicas	19
3.3 Teste de Especificidade dos <i>primers</i> OIE / WOA	20
3.3.1 PCR	20
3.3.2 <i>qPCR</i>	20
3.4 Avaliação dos Sítios Polimórficos	21
3.5 Desenho de <i>Primer</i>	21
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
4.1 Sequências Genômicas Analisadas	22
4.2 Alinhamento com <i>primers</i> sugeridos pela OIE / WOA/WOA	22
4.2.1 <i>Primer q-PCR (Convencional)</i>	22
4.2.2 <i>Primers qRT-PCR (em tempo real) e Sonda</i>	30
4.3 Sítios Polimórficos	36
4.4 Desenho de <i>Primer</i>	36
5 CONCLUSÃO	45
REFERÊNCIAS	46

1 INTRODUÇÃO

Devido à grande exploração dos recursos naturais pesqueiros, não dando tanta importância para esse recurso, ocorreu que com o passar dos anos a produção oriunda da pesca se estagnou, por conta da diminuição da população dos pescados (FAO, 2020). Por conta desse declínio se viu a necessidade de novos métodos para se ter a disponibilidade de proteína animal oriunda do pescado (JIANG, 2010). Com isso a aquicultura que já era um método de cultivo de organismos aquáticos utilizado, mas sem muito investimento, teve avanços em técnicas de reprodução de algumas espécies se tornando um novo meio de adquirir proteína animal de pescado, devido à diminuição do estoque pesqueiro (WALDIGE; CASEIRO, 2004).

Com o avanço da aquicultura, principalmente da carcinicultura que vem tendo um dos maiores crescimentos produtivos nas últimas décadas, veio sofrendo nos últimos anos um crescimento mais lento na sua produção por crises causadas por patógenos, principalmente vírus e bactérias (ORMOND, 2004; FENG *et al.*, 2020). O camarão branco, *Litopenaeus vannamei*, é o camarão mais utilizado na carcinicultura mundial, chegou ao Brasil na década de 80 e desde então vem sendo o camarão mais cultivado no país, isso se deu graças aos avanços nas técnicas de cultivo da espécie (LIMA, 2007).

Por conta de mudanças ambientais que vem ocorrendo nos últimos anos, mudanças de temperatura, pH na água de cultivo e devido à alta densidade de estocagem que estavam sendo utilizadas, o aparecimento de patógenos em fazendas de cultivo por conta da imunidade baixa dos camarões causada por esses fatores, começaram a ser confirmados (ROCHA, 2008).

O IMN (Mionecrose Infecciosa), causada pelo vírus do IMNV (Vírus da Mionecrose Infecciosa), vem gerando perdas econômicas na produção da carcinicultura, com mortalidade de 30 a 70% (LIGTHNER, 2012). O vírus causador do IMN foi descoberto numa fazenda de cultivo de camarão no Brasil, no ano de 2004, após uma grande taxa de mortalidade que ocorreu nessa fazenda (LIGTHNER *et al.*, 2004a,b).

Anos depois o vírus que estava causando perdas econômicas nas fazendas do Brasil, teve seu primeiro registro na Indonésia, possivelmente devido compras de matrizes ilícitas adquiridas de fazendas brasileiras, a partir de uma análise do sequenciamento desse vírus na Indonésia, foi confirmado uma semelhança com a linhagem do vírus brasileiro (SENAPIN *et al.*, 2007).

Com o passar dos anos, novas linhagens foram sendo descobertas, a partir de análises de sequenciamento em amostras que mostravam os sinais clínicos da doença, mas que com os *primers* indicados pela IOE acabavam não identificando esse vírus (DANTAS *et al.*,

2015; MAI *et al.*, 2019; ANDRADE *et al.*, 2022).

Com isso, o presente trabalho tem como objetivo geral identificar uma região que seja capaz de realizar a avaliação de polimorfismo no genoma do IMNV. Sendo assim, foram delineados como objetivos específicos: (i) fazer uma revisão da eficácia dos *primers* sugeridos pela OIE / WOAHP na identificação do IMNV, (ii) comparar cada sequência depositada no GenBank e (iii) sugerir uma reformulação dos *primers* ou a criação de um novo par de *primers* que sejam eficientes em todas as linhagens depositadas atualmente no GenBank.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aquicultura

A aquicultura vem crescendo no mundo durante os anos, se tornando a maior fonte da proteína de organismo aquático, após o declínio da produção oriunda da pesca. A carcinicultura, uma de suas vertentes, se tornou uma das áreas mais produtivas, com 9,3 milhões de toneladas produzidas no ano de 2018 (FAO, 2020). Isso se tornou possível por conta da implementação do camarão branco do pacífico na carcinicultura, por conta das suas características e das tecnologias e técnicas de manejo existente, que fizeram com que o camarão branco se tornasse o camarão mais cultivado no mundo todo (NATORI *et al*, 2011).

Com sua chegada no Brasil na década de 80 e ao se ter um controle da sua reprodução e da larvicultura, o camarão branco nos anos seguinte logo se tornou o mais utilizado nas fazendas de camarão, com um foco maior no Nordeste onde se tem a maior produção de camarão nacional desde então (MOLE; BUNGE, 2003; IBGE, 2017). Isso se deu graças ao êxito do cultivo do mesmo em países vizinhos como o Equador e Panamá e por conta da sua adaptação ao ambiente (ROCHA, 2011).

Com o aumento da produção do camarão nos anos seguintes, os produtores se viram com a necessidade de aumentar sua densidade de estocagem, por conta do aumento da demanda do produto no mercado. Com esse aumento da densidade de estocagem e as mudanças climáticas, variação da temperatura e do pH, que começaram a ocorrer nos anos seguintes as aparições de patógenos nas fazendas de camarão foram sendo notificadas, principalmente oriundas de vírus e bactérias (FENG *et al.*, 2020).

2.2 Patógenos Virais em Camarões Peneídeos

Na carcinicultura existem patógenos que vem acometendo os cultivos em todo o mundo, dentre eles se tem conhecimento de vírus, fungos, bactérias e alguns parasitas que vem trazendo grandes perdas econômicas nos últimos anos em cultivos mundiais (ZORRIEHZAHRA; BANADERAKHSAN, 2015).

Dentre esses patógenos temos o vírus da mancha branca (WSSV) que vem causando perdas econômicas no cultivo de camarão da família peneídeos, com sinais clínicos como falta de apetite, letargia e manchas brancas no corpo, gerados por acúmulo de cálcio, nesse caso, embora sendo um sinal clinico da doença a mancha branca no corpo do camarão não pode está

sendo utilizado como uma forma de comprovar a presença do vírus, sendo necessário realizar análises histopatológicas e PCR (SANTOS *et al.*, 2013).

O Vírus da Infecção Hipodermal e Necrose Hematopoiética (IHHNV) infecta espécies de camarões peneídeos selvagens e de cultivos, com sinais clínicos como rostos deformados, carapaça áspera entre outras deformidades no camarão. As técnicas utilizadas para diagnóstico do vírus são PCR, PCR em tempo real, hibridização *in situ* e “dot-blot” (BELL & LIGHTNER, 1988; LIGHTNER, 1996a; LIGHTNER *et al.*, 1992; TANG & LIGHTNER, 2001).

2.3 Vírus da Mionecrose Infecciosa (IMNV)

Uma das principais doenças que acometem a carcinicultura é a IMN, que tem como seu patógeno o IMNV, um vírus de RNA de dupla fita, que é formado por duas ORF's (ORF-1 e ORF-2), que faz parte da família Totiviridae (NIBERT, 2007; POULOS *et al.*, 2006). Essa doença causa necrose no músculo esquelético, principalmente na parte caudal e abdominal do camarão (LIGHTNER, 2012). Além de acometer o camarão branco, os camarões *Litopenaeus stylirostris* e *Penaeus monodon* são susceptíveis ao IMNV (TANG *et al.*, 2005).

Esse vírus vem trazendo perdas econômicas e mortalidade de 40 a 70% em fazendas de camarão, principalmente no Nordeste brasileiro e na Ásia (LIGHTNER, 2012). Estima-se que essa doença tenha causado perdas econômicas maiores de 60 milhões de dólares, afetando empresários, trabalhadores da área e indústrias associadas a esse produto (ASCHE *et al.*, 2020, FONSECA & SILVA, 2021; SILVA *et al.*, 2015; VALENTI *et al.*, 2021).

Com seu aparecimento no Nordeste brasileiro em 2004, a IMN foi registrado no ano de 2007 na Indonésia, após alguns camarões moribundos apresentarem sinais clínicos de necrose no músculo caudal (ANDRADE *et al.*, 2007; LIGHTNER *et al.*, 2004a,b; SENAPIN *et al.*, 2007).

Ainda não se sabe com total certeza como o IMNV chegou na Ásia, mas pesquisadores supõem que chegaram camarões ilícitos no território vindo do Brasil infectados com o vírus, se tem essa hipótese por conta da semelhança da sequência do IMNV encontrado na Indonésia com a do Brasil (LIGHTNER, 2012; SENAPIN *et al.*, 2007; WALKER & WINTON, 2010). Com o passar dos anos novas sequências foram sendo descobertas, tanto no Brasil como na Indonésia, sendo essas possíveis serem descobertas por conta da incompatibilidade das mesmas ao serem analisadas com os *primers* sugeridos pela OIE / WOA (MAI *et al.*, 2019).

2.4 Diagnóstico Viral do IMNV

O Vírus da Mionecrose Infecciosa é diagnosticado a partir de diferentes técnicas como q-PCR, Histologia, Hibridização *in situ* (ISH), sendo a PCR o método de diagnóstico mais utilizado na detecção dessa doença (LAURIN *et al.*, 2018).

Existem alguns tipos de PCR, como a PCR que é a PCR convencional e a q-PCR que é a PCR em tempo real, um dos métodos mais utilizados, por conta da capacidade de saber dados tanto qualitativos como quantitativos do vírus em amostras testadas, não necessitando de eletroforese após a PCR, como ocorre na PCR, em que se torna necessário realizar duas PCR diferentes e uma eletroforese para confirmação da presença do vírus na amostra (POULOS & LIGHTNER, 2005; VALASEK & RIPA, 2005; VAN GUILDER *et al.*, 2008).

Ao utilizarem a PCR em amostras, observaram a presença de falsos negativos quando utilizados os *primers* sugeridos pela OIE / WOAHA em algumas sequências armazenadas no GenBank que apresentavam sinais clínicos da doença, mas ao se realizarem o teste da PCR dava negativo, por conta de polimorfismos a nível nucleico sofrido nas sequências (WALKER; COWLEY, 2000).

2.5 Polimorfismo

Com essa diferença geográfica e por conta de vírus de RNA terem uma maior facilidade para mutações, as sequências depositadas no GenBank mostram uma diferença polimórfica entre elas (MAI *et al.*, 2019; SANJUÁN, 2010).

Há dois tipos de substituição em sequências de nucleotídeos, o primeiro quando ocorre uma transição, em que há uma troca de uma purina com outra purina (A com G ou vice-versa) ou uma pirimidina com outra pirimidina (C com T ou vice-versa). O outro tipo é a transversão, quando ocorre uma troca entre uma purina com uma pirimidina ou vice-versa, sendo que essa segunda pode ser mais propícia a gerar uma mutação por conta da troca entre purina e pirimidina, gerando uma proteína diferente (SHASTRY, 2007).

Além do polimorfismo poder tornar um vírus mais potente, dificultar sua identificação a partir da PCR, por conta dos *primers* utilizados se ligarem durante a etapa de anelamento e ter polimorfismo o mesmo não consegue se ligar, interrompendo assim a ligação, não gerando a área de interesse no processo, podendo dar um falso negativo ao teste de PCR (POULOS; LIGHTNER, 2005).

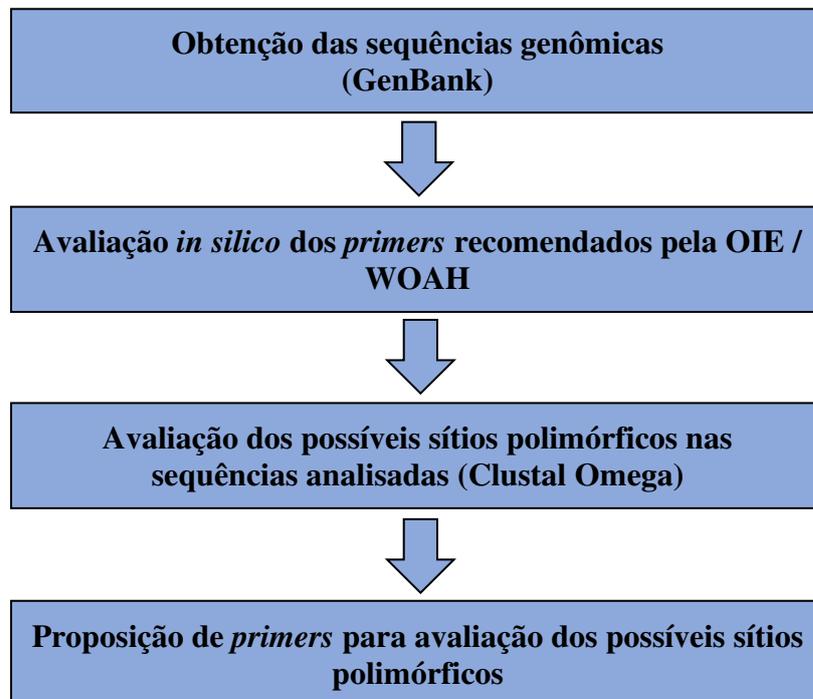
Dentro dessa problemática, surge ainda um agravamento pela ocorrência de variantes virais, as quais influenciam nas características estruturais dos vírus e causam modificações também nos aspectos patogênicos, como reconhecimento celular e infectividade (KWOK *et al.*, 2020; ZHENG; XU; LIU, 2019). Em relação ao IMNV ainda não foi comprovada a presença de uma nova variante, quando ocorre uma ou mais mutações em sequências genéticas, só existem suposições de possíveis variantes, com base em dados coletados de diferentes níveis de mortalidade (DANTAS *et al.*, 2015; ANDRADE *et al.*, 2022).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Fluxograma Metodológico

Para alcançar o objetivo geral do presente estudo, foi preconizado um fluxograma metodológico de trabalho, para o qual foram consideradas as etapas pertinentes à: (1) obtenção das sequências genômicas do IMNV, (2) avaliação *in silico* dos *primers* recomendados pela OIE / WOA, (3) avaliação dos possíveis sítios polimórficos nas sequências analisadas e (4) proposição de *primers* para avaliação dos possíveis sítios polimórficos determinados (Figura 1).

Figura 1 – Fluxograma metodológico de trabalho.



Fonte: O autor.

3.2 Obtenção das Sequências Genômicas

As sequências de genoma completo do IMNV foram extraídas do banco de dados genéticos do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), o *Genbank* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Na aba de pesquisa foi utilizado o filtro para sequências nucleotídicas e a busca foi feita com a expressão “*complete genome infectious myonecrosis virus*” como palavra-chave.

3.3 Teste de Especificidade dos *primers* OIE / WOA

3.3.1 PCR

Após realização do alinhamento do perfil nucleotídico foi realizado o teste dos *primers* sugeridos para a identificação do vírus do IMNV pela OIE / WOA, para saber se os mesmos são compatíveis com todas as sequências obtidas. A plataforma utilizada para realizar esses testes foi a do BLASTn (National Library of Medicine National Center for Biotechnology Information) https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome na função nucleotide BLAST. Foram testados os *primers* da PCR (Convencional) utilizados no primeiro e segundo passo da PCR (Quadro 1).

3.3.2 qPCR

Foi realizado os mesmos testes na PCR em tempo real, mas diferente da PCR convencional, nessa somente é realizado uma única PCR, porém além do par de *primers* utilizado na PCR se utiliza também uma sonda para a marcação do vírus. Os *primers* e sonda teste para a PCR em tempo real podem ser observados no Quadro 1.

Quadro 1 – *Primers* da OIE / WOA utilizados no teste.

Tipo de PCR	Primers	Sequência	Referência
PCR Convencional	Passo 1	4587F	Poulos & Lighther, (2006)
		4914R	
	Passo 2	4725NF	
		4863NR	
PCR em Tempo Real	412F	GGACCTATCATACATAGCGTT GCA	Andrade <i>et al.</i> , (2007); Poulos <i>et al.</i> , (2006)
	545R	AACCCATATCTATTGTCGCTG GAT	
	Sonda IMNVp1	CCACCTTTACTTTCAATACTAC ATCATCCCCGG	

Fonte: O autor.

3.4 Avaliação dos Sítios Polimórficos

As sequências genômicas selecionadas, em formato FASTA, foram submetidas a um alinhamento múltiplo para dados de DNA, na plataforma Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Esse alinhamento teve por finalidade descobrir as regiões nas quais houveram diferença no perfil nucleotídico (polimorfismo).

3.5 Desenho de *Primer*

Ao finalizar o alinhamento entre as sequências encontradas, foi escolhida uma região de interesse para ser utilizada no *site* Primer3Plus (<https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) para se desenhar o par de *primer*. Após o desenho o par de *primer* foi testado no *site* Primer Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) para ver a compatibilidade com as sequências utilizadas no trabalho, o intuito desse par de *primer* é que seja possível ao se realizar a PCR numa amostra identificar a qual sequência aquela amostra pertence.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Sequências Genômicas Analisadas

Foram obtidas 9 sequências genômicas a partir da consulta ao banco de dados genômicos público do GenBank/NCBI (Tabela 1). Dentre elas, 5 são sequências oriundas do Brasil (KR815474.1, AY570982.3, KJ556923.1, NC_007915. e MZ593846.1) e 4 são da Indonésia (EF061744.1, KJ636782.2, KJ636783.2 e KF836757.1). A primeira sequência completa foi depositada no ano de 2007 (Indonésia), embora a primeira aparição do vírus tenha sido no Brasil no ano de 2004.

Tabela 1 – Sequências genômicas obtidas.

Número de Acesso	País de Origem	Ano	Tamanho (pb)
EF061744.1	Indonésia	2007	7561
KR815474.1	Brasil	2009	8226
KJ636782.2	Indonésia	2011	8230
KJ636783.2	Indonésia	2012	8226
KF836757.1	Indonésia	2014	8226
AY570982.3	Brasil	2014	8226
KJ556923.1	Brasil	2014	8226
NC_007915.3	Brasil	2018	8226
MZ593846.1	Brasil	2018	8185

Fonte: o autor

4.2 Alinhamento com *primers* sugeridos pela OIE / WOAH/WOAH

4.2.1 *Primer q-PCR (Convencional)*

Os testes realizados com o primeiro par de *primers* na PCR convencional se mostrou 100% compatível com as sequências: KR815474.1; KJ556923.1; AY570982.3 e NC_007915.3, tanto em relação ao *primer* F e R, sendo somente as sequências de origem do Brasil que se alinham totalmente ao *primer*, exceto a sequência MZ593846.1. As sequências MZ593846.1, EF061744.1, KJ636783.2, KJ636782.2 e KF836757.1 não foram 100% compatíveis com o par de *primer*, sendo que as KJ636782.2 e KF836757.1 não foram compatíveis nem com o *primer* F e R, não se alinhando no mesmo nucleotídeo, porém a

sequência KF836757.1 tinha um nucleotídeo diferente a mais que a KJ636782.2. As outras sequências somente não se alinhavam com o *primer* R e todas no mesmo nucleotídeo (Figura 2). Dentre as sequências que não se alinham totalmente com o par de *primer* do primeiro passo da PCR convencional, todas são de origem da Indonésia, sendo somente a sequência MZ593846.1 de origem do Brasil que não se alinha com *primer*, sendo possivelmente por conta dessa sequência ter uma similaridade com as sequências de origem da Indonésia (ANDRADE *et al.*, 2022)

O par de *primer* utilizado no produto da primeira PCR (2º passo) se mostrou 100% compatível com todas as 9 sequências testadas, se mostrando bastante eficaz para a identificação do vírus (Figura 3). Em trabalho mostrado por Dantas, (2014) mostrou que a região mais conservada do vírus entre a sequência do Brasil AY570982.3 e EF061744.1 é a da ORF-2, por serem as primeiras sequências de cada país as mesmas serviram de base para a criação de *primers*, como o par de *primer* utilizado no 2º passo da PCR convencional pertence a região da ORF-2 o mesmo se ligou com todas as sequências por ser uma região mais conservada.

Figura 2 – PCR *in silico* do 1º passo da PCR convencional**Primers PCR Convencional (Passo 1 - 4587F e 4914R)**

	Sequência (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer (4587F)	CGACGCTGCTAACCATACAA	20	58.36	50.00	3.00	0.00
Reverse primer (4914R)	ACTCGGCTGTTCGATCAAGT	20	59.40	50.00	6.00	2.00

Products on target templates

>[NC_007915.3](#) Penaeid shrimp infectious myonecrosis virus, complete genome

```
product length = 328
Forward primer 1      CGACGCTGCTAACCATACAA  20
Template        5227  ..... 5246

Reverse primer 1      ACTCGGCTGTTCGATCAAGT  20
Template        5554  ..... 5535
```

>[KR815474.1](#) Penaeid shrimp infectious myonecrosis virus isolate Brazil_2009, complete genome

```
product length = 328
Forward primer 1      CGACGCTGCTAACCATACAA  20
Template        5227  ..... 5246

Reverse primer 1      ACTCGGCTGTTCGATCAAGT  20
Template        5554  ..... 5535
```

>[KJ556923.1](#) Penaeid shrimp infectious myonecrosis virus strain Brazil, complete genome

```
product length = 328
Forward primer 1      CGACGCTGCTAACCATACAA  20
Template        5227  ..... 5246

Reverse primer 1      ACTCGGCTGTTCGATCAAGT  20
Template        5554  ..... 5535
```

>[AY570982.3](#) Penaeid shrimp infectious myonecrosis virus, complete genome

```
product length = 328
Forward primer 1      CGACGCTGCTAACCATACAA  20
Template       5227  ..... 5246

Reverse primer 1      ACTCGGCTGTTCGATCAAGT  20
Template       5554  ..... 5535
```

>[MZ593846.1](#) Penaeid shrimp infectious myonecrosis virus isolate Br-1, complete genome

```
product length = 328
Forward primer 1      CGACGCTGCTAACCATACAA  20
Template       5208  ..... 5227

Reverse primer 1      ACTCGGCTGTTCGATCAAGT  20
Template       5535  .....T..... 5516
```

>[EF061744.1](#) Penaeid shrimp infectious myonecrosis virus from Indonesia, complete genome

```
product length = 328
Forward primer 1      CGACGCTGCTAACCATACAA  20
Template       4584  ..... 4603

Reverse primer 1      ACTCGGCTGTTCGATCAAGT  20
Template       4911  .....T..... 4892
```

>[KJ636783.2](#) Penaeid shrimp infectious myonecrosis virus isolate IMNV-ID-EJ-12-1 ORF1/ORF2 and ORF1 polyprotein genes, complete cds

```
product length = 328
Forward primer 1      CGACGCTGCTAACCATACAA  20
Template       5227  ..... 5246

Reverse primer 1      ACTCGGCTGTTCGATCAAGT  20
Template       5554  .....T..... 5535
```

>[KJ636782.2](#) Penaeid shrimp infectious myonecrosis virus isolate IMNV-ID-LP-11 complete genome

product length = 328

Forward primer 1 CGACGCTGCTAACCATACAA 20
 Template 5230C..... 5249

Reverse primer 1 ACTCGGCTGTTCGATCAAGT 20
 Template 5557T..... 5538

>[KF836757.1](#) Penaeid shrimp infectious myonecrosis virus strain Indonesia, complete genome

product length = 328

Forward primer 1 CGACGCTGCTAACCATACAA 20
 Template 5227C.....G. 5246

Reverse primer 1 ACTCGGCTGTTCGATCAAGT 20
 Template 5554T..... 5535

Fonte: O autor.

Figura 3 – *PCR in silico* do 2º passo da *PCR convencional*.

Primers PCR Convencional (Passo 2 -4725NF e 4863NR)

	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer (4725NF)	GGCACATGCTCAGAGACA	18	56.97	55.56	5.00	5.00
Reverse primer (4863NR)	AGCGCTGAGTCCAGTCTTG	19	59.71	57.89	6.00	3.00

>[KJ636782.2](#) Penaeid shrimp infectious myonecrosis virus isolate IMNV-ID-LP-11 complete genome

```
product length = 139
Forward primer 1      GGCACATGCTCAGAGACA  18
Template        5368  ..... 5385

Reverse primer 1      AGCGCTGAGTCCAGTCTTG  19
Template        5506  ..... 5488
```

>[MZ593846.1](#) Penaeid shrimp infectious myonecrosis virus isolate Br-1, complete genome

```
product length = 139
Forward primer 1      GGCACATGCTCAGAGACA  18
Template        5346  ..... 5363

Reverse primer 1      AGCGCTGAGTCCAGTCTTG  19
Template        5484  ..... 5466
```

>[NC_007915.3](#) Penaeid shrimp infectious myonecrosis virus, complete genome

```
product length = 139
Forward primer 1      GGCACATGCTCAGAGACA  18
Template        5365  ..... 5382

Reverse primer 1      AGCGCTGAGTCCAGTCTTG  19
Template        5503  ..... 5485
```

>[KR815474.1](#) Penaeid shrimp infectious myonecrosis virus isolate Brazil_2009, complete genome

```
product length = 139
Forward primer  1      GGCACATGCTCAGAGACA  18
Template        5365  .....  5382

Reverse primer  1      AGCGCTGAGTCCAGTCTTG  19
Template        5503  .....  5485
```

>[KJ556923.1](#) Penaeid shrimp infectious myonecrosis virus strain Brazil, complete genome

```
product length = 139
Forward primer  1      GGCACATGCTCAGAGACA  18
Template        5365  .....  5382

Reverse primer  1      AGCGCTGAGTCCAGTCTTG  19
Template        5503  .....  5485
```

>[AY570982.3](#) Penaeid shrimp infectious myonecrosis virus, complete genome

```
product length = 139
Forward primer  1      GGCACATGCTCAGAGACA  18
Template        5365  .....  5382

Reverse primer  1      AGCGCTGAGTCCAGTCTTG  19
Template        5503  .....  5485
```

>[KF836757.1](#) Penaeid shrimp infectious myonecrosis virus strain Indonesia, complete genome

```
product length = 139
Forward primer  1      GGCACATGCTCAGAGACA  18
Template        5365  .....  5382

Reverse primer  1      AGCGCTGAGTCCAGTCTTG  19
Template        5503  .....  5485
```

>[EF061744.1](#) Penaeid shrimp infectious myonecrosis virus from Indonesia, complete genome

product length = 139

Forward primer 1 GGCACATGCTCAGAGACA 18
 Template 4722 4739

Reverse primer 1 AGCGCTGAGTCCAGTCTTG 19
 Template 4860 4842

>[KJ636783.2](#) Penaeid shrimp infectious myonecrosis virus isolate IMNV-ID-EJ-12-1 ORF1/ORF2 and ORF1 polyprotein genes, complete cds

product length = 139

Forward primer 1 GGCACATGCTCAGAGACA 18
 Template 5365 5382

Reverse primer 1 AGCGCTGAGTCCAGTCTTG 19
 Template 5503 5485

Fonte: O autor.

4.2.2 Primers qRT-PCR (em tempo real) e Sonda

Os testes realizados para ver a compatibilidade dos *primers* utilizados hoje na identificação da presença do IMNV em amostras testadas deu compatibilidade de 100% somente para as sequências: KJ556923.1, AY570982.3 e NC_007915.3, sendo essas todas de origem brasileira (Figura 4 e tabela 1). As sequências MZ593846.1, EF061744.1, KJ636783.2, KJ636782.2, KF836757.1 e KR815474.1 não tiveram alinhamento total com os *primers* testados, dentre eles a sequência KR815474.1 de origem do Brasil não teve alinhamento com o *primer* F, já as sequências EF061744.1, KJ636783.2, KJ636782.2 e KF836757.1 que são de origem da Indonésia não tiveram alinhamento com o *primer* R, a sequência MZ593846.1 que é de origem do Brasil não se alinha nem com o *primer* F ou R (Figura 4 e Tabela 1). A sequência KR815474.1 mesmo sendo de origem do Brasil pode não ter se alinhado por conta de possuir uma linhagem diferente ao se comparar filogenicamente com as outras sequências do Brasil, entrando em outro clado como mostrado por DANTAS *et al.*, (2015).

Em relação à sonda do IMNV utilizada durante o processo da PCR em tempo real também foi observado que a mesma só é compatível 100% com as sequências: KR815474.1; KJ556923.1; AY570982.3 e NC_007915.3 que são de origem do Brasil e com as sequências KF836757.1 e EF061744.1 que são de origem da Indonésia. Já as sequências KJ636783.2 e KJ636782.2 de origem da Indonésia e a MZ593846.1 de origem do Brasil não se alinharam com a sonda do IMNV (Figura 5 e Tabela 2). As sequências KJ636783.2 e KJ636782.2 de origem da Indonésia foram as únicas que não se alinharam com a sonda do IMNV possivelmente por conta de serem de uma linhagem diferente das outras sequências da Indonésia (NAIM; BROWN; NIBERT, 2014).

Entre as sequências do Brasil a MZ593846.1 se alinou somente com o par de *primer* utilizado no segundo passo da PCR, isso pode ser por conta da sua maior proximidade com as sequências da Indonésia (ANDRADE *et al.*, 2022). Dentre as sequências da Indonésia somente KF836757.1 e EF061744.1 se alinharam com a sonda do IMNV, mas em relação aos *primers* utilizados tanto na PCR convencional como na PCR em tempo real todas as sequências de origem da Indonésia não se alinharam 100% com eles, somente se alinhando com o *primer* utilizado no 2º passo da PCR convencional. O não alinhamento das sequências da Indonésia com os *primers* recomendados pela OIE / WOAHA pode ser por conta da similaridade filogenética com a do Brasil ser menor que 100%, isso ocorreu desde a primeira

sequência descoberta na Indonésia, onde a proximidade era de somente 99,6% e com os testes convencionais já não se conseguia identificar o vírus nas amostras coletadas, mesmo mostrando sinais clínicos (SENAPIN *et al.*, 2007).

Figura 4 – PCR em tempo real in silico.

Primers PCR em Tempo Real (412 F e 545R)

	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer (412F)	GGACCTATCATACATAGCGTTGCA	24	60.56	45.83	5.00	4.00
Reverse primer (545R)	AACCCATATCTATTGTCGCTGGAT	24	59.71	41.67	4.00	3.00

Products on target templates

>[NC_007915.3](#) Penaeid shrimp infectious myonecrosis virus, complete genome

product length = 134

```
Forward primer 1      GGACCTATCATACATAGCGTTGCA  24
Template        1055  ..... 1078
```

```
Reverse primer 1      AACCCATATCTATTGTCGCTGGAT  24
Template        1188  ..... 1165
```

>[KJ556923.1](#) Penaeid shrimp infectious myonecrosis virus strain Brazil, complete genome

product length = 134

```
Forward primer 1      GGACCTATCATACATAGCGTTGCA  24
Template        1055  ..... 1078
```

```
Reverse primer 1      AACCCATATCTATTGTCGCTGGAT  24
Template        1188  ..... 1165
```

>[AY570982.3](#) Penaeid shrimp infectious myonecrosis virus, complete genome

product length = 134

```
Forward primer 1      GGACCTATCATACATAGCGTTGCA  24
Template        1055  ..... 1078
```

```
Reverse primer 1      AACCCATATCTATTGTCGCTGGAT  24
Template        1188  ..... 1165
```

>[KJ636782.2](#) Penaeid shrimp infectious myonecrosis virus isolate IMNV-ID-LP-11 complete genome

```
product length = 134
Forward primer 1   GGACCTATCATAACATAGCGTTGCA 24
Template        1058 ..... 1081

Reverse primer 1   AACCCATATCTATTGTCGCTGGAT 24
Template        1191 .G..... 1168
```

>[KR815474.1](#) Penaeid shrimp infectious myonecrosis virus isolate Brazil_2009, complete genome

```
product length = 134
Forward primer 1   GGACCTATCATAACATAGCGTTGCA 24
Template        1055 .....T..... 1078

Reverse primer 1   AACCCATATCTATTGTCGCTGGAT 24
Template        1188 ..... 1165
```

>[KF836757.1](#) Penaeid shrimp infectious myonecrosis virus strain Indonesia, complete genome

```
product length = 134
Forward primer 1   GGACCTATCATAACATAGCGTTGCA 24
Template        1055 ..... 1078

Reverse primer 1   AACCCATATCTATTGTCGCTGGAT 24
Template        1188 .G..... 1165
```

>[EF061744.1](#) Penaeid shrimp infectious myonecrosis virus from Indonesia, complete genome

```
product length = 134
Forward primer 1   GGACCTATCATAACATAGCGTTGCA 24
Template        412 ..... 435

Reverse primer 1   AACCCATATCTATTGTCGCTGGAT 24
Template        545 .G..... 522
```

>[KJ636783.2](#) Penaeid shrimp infectious myonecrosis virus isolate IMNV-ID-EJ-12-1 ORF1/ORF2 and ORF1 polyprotein genes, complete cds

```
product length = 134
Forward primer 1   GGACCTATCATACATAGCGTTGCA 24
Template       1055 ..... 1078

Reverse primer 1   AACCCATATCTATTGTCGCTGGAT 24
Template       1188 .G..... 1165
```

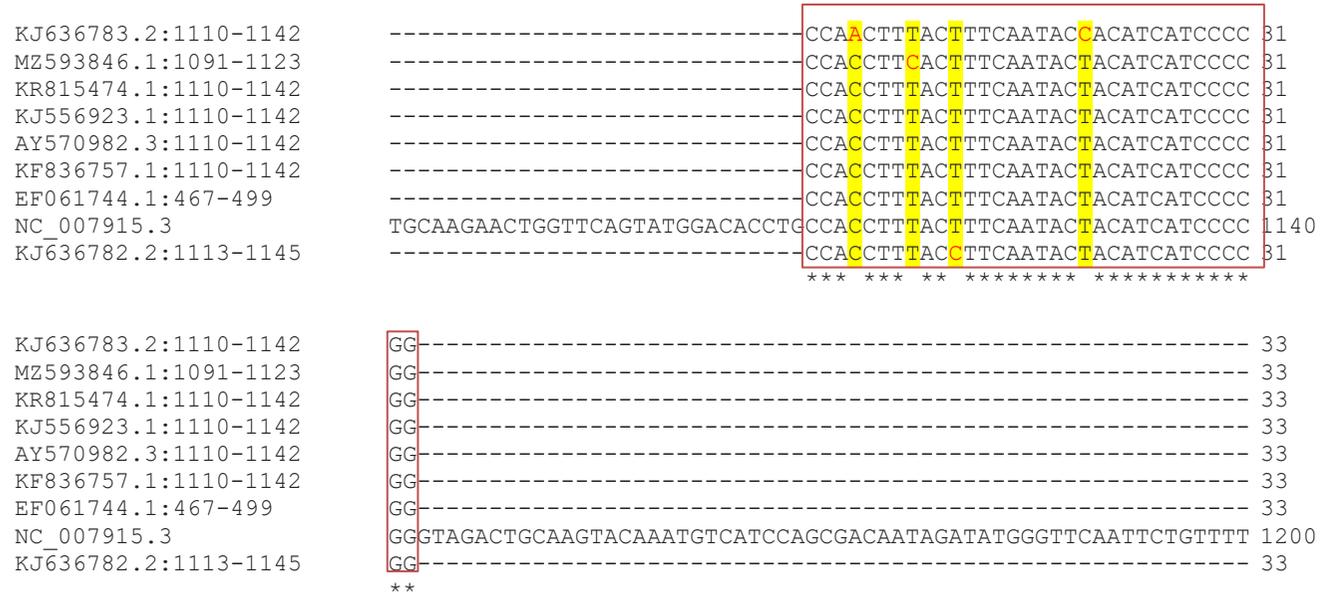
>[MZ593846.1](#) Penaeid shrimp infectious myonecrosis virus isolate Br-1, complete genome

```
product length = 134
Forward primer 1   GGACCTATCATACATAGCGTTGCA 24
Template       1036 .....A... 1059

Reverse primer 1   AACCCATATCTATTGTCGCTGGAT 24
Template       1169 .G..... 1146
```

Fonte: O autor.

Figura 5 – Alinhamento sonda IMNV.



Fonte: O autor.

4.3 Sítios Polimórficos

Após as 9 sequências serem submetidas a um alinhamento realizado na plataforma Cluster Ômega foi possível observar a presença de 316 SNP (*Single nucleotide polymorphism*) entre as sequências obtidas com genoma completo do Genbank, sendo que entre esses SNP há a presença de 266 polimorfismos de transição entre os 316 encontradas, 47 polimorfismos de transcrição e durante a análise foi encontrado 3 SNPs com 3 diferentes nucleotídeos em um mesmo bp (pares de base) dentre as sequências, sendo que a maioria dos SNPs observados pertenciam a ORF-1, com um total de 227 SNPs. Essa maior concentração de polimorfismo na ORF-1 pode se dar pelo fato dela ser maior que a ORF-2, que apresentou somente 89 SNPs. Dantas, (2014) encontrou dados parecidos em trabalho realizado com o alinhamento das sequências AY570982.3 e EF061744.1 que são a do Brasil e da Indonésia respectivamente, mas como nesse se alinhou todas as sequências completas existentes se teve um número maior de sítios polimórficos, porém a relação de mais SNP's na ORF-1 do que na ORF-2 se mostrou o mesmo, sendo a ORF-2 mostrada mais conservada.

4.4 Desenho de *Primer*

Dentre os *primers* sugeridos para ser usado na identificação do vírus somente o par de *primer* do 2º passo se alinhou totalmente com as 9 sequências, no alinhamento realizado foi possível observar a presença de 3 polimorfismos dentro da região de interesse, mostrando assim, que é possível utilizar esse par de *primer* para a identificação de qual variante a amostra pertence (Figura 7). Para os outros *primers* serem capazes de se alinhar totalmente com todas as sequências testadas seria necessário realizar uma degeneração nos *primers* para os mesmos serem capazes de se alinhar 100% com as sequências.

Outra solução seria a criação de um novo *primer* para ser utilizado, a região da ORF-1 se mostrou bastante promissora para ser utilizada como fonte de análise de polimorfismo por conta do maior número de SNPs encontrados na mesma, com isso o desenho de um *primer* nessa região faria com que fosse possível saber a partir da análise realizada a qual variante a amostra testada pertencia. É possível descobrir isso pela presença de polimorfismo na região de interesse, a partir da análise da curva de melting pois, cada variante terá uma curva diferente por ter nucleotídeos diferentes dentro da região de interesse, sendo necessário diferentes temperaturas para chegar no pico máximo no gráfico. A região na ORF-1 que se mostrou uma boa região de criação do *primer* foi a entre os bp 1936 a 2226, que se alinham totalmente com

todas as sequências testadas (Figura 8) e que tem 12 polimorfismos na região de interesse se tornando um *primer* bom para a análise de polimorfismo (figura 9). Um par de *primer* desenhado que apresenta polimorfismos na região de interesse se mostra bastante eficaz na identificação de diferentes sequências (HEBERT *et al.*, 2003). Os parâmetros da qualidade do *primer* desenhado se mostrou dentro do recomendado (Figura 6), como citado por QUEIROZ *et al.*, (2017) com uma relação GC entre 40% e 60% para não aumentar tanto a temperatura de anelamento ao se passar e de 60% e não ter um *primer* sem estabilidade ao se ter uma relação abaixo de 40%.

Figura 6 – Desenho do primer (Primer3 Plus)

Pair 2:						
<input type="checkbox"/> Left Primer 2:	Primer_1_F					
Sequence:	AATCACCACCAAAGCCAAAG					
Start: 35	Length: 20 bp	Tm: 60.0 °C	GC: 45.0 %	ANY: 2.0	SELF: 0.0	
<input type="checkbox"/> Right Primer 2:	Primer_1_R					
Sequence:	CCTTCTCCAAAGGGTGTACG					
Start: 259	Length: 20 bp	Tm: 59.6 °C	GC: 55.0 %	ANY: 4.0	SELF: 2.0	
Product Size: 225 bp		Pair Any: 4.0	Pair End: 0.0			

Fonte: O autor

Figura 7 – Alinhamento 2º passo PCR convencional.

```

MZ593846.1:5346-5484      -----GGCACATGCTCAGAGACAACGTGTATATGACAGTAG 36
KJ636782.2:5368-5506    -----GGCACATGCTCAGAGACAACGTGTATATGACAGCAG 36
KF836757.1:5365-5503   -----GGCACATGCTCAGAGACAACGTGTATATGACAGCAG 36
KR815474.1:5365-5503   -----GGCACATGCTCAGAGACAACGTGTATATGACAGCAG 36
KJ556923.1:5365-5503   -----GGCACATGCTCAGAGACAACGTGTATATGACAGCAG 36
AY570982.3:5365-5503   -----GGCACATGCTCAGAGACAACGTGTATATGACAGCAG 36
EF061744.1:4722-4860   -----GGCACATGCTCAGAGACAACGTGTATATGACAGCAG 36
NC_007915.3             GCTTTCAAAACCGGCATTCAAGTGGCACATGCTCAGAGACAACGTGTATATGACAGCAG 5400
KJ636783.2:5365-5503   -----GGCACATGCTCAGAGACAACGTGTATATGACAGCAG 36
  
```

***** **

```

MZ593846.1:5346-5484    TCGTCCAGGGATGGACGCAATCACAAAGTTGTGTGCACGAAAGTCGGGTTTTATGAATGC 96
KJ636782.2:5368-5506    TCGTCCAGGGATGGACGCAATCACAAAGTTGTGTGCACGAAAGTCGGGTTTTATGAATGC 96
KF836757.1:5365-5503   TCGTCCAGGGATGGACGCAATCACAAAGTTGTGTGCACGAAAGTCGGGTTTTATGAATGC 96
KR815474.1:5365-5503   TCGTCCAGGGATGGACGCAATCACAAAGTTGTGTGCACGAAAGTCGGGTTTTATGAATGC 96
KJ556923.1:5365-5503   TCGTCCAGGGATGGACGCAATCACAAAGTTGTGTGCACGAAAGTCGGGTTTTATGAATGC 96
AY570982.3:5365-5503   TCGTCCAGGGATGGACGCAATCACAAAGTTGTGTGCACGAAAGTCGGGTTTTATGAATGC 96
EF061744.1:4722-4860   TCGTCCAGGGATGGACGCAATCACAAAGTTGTGTGCACGAAAGTCGGGTTTTATGAATGC 96
NC_007915.3            TCGTCCAGGGATGGACGCAATCACAAAGTTGTGTGCACGAAAGTCGGGTTTTATGAATGC 5460
KJ636783.2:5365-5503   TCGTCCAGGGATGGACGCAATCACAAAGTTGTGTGCACGAAAGTCGGGTTTTATGAATGC 96
  
```

```

MZ593846.1:5346-5484    CCGTTCACAGCAATGATGGCACCAAGACTGGACTCAGCGCT----- 139
KJ636782.2:5368-5506    CCGTTCACAACAATGATGGCACCAAGACTGGACTCAGCGCT----- 139
KF836757.1:5365-5503   CCGTTCACAACAATGATGGCACCAAGACTGGACTCAGCGCT----- 139
KR815474.1:5365-5503   CCGTTCACAGCAATGATGGCACCAAGACTGGACTCAGCGCT----- 139
KJ556923.1:5365-5503   CCGTTCACAGCAATGATGGCACCAAGACTGGACTCAGCGCT----- 139
  
```

```
AY570982.3:5365-5503   CCGTTCACA G CAATGATGGCACCCAAGACTGGACTCAGCGCT----- 139
EF061744.1:4722-4860   CCGTTCACA G CAATGATGGCACCCAAGACTGGACTCAGCGCT----- 139
NC_007915.3           CCGTTCACA G CAATGATGGCACCCAAGACTGGACTCAGCGCTGTTATAGATCAAGCACC 520
KJ636783.2:5365-5503   CCGTTCACA G CAATGATGGCACCCAAGACTGGACTCAGCGCT----- 139
*****
```

Fonte: O autor.

Figura 8 – PCR in silico primer teste

Primer pair 1

	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity
Forward primer	AATCACCACCAAAGCCAAAG	20	56.79	45.00	2.00
Reverse primer	CCTTCTCCAAAGGGTGTACG	20	57.91	55.00	4.00
Products on target templates					

>[KJ636782.2](#) Penaeid shrimp infectious myonecrosis virus isolate IMNV-ID-LP-11 complete genome

product length = 225

```
Forward primer 1   AATCACCACCAAAGCCAAAG   20
Template         1977 ..... 1996
```

```
Reverse primer 1   CCTTCTCCAAAGGGTGTACG   20
Template        2201 ..... 2182
```

>[MZ593846.1](#) Penaeid shrimp infectious myonecrosis virus isolate Br-1, complete genome

product length = 225

```
Forward primer 1   AATCACCACCAAAGCCAAAG   20
Template         1955 ..... 1974
```

```
Reverse primer 1   CCTTCTCCAAAGGGTGTACG   20
Template        2179 ..... 2160
```

>[NC_007915.3](#) Penaeid shrimp infectious myonecrosis virus, complete genome

product length = 225

```
Forward primer 1   AATCACCACCAAAGCCAAAG   20
Template         1974 ..... 1993
```

```
Reverse primer 1   CCTTCTCCAAAGGGTGTACG   20
Template        2198 ..... 2179
```

>[KR815474.1](#) Penaeid shrimp infectious myonecrosis virus isolate Brazil_2009, complete genome

```
product length = 225
Forward primer 1      AATCACCACCAAAGCCAAAG  20
Template       1974  ..... 1993

Reverse primer 1      CCTTCTCCAAAGGGTGTACG  20
Template       2198  ..... 2179
```

>[KJ556923.1](#) Penaeid shrimp infectious myonecrosis virus strain Brazil, complete genome

```
product length = 225
Forward primer 1      AATCACCACCAAAGCCAAAG  20
Template       1974  ..... 1993

Reverse primer 1      CCTTCTCCAAAGGGTGTACG  20
Template       2198  ..... 2179
```

>[AY570982.3](#) Penaeid shrimp infectious myonecrosis virus, complete genome

```
product length = 225
Forward primer 1      AATCACCACCAAAGCCAAAG  20
Template       1974  ..... 1993

Reverse primer 1      CCTTCTCCAAAGGGTGTACG  20
Template       2198  ..... 2179
```

>[KF836757.1](#) Penaeid shrimp infectious myonecrosis virus strain Indonesia, complete genome

```
product length = 225
Forward primer 1      AATCACCACCAAAGCCAAAG  20
Template       1974  ..... 1993

Reverse primer 1      CCTTCTCCAAAGGGTGTACG  20
Template       2198  ..... 2179
```

>[EF061744.1](#) Penaeid shrimp infectious myonecrosis virus from Indonesia, complete genome

product length = 225

Forward primer 1 AATCACCACCAAAGCCAAAG 20
 Template 1331 1350

Reverse primer 1 CCTTCTCCAAAGGGTGTACG 20
 Template 1555 1536

>[KJ636783.2](#) Penaeid shrimp infectious myonecrosis virus isolate IMNV-ID-EJ-12-1 ORF1/ORF2 and ORF1 polyprotein genes, complete cds

product length = 225

Forward primer 1 AATCACCACCAAAGCCAAAG 20
 Template 1974 1993

Reverse primer 1 CCTTCTCCAAAGGGTGTACG 20
 Template 2198 2179

Fonte: O autor.

Figura 9 – Alinhamento do novo *primer*.

MZ593846.1	GCCAGAACAACCTTCAAATGATTCTGGCAATGCAAAAATC	1958
KR815474.1	GCCAGAACAACCTTCAAATGATTCTGGCAATGCAAAAATC	1977
KJ636783.2	ACCAGAACAACCTTCAAATGATTCTGGCAATGCAAAAATC	1977
KJ636782.2	GCCAGAACAACCTTCAAATGATTCTGGCAATGCAAAAATC	1980
KF836757.1	GCCAGAACAACCTTCAAATGATTCTGGCAATGCAAAAATC	1977
EF061744.1	GCCAGAACAACCTTCAAATGATTCTGGCAATGCAAAAATC	1334
NC_007915.3	GCCAGAACAACCTTCAAATGATTCTGGCAATGCAAAAATC	1977
AY570982.3	GCCAGAACAACCTTCAAATGATTCTGGCAATGCAAAAATC	1977
KJ556923.1	GCCAGAACAACCTTCAAATGATTCTGGCAATGCAAAAATC	1977

MZ593846.1	ACCACCAAAGCCAAAGATCAAAGAACTAAGTGAAAGGGAAATTCAGTTAAGGCTCCAAGG	2018
KR815474.1	ACCACCAAAGCCAAAGATCAAAGAACTAAGTGAAAGGGAAATTCAGTTAAGGCTCCAAGG	2037
KJ636783.2	ACCACCAAAGCCAAAGATCAAAGAACTAAGTGAAAGGGAAATTCAGTTAAGGCTCCAAGG	2037
KJ636782.2	ACCACCAAAGCCAAAGATCAAAGAACTAAGTGAAAGGGAAATTCAGTTAAGGCTCCAAGG	2040
KF836757.1	ACCACCAAAGCCAAAGATCAAAGAACTAAGTGAAAGGGAAATTCAGTTAAGGCTCCAAGG	2037
EF061744.1	ACCACCAAAGCCAAAGATCAAAGAACTAAGTGAAAGGGAAATTCAGTTAAGGCTCCAAGG	1394
NC_007915.3	ACCACCAAAGCCAAAGATCAAAGAACTAAGTGAAAGGGAAATTCAGTTAAGGCTCCAAGG	2037
AY570982.3	ACCACCAAAGCCAAAGATCAAAGAACTAAGTGAAAGGGAAATTCAGTTAAGGCTCCAAGG	2037
KJ556923.1	ACCACCAAAGCCAAAGATCAAAGAACTAAGTGAAAGGGAAATTCAGTTAAGGCTCCAAGG	2037

MZ593846.1	AAATGAAGCAACCCGCAGACATCAAAGATTTAAAGGTGAGCCCATTGATCCAGTTCTAAC	2078
KR815474.1	AAATGAAGCAACCCGCAGACATCAAAGATTTAAAGGTGAGCCCATTGATCCAGTTCTAAC	2097
KJ636783.2	AAATGAAGCAACCCGCAGACATCAAAGATTTAAAGGTGAGCCCATTGATCCAGTTCTAAC	2097
KJ636782.2	AAATGAAGCAACCCGCAGACATCAAAGATTTAAAGGTGAGCCCATTGATCCAGTTCTAAC	2100
KF836757.1	AAATGAAGCAACCCGCAGACATCAAAGATTTAAAGGTGAGCCCATTGATCCAGTTCTAAC	2097
EF061744.1	AAATGAAGCAACCCGCAGACATCAAAGATTTAAAGGTGAGCCCATTGATCCAGTTCTAAC	1454
NC_007915.3	AAATGAAGCAACCCGCAGACATCAAAGATTTAAAGGTGAGCCCATTGATCCAGTTCTAAC	2097
AY570982.3	AAATGAAGCAACCCGCAGACATCAAAGATTTAAAGGTGAGCCCATTGATCCAGTTCTAAC	2097
KJ556923.1	AAATGAAGCAACCCGCAGACATCAAAGATTTAAAGGTGAGCCCATTGATCCAGTTCTAAC	2097

MZ593846.1	TAGAGAAGATATAATTAGAAAACACAATCAA	CAGAATGGAATATTGCC	TGATG	AAAAAGA	2138
KR815474.1	TAGAGAAGATATAATTAGAAAACACAATCAG	CAGAATGGAATATTGCC	CTATG	AAAAAGA	2157
KJ636783.2	TAGAGAAGATATAATTAGAAAACACAATCAG	CAGAATGGAATATTGCC	TGATG	AAAAAGA	2157
KJ636782.2	TAGAGAAGATATAATTAGAAAACACAAC	CAGAATGGAATATTGCC	TGATG	AAAAAGA	2160
KF836757.1	TAGAGAAGATATAATTAGAAAACACAAC	CAGAATGGAATATTGCC	TGATG	AAAAAGA	2157
EF061744.1	TAGAGAAGATATAATTAGAAAACACAATCAG	CAGAATGGAATATTGCC	TGATG	AAAAAGA	1514
NC_007915.3	TAGAGAAGATATAATTAGAAAACACAATCAG	CAGAATGGAATATTGCC	TGATG	AAAAAGA	2157
AY570982.3	TAGAGAAGATATAATTAGAAAACACAATCAG	CAGAATGGAATATTGCC	TGATG	AAAAAGA	2157
KJ556923.1	TAGAGAAGATATAATTAGAAAACACAATCAG	CAGAATGGAATATTGCC	TGATG	AAAAAGA	2157

***** * ***** ** ***** *****

MZ593846.1	ACAGCCGATAGTGGTAAATAACGTACACCCTTTGGAGAAGG	AGTATTCCATTGAAAAGGA	2198
KR815474.1	ACAGCCGGTGGTGGTAAATAACGTACACCCTTTGGAGAAGG	AGTATTCCATTGAAAAGGA	2217
KJ636783.2	ACAGCCGGTAGTGGTAAATAACGTACACCCTTTGGAGAAGG	AGTATTCCATTGAAAAGGA	2217
KJ636782.2	ACAGCCAAATAGTGGTAAATAACGTACACCCTTTGGAGAAGG	AGTATTCCATTGAAAAGGA	2220
KF836757.1	ACAGCCAAATAGTGGTAAATAACGTACACCCTTTGGAGAAGG	AGTATTCCATTGAAAAGGA	2217
EF061744.1	ACAGCCGGTAGTGGTAAATAACGTACACCCTTTGGAGAAGG	AGTATTCCATTGAAAAGGA	1574
NC_007915.3	ACAGCCGGTAGTGGTAAATAACGTACACCCTTTGGAGAAGG	AGTATTCCATTGAAAAGGA	2217
AY570982.3	ACAGCCGGTAGTGGTAAATAACGTACACCCTTTGGAGAAGG	AGTATTCCATTGAAAAGGA	2217
KJ556923.1	ACAGCCGGTAGTGGTAAATAACGTACACCCTTTGGAGAAGG	AGTATTCCATTGAAAAGGA	2217

***** * ***** *****

MZ593846.1	AGGAATGGCGTGGGACGAGGAACAATTTTTGACGTACATACATGACAAATCATCAAGCAA	2258
KR815474.1	AGGAATGGTGTGGGACGAGGAACAATTTCTAACGTATATACATGACAAATCATCAAGCAA	2277
KJ636783.2	AGGAATGGTGTGGGACGAAGAACAATTTTTGACGTATATACATGACAAGTCATCAAGCAA	2277
KJ636782.2	AGGAATGGTGTGGGACGAGGAACAATTTTTGACGTATATACATGACAAATCGTCAAGCAA	2280
KF836757.1	AGGAATGGTGTGGGACGAGGAACAATTTTTGACGTATATACATGACAAATCGTCAAGCAA	2277
EF061744.1	AGGAATGGTGTGGGACGAGGAACAATTTTTGACGTATATACATGACAAATCATCAAGCAA	1634
NC_007915.3	AGGAATGGTGTGGGACGAGGAACAATTTTTGACGTATATACATGACAAATCATCAAGCAA	2277
AY570982.3	AGGAATGGTGTGGGACGAGGAACAATTTTTGACGTATATACATGACAAATCATCAAGCAA	2277
KJ556923.1	AGGAATGGTGTGGGACGAGGAACAATTTTTGACGTATATACATGACAAATCATCAAGCAA	2277

***** ***** * ***** *****

Fonte: O autor.

5 CONCLUSÃO

A partir dos dados obtidos no trabalho foi possível confirmar que os *primers* indicados pela OIE / WOAHA não conseguem se alinhar a todas as sequências completas depositadas no GenBank, sendo principalmente as sequências de origem da Indonésia. Dentre os *primers* testados, somente o par de *primer* do 2º passo da PCR convencional se tornou capaz de se alinhar totalmente com todas as sequências testadas.

Com isso, foi possível definir que se somente o par de *primer* do 2º passo da PCR convencional fosse usado seria possível a partir da análise definir a qual variante o vírus presente na amostra pertencia, por conta dos polimorfismos presentes na região de interesse. Como o recomendado é utilizar a PCR convencional em 2º passo para a análise do IMNV, foi realizado um novo desenho de *primer* utilizando a região ORF-1 por conta do maior número de polimorfismo presente. Os testes realizados confirmaram o alinhamento com todas as sequências testadas e pela região de interesse, possui 12 polimorfismos, podendo então, realizar a identificação a qual variante é pertencente. Como citado no trabalho, os outros *primers* indicados pela OIE / WOAHA somente se tornam viáveis se for realizado nos mesmos uma degeneração, para que eles consigam se alinhar a todas as sequências testadas.

Recomenda-se realizar trabalhos futuros para saber mais diferenças entre as variantes, principalmente para saber se há a diferença de sinais clínicos e velocidade de transmissão entre as variantes.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, Thales PD *et al.* Novel infectious myonecrosis virus (IMNV) variant is associated with recent disease outbreaks in *Penaeus vannamei* shrimp in Brazil. **Aquaculture**, v. 554, p. 738159, 2022.
- ASCHE, Frank *et al.* The economics of shrimp disease. **Journal of invertebrate pathology**, v. 186, p. 107397, 2021.
- ANDRADE, Thales PD *et al.* Real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay using TaqMan probe for detection and quantification of infectious myonecrosis virus (IMNV). **Aquaculture**, v. 264, n. 1-4, p. 9-15, 2007.
- BELL, T. A.; LIGHTNER, Donald V. IHNV disease of *Penaeus stylirostris*: effects of shrimp size on disease expression. **Journal of Fish Diseases**, v. 10, n. 3, p. 165-170, 1987.
- DANTAS, Márcia Danielle de Araújo. Estudo do genoma do vírus causador da mionecrose infecciosa em camarões e desenvolvimento de métodos para detecção de polimorfismos. 2014.
- DANTAS, Márcia Danielle A. *et al.* Analysis of new isolates reveals new genome organization and a hypervariable region in infectious myonecrosis virus (IMNV). **Virus research**, v. 203, p. 66-71, 2015.
- DA FONSECA, Emiliano Bezerra; DA SILVA, Márcia Regina Farias. Percepção dos problemas socioambientais decorrentes da carcinicultura no município de Pendências (RN)-Brasil. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, v. 4, n. 1, p. 1047-1066, 2021.
- DE LIMA, ANA PATRÍCIA SOUZA. Estrutura genética de populações cultivadas do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* em Pernambuco. 2007.
- DA SILVA, Suzianny Maria Bezerra Cabral *et al.* Experimental infection of infectious myonecrosis virus (IMNV) in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). **Aquaculture International**, v. 23, n. 2, p. 563-576, 2015.
- FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture: Sustainability in action. Rome, 2020.
- FENG, Junli *et al.* A universal random DNA amplification and labeling strategy for microarray to detect multiple pathogens of aquatic animals. **Journal of Virological Methods**, v. 275, p. 113761, 2020.
- HELBERT, P. D. N. *et al.*, 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal of London* 270:317-322.
- JIANG, Shan. Aquaculture, capture fisheries, and wild fish stocks. **Resource and Energy Economics**, v. 32, n. 1, p. 65-77, 2010.
- KWOK, Kirsty TT *et al.* Virus metagenomics in farm animals: a systematic review. **Viruses**, v. 12, n. 1, p. 107, 2020.

LIGHTNER, Donald V. A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp. 1996.

LIGHTNER, D. V. New developments in penaeid virology: application of biotechnology in research and disease diagnosis for shrimp viruses of concern in the Americas. **Disease of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and the United States**, 1992.

LAURIN, E. *et al.* Design standards for experimental and field studies to evaluate diagnostic accuracy of tests for infectious diseases in aquatic animals. **Journal of fish diseases**, v. 41, n. 5, p. 729-749, 2018.

LIGHTNER, Donald V. *et al.* Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in the Americas. **Journal of invertebrate pathology**, v. 110, n. 2, p. 174-183, 2012.

LIGHTNER, D. V. *et al.* Infectious myonecrosis: new disease in Pacific white shrimp. **Glob Aquac Advocate**, v. 7, p. 85, 2004b.

LIGHTNER, D. V. *et al.*, 2004a. Infectious Myonecrosis (IMN): a new virus disease of *Litopenaeus vannamei*. p.353. In: Aquaculture 2004 Book of Abstracts of Aquaculture. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana.

MAI, H. N. *et al.* Novel infectious myonecrosis virus (IMNV) genotypes associated with disease outbreaks on *Penaeus vannamei* shrimp farms in Indonesia. **Archives of virology**, v. 164, n. 12, p. 3051-3057, 2019.

MOLES, P.; BUNGE, J. **Shrimp farming in Brazil: an industry overview**. Roma. FAO/WWF/NACA, 26p, 2002.

NAIM, Sidrotun; BROWN, Judith K.; NIBERT, Max L. Genetic diversification of penaeid shrimp infectious myonecrosis virus between Indonesia and Brazil. **Virus research**, v. 189, p. 97-105, 2014.

NATORI, Mariene Miyoko *et al.* Desenvolvimento da carcinicultura marinha no Brasil e no mundo: avanços tecnológicos e desafios. **Informações econômicas**, v. 41, n. 2, p. 61-73, 2011.

NIBERT, Max L. '2A-like' and 'shifty heptamer' motifs in penaeid shrimp infectious myonecrosis virus, a monosegmented double-stranded RNA virus. **Journal of General Virology**, v. 88, n. 4, p. 1315-1318, 2007.

ORMOND, José Geraldo Pacheco *et al.* A carcinicultura brasileira. 2004.

QUEIROZ, Jackson Alves da Silva *et al.* Desenho e Validação de Primers In Silico para Detecção do Vírus Sincicial Respiratório Humano. 2017.

ROCHA, I. P. Carcinicultura Brasileira: Processos Tecnológicos, Impactos Sócio-Econômicos, Sustentabilidade Ambiental, Entraves e Oportunidades. Associação de Criadores de Camarão em Cataveiro (ABCC). 2011.

POULOS, Bonnie T.; LIGHTNER, Donald V. Detection of infectious myonecrosis virus (IMNV) of penaeid shrimp by reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). **Diseases of aquatic organisms**, v. 73, n. 1, p. 69-72, 2006.

POULOS, Bonnie *et al.* Purification and characterization of infectious myonecrosis virus of penaeid shrimp. **JOURNAL-OF-GENERAL-VIROLOGY**, v. 87, p. 987-996, 2006.

ROCHA, I. P. Desempenho da carcinicultura brasileira em 2007: desafios e portunidades para 2008. **Revista da ABCC**, Recife, ano 10, mar. 2008.

SANTOS, Raíssa *et al.* A brief history if white spot syndrome virus and its epidemiology in Brazil. 2013.

SHASTRY, Barkur S. SNPs in disease gene mapping, medicinal drug development and evolution. **Journal of human genetics**, v. 52, n. 11, p. 871-880, 2007.

SANJUÁN, Rafael *et al.* Viral mutation rates. **Journal of virology**, v. 84, n. 19, p. 9733-9748, 2010.

SENAPIN, Saengchan *et al.* Outbreaks of infectious myonecrosis virus (IMNV) in Indonesia confirmed by genome sequencing and use of an alternative RT-PCR detection method. **Aquaculture**, v. 266, n. 1-4, p. 32-38, 2007.

TANG, Kathy FJ *et al.* In situ hybridization demonstrates that *Litopenaeus vannamei*, *L. stylirostris* and *Penaeus monodon* are susceptible to experimental infection with infectious myonecrosis virus (IMNV). **Diseases of aquatic organisms**, v. 63, n. 2-3, p. 261-265, 2005.

TANG, Kathy FJ; LIGHTNER, Donald V. Detection and quantification of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in penaeid shrimp by real-time PCR. **Diseases of aquatic organisms**, v. 44, n. 2, p. 79-85, 2001.

VALENTI, Wagner C. *et al.* Aquaculture in Brazil: past, present and future. **Aquaculture Reports**, v. 19, p. 100611, 2021.

VALASEK, Mark A.; REPA, Joyce J. The power of real-time PCR. **Advances in physiology education**, v. 29, n. 3, p. 151-159, 2005.

VANGUILDER, Heather D.; VRANA, Kent E.; FREEMAN, Willard M. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. **Biotechniques**, v. 44, n. 5, p. 619-626, 2008.

WALKER, Peter J.; COWLEY, Jeff A. Viral genetic variation: implications for disease diagnosis and detection of shrimp pathogens. **FAO fisheries. Technical paper**, n. 395, p. 54-9, 2000.

WALKER, Peter J.; WINTON, James R. Emerging viral diseases of fish and shrimp. **Veterinary research**, v. 41, n. 6, p. 51, 2010.

ZHENG, Shu-cheng; XU, Jiao-yang; LIU, Hai-peng. Cellular entry of white spot syndrome virus and antiviral immunity mediated by cellular receptors in crustaceans. **Fish & Shellfish**

Immunology, v. 93, p. 580-588, 2019.

ZORRIEZHARA, M. J.; BANAEDERAKHSHAN, R. Early mortality syndrome (EMS) as new emerging threat in shrimp industry. **Adv. Anim. Vet. Sci**, v. 3, n. 2S, p. 64-72, 2015.