



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PESCA**

INGRID LUANA DA SILVEIRA SIQUEIRA

**CARACTERIZAÇÃO DO VÍRUS DA SÍNDROME DA MANCHA BRANCA (WSSV)
PREVALENTE NO PERÍODO DE 2012, 2016 e 2018 NO MUNICÍPIO DE ARACATI
(CE)**

FORTALEZA

2019

INGRID LUANA DA SILVEIRA SIQUEIRA

CARACTERIZAÇÃO DO VIRUS DA SINDROME DA MANCHA BRANCA (WSSV)
PREVALENTE NO PERÍODO DE 2012, 2016 e 2018 NO MUNICÍPIO DE ARACATI
(CE)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, como cumprimento dos requisitos parciais exigidos no regimento do programa. Área de concentração: Biotecnologia e Genética de Recursos Pesqueiros.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Maggioni.

FORTALEZA

2019

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)

- S63c Siqueira, Ingrid Luana da Silveira.
Caracterização do vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV) prevalente no período de 2012, 2016 e 2018 no município de Aracati (CE) / Ingrid Luana da Silveira Siqueira. – 2019.
56 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2019.
Orientação: Prof. Dr. Rodrigo Maggioni.
1. WSSV. 2. Enfermidades. 3. Carcinicultura. 4. Genótipos. I. Título.

CDD 639.2

INGRID LUANA DA SILVEIRA SIQUEIRA

CARACTERIZAÇÃO DO VÍRUS DA SÍNDROME DA MANCHA BRANCA (WSSV)
PREVALENTE NO PERÍODO DE 2012, 2016 e 2018 NO MUNICÍPIO DE ARACATI
(CE)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, como cumprimento dos requisitos parciais exigidos no regimento do programa. Área de concentração: Biotecnologia e Genética de Recursos Pesqueiros.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr^a. Carminda Sandra Brito Salmito Vanderley
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Prof. Dr. Pedro Carlos Cunha Martins
Universidade Federal do Semiárido (UFERSA)

Aos meus avós e minha mãe.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por nesta caminhada nunca ter me faltado.

Aos meus pais, Maria Iluana da Silveira e José Erinaldo Martins Siqueira.

Por todo amor, carinho, sabedoria, ensinamento, investimento e educação, de acordo com seus valores eternos.

A minha irmã que sempre me apoiou e por sempre oferecer um suporte científico das humanas.

Aos meus familiares, que sempre demonstraram apoio, preocupação, conselhos e investimentos, quando necessário.

Ao Edu e família, por todo amor, paciência, incentivo e ajuda.

Aos meus amigos do CEDECAM, Jamille, Fagner, Mayara, Juliana Gaeta, Juliana e Marina pelos cafés que nos proporcionaram boas risadas e tornaram esta caminhada mais suave e construtiva.

Aos técnicos do CEDECAM, Graça, Renata e Rafael, sem eles este trabalho teria uma caminhada mais pesada e tortuosa.

Aos amigos do IFCE que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, Cícero, Aldevan, Prof. Rachel Sabry e Max.

Aos meus amigos de faculdade, Dyuli, Hudson, Vládila, Iris, e tantos outros que encontrei nestes anos e sempre proporcionavam uma palavra de incentivo e/ou consolo.

Aos professores Rubens, Pedro Martins e Roberto pela disposição em ajudar e ampliar meus horizontes da ciência.

Ao meu orientador Rodrigo Maggioni que me ajudou pacientemente durante esta caminhada e permitiu que este trabalho acontecesse.

Ao Programa de Pós- Graduação em Engenharia de Pesca que disponibilizou a oportunidade deste estudo.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES).

“O que faz andar o barco não é a vela enfunada, mas o vento que não se vê.”

Platão

RESUMO

O cultivo de camarões marinhos vem se expandindo rapidamente ao redor do mundo, nos últimos vinte anos. Neste período, um dos principais desafios para a expansão da produção foi o surgimento e disseminação de enfermidades. Dentre as principais enfermidades, a mais grave e mais persistente é aquela causada pelo vírus da síndrome da mancha branca (*White Spot Syndrome Virus – WSSV*). A doença da mancha branca é hoje bem conhecida, mas o WSSV é um vírus complexo, e pouco se sabe ainda sobre a sua origem, evolução e variantes. O Ceará é um dos maiores produtores de camarão do Brasil e o WSSV se encontra presente no estado desde 2005, vindo a afetar significativamente a produção a partir do ano de 2016. Com base nestes antecedentes, o presente trabalho teve como objetivo detectar variantes genotípicas no camarão marinho *Litopenaeus vannamei* cultivado no município de Aracati (CE), nos anos de 2012, 2016 e 2018. Espera-se com isso aprofundar o conhecimento acerca da epidemiologia do vírus na região, ampliando a compreensão de sua propagação e dinâmica. Neste trabalho a presença do vírus da mancha branca (WSSV) foi avaliada por meio de análise histológica e PCR quantitativo em tempo real (qPCR). A análise e caracterização das estirpes virais presentes foi realizada pela análise de minissatélites (ORFs 75, 94 e 125 e das VRs 14/15 e 23/24). Os resultados mostraram que as amostras coletadas nos anos de 2012, 2016 e 2018 apresentaram, respectivamente, 22,4%, 95,0% e 46,7% de prevalência para WSSV, com carga viral média de $1,3 \times 10^2$, $7,34 \times 10^7$ e $1,72 \times 10^4$ cópias virais por μg de DNA. Já a análise de minissatélites indicou a presença de 68 genótipos virais. Os resultados encontrados indicam que a severidade dos surtos de mancha branca parece estar ligada não só à presença do vírus, mas principalmente às variantes presentes e suas interações.

Palavras-chave: WSSV. Enfermidades. Carcinicultura. Genótipos.

ABSTRACT

In the past twenty years, marine shrimp farming have expanded rapidly around the world. With this expansion came the emergence and dissemination of a number of shrimp diseases. Among the main pathogens, White Spot Syndrome Virus (WSSV) is possibly the most severe and the most persistent through the years. White spot disease is well known today. However, considerably less is known about WSSV origin, evolution and variation. In Brazil, the state of Ceará is one of the largest shrimp producers in Brazil. WSSV has been present in the state since 2005, significantly affecting production in 2016. Considering this background, the objective of the present work was to detect WSSV genotypic variants in cultured *Litopenaeus vannamei* shrimp, during 2012, 2016 and 2018, in the municipality of Aracati (CE). Through this approach, this work seeks to improve the knowledge about WSSV epidemiology, propagation and dynamics. The presence of WSSV was evaluated by histological analysis and quantitative real time PCR (qPCR). The analysis and characterization of the viral strains present were performed through analysis of the ORFs 75, 94 and 125 and the VRs 14/15 and 23/24. The results showed that the samples evaluated for the years 2012, 2016 and 2018 presented, respectively, a prevalence of 22.4%, 95% and 46.7% for WSSV, with an average viral load of $1,3 \times 10^2$, 7.34×10^7 e 1.72×10^4 virus copies per μg DNA. The analysis of minisatellites indicated the presence of 68 viral genotypes. These results suggest that the severity of WSSV outbreaks in the region are likely linked not only to the virus presence, but also to the presence of different viral strains and their interactions.

Keywords: WSSV. Disease. Shrimp farming. Genotypes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 –	Corpos de inclusão (seta), no epitélio subcuticular do estômago do camarão <i>L. vannamei</i> Barra = 25µm.....	31
FIGURA 2 –	Corpos de inclusão (seta) nas brânquias do camarão <i>L. vannamei</i> coletado no município de Aracati (CE). Objetiva: 40x.	31
FIGURA 3 –	Gel de eletroforese VR 14/15 amostra de Aracati 2016.....	37
FIGURA 4 –	Gel de eletroforese VR 1415, comparativo entre os anos de 2012, 2016 e 2018.....	38
FIGURA 5 –	Gel de eletroforese VR 23/24 amostra de Aracati 2016, pode-se observar amplicons de 942 e 539 pb.....	39

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 –	Organismos positivos e negativos dos anos 2012, 2016 e 2018.	29
Gráfico 2 –	Carga viral média dos organismos positivos referentes aos anos de 2012, 2016 e 2018	29
Gráfico 3 –	Grau de severidade da infecção por WSSV nas amostras coletadas em Aracati em 2012, 2016 e 2018.....	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 – Classificação do grau de severidade da infecção observada na análise histopatológica de camarões coletados em fazendas de cultivo do município de Aracat- (CE) no período de 2012, 2016 e 2018.....	25
Tabela 02 – Descrição de primers utilizados para a genotipagem do WSSV detectado em camarões <i>L. vannamei</i> coletados em fazendas do município de Aracati (CE) nos anos de 2012, 2016 e 2018.....	27
Tabela 03 – Condições de termociclagem empregada para a genotipagem do WSSV por análise de minissatélites.....	27
Tabela 04 – Grau de severidade da infecção por WSSV verificado através da histopatologia em camarões <i>L. vannamei</i> coletados em Aracati em 2012, 2016 e 2018.....	30
Tabela 05 – Amplicons obtidos com o primer ORF 75a nos anos de 2012, 2016 e 2018.....	32
Tabela 06 – Sequências das UR de 45 e 102 pb da ORF 75. As bases em negrito nas posições 3, 15, 30, 40, 42, 44 e 83 correspondem aos locais onde foram observados polimorfismos.....	33
Tabela 07 – Amplicons obtidos com o primer ORF 75b nos anos de 2012, 2016 e 2018.....	33
Tabela 08 – Amplicons obtidos com o primer ORF 94a nos anos de 2012, 2016 e 2018.....	34
Tabela 09 – Amplicons obtidos com o primer ORF 94b nos anos de 2012, 2016 e 2018.....	35
Tabela 10 – Amplicons obtidos com o primer ORF 1415a nos anos de 2012, 2016 e 2018.....	36
Tabela 11 – Amplicons obtidos com o primer ORF 1415b nos anos de 2012, 2016 e 2018.....	37
Tabela 12 – Variações genotípicas referente ao ano de 2012.....	40
Tabela 13 – Legenda da quantidade de pb referente a tabela de variações genotípicas de 2012.....	40
Tabela 14 – Variações genotípicas referente ao ano de 2016.....	41

Tabela 15 – Legenda da quantidade de pb referente a tabela de variações genotípicas de 2016.....	43
Tabela 16 – Variações genotípicas referente ao ano de 2018.....	43
Tabela 17 – Legenda da quantidade de pb referente a tabela de variações genotípicas de 2018.....	45

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	Revisão bibliográfica	18
1.1.1	<i>Aquicultura</i>	18
1.1.2	<i>Carcinicultura Mundial</i>	19
1.1.3	<i>Carcinicultura Brasileira</i>	20
1.1.4	<i>Vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV)</i>	21
1.1.5	<i>Variantes virais</i>	22
2	OBJETIVOS	23
2.1	Geral	23
2.2	Específicos	23
3	MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1	Material de Estudo e Coleta	24
3.2	Extração de DNA	24
3.3	Análise histopatológica	25
3.4	Reação da Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR)	27
3.5	Genotipagem por análise de minissatélites	27
3.6	Clonagem	29
3.7	Sequenciamento	29
3.8	Análise de dados	29
4	RESULTADOS	30
4.1	Detecção e Quantificação viral	30
4.2	Histologia	31
4.3	ORF75a	33
4.4	ORF 75b	35
4.5	ORF 94a	35
4.6	ORF 94b	36
4.7	ORF 125	37
4.8	ORF 14/15a	37
4.9	ORF14/15b	38
4.10	ORF 23/24a	39
4.11	Variações genotípicas	41

4.11.1	<i>Variações genotípicas referentes a 2012.....</i>	41
4.11.2	<i>Variações genotípicas referentes a 2016.....</i>	42
4.11.3	<i>Variações genotípicas referentes a 2018.....</i>	46
5	DISCUSSÃO.....	47
6	CONCLUSÃO.....	51
	REFERÊNCIAS.....	52
	APENDICE A – CARGA VIRAL DETECTADA EM CAMARÕES <i>L. VANNAMEI</i> COLETADOS NO MUNICÍPIO DE ARACATI (CE) NO PERÍODO DE 2012, 2016 E 2018.....	57

1 INTRODUÇÃO

O cultivo de camarões vem rapidamente se expandindo, e constituindo um importante comércio no mundo (XU *et al.*, 2014). Porém, as doenças que atingem a produção tem se tornado um fator limitante para expansão da indústria (STENTIFORD *et al.*, 2012). Segundo um estudo realizado pela Global Aquaculture Alliance, cerca de 60% das enfermidades em camarões são causadas por vírus, 20% por bactérias e outros 20% por parasitas e fungos (FLEGEL *et al.*, 2008).

O surgimento de enfermidades no cultivo está relacionado ao desequilíbrio do meio ambiente, a saúde do animal e a presença de agentes patogênicos no meio (PEREIRA; SANTOS, 2003). Estudos revelam que milhões de vírus podem ser encontrados em cada mililitro da água do mar, e que estes microrganismos são os mais abundantes nos oceanos, desempenhando importantes papéis no ciclo geoquímico (SUTTLE, 2007).

Essas patologias vêm causando prejuízo na economia global, podendo levar a perdas superiores a 40% de toda a produção mundial (LEE *et al.*, 2015). Sabe-se que a indústria da carcinicultura é impactada por patógenos dos quais se conhece pelo menos 20 doenças causadas por vírus, 4 transmitidas por bactérias, 3 fúngicas e algumas por parasitas (ZORRIEZHARA; BANAEDERAKHSHAN, 2015). Os principais vírus de notificação obrigatória responsáveis pela perda de produção são os vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV, *White Spot Syndrome Virus*), vírus da necrose hipodérmica e hematopoiética (IHHNV, *Infectious Hypodermal and Hematopietic Necrosis Virus*), vírus da Mionecrose Infecciosa (IMNV, *Infectious Myonecrosis Virus*), Doença da cauda branca (WTD, *White Tail Disease*), Spherical baculovirosis (MBV, *Penaeus monodon baculovirus*), vírus da síndrome da cabeça amarela (YHV, *Yellow Head Syndrome Virus*), vírus da síndrome de Taura (TSV, *Taura Syndrome Virus*) e Baculovirus penaei (PvSNPV, *Baculovirus penaei*) (OIE, 2018).

O *White Spot Syndrome Virus* (WSSV) é um dos patógenos que promove grande impacto econômico na criação de camarões peneídeos (STENTIFORD *et al.*, 2012). No Brasil, o WSSV foi responsável pela queda de produção de 10.543 toneladas no ano de 2016. Diante disso, novas técnicas de criação e medidas de biossegurança foram adotadas para um sistema de produção mais eficaz (ABCC, 2017).

Os métodos moleculares vêm permitindo o diagnóstico de doenças que impactam a indústria, facilitando seu entendimento e gerenciamento (LIGHTNER; REDMAN, 1998). Neste sentido, a disponibilidade de ferramentas moleculares, como a PCR em tempo real, ampliou significativamente a capacidade de detectar e quantificar o WSSV em anos recentes. Porém, ainda existem muitos estudos que podem ser realizados a respeito da sua origem, diversidade e dinâmica populacional. Logo, o conhecimento da genética dos patógenos (FLEGEL *et al.*, 2008) e sua detecção, por meio de técnicas moleculares (PCR e testes cromatográficos) permitem o desenvolvimento de uma indústria da carcinicultura mais estável (FLEGEL, 2006) e revelam maneiras de reduzir o impacto econômico por doenças (STENTIFORD *et al.*, 2017).

Sabe-se que o acompanhamento e detecção de enfermidades por PCR das pós-larvas permitem um maior controle epidemiológico ao produtor, reduzindo os riscos de grandes perdas da produção (PENG *et al.*, 2001, WITHYACHUMNARNKUL, 1999). No entanto, o acompanhamento epidemiológico não impossibilita que os organismos cultivados sejam infectados pelo vírus durante o cultivo. Visto que, a exposição ambiental permite a contaminação dos organismos cultivados, seja por fatores bióticos ou abióticos, e a ausência das técnicas de biossegurança no manejo favorece o aumento do risco de infecção dos organismos cultivados (WALKER *et al.*, 2011).

O Ceará é um dos maiores produtores de camarão do Brasil (ABCC, 2017) e o WSSV se encontra presente no estado desde 2005 (MULLER *et al.*, 2010), vindo afetar significativamente a produção a partir do ano de 2016 (NUNES; FEIJÓ, 2016). No entanto, nenhum estudo veio a relatar sobre os genótipos do vírus e sua variação genética no estado do Ceará. Por isso, são necessários estudos com esta abordagem para que possam permitir o conhecimento acerca da epidemiologia do vírus na região, buscando a compreensão de sua propagação e dinâmica viral.

1.1 Revisão Bibliográfica

1.1.1 Aquicultura

Aquicultura, segundo a FAO (2018), é o cultivo de organismos aquáticos incluindo peixes, moluscos, crustáceos e plantas aquáticas em águas costeiras ou interiores, onde para melhorar sua produção são realizadas medidas interventoras no processo de produção.

A produção total da aquicultura em 2016 foi de 80 milhões de toneladas de peixes, movimentando cerca de US\$ 232 bilhões de dólares em todo o mundo. Estes peixes cultivados englobam 54,1 milhões de toneladas de pescado, 17,1 milhões de toneladas de moluscos, 7,9 milhões de toneladas de crustáceos e 938.500 toneladas de outros animais aquáticos (SOFIA, 2018). Os maiores produtores foram China, Índia, Indonésia, Vietnã, Bangladesh, Egito e Noruega. (SOFIA, 2018).

Podemos observar grande diversidade na aquicultura quando nos referimos às: espécies cultivadas (são cultivadas 598 espécies no mundo (SOFIA, 2018); sistemas de cultivo (bioflocos, água verde, água clara, mixotrófico, em tanque-rede, policultivo); ambientes (água doce, salobra, marinha); intensificação (extensivo, semi-intensivo, intensivo, super-intensivo) (REANTASO *et al.*, 2005).

A aquicultura apresentou crescimento anual médio de 5,8% de 2000 – 2016 sendo um dos setores com maior taxa de crescimento da área de produção alimentícia. No entanto, observaremos um declínio em seu crescimento se compararmos a taxa de crescimento atual com a das décadas de 1980 – 1990 que eram de 10% ao ano, mas o crescimento na escala de dois dígitos ainda pode ser verificado atualmente em alguns países da África (SOFIA, 2018).

Uma das causas do decréscimo na produção vem sendo às enfermidades que atingem o cultivo de organismos aquáticos. Onde surtos podem acarretar na perda de toda a produção causando grandes despesas (PILLAY; KUTTY, 2005). As mudanças climáticas e a alta produção de alimentos são uma das responsáveis pelo aumento de patógenos nos cultivos (LEUNG; BATES, 2013), visto que com a intensificação dos cultivos podem surgir problemas com a qualidade de água e nutricionais, estes permitem ambientes satisfatórios para o desenvolvimento de parasitas que encontrarão hospedeiros com imunidade debilitada devido as

condições ambientais que vivem (MARTINS, 2004). Porém, o conhecimento das condições apresentadas para se ter os surtos não foram identificados. No entanto, seu conhecimento auxiliaria na prevenção e/ou previsão de futuros surtos, possibilitando a criação de estruturas ou estratégias de gestão adaptáveis (LEUNG; BATES, 2013).

1.1.2 Carcinicultura Mundial

A produção mundial de crustáceos no ano de 2016 foi de 7,8 milhões de toneladas, desses 4,1 milhões de toneladas pertenceu à produção do camarão branco do pacífico *Litopenaeus vannamei* (SOFIA, 2018). Esta espécie é considerada uma das mais produzidas mundialmente pela carcinicultura (VALDERRAMA *et al.*, 2016), pois apresenta características favoráveis ao cultivo como: sobrevivência larval elevada, rápido crescimento, adaptação do cultivo em altas densidades, consumo de rações com baixos níveis proteicos, utilização eficiente da proteína vegetal, tolerância a toxicidade da amônia e nitrito (LIAO; CHIEN, 2011) e suportar altas variações de salinidade.

No momento, um dos maiores problemas e desafios da carcinicultura mundial são doenças, custos de produção (principalmente com a ração), qualidade e disponibilidade de reprodutores e acesso a estoques livres de patógenos (VALDERRAMA *et al.*, 2016). Doenças na carcinicultura vêm impactando a indústria com perdas de bilhões de dólares (CHOI, 2017). A principal patogenia viral do mundo vem sendo causada pelo WSSV (THITAMADEE *et al.*, 2016), estimando-se perda de 1 bilhão de dólares por ano em todo o mundo desde meados de 1990 (FLEGEL *et al.*, 2008). Porém, o surgimento de uma nova doença emergente a Síndrome da Mortalidade Precoce (EMS) vem causando grandes perdas na indústria, onde se estima prejuízos de 1 bilhão de dólares por ano (ZORRIEHZAHRA & BANAEDERAKHSHAN, 2015), e sendo a responsável pelo decréscimo de 20% na produção do México em 2013 (GOAL, 2017).

Com este entrave produtivo o setor vem apostando em programas de melhoramento genético voltados a seleção de animais resistentes à patógenos, assim como o desenvolvimento do setor de ração para que venha a propiciar melhores ingredientes alimentares, permitindo o desenvolvimento do agronegócio e intensificação do processo produtivo (GOAL, 2017).

1.1.3 Carcinicultura Brasileira

A carcinicultura no Brasil apresentou uma produção de 52,11 mil toneladas em 2016 (IBGE, 2016) apresentando um decréscimo de aproximadamente 25,4% em comparação ao ano anterior (IBGE, 2015), em 2003 a atividade apresentou sua melhor produção com 90 mil toneladas de camarões. Nos anos seguintes, teve início uma queda na produção devido ao surgimento de enfermidades como o Vírus da Mionecrose Infecciosa (IMNV) e o Vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV) (ABCC, 2017).

O crescimento do cultivo de camarão marinho apresenta duas características: a participação de pequenos produtores que compreendem aproximadamente 75% do total da produção nacional; e a geração de 3,75 empregos diretos e indiretos por hectare em produção (ROCHA, 2011), tornando o segmento mais dinâmico na geração de empregos no setor primário brasileiro (OLIVEIRA; MATTOS, 2007).

O estado do Ceará em 2015 foi o maior produtor nacional desta atividade apresentando uma produção de 41.414 toneladas. Esta atividade foi realizada por cerca de 630 produtores numa área de 9.744 hectares de viveiros em produção (ABCC, 2017). Neste período os principais municípios produtores de camarão eram cearenses tendo Aracati como líder do *ranking* com 12,56 mil toneladas, seguido por Acaraú, Jaguaruana, Beberibe e Camocim (IBGE, 2015).

A intensificação do cultivo de camarões pode gerar acúmulo de resíduos de alimento, matéria orgânica e compostos tóxicos que comprometem a qualidade da água e, conseqüentemente, os organismos cultivados. Para mantê-la nos parâmetros ideais de cultivo são utilizadas frequentes renovações de água que podem trazer enfermidades ao ambiente e grande carga de efluentes (HARGREAVES, 2006).

No ano de 2016, o vírus da mancha branca (WSSV) se disseminou nas fazendas do Ceará. Estima-se que esta enfermidade tenha dizimado parte da produção de fazendas localizadas na região do baixo Jaguaribe (NUNES; FEIJÓ, 2016), onde se localizam os principais municípios produtores do país. Logo, sendo o responsável pela queda de 41,6% da produção do estado, que neste ano apresentou aumento de 10% no número de produtores e incremento de 663 ha na área cultivada (ABCC, 2017).

1.1.4 Vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV)

A síndrome da mancha branca vem sendo uma das enfermidades de maior impacto econômico nas produções de camarão do mundo (FLEGEL, 2008). Sendo detectado inicialmente no leste da Ásia entre os anos de 1992 e 1993 (FLEGEL, 2011) vindo, posteriormente, a se dispersar por todos os continentes causando significativas perdas econômicas (VERBRUGGEN *et al.*, 2016).

Organismos infectados por este patógeno viral podem apresentar menor consumo alimentar; natação lenta, exoesqueleto mole, hemolinfa turva, manchas brancas na carapaça, hepatopâncreas necrosado e causar entre 80 a 100% de mortalidade em cerca de 3 a 5 dias após sua manifestação. Fatores que podem propiciar a entrada e disseminação deste vírus nas fazendas de cultivo de camarão são: excesso de matéria orgânica no solo de viveiros; captação de água contaminada com o vírus no ambiente; alta amplitude térmica; utilização de larvas contaminadas; estresse; baixa qualidade de água e ausência de medidas de biossegurança (NUNES; FEIJÓ, 2016).

Sua transmissão pode ocorrer de forma horizontal, através do contato e/ou ingestão de outros organismos infectados; ou vertical, sendo transmitida pelos pais para a progênie (VERBRUGGEN *et al.*, 2015). O WSSV apresenta grande diversidade de hospedeiros potenciais como poliquetas, bivalves, caranguejos, copépodos, lagostas, larvas de insetos aquáticos (ESCOBEDO BONILLA *et al.*, 2007), possibilitando que sua disseminação seja mais ampla. No entanto, apresenta patogenicidade e alto poder de virulência apenas em camarões peneídeos (VERBRUGGEN *et al.*, 2016). Contudo, sabe-se que a passagem do WSSV por alguns crustáceos permite que o vírus mantenha sua patogenicidade ao infectar camarões da espécie *L. vannamei*, no entanto o vírus perde seu poder de virulência quando seu hospedeiro é o *Macrobrachium rosenbergii* (WAIKHOM *et al.*, 2006).

O WSSV pertence ao gênero *Whispovirus* e a família Nimaviridae, sendo seu único representante. Apresenta DNA fita dupla circular e um dos maiores genomas conhecidos entre os vírus, com aproximadamente 300 kbp. São conhecidos alguns genomas completos do vírus coletado em diferentes partes do mundo, 293 kbp (Tailândia), 296 kbp (Coreia), 305 kbp (China), 307 kbp (Taiwan) (VERBRUGGEN *et al.*, 2016) e 285 kbp (Austrália) (OAKLEY; SMITH, 2018).

1.1.5 Variantes virais

Após a publicação do genoma completo de algumas estirpes como a de Taiwan (WSSV-TW) (TSAI *et al.*, 2000), China (WSSV-CH) (YANG *et al.*, 2001) e da Tailândia (WSSV-TH) (VAN HULTEN *et al.*, 2001), possibilitou que estas sequências fossem alinhadas, e observadas que, apesar de apresentarem alta similaridade genômica, possuíam regiões diferentes (SHEKAR; PRADEEP; KARUNASAGAR, 2012). Uma dessas regiões, denominada VR 23/24, apresentava alto índice de deleção entre as estirpes; a região da VR 14/15 foi observada apenas a partir da estirpe WSSV-TH podendo ser atribuída a uma recombinação da região genômica; variações repetidas em tandem (VNTR) foram observadas nas ORF 75, 94 e 125 (SÁNCHEZ-PAZ, 2010; SHEKAR; PRADEEP; KARUNASAGAR, 2012).

A descoberta dessas regiões genômicas permitiram o desenvolvimento de estudos epidemiológicos onde as ORF 75, 94 e 125 passaram a ser utilizadas na verificação da disseminação do vírus em pequenas escalas (proporções regionais) espaço-temporais e as deleções genômicas observadas nas VRs 14/15 e 23/24 a serem utilizadas para estudos em grandes escalas (proporções continentais) (proporções continentais) (PIAMSOMBOON *et al.*, 2017).

Assim, o estudo dessas regiões genômicas permitiram que abordagens epidemiológicas fossem utilizadas para investigar a propagação e o movimento do vírus, ajudando na compreensão de sua distribuição e evolução (PIAMSOMBOON *et al.*, 2017).

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Detectar mudanças genotípicas no vírus da síndrome da mancha branca (*White Spot Syndrome Virus – WSSV*) no camarão *L. vannamei* no maior polo produtivo do Estado do Ceará nos períodos de 2012, 2016 e 2018.

2.2 Específicos

- Avaliar a ocorrência do vírus da mancha branca (WSSV) no município de Aracati por meio de análise histológica e molecular.
- Caracterizar geneticamente o WSSV através da análise de minissatélites nas ORFs 75, 94 e 125 e VRs 14/15 e 23/24.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Material de Estudo e Coleta

Neste trabalho, foi realizado um estudo temporal em três fazendas distintas na cidade de Aracati que compreendeu os anos de 2012, 2016 e 2018. Camarões da espécie *L. vannamei* foram coletados para análise molecular e histopatológica. Onde foram analisadas um total de 210 amostras de pleópodos, dispostas em: 60 amostras de 2012, 30 amostras do ano de 2016, 60 amostras referentes ao ano de 2018. As amostras pertencentes aos anos de 2012 e 2016 faziam parte do banco de amostras do Centro de Diagnósticos de Organismos Aquáticos (CEDECAM/LABOMAR – UFC). As lâminas histológicas referentes a 2012 estavam prontas para análise microscópica e as de 2016 deveriam ser processadas.

As amostras de camarões referentes a 2018 destinadas à análise histopatológica foram fixadas em solução de Davidson AFA's (11,5% de ácido acético, 22% de formalina e 33% de etanol) e imersas na mesma solução por 24 horas (BELL; LIGHTNER, 1998). As amostras dos pleópodos destinadas às análises moleculares foram preservadas em álcool 95% (Merk®).

3.2 Extração de DNA

O DNA genômico total foi extraído de 1mg do tecido muscular estocado em álcool etílico 96% (Merck®) através da metodologia adotada por Sambrook *et al.* (1989). O tecido foi lavado em microtubos de 1,5 ml com Tris-HCl 10 mM (pH 7,0), e adicionados 700 µl do tampão de extração (Tris-HCl 100 mM, SDS 1%) e 10 µl (30 ng/ µl) de proteinase K. Em seguida, foram incubadas em 42°C por aproximadamente 16 horas, objetivando a completa digestão do tecido. Após o período de incubação foi realizado a purificação adicionando-se 350 µl de fenol e 350 µl de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) que durante 5 minutos foram misturados por inversão e, posteriormente, centrifugados a 7.000 g por 5 minutos. Subsequentemente, pode ser constatada duas fases aquosas, da qual foi transferida para um novo microtubo de 1,5 ml a fase aquosa superior. Para uma nova etapa de purificação se adicionou 500 µl de clorofórmio: álcool isoamílico misturando por inversão durante 5 minutos e novamente centrifugado a 7.000 rpm/5min. Onde se

observou duas fases aquosas, a qual foi retirada a fase superior e descartada. Em seguida, se adicionou 1 ml de etanol absoluto e 50 µl do acetato de sódio (3M), e foram incubadas em freezer -20°C/ 15 min sendo centrifugadas, sucessivamente, a 10.000 g por 5 minutos. Posteriormente, se descartou a fase aquosa e o pellet obtido foi lavado com álcool 70% gelado, que passou por uma nova centrifugação a 10.300 rpm/5min. Em seguida, o etanol foi descartado e os microtubos invertidos em papel toalha com a finalidade de maximizar sua secagem a temperatura ambiente pelo período de 15 minutos. Finalizando o DNA foi recuperado em 50 µl de TE (Tris-HCl 10 mM e EDTA 1 mM).

A integridade do DNA foi verificada em gel de eletroforese 1%, e realizada a análise para validação do DNA onde teve sua integridade constatada através da amplificação do gene da β -actina (Forward – 5'- GACCGAGGCTCCCCTTCAA -3' e Reverse – 5' -TCTCGAACATGATCTGTGTCAT -3').

3.3 Análise Histopatológica

A preparação das lâminas histológicas se iniciou com os cortes dos tecidos e armazenamento em histocassetes que foram imersos em álcool 70%. O passo seguinte foi o processamento de tecidos, sendo realizados no processador automático LUPETEC PT05 banhos de imersões durante o período de 1 hora em uma série alcoólica crescente de 70%, 80%, 90% e 100%, diafanizados em xilol e infiltrados em parafina.

Posteriormente, o tecido estava pronto para o emblocamento, onde esse foi retirado do histocassete e posicionado em molde para adição da parafina com o auxílio do emblocador HESTION TEC 2800, em seguida solidificou sobre placa fria. Após 24 horas pode-se realizar no micrótomo LEICA MR2125RT os cortes histológicos com espessura de 5 µm, onde o corte ficou sobre água pré-aquecida (40°C) com o intuito de que abrisse e evitasse dobras no tecido. Após fixação do tecido na lâmina, as amostras foram fixadas com a adição de albumina na lâmina histológica, a mesma foi posicionada sobre um suporte para secagem e posterior coloração.

A coloração H&E (Hematoxilina e Eosina) ocorreu 24 horas após a realização do corte dos tecidos. As lâminas foram posicionadas no suporte adequado e se prosseguiu com a imersão nos reagentes (BELL; LIGHTNER, 1998).

Finalizando a coloração, as lâminas foram montadas com Entellan e as lamínulas fixadas. Estas continuaram na capela até cessar o odor de xilol. A análise das lâminas ocorreu em microscópio de luz DM 500 (Leica®) de acordo com Lightner (1996), onde foram observados os tecidos do epitélio estomacal e brânquias.

Tabela 1 - Classificação do grau de severidade da infecção observada na análise histopatológica de camarões coletados em fazendas de cultivo do município de Aracat- (CE) no período de 2012, 2016 e 2018.

Grau de Severidade da Infecção	Alterações celulares
0	Não infectado. Observam-se células com aparência normal.
1	Infecção muito leve. Início da Infecção viral. Grande quantidade de células saudáveis. Porém, surgem as primeiras alterações histopatológicas como hipertrofia nuclear, fragmentação nuclear com cromatina condensada ou degeneração celular leve (cariorrhexis) e retração nuclear com cromatina condensada (picnosis).
2	Infecção moderada. Observam-se células com cariorrhexis e picnosis moderadas; inclusões intranucleares eosinofílicas com cromatina marginada rodeadas de citoplasma transparente (células tipo Cowdry A).
3	Infecção Alta. Apresenta células com dissolução do núcleo (cariolisis), células Cowdry tipo A em processo de crescimento das inclusões intranucleares eosinofílicas com cromatina marginada até que finalmente o núcleo ocupa completamente o citoplasma. As inclusões nucleares se desenvolvem dentro de corpos basofílicos tênues, as quais não são muito evidentes nessa etapa. Podem existir degeneração e desintegração nos tecidos.
4	Infecção severa. Constata-se a invasão generalizada dos tecidos infectados, grandes corpos de inclusão basofílicos proeminentes e, em menor grau, necrose celular. Degeneração massiva e desintegração dos tecidos.

Fonte: Lightner, 1996

3.4 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR)

A PCR em Tempo Real foi utilizada para detecção e quantificação molecular do WSSV, através da plataforma *ABI 7500 Real-time PCR system* (Applied Biosystems®), sendo utilizados os primers e sondas recomendados pela OIE (Organização Mundial da Saúde Animal). A quantificação da carga viral foi realizada por meio de reações da qPCR com 10 µL de volume final, onde se utilizou 5 µL do TaqMan® Universal PCR Master Mix No AmpErase® UNG (Applied Biosystems®); 0,3 µL (10 µM) de ambos os primers (WSSV qPCR: Forward 5'-TGGTCCCGTCCTCATCTCAG -3', Reverse 5'-GCTGCCTTGCCGGAAATTA- 3'); 0,15 µL (10 µM) da sonda de hidrólise (WSSV: *FAM-AGCCATGAAGAATGCCGTCTATCACACA-TANRA*); 3,25 µL de água ultrapura (Invitrogen®) e 1 µL (100 ng) de DNA. Controle negativo (reação sem adição de DNA) foi utilizado para confirmação da ausência de contaminação dos reagentes e controles positivos clonais (pTOPO-WSSV) com diluições conhecidas (10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 e 10^9 cópias de pTOPO-WSSV) para construção da curva padrão de quantificação do vírus. A reação ocorreu nas seguintes condições: incubação a 50°C por 2 minutos, ativação da Platinum®Taq DNA polimerase a 95°C por 2 minutos, subsequentemente 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e uma extensão final a 60°C durante 30 segundos. Todas as amostras foram realizadas em duplicatas sendo considerada positiva apenas com a amplificação de ambas.

3.5 Genotipagem por Análise de Minisatélite

A partir do DNA extraído foram realizados PCRs convencionais com primers específicos para a amplificação de regiões das ORF 75, 94, 125 e das VRs 14/15 e 23/24 (Tabela 02), onde as condições de termociclagem utilizadas encontram-se na Tabela 03.

As reações de amplificação foram realizadas no termociclador *Veriti® 96-Well Thermal Cycler* (Thermo Fisher Scientific), onde as condições de termociclagem utilizadas se encontravam devidamente otimizadas, ou seja, na melhor faixa de temperatura e concentrações dos reagentes para sua amplificação. Para validação da PCR foi utilizado um controle negativo e controle positivo (proveniente de outros trabalhos realizados no laboratório). Os fragmentos amplificados foram observados

em gel de agarose a 1%, conforme descrito anteriormente (Item 3.2). Posteriormente, foram analisados os tamanhos dos amplicons com a ajuda do software Gel analyser com o objetivo de observar possíveis padrões (amplicons) diferentes entre as amostras.

Tabela 2 - Descrição de primers utilizados para a genotipagem do WSSV detectado em camarões *L. vannamei* coletados em fazendas do município de Aracati (CE) nos anos de 2012, 2016 e 2018.

Primers		Sequência	Fonte
ORF 75a	Forward	ATATGCCAGATTTCTTCCCCTACCC	Dados não publicados
	Reverse	CAACAGGTGCGTAAAAGAAGTCGAG	
ORF 75b	Forward	GAA GCA GTA TCT CTA ACA C	DIEU <i>et al.</i> , 2004
	Reverse	CAA CAG GGT CGT AAA AGA AC	
ORF 94a	Forward	AGGAACTTTTCGATACAGTAGGGTCT	Dados não publicados
	Reverse	TAGTCTATTCTTCAACCACCGTCAC	
ORF94b	Forward	TCT ACT CGA GGA GGT GAC GAC	WONGTEERASUPAYA <i>et al.</i> , 2003
	Reverse	AGC AGG TGT GTA CACATT TCA TG ACA GTG ACC ACA CGA TAA TAC CA	
ORF 125	Forward	CA	HOA <i>et al.</i> , 2011
	Reverse	TCG TTC ACC ATA TCC ATT GCC CT	
VR 14/15a	Forward	AAT ATG GAA CGA CGG GTG	MARKS <i>et al.</i> , 2005
	Reverse	GAC CAG CGC CTC TTC AG	
1415b (1 STEP)	Forward	TCAACAACCCAAATCCCATT	PIAMSONBOOM <i>et al.</i> , 2018
	Reverse	CTCTCAATCTTCCCCCAACA	
1415c (2 STEP)	Forward	GAGATGCGAACCACTAAAAG	DIEU <i>et al.</i> , 2004
	Reverse	ATGGAGGCGAGACTTGC	
VR 23/24	Forward	GTA GTG CAT GTT TCT CTA AC	DIEU <i>et al.</i> , 2010
	Reverse	GTA AGT TTA TTG CTG AGA AG	

Tabela 3 - Condições de termociclagem empregada para a genotipagem do WSSV por análise de minissatélites.

Primer	Condições de termociclagem			
	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Nº de ciclos
ORF 75a	94°C – 50s	61°C – 50s	70°C – 50s	35
ORF 75b	95°C – 45s	48°C – 20s	72°C – 80s	36
ORF 94a	94°C – 50s	60°C – 50s	70°C – 50s	35
ORF 94b	95°C – 20s	54°C – 20s	72°C – 90s	40
ORF 125	95°C – 30s	40°C – 20s	72°C – 100s	40
VR 14/15a	95°C – 30s	59°C – 30s	72°C – 120s	35
1415b (1 STEP)	95°C – 15s	60°C – 15s	72°C – 60s	40
1415c (2 STEP)	95°C – 15s	60°C – 15s	72°C – 60s	40
VR 23/24	95°C – 30s	60°C – 30s	72°C – 50s	35

Fonte - Elaborada pelo autor.

3.6 Clonagem

Os produtos de PCRs referentes a fragmentos genéticos das ORFs 75, 94, 125 e das VRs 14/15 e 23/24 foram purificados utilizando-se o kit Quick PCR Purification Kit (INVITROGEN®). Posteriormente, ocorreu a ligação dos fragmentos ao plasmídeo pGEM®-T Easy Vector Systems (PROMEGA®) para que pudessem ser transformadas em células eletrocompetentes. As células foram transferidas para placas de Petri contendo meio de cultura LB sólido, X-gal (100 µl / ml), IPTG (0,5 mM) e ampicilina (100 µl / ml) que foram mantidas em estufa a 37°C para crescimento das colônias. As colônias de coloração branca, ou seja, as colônias que apresentavam o inserto, foram utilizadas para replicação em meio líquido. Nesse período, uma análise de PCR foi realizada para a confirmação do tamanho do fragmento clonado, utilizando-se os primers M13 (M13 *Forward* – 5'-GTAAAACGACGGCCA-3' e M13 *Reverse* – 5'-AGCGGATAACAATTCACACAGG-3'), específicos para o vetor plasmidial utilizado. Em seguida, ocorreu a purificação do DNA plasmidial através do PureLink-Quick Plasmid Miniprep Kit (INVITROGEN®), que foi armazenado em freezer a -20°C.

3.7 Sequenciamento

O processo de leitura dos fragmentos plasmidiais clonados foram realizados no sequenciador automático capilar 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems®) da Plataforma de Sequenciamento de DNA do Laboratório Central do Centro de Ciências Biológicas (CCB) da UFPE, de forma bidirecional, onde os *primers* M13 (descritos no subitem 3.6) foram utilizados como iniciadores. Os resultados obtidos foram posteriormente analisados em softwares de bioinformática.

3.8 Análise de dados

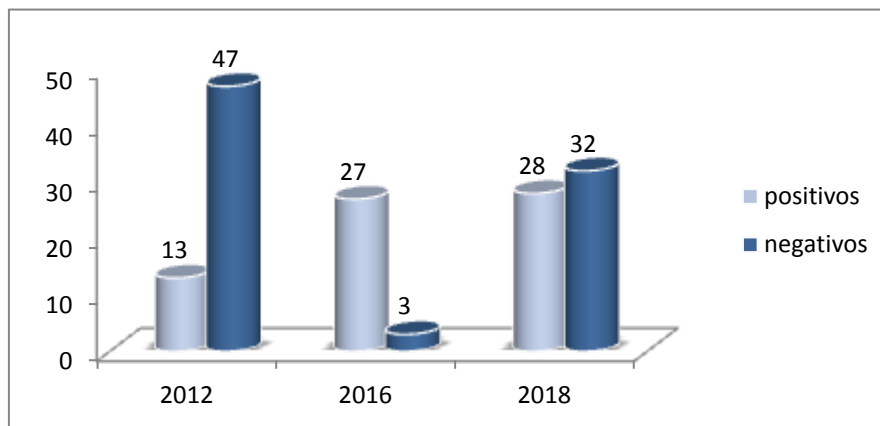
A análise dos dados obtidos do sequenciamento foi realizada através dos programas Chromas® e Geneious®, que permitiram a visualização da integridade das sequências obtidas e retirada de contaminantes. Posteriormente, foi utilizado o software MEGA 7 para realização do consenso de algumas amostras. A ferramenta BLAST foi utilizada para confirmação das sequências com o vírus do WSSV, disponíveis no NCBI (National Center of Biotechnology Information).

4 RESULTADOS

4.1 Detecção e Quantificação de Carga Viral

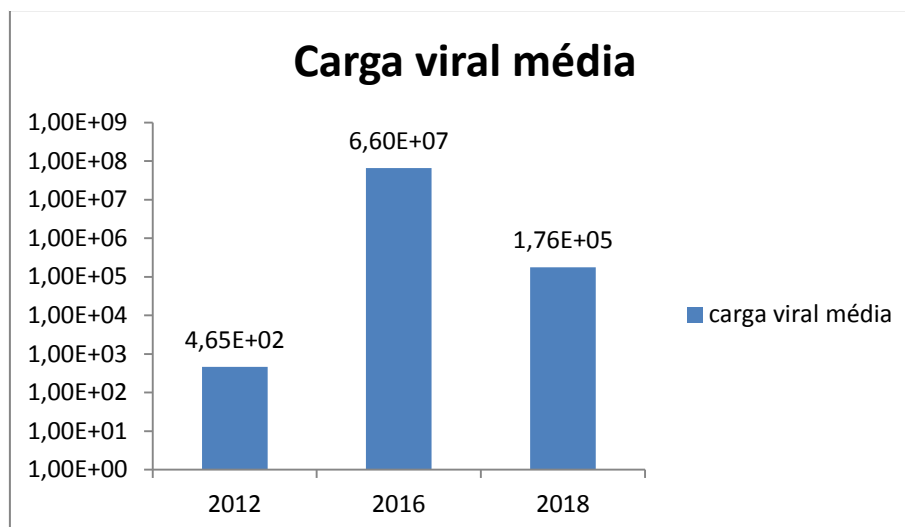
As amostras de camarões coletadas em Aracati nos anos de 2012, 2016 e 2018 apresentaram 22,4%, 95% e 46,7%, respectivamente, para a presença do WSSV, o gráfico 01 demonstra a quantidade de organismos infectados e não infectados em cada ano. A carga viral média encontrada foi de $4,65 \times 10^2$; $6,60 \times 10^7$ e $1,76 \times 10^5$ cópias de WSSV/ μg de DNA, respectivamente para os anos de 2012, 2016 e 2018, onde foram considerados apenas os organismos positivos. Esta pode ser observada no gráfico 02. Tabela completa com a carga viral de cada indivíduo encontra-se no Apêndice.

Gráfico 01 - Organismos positivos e negativos dos anos 2012, 2016 e 2018.



Fonte - Elaborado pelo autor.

Gráfico 02 - Carga viral média dos organismos positivos referentes aos anos de 2012, 2016 e 2018.



Fonte - Elaborado pelo autor.

4.2 HISTOLOGIA

As análises histopatológicas mostraram que 46,7%, 100% e 100% dos camarões analisados em 2012, 2016 e 2018, respectivamente, possuíam lesões características de WSSV, a partir do total de camarões analisados nos anos de 2012, 2016 e 2018 obteve-se que 18% dos animais não apresentaram infecção, obtendo grau de severidade 0; 11,23% possuíam infecção muito leve com grau 1 de severidade; 27% apresentaram grau 2 de severidade; 25,8% dos animais apresentaram grau 3 de severidade nas lesões e 17,9% grau 4 (Tabela 5 e gráfico 1). Não foi possível analisar o grau de severidade da amostra 2 referente ao ano de 2018. Na figura 1 e 2 podemos observar corpos de inclusão (indicados por seta) referentes as amostras de 2016.

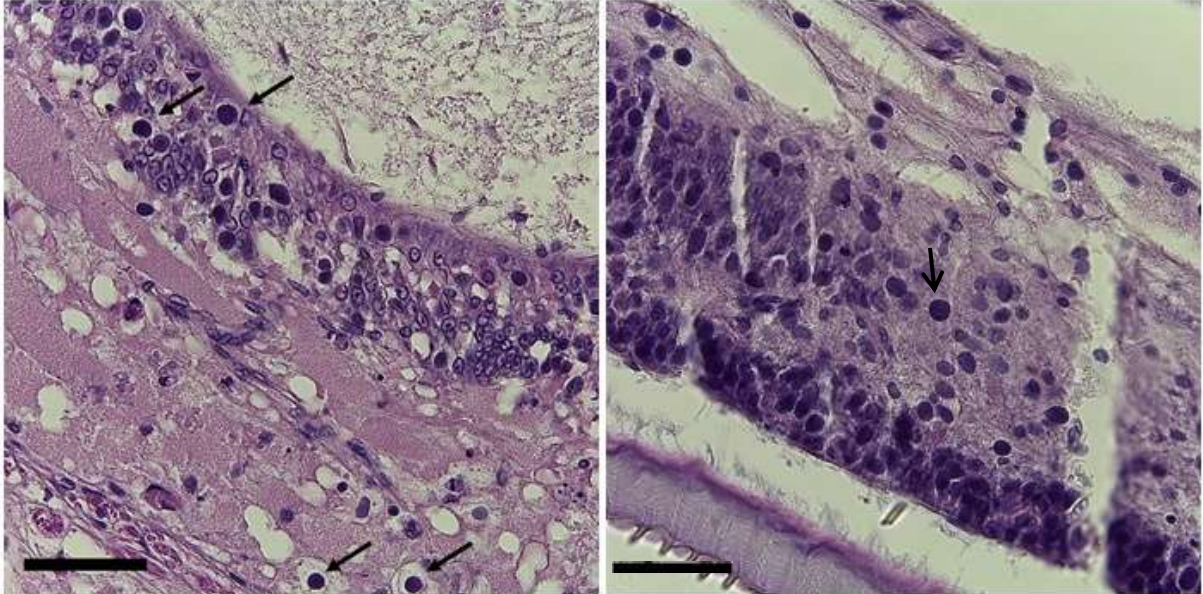
Tabela 4 - Grau de severidade da infecção por WSSV verificado através da histopatologia em camarões *L. vannamei* coletados em Aracati em 2012, 2016 e 2018.

Amostras 2012	Grau de severidade	Amostras 2016	Grau de severidade	Amostras 2018	Grau de severidade
1	1	1	3	1	3
2	0	2	3	2	-
3	0	3	3	3	2
4	2	4	4	4	1
5	1	5	3	5	3
6	3	6	3	6	2
7	1	7	4	7	2
8	1	8	3	8	3
9	2	9	4	9	2
10	1	10	3	10	3
11	2	11	4	11	3
12	1	12	4	12	2
13	0	13	3	13	2
14	1	14	3	14	2
15	0	15	4	15	2
16	0	16	4	16	2
17	0	17	4	17	2
18	0	18	4	18	2
19	0	19	3	19	2
20	0	20	4	20	1
21	0	21	3	21	2
22	0	22	4	22	3
23	0	23	4	23	2
24	0	24	3	24	2
25	2	25	4	25	2
26	0	26	3	26	2

Amostras 2012	Grau de severidade	Amostras 2016	Grau de severidade	Amostras 2018	Grau de severidade
27	0	27	4	27	3
28	2	28	3	28	3
29	0	29	4	29	1
30	2	30	4	30	2

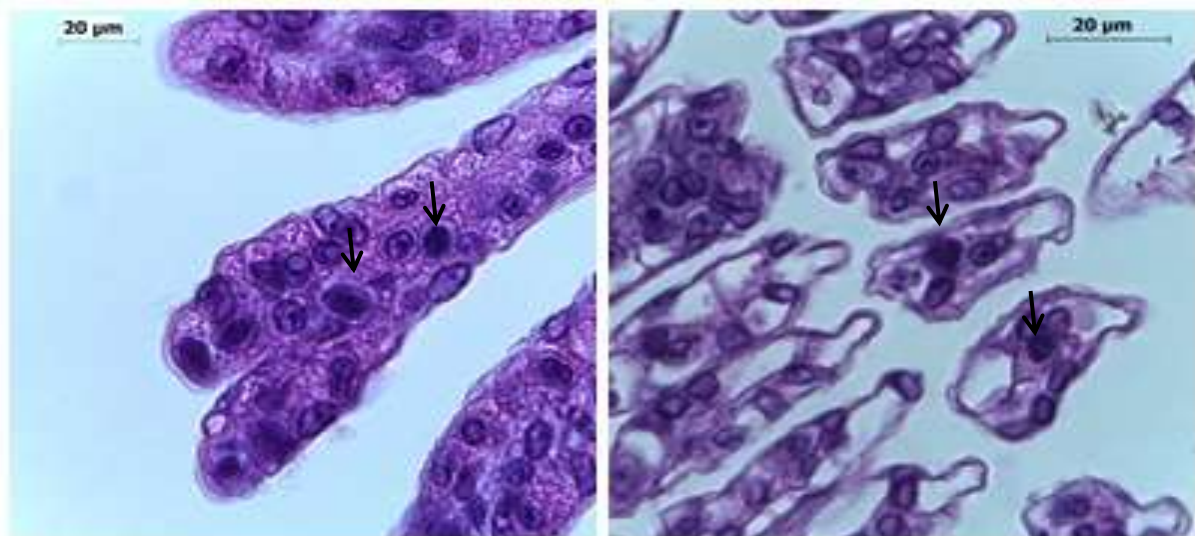
Fonte – Elaborada pelo autor

Figura 1 - Corpos de inclusão (seta) no epitélio subcuticular do estômago do camarão *L. vannamei* coletado no município de Aracati (CE). Barra = 25µm. Objetiva: 40x.



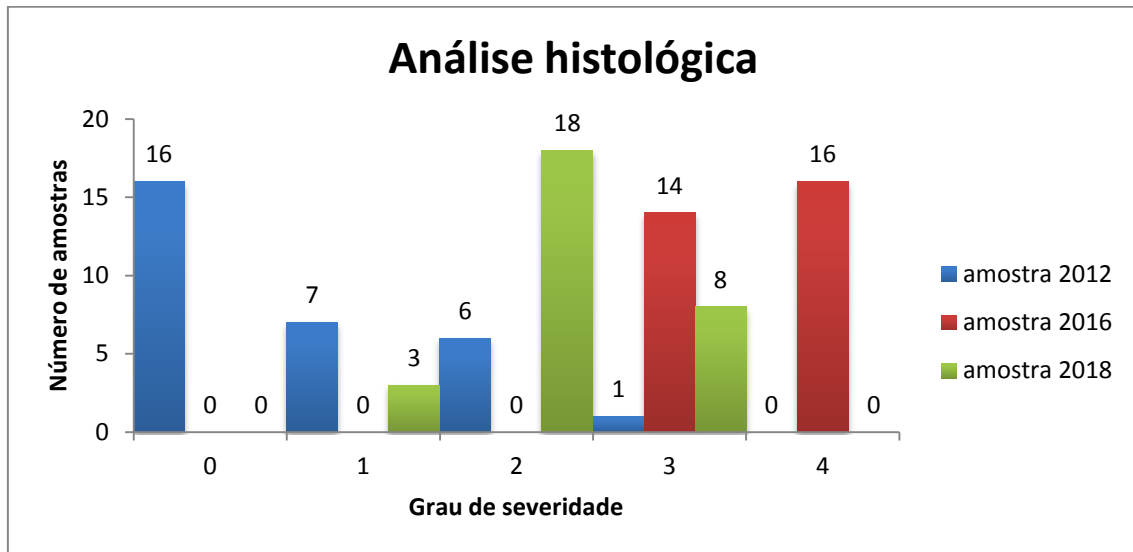
Fonte - Elaborada pelo autor.

Figura 2 - Corpos de inclusão (seta) nas brânquias do camarão *L. vannamei* coletado no município de Aracati (CE). Objetiva: 40x .



Fonte - Elaborada pelo autor.

Gráfico 3 - Grau de severidade da infecção por WSSV nas amostras coletadas em Aracati em 2012, 2016 e 2018.



Fonte - Elaborada pelo autor.

Nas lâminas histológicas foi verificado que as variantes virais referentes ao período de 2016 apresentaram maior grau de severidade nos tecidos analisados, as estirpes referentes ao período de 2012 apresentaram baixo grau de severidade variando entre 0 e 1, o período de 2018 apresentou variantes virais com grau de severidade mediana, grau 2 e 3.

4.3 ORF 75a

Os amplicons obtidos nas amplificações deste primer encontram-se na tabela 06.

Tabela 05 - Amplicons obtidos com o primer ORF 75a nos anos de 2012, 2016 e 2018.

Ano	Amplicons		
2012	200 (5/12)	450 (8/12)	850 (8/12)
2016	466 (2/30)	576 (26/30)	594 (2/30)
2018	422 (2/60)	784 (7/60)	943 (51/60)

Fonte - Elaborado pelo autor.

As amostras relativas ao ano de 2016 apresentaram amplicons de, aproximadamente 576 (26/30), 594 (2/30) ou 466 (2/30) pb. As amostras referentes a 2018 apresentaram, 943 (51/60), 784 (7/60) e 422 (2/60) pb, aproximadamente, onde pode-se observar 4 amostras com 2 amplicons e 2 amostra com 3 amplicons, não havendo amplificação em 6 amostras.

As amostras relativas ao ano de 2012 apresentaram 3 amplicons de aproximadamente, 850 (8/12), 450 (8/12) e 200 (5/12) amplicons, onde 3 amostras apresentaram apenas 1 amplicon, 6 apresentaram 2 amplicons e 1 apresentou os 3 amplicons.

A amostra sequenciada pertencia ao ano de 2018 com amplicon de 943 pb, o qual apresentou 96% de similaridade com a estirpe TH-96-II Orf 75 (GenBank nº AY864668.1) oriunda da Tailândia.

As sequências em tandem da ORF75 foram observadas com o auxílio do software UGEU, podendo-se observar 4 regiões de repetição com 45 pb. Após comparar - se o resultado obtido por Ramos Paredes *et al.* (2017) na estirpe do México e o deste trabalho foi observado que o padrão α II repete-se na amostragem sequenciada , destacados na tabela 07, e outro padrão que se repetiu 3 vezes com a sequência: GGA GCT GCT TCG GCC TCT TAC GTC CAA GGG CAC CTT TAA GTC GAG GAC CTG CTT TCG CGC CTC TTA GTC CAA.

Tabela 06 - Sequências das UR de 45 e 102 pb da ORF 75. As bases em negrito nas posições 3, 15, 30, 40, 42, 44 e 83 correspondem aos locais onde foram observados polimorfismos.

Padrão	Sequência
α I	CG C GAAGCAGCTCC C CCACTTAAAGGTGC A CTTGGACGT A AGAGG
β I	CG C GAAGCAGCTCC C CCACTTAAAGGTGC A CTTGGACGT A AGAGG CGCGAAGCAGAATCCTTGGAGGAAGA A ACTTGTGTCTGTTGAAGAAG AACGTGAAAAG
β Ic	CG C GAAGCAGCTCC C CCACTTAAAGGTGC A CTTGGACGT A AGAGG CGCGAAGCAGAATCCTTGGAGGAAGA A ACTTGTGTCTG C TGAAGAAG AACGTGAAAAG
α II	CG C GAAGCAGCTCC C CCACTTAAAGGTG C TCTTGGACGT A AGAGG
β IIc	CG C GAAGCAGCTCC C CCACTTAAAGGTG C TCTTGGACGT A AGAGG CGCGAAGCAGAATCCTTGGAGGAAGA A ACTTGTGTCTG C TGAAGAAG AACGTGAAAAG
α III	CGTGAAGCAGCTCCT C CACTTAAAGGTG C GCTTGGACGT A AGAGG
β IIIc	CGTGAAGCAGCTCCT C CACTTAAAGGTG C GCTTGGACGT A AGAGG CGCGAAGCAGAATCCTTGGAGGAAGA A ACTTGTGTCTG C TGAAGAAG AACGTGAAAAG
α IV	CGTGAAGCAGCTCCT C CACTTAAAGGTGC A CTTGGACGT A AAAGG
α V	CG C GAAGCAGCTCC C CCACTTAAAGGTGC A CTTGGACGT G AAAAG
β VIc	CG C GAAGCAGCTCC C CCACTTAAAGGTG C GCTTGGACGT A AGAGG CGCGAAGCAGAATCCTTGGAGGAAGA A ACTTGTGTCTG C TGAAGAAG AACGTGAAAAG
α VII	CG C GAAGCAGCTCC C CCACTTAAAGGTG C GCTTGGACGT G AAAAG
α VIII	CG C GAAGCAGCTCC C CCACTTAAAGGTGC A CTTGGACGT A AAAGG
α IX	CG C GAAGCAGCTCCT C CACTTAAAGGTG C GCTTGGACGT A AGAGG
α X	CG C GAAGCAGCTCCT C CACTTAAAGGTGC A CTTGGACGT A AGAGG

Fonte - Carvalho (2017).

4.4 ORF 75b

Os amplicons obtidos nas amplificações deste primer encontram-se na tabela 08.

Tabela 07 - Amplicons obtidos com o primer ORF 75b nos anos de 2012, 2016 e 2018.

Ano	Amplicons		
2012	450 (1/12)	600 (1/12)	900 (3/12)
2016	716 (1/30)	862 (4/30)	940 (25/30)
2018	200 (2/60)	450 (15/60)	940 (50/60)

Fonte - Elaborado pelo autor.

As amostras do ano de 2016 apresentaram amplicons de aproximadamente 940 (25/30), 862 (4/30) ou 716 (1/30) pb. As amostras referentes a 2018 apresentaram amplicons de 940 (50/60), 450 (15/60) e 200 (2/60) pb, aproximadamente, onde 5 amostras não apresentaram amplificação, pode-se observar 37 amostras com 1 amplicon, 9 amostras com 2 amplicons e 2 amostras com 3 amplicons.

As amostras relativas ao ano de 2012 apresentaram 3 amplicons de aproximadamente, 900 (3/12), 600 (1/12) e 450 (1/12) amplicons, onde 8 amostras não amplificaram, as amostras que amplificaram apresentaram apenas 1 amplicon.

A amostra sequenciada referente ao ano de 2018 com amplicon de 940 pb apresentou 96% de similaridade com o vírus da síndrome da mancha branca, cepa TH-96-II Orf 75 (AY753327), referente a Tailândia. As variações em tandem observadas correspondem aos mesmos resultados observados no primer anterior (ORF 75a).

4.5 ORF 94a

Os amplicons obtidos nas amplificações deste primer encontram-se na tabela 09.

Tabela 08 - Amplicons obtidos com o primer ORF 94a nos anos de 2012, 2016 e 2018.

Ano	Amplicons		
2012	200 (8/12)	400 (6/12)	500 (3/12)
2016	600 (1/30)	800 (9/30)	1050 (13/30)
2018	597 (11/60)	875 (46/60)	1028 (8/60)

Fonte - Elaborado pelo autor.

As amostras do ano de 2016 possuíam 3 amplicons de, aproximadamente, 1050 (13/30), 800 (9/30) e 600 (1/30) pb, 4 amostras não apresentaram amplificação, as amostras que apresentaram amplificação obtiveram apenas um amplicon. As amostras referentes a 2018 apresentaram amplicons de, 1028 (8/60), 875 (46/60) e 597 (11/60) pb ,aproximadamente, onde 8 amostras não apresentaram amplificação, pode-se observar 37 amostras com 1 amplicon, 11 amostra com 2 amplicons e 2 amostras com 3 amplicons.

As amostras relativas ao ano de 2012 apresentaram 3 amplicons de aproximadamente, 500 (3/12), 400 (6/12) e 200 (8/12) amplicons, onde 4 amostras não amplificaram, as amostras que amplificaram 3 apresentaram 1 amplicon, 4 amostras apresentaram 2 amplicons e 2 amostras amplificaram 3 amplicons.

Este primer não obteve êxito na clonagem, logo não houve sequenciamento.

4.6 ORF 94b

Os amplicons obtidos nas amplificações deste primer encontram-se na tabela 10.

Tabela 09 - Amplicons obtidos com o primer ORF 94b nos anos de 2012, 2016 e 2018.

Ano	Amplicons		
2012	200 (11/12)	500 (1/12)	-
2016	637 (1/30)	693 (4/30)	1252 (21/30)
2018	700 (3/60)	950 (25/60)	1050 (27/60)

Fonte - Elaborado pelo autor.

As amostras do ano de 2016 possuíam 3 amplicons de, aproximadamente 1252 (21/30), 693 (4/30) ou 637 (1/30) pb. As amostras referentes a 2018 apresentaram, 1050 (27/60), 950 (25/60), 700 (3/60) e 200 (1/60) pb ,aproximadamente, onde 13 amostras não apresentaram amplificação, pode-se observar 35 amostras com 1 amplicon, 8 amostras com 2 amplicons e 2 amostras com 3 amplicons.

As amostras relativas ao ano de 2012 apresentaram 2 amplicons de aproximadamente, 500 (1/12) e 200 (11/12) amplicons, onde 1 amostras não

amplificou, as amostras que amplificaram 10 apresentaram apenas 1 amplicon e uma apresentou dois amplicons.

A amostra sequenciada referente ao ano de 2018 com amplicon de 950 pb apresentou 100% de similaridade (E value = 1E-49) com as estirpes do FSL 39 (GenBank nº MF784752.1), proveniente do Rio Grande do Norte e com a MX-G-04 (GenBank nº HQ007032.1), do México.

A análise nos mostrou a seguinte sequência com 54 pb: CGC AAA AAG CGT GCC GCA CCT CCA CCT GAG GAT GAA GAA GAG GAT GAG TTC TAC. Onde foi observado na posição polimórfica 48 a base guanina e 5 unidades de repetição.

4.7 ORF 125

As amostras do ano de 2016 possuíam 1 amplicon de, aproximadamente 860 pb onde apresentou amplificação de apenas 4 amostras. As amostras referentes a 2018 e 2012 não apresentaram amplificação.

A amostra sequenciada referente ao ano de 2016 não apresentou similaridade com o genoma do WSSV quando submetidas a análise do BLAST (NCBI).

4.8 VR 14/15a

Os amplicons obtidos nas amplificações deste primer encontram-se na tabela 11.

Tabela 10 - Amplicons obtidos com o primer ORF 1415a nos anos de 2012, 2016 e 2018.

Ano	Amplicons (pb)	
2012	-	-
2016	Padrão 1 1256 e 4524 (24/30)	Padrão 2 3645 (2/30)
2018	Padrão 1 1256 e 4524 (4/60)	Padrão 2 3645 (1/60)

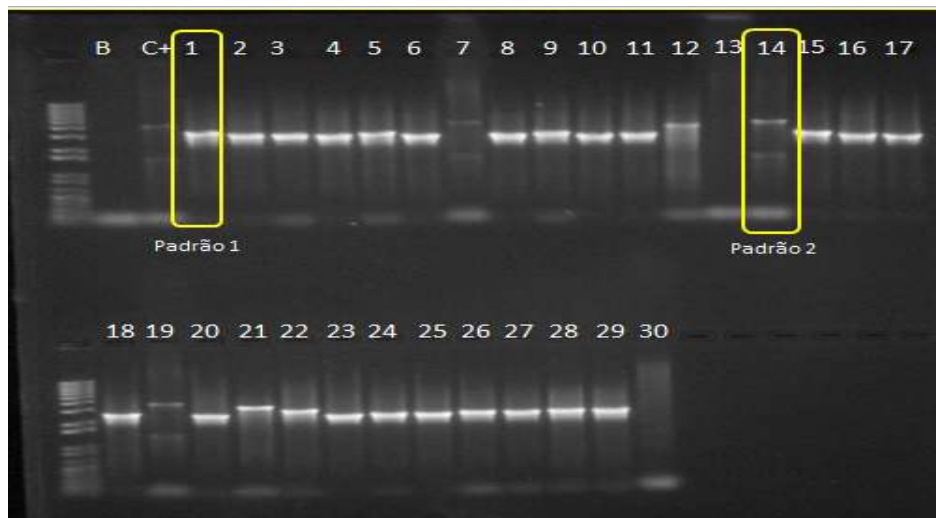
Fonte - Elaborado pelo autor.

A amostragem referente ao ano de 2012 não apresentou amplificação para os primers utilizados. As amostras de Aracati 2016 e 2018 apresentaram dois padrões de amplificação, o padrão 1 consistia de apenas um fragmento com cerca de 3645 pb; o padrão 2 apresentou 2 amplicons com 4524 e 1256 pb,

aproximadamente. O padrão 1 pode ser observado em 24 amostras de 2016 e 4 amostras de 2018, 3 amostras de 2016 exibiram o padrão 2, enquanto apenas 1 no ano de 2018. Não obtiveram amplificação 2 amostras referente a 2016 e 52 amostras referente a 2018. Na Figura 3 pode-se observar os padrões 1 e 2 destacados em amarelo.

O amplicon de 3645 pb ao ser sequenciado e comparados com a cepa ancestral TH-96-II (AY753327) que possui 7.801 pb, apresentou deleção de 4155 pb em relação ao seu ancestral. Pode-se observar 99% de similaridade com o vírus da síndrome da mancha branca, cepa FSL39 (Evalue = 0), referente ao Brasil (estado do Rio Grande do Norte). O padrão 2 não obteve sucesso na clonagem e na digestão do gel.

Figura 3 – Gel de eletroforese VR 14/15 amostra de Aracati 2016.



Fonte - Elaborado pelo autor.

4.9 VR 14/15b

Os amplicons obtidos nas amplificações deste primer encontram-se na tabela 12.

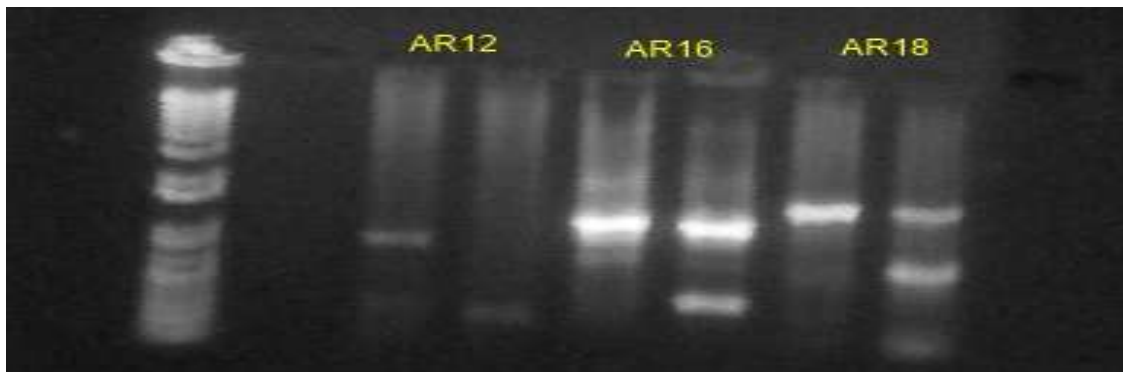
Tabela 11 - Amplicons obtidos com o primer ORF 1415b nos anos de 2012, 2016 e 2018.

Ano	Amplicons (pb)		
2012	500 (2/12)	600 (1/12)	1245 (1/12)
2016	1245	413	-
2018	500 (5/60)	1245 (1/60)	1700 (35/60)

Fonte - Elaborado pelo autor.

As amostras do ano de 2016 possuíam 2 amplicons de, aproximadamente 1245 e 413 pb. As amostras referentes a 2018 apresentaram 1700 (35/60), 1245 (1/60) e 500 (5/60) pb ,aproximadamente, onde 17 amostras não apresentaram amplificação, pode-se observar 39 amostras com 1 amplicon, 1 amostra com 2 amplicons. Pode ser observado na Figura 4 um comparativo dos amplicons adquiridos em cada ano.

Figura 4 - Gel de eletroforese VR 1415, comparativo entre os anos de 2012, 2016 e 2018.



Fonte – Elaborada pelo autor.

As amostras relativas ao ano de 2012 apresentaram 3 amplicons de aproximadamente, 1245 (1/12), 600 (1/12) e 500 (2/12) amplicons, onde 9 amostras não amplificaram, as amostras que amplificaram apresentaram apenas 1 amplicon.

Os amplicons ao serem sequenciados e comparados com a cepa ancestral TH-96-II (AY753327), apresentaram deleção de 6.556 pb para o amplicon de 1245 pb, referentes a 2012, 2016 e 2018, apresentou similaridade de 98% (Evalue = 0) com a estirpe TH-96-II (AY753327), o amplicon de 600 pb do ano de 2012 não obteve sucesso na etapa de clonagem, conseqüentemente não foi possível a realização de seu sequenciamento. A amostra de 2016 com amplicon de 470 pb apresentou 99% (Evalue =6e-141) com a estirpe FSL39 ([MH883319.1](#)). O amplicon de 500 pb da amostragem de 2018 apresentou 100% (Evalue = 2E -144) de similaridade com as cepas do México (KU216744.2), Japão (MG432479.1) e Rio Grande do Norte ([MH883319.1](#)).

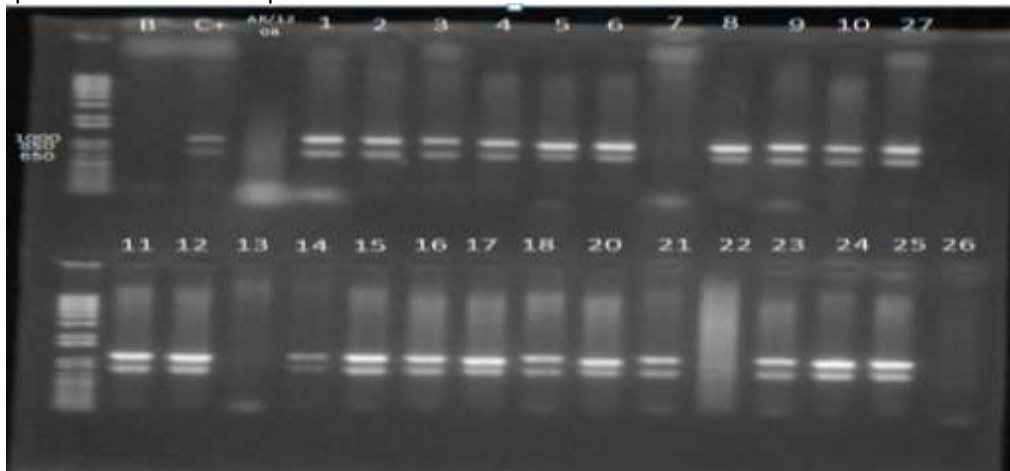
4.6 VR 23/24a

A amostragem referente ao ano de 2012 não apresentou amplificação para os primers utilizados. A amostragem de 2016 e 2018 apresentou mesmo

amplicons para 25 e 4 amostras respectivamente, onde estas apresentaram 2 fragmentos com 942 pb e 539 pb, aproximadamente, as demais amostras não apresentaram amplificação.

Os amplicons não apresentaram similaridade com o WSSV após serem submetidos a análise do BLAST.

Figura 5 – Gel de eletroforese VR 23/24 amostra de Aracati 2016, pode-se observar amplicons de 942 e 539 pb.



Fonte – Elaborada pelo autor.

4.7 Variações genotípicas

4.7.1 Variações genotípicas referentes a 2012

Pode-se observar 12 variantes genotípicas para o ano de 2012 ao se observar todos os amplicons dos primers utilizados e realizar uma combinação.

Tabela 7 - Variações genotípicas referente ao ano de 2012.

Aracati 2012										Variantes
ORF 75	ORF 75 R	ORF 94	ORF 94 R	ORF 125b	VR 1415a	VR 1415b	VR 2324a	VR 2324b		
4	B	B	A	B	-	-	A	-	-	BBAB --A--
6	AB	A	CD	B	-	-	A	-	-	ABACDB --A--
8	AC	-	BD	B	-	-	-	-	-	AC-BDB ----
15	AB	-	CD	B	-	-	-	-	-	AB-CDB- ----
16	ABC	C	ACD	B	-	-	-	-	-	ABCCACDB- ----
22	AB	-	ACD	B	-	-	B	-	-	AB-ACB --B--
25	BC	-	A	B	-	-	-	-	-	BC-AB-----
27	C	-	BD	B	-	-	-	-	-	C-BDB-----
28	A	-	-	B	-	-	-	-	-	A—B-----
29	BC	B	D	B	-	-	-	-	-	BCBDB-----
30	AB	-	-	-	-	-	-	-	-	AB-----
31	A	B	-	AB	-	-	-	-	-	AB-AB-----
60	-	-	D	B	-	-	-	-	-	--DB-----

Fonte - Elaborada pelo autor.

Tabela 8 - Legenda da quantidade de pb referente a tabela de variações genótípicas de 2012.

	ORF 75	ORF 75B	ORF 94	ORF 94 B	ORF 125b	VR 1415a	VR 1415b	VR 2324
A	850	900	500	500	-	-	1245	-
B	450	600	400	200	-	-	600	-
C	200	450	200	-	-	-	500	-
D	-	-	-	-	-	-	-	-

Fonte - Elaborada pelo autor.

4.7.2 Variações genótípicas referentes a 2016

Após realização da combinação entre os resultados adquiridos com os amplicons obtidos dos primers utilizados pode-se observar 18 variantes virais.

Tabela 9 - Variações genótípicas referente ao ano de 2016.

Aracati 2016								Variantes
	ORF 75	ORF 75 B	ORF 94	ORF 94 B	ORF 125b	VR 1415a	VR 2324a	
1	A	A	A	A	-	A	AB	AAAA -A AB
2	A	A	A	A	A	A	AB	AAAA AA AB
3	A	B	A	A	A	A	AB	ABAA AA AB
4	A	A	B	A	-	A	AB	AABA -A AB
5	A	A	B	B	-	A	AB	AABB -A AB
6	A	A	B	A	-	A	AB	AABA -A AB
7	B	C	A	C	-	-	-	BCAC - AB
8	A	A	A	C	-	-	AB	AAAC - AB
9	A	A	A	A	-	A	AB	AAAA -A AB
10	A	A	B	A	A	A	AB	AABA AA AB

Aracati 2016								Variantes
ORF 75a	ORF75b	ORF94a	ORF 94b	ORF 125b	Vr 1415a	Vr 2324		
11	A	A	B	A	A	A	AB	AABA AA AB
12	A	A	B	A	-	BC	AB	AABA -BC AB
13	B	B	-	C	-	-	-	BB-C -- -
14	A	B	A	C	-	BC	AB	ABAC -BC AB
15	A	A	A	A	-	A	AB	AAAA -A AB
16	A	A	A	A	-	A	AB	AAAA -A AB
17	A	A	A	A	-	A	AB	AAAA -A AB
18	A	A	A	A	-	A	AB	AAAA -A AB
19	A	A	A	A	-	BC	AB	AAAA -BC AB
20	A	A	B	A	-	A	AB	AABA -A AB
21	A	A	B	B	-	D	AB	AABB -D AB
22	A	A	B	B	-	E	-	AABB -E -
23	A	A	B	B	-	A	AB	AABB -A AB
24	A	A	A	A	-	A	AB	AAAA -A AB
25	A	A	B	A	-	A	AB	AABA -A AB
26	A	A	B	A	-	A	AB	AABA -A AB
27	C	A	B	A	-	A	AB	CABA -A AB
28	C	A	-	-	-	A	AB	CA-- -A AB
29	A	A	-	A	-	A	AB	AA-A -A AB
30	A	B	-	A	-	-	AB	AB-A -- AB

Fonte - Elaborada pelo autor.

Tabela 10 – Legenda da quantidade de pb referente a tabela de variações genotípicas de 2016.

	ORF 75	ORF 75r	ORF 94	ORF 94 R	VR 1415a	VR 1415b	VR 2324
A	594	940	1050	1252	2530 (1)	1245	942
B	576	862	800	693	4524 (2)	413	539
C	466	716	-	637	1305(2)		-

Fonte - Elaborada pelo autor.

4.7.3 Variações genotípicas referentes a 2018

O ano de 2018 foi caracterizado com o maior número de genótipos virais distintos, apresentando 38 variantes virais.

Tabela 15 - Variações genotípicas referente ao ano de 2018.

Aracati 2018									Variantes
ORF 75	ORF 75 R	ORF 94	ORF 94 R	ORF 125b	VR 1415a	VR 1415b	VR 2324a		
1	AB	AB	B	AB	-	B	C	AB	ABABBAB-BCAB
2	AB	AB	BC	A	-	B	A	AB	ABABBBCA-BAAB
3	ABC	AB	B	B	-	-	A	-	ABCABBB--A-
4	A	A	B	B	-	-	A	-	AABB--A-
5	A	A	B	B	-	-	A	-	AABB--A-
6	A	A	AB	B	-	-	A	-	AAABB--A-
7	A	-	-	-	-	-	-	-	A-----
8	A	A	B	-	-	-	A	-	AAB---A-
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-----
10	AB	AB	C	B	-	B	AB	AB	ABABCB-BABAB
11	A	A	C	AB	-	-	A	-	AACAB--A-
12	A	A	BC	AB	-	-	A	-	AABCAB--A-

	Aracati 2018								Variantes
	ORF 75a	ORF 75b	ORF 94a	ORF 94b	ORF 125b	VR 1415a	VR1415b	VR 2324	
13	A	A	BC	B	-	-	A	-	AABCB--A-
14	A	A	BC	AB	-	-	A	-	AABCAB--A-
15	A	A	BC	AB	-	-	A	-	AABCAB--A-
16	A	A	BC	-	-	-	A	-	AABC---A-
17	A	AB	BC	AB	-	-	A	-	AABBCAB---A-
18	A	A	B	AB	-	-	C	-	AABAB--A-
19	A	A	B	A	-	-	-	-	AABA--A-
20	A	A	ABC	B	-	-	A	-	AAABCB--A-
21	A	AB	B	ABC	-	-	A	-	AABBABC--A-
22	A	A	B	B	-	-	A	-	AABB--A-
23	A	A	BC	BCD	-	-	A	-	AABCBCD--A-
24	A	A	B	-	-	-	A	-	AAB---A-
25	A	A	B	B	-	-	-	-	AABB----
26	A	A	B	B	-	-	-	-	AABB----
27	A	A	AB	B	-	-	-	-	AAABB----
28	A	A	AB	B	-	-	A	-	AAABB----
29	A	A	B	B	-	-	-	-	AABB----
30	A	A	B	B	-	-	-	-	AABB----
31	-	A	B	-	-	-	-	-	-AB-----
32	A	A	B	B	-	-	A	-	AABB--A-
33	A	A	B	-	-	-	-	-	AAB-----
34	A	BC	B	C	-	-	C	-	ABCBC--C-
35	ABC	A	B	B	-	B	B	AB	ABCABB-BBAB
36	A	A	B	A	-	-	A	-	AABA--A-
37	B	A	B	A	-	-	A	-	BABA--A-
38	A	A	B	A	-	-	A	-	AABA--A-
39	A	A	B	A	-	-	A	-	AABA--A-

	Aracati 2018								Variantes
	ORF 75a	ORF 75b	ORF 94a	ORF 94b	ORF 125b	VR 1415a	VR1415b	VR 2324	
40	A	A	AB	A	-	-	-	-	AAABA----
41	A	A	BC	A	-	-	A	-	AABCA--A-
42	A	A	ABC	A	-	-	A	-	AAABCA--A-
43	A	A	B	-	-	-	-	-	AAB-----
44	A	A	B	A	-	-	A	-	AABA--A-
45	A	A	B	A	-	-	A	-	AABA--A-
46	A	A	B	A	-	-	-	-	AABA----
47	AB	BC	B	A	-	AC	A	AB	ABBCBA-ACAAB
48	A	A	-	A	-	-	C	-	AA-A--C-
49	-	-	-	-	-	-	A	-	-----A-
50	A	A	-	-	-	-	-	-	AA-----
51	A	DA	AB	A	-	-	A	-	ADAABA--A-
52	A	A	B	AC	-	-	-	-	AABAC----
53	A	A	B	A	-	-	A	-	AABA--A-
54	A	A	-	-	-	-	C	-	AA----C-
55	-	-	-	-	-	-	-	-	-----
56	-	-	AB	A	-	-	-	-	--ABA----
57	A	A	AB	A	-	-	A	-	AAABA--A-
60	-	-	-	-	-	-	-	-	-----

Fonte - Elaborada pelo autor.

Tabela 16 - Legenda da quantidade de pb referente a tabela de variações genotípicas de 2018.

	ORF 75	ORF 75r	ORF 94	ORF 94 R	ORF125	VR 1415a	VR 1415b	VR2324
A	943	940	1028	1050	-	4524	1700	942
B	784	450	875	950	-	3645	1245	539
C	422	200	597	700	-	1256	500	-
D	-	-	-	200	-	-	-	-

5 DISCUSSÃO

As análises de PCR em tempo real e histológicas confirmaram a presença do vírus WSSV no ano de 2012, 2016 e 2018. Estudos anteriores relataram que camarões com alto nível de infecção por WSSV apresentaram altas cargas virais (CARVALHO, 2017; DURAND *et al.*, 2003). Logo, os resultados encontrados para o ano de 2016 corroboram com Nunes e Feijó (2016) que relataram maior prevalência do vírus da Mancha Branca neste período na cidade do Aracati, onde pode ser constatada uma queda na produtividade de 25.338 toneladas em 2015 para 14.795 toneladas no ano de 2016 (ABCC, 2017).

No entanto, podemos observar que o vírus já estava presente nas amostras de 2012, apesar da baixa carga viral e grau de severidade. Além disso, há relatos da presença do vírus em nosso estado desde o período de 2005 (MULLER *et al.*, 2010) e 2007 (FEIJÓ *et al.*, 2013). Portanto, de acordo com os relatos anteriores, o vírus se faz presente em nossos cultivos a mais de 10 anos sem demonstrar sintomatologia, ou seja, os organismos estavam infectados, mas não apresentavam sintomas da doença como manchas brancas, corpo rosado a avermelhado, cutícula se desprendendo facilmente e/ou queda na produtividade (NUNES; FEIJÓ, 2016).

A expressividade do vírus e seu poder de virulência podem estar relacionados com o tipo de variante viral que se encontra no ambiente e suas interações com o mesmo. Assim, a ocorrência de variantes virais mais patogênicas e virulentas podem causar surtos e grandes mortalidades na produção de camarões (NUNES; FEIJÓ, 2016). Segundo GAO *et al.* (2014), cepas com alto poder de virulência podem modificar proteínas que altera o estado físico e imunológico do hospedeiro, fazendo com que se torne sintomática.

A temperatura é o principal fator ambiental que influencia na replicação do vírus (GAO *et al.*, 2011), camarões cultivados em salinidades extremas com 5 e 54 psu apresentaram maior mortalidade quando comparados com cultivo em salinidades entre 15 e 28 psu (CARREÑO *et al.*, 2014). Sabe-se que organismos infectados com o vírus da Síndrome da Mancha Branca expostos a temperaturas entre 22 e 30° C apresentam maior poder de replicação em relação a temperatura mais elevadas (SUN *et al.*, 2014).

Outro fator que possa influenciar na manifestação do vírus WSSV em camarões seria a coinfeção com outros vírus. A coinfeção pode influenciar na imunidade podendo promover maior ou menor patogenicidade do vírus, o WSSV coinfectado com IHHNV obtêm menor poder de virulência (YEH *et al.*, 2009). No entanto, quando coinfectado com *Vibrio* sp. apresentou maior patogenicidade (PHUOC *et al.*, 2009). O WSSV já foi relatado coinfectado com outros vírus como o IMNV (FEIJÓ *et al.*, 2003), IHHNV (DEWANGAN *et al.*, 2017), TSV (TSAI *et al.*, 2002) e doenças bacterianas (JANG *et al.*, 2014).

O decréscimo da carga viral média observada no período de 2018 pode-se dar devido menor densidade dos organismos no cultivo, utilização de berçários e raceways e melhora no manejo, com implementação das medidas de biossegurança.

Algumas amostras referentes ao ano de 2018 não apresentaram quantificação ao realizar o qPCR, no entanto, ao realizar a PCR convencional de acordo com os primers desenvolvidos por LO *et al.* (1996) e dos minissatélites apresentaram amplificação. Isto pode ter ocorrido devido uma mutação na região de anelamento ou baixa sensibilidade para a variante viral estudada (SIDDIQUE *et al.*, 2018).

Pode-se observar diferentes tamanhos de amplicons para os mesmo primers utilizados nos anos estudados, sugerindo múltipla infecção do vírus. O mesmo foi observado nos estudo de CARVALHO (2017) e MUSTHAQ *et al.* (2006).

Diferentes variantes virais foram detectadas em cada período. O estudo demonstrou um total de 68 variantes virais distintas entre si referentes aos anos de 2012, 2016 e 2018. Outros estudos relataram variantes virais distintas entre anos estudados como CARVALHO (2017) que encontrou para o Rio Grande do Norte 5 variantes para o ano de 2012 e 4 em 2015. Piamsomboon (2018) encontrou 33 genótipos distintos do vírus entre os períodos de 2007 a 2014 na Tailândia. A ocorrência de múltiplos genótipos pode-se dar devido a infecção por fontes variáveis (WALKER *et al.*, 2011). Diferentes fontes de infecção podem variar no poder de virulência do vírus, onde alguns hospedeiros causam pressão seletiva no patógeno (WAIKHON *et al.*, 2006).

Podemos observar que o ano de 2016 apresentou maior infecção viral e menor número de genótipos ao compararmos com 2018. Hoa *et al.* (2011) afirmou que camarões infectados por múltiplos genótipos apresentaram menor surto da

doença. Porém, Walker *et al.* (2011) observaram maior surto da doença em viveiros com camarões individuais fortemente infectados com mais de um genótipo de WSSV e camarões do mesmo viveiro apresentavam infecção por genótipos distintos. Assim, para este estudo podemos observar que viveiros infectados por vários genótipos apresentaram menor surto, mesmo que o camarão esteja infectado por mais de um genótipo distinto, ao compararmos com o cultivo que apresentou maior surto este possuía menor infecção por genótipos diferentes. Não podemos comparar os anos de 2016 e 2018 com 2012 devido as condições de termociclagem (empregou-se temperaturas diferentes) utilizadas para amplificação dos amplicons da amostragem destes anos serem distintas.

Algumas amostras não apresentaram amplificação para os primers utilizados isso pode ser observado devido uma possível mutação na região de anelamento do primer. Ausência de amplificação também foi observada em outros trabalhos (DIEU *et al.*, 2004, 2010; PIAMSOMBOON *et al.*, 2017; RAMOS-PAREDES *et al.*, 2012) que ao utilizarem primers distintos apresentaram êxito na amplificação. Para a ORF 125 e VR 2324 foram utilizados diferentes primers Dieu *et al.* (2004), para a ORF 125, e MULLER *et al.* (2010), para a VR 2324, no entanto, não apresentaram amplificação para as amostras utilizadas.

Nas amostras coletadas podemos observar infecção por múltiplos genótipos, no entanto, a amostragem de 2016 que apresentou maior carga viral apresentou menor quantidade de genótipos distintos. Contrastando com Carvalho (2017) que observou maior quantidade de genótipos durante o surto da doença.

A análise dos resultados obtidos pelas ORF 75, 94 e VR 1415 sugere que o vírus responsável por infectar os cultivos da região do Aracati possui alta similaridade com a cepa encontrada no Rio Grande do Norte, FSL39. Mostrando que este patógeno pode ter ingressado no estado do Ceará através do limite entre os estados.

Os primers utilizados para amplificação nas regiões da ORF 75, 94 e 1415 mostraram ser eficientes marcadores genéticos para o vírus que circunda a região do Aracati, permitindo verificar os diferentes genótipos presentes no cultivo de camarão. Porém, devido os primers referentes a ORF 125 e VR 2324 não apresentarem similaridade com o vírus da mancha branca podemos observar a necessidade do desenho de novos primers para estas regiões.

O conhecimento acerca dos diferentes genótipos que infectam os cultivos de camarões e sua epidemiologia vem a permitir um maior controle e menores perdas de produção pelo vírus da síndrome da mancha branca (WSSV). Visto que o acompanhamento da infecção deste patógeno em fazendas e a detecção do genótipo predominante, através do conhecimento da sua severidade em cultivos, podem indicar se um cultivo deverá ou não continuar.

Este trabalho tem a perspectiva futura do desenvolvimento de novos primers referentes as regiões da ORF 125 e VR 2324, pois se faz necessário para melhor entendimento do comportamento viral na região do Aracati.

6 CONCLUSÃO

As informações obtidas neste trabalho nos levam a concluir que o vírus da Síndrome da Mancha Branca tem se mostrado presente nos cultivos de camarões na região do Aracati já estava presente em 2012 e continuou até os dias de hoje, mesmo não apresentando sintomatologia e expressiva mortalidade.

Os anos estudados apresentaram diferentes genótipos do vírus, onde as variantes observadas no período de 2016 apresentaram maior grau de severidade nas lâminas histológicas e carga viral média. Portanto, sugere-se o isolamento das variantes detectadas para que as mesmas possam ser submetidas a desafios visando a determinação de sua patogenicidade.

REFERÊNCIAS

- ABCC - Associação Brasileira de Criadores de Camarão. 2017. **Censo da carcinicultura do litoral sul do estado do Ceará e zonas interioranas adjacentes 2015/ 2016**. Natal: ABCC/MAPA.
- BELL T.A. & LIGHTNER D.V. **A Handbook of Normal Penaeid Shrimp Histology**. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA. 1988.
- CARREÑO, S. R. *et al.* White spot syndrome virus (WSSV) infection in shrimp (*Litopenaeus vannamei*) exposed to low and high salinity. **Archives of Virology**, [s. l.], v. 159, p. 2213- 2222, 2014.
- CARVALHO, Roberto Aurélio Almeida. **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. 84 f. Tese (Doutorado em Ciências Marinhas Tropicais) – Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.
- CHOI, M. *et al.* Strain and dose infectivity of *Vibrio parahaemolyticus*: the causative agent of early mortality syndrome in shrimp. **Aquaculture Research**, [s. l.], v. 48, p. 3719-3727, 2017.
- DEWANGAN, N. K. *et al.* Incidence of simultaneous infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) and white spot syndrome virus (WSSV) in *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, [s. l.], v. 471, p. 1-7, 2017.
- DIEU, Bui Thi Minh *et al.* Molecular epidemiology of white spot syndrome virus within Vietnam. **Journal of General Virology**, [s. l.], v. 85, n. 12, p. 3607–3618, 2004.
- DIEU, Bui Thi Minh *et al.* Evaluation of white spot syndrome virus variable DNA loci as molecular markers of virus spread at intermediate spatiotemporal scales. **Journal of General Virology**, [s. l.], v. 91, n. 5, p. 1164–1172, 2010.
- DUMARESQ DE OLIVEIRA, Guilherme; MARIA DA COSTA MATTOS, Karen. **Desmatamento Gerado Pela Atividade Da Carcinicultura No Município De Nísia Floresta (Rn)**. [s. l.], p. 5–10, 2007.
- DURAND, S. V. *et al.* Qualitative and quantitative studies on the relative virus load of tails and heads of shrimp acutely infected with WSSV. **Aquaculture**, [s. l.], v. 216, n. 1–4, p. 9–18, 2003.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED STATES (FAO). **Fisheries and Aquaculture Statistics 2015**. Roma: FAO/ Fisheries and Aquaculture Department, 2017. Disponível em: <http://www.fao.org/3/a-i7989t.pdf>. Acesso em: 05 mar. 2018.
- FEIJÓ, Rubens Galdino *et al.* Infectious myonecrosis virus and white spot syndrome virus co-infection in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) farmed in Brazil. **Aquaculture**, [s. l.], v. 380–383, n. February 2007, p. 1–5, 2013.
- FEIJÓ, Rubens Galdino *et al.* RNAi-based inhibition of infectious myonecrosis virus

replication in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Diseases of Aquatic Organisms**, [s. l.], v. 114, n. 2, p. 89–98, 2015.

FLEGEL, Timothy W. Detection of major penaeid shrimp viruses in Asia, a historical perspective with emphasis on Thailand. **Aquaculture**, [s. l.], v. 258, p. 1-33, 2006.

FLEGEL, Timothy W. Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in Asia. **Journal of Invertebrate Pathology**, p. 166–172, 2012.

FLEGEL, Timothy W. *et al.* Shrimp Disease Control : Past , Present and Future. **Diseases in Asian Aquaculture VI**, [s. l.], p. 355–378, 2008.

FLEGEL, Timothy W. Virus diseases of farmed shrimp in the Western Hemisphere (the Americas): A review. **Journal of Invertebrate Pathology**, p. 110–130, 2011.

GAO, H. *et al.* Quantitative analysis of temperature, salinity and pH on WSSV proliferation in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* by real time PCR. **Aquaculture**, [s. l.], v. 312, p. 26-31, 2011.

GAO, M. *et al.* White spot syndrome virus strains of different virulence induce distinct immune response in *Cherax quadrinatus*. **Fish & Shellfish Immunology**, [s. l.], v. 39, p. 17-23, 2014.

GOAL - GLOBAL AQUACULTURE ALLIANCE. **Global shrimp production review and forecast**. October, 2017.

HARGREAVES, John A. Photosynthetic suspended-growth systems in aquaculture. **Aquacultural Engineering**, [s. l.], v. 34, n. 3, p. 344–363, 2006.

HOA, T. T. T. *et al.*, Mixed genotype white spot syndrome virus infections of shrimp are inversely correlated with disease outbreaks in ponds. **Journal of General Virology**, [s. l.], v. 92, p. 675-680, 2011.

HONG XIA, Jun *et al.* Signatures of selection in tilapia revealed by whole genome resequencing. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 5, p. 1–10, 2015.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Produção pecuária 2015. **Produção Pecuária Municipal**, [s. l.], v. 43, p. 1–49, 2015.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Pesquisa Pecuária Municipal 2016**. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/ppm/tabelas>. Acesso em: 05 mar. 2018.

JANG, I. K.; QIAO, G.; KIM, S. Effect of multiple infections with white spot syndrome virus and *Vibrio anguillarum* on Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (L): mortality and viral replication. **Journal of fish disease**, [s. l.], v. 37, p. 911-920, 2014.

LEE, Chung-Te *et al.* The opportunistic marine pathogen *Vibrio parahaemolyticus* becomes virulent by acquiring a plasmid that expresses a deadly toxin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 112, n. 34, p. 10798–10803, 2015.

LEUNG, T. L. F.; BATES, A. E. More rapid and severe disease outbreaks for aquaculture at the tropics: implications for food security. **Journal of Applied**

Ecology, [s. l.], v. 50, p. 215-222, 2013.

LIAO, C.; CHIEN, Y. **The Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, in Asia: The World's Most Widely Cultured Alien Crustacean**. In: Alien Marine Crustaceans: Distribution, Biology and Impacts. Volume 6 of the series Invading Nature - Springer Series in Invasion Ecology, p. 489-519, 2011.

LIGHTNER, D.V; REDMAN, R. M. Shrimp diseases and current diagnostic methods. **Aquaculture**, v. 164, p. 201 – 220, 1998.

LIGHTNER, D.V. **Handbook of pathology and diagnostic procedures for diseases of penaeid shrimp**. Baton Rouge: World Aquaculture Society, 1996.

LO , Chu Fang *et al.* Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimps using polymerase chain reaction. **Diseases of Aquatic Organisms**, [s. l.], v. 25, n. 1–2, p. 133–141, 1996.

MARTINS, M.L. Cuidados básicos e alternativas no tratamento de enfermidades de peixes na Aquicultura brasileira. **Sanidade de Organismos Aquáticos**. Editora Varela, p. 355- 368, 2004.

MARKS, Hendrik *et al.* Fitness and virulence of an ancestral White Spot Syndrome Virus isolate from shrimp. **Virus Research**, [s. l.], v. 110, n. 1–2, p. 9–20, 2005.

MULLER, Isabel C. *et al.* Genotyping of White spot syndrome virus (WSSV) geographical isolates from Brazil and comparison to other isolates from the Americas. **Diseases of Aquatic Organisms**, [s. l.], v. 88, n. 2, p. 91–98, 2010.

MUSTHAQ, S. S. *et al.* Variability in the tandem repetitive DNA sequences of white spot syndrome virus (WSSV) genome and suitability of VP28 gene to detect different isolates of WSSV from India. **Aquaculture**, [s. l.], v. 256, p. 34-41, 2006.

Nunes, A. J. P; Feijó, R. G . Convivência com o vírus da mancha branca no cultivo de camarão marinho no Brasil. **Revista da ABCC**, v. XVIII Nº 2. pág 30-36, 2016.

OAKEY, H.Jane; SMITH, Craig S. Complete genome sequence of a white spot syndrome virus associated with a disease incursion in Australia. **Aquaculture**, [s. l.], v. 484, n. August 2017, p. 152–159, 2018.

OIE - Office International Epizooties. **Manual of diagnostic tests for aquatic animals**. Crustacean. Paris: OIE, 2018.

PENG, S. *et al.*, Performance of WSSV -infected and WSSV-negative *Penaeus monodon* postlarvae in culture ponds. **Diseases of aquatic organisms**, [s. l.], v. 46, p. 165-172, 2001.

Pereira, A.M.L.; Santos, M.L. **Relatório do treinamento em patologia de camarões marinhos**. Instituto Tecnológico de Sonora, 2003.

PHUOC, L. H. *et al.* Effect of dose and challenge routes of *Vibrio spp.* on co-infection with white spot syndrome virus in *Penaeus vannamei*. **Aquaculture**, [s. l.], v. 290, p. 61–68, 2009.

PIAMSOMBOON, Patharapol *et al.* Genetic variation of white spot syndrome virus

(WSSV) in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone 1931) culture of Thailand. **Aquaculture Research**, [s. l.], n. Boone 1931, 2017.

PILLAY, T.V.R. & KUTTY, M.N. **Aquaculture: Principles and Practices**, 2nd edn. Wiley-Blackwell, Oxford, UK. 2005.

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

RAMOS-PAREDES, J.; GRIJALVA-CHON, J. M.; IBARRA-GÁMEZ, J. C. Virulence and genotypes of white spot syndrome virus infecting Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* in north-western Mexico. **Journal of Fish Diseases**, [s. l.], v. 40, n. 3, p. 425–435, 2017.

ROCHA, Itamar de Paiva. A Carcinicultura no Contexto do Setor Pesqueiro Brasileiro. **Panorama da Aquicultura**, n 80. 2011.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning - A Laboratory Manual**. 2. ed. (2.60-2.80). New York: Cold Spring Harbor Press, 1989.

SÁNCHEZ-PAZ, Arturo. White spot syndrome virus: An overview on an emergent concern. **Veterinary Research**, [s. l.], v. 41, n. 6, 2010.

SHEKAR, Malathi; PRADEEP, Balakrishnan; KARUNASAGAR, Indrani. White spot syndrome virus: Genotypes, epidemiology and evolutionary studies. **Indian Journal of Virology**, [s. l.], v. 23, n. 2, p. 175–183, 2012.

SIDDIQUE, M. A. *et al.* Circulatory white spot syndrome virus in South- West region of Bangladesh from 2014 to 2017: molecular characterization and genetic variation. **AMB Express**, [s. l.], v. 8, p. 1-13, 2018.

SOFIA - The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 - Meeting the sustainable development goals. Rome. 2018

STENTIFORD, G. D. *et al.* Disease will limit future food supply from the global crustacean fishery and aquaculture sectors. **Journal of Invertebrate Pathology**, [s. l.], v. 110, n. 2, p. 141–157, 2012.

STENTIFORD, Grant D. *et al.* New Paradigms to Help Solve the Global Aquaculture Disease Crisis. **PLoS Pathogens**, [s. l.], v. 13, n. 2, p. 1–6, 2017.

SUN, Y. *et al.* Transcriptome analysis of the initial stage of acute WSSV infection caused by temperature change. **PLOS**, [s. l.], v. 9, p. 1-16, 2014.

SUTTLE, Curtis A. Marine viruses - Major players in the global ecosystem. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 5, n. 10, p. 801–812, 2007.

THITAMADEE, S. *et al.* Review of current disease threats for cultivated penaeid shrimp in Asia. **Aquaculture**, [s. l.], v. 452, p. 69-87, 2016.

TSAI, J. *et al.* Simultaneous detection of white spot syndrome virus (WSSV) and Taura syndrome virus (TSV) by multiplex reverse transcription- polymerase chain reaction (RT-PCR) in Pacific white shrimp *Penaeus vannamei*. **Diseases of aquatic**

organisms, [s. l.], v. 50, p. 9-12, 2002.

TSAI, Meng Feng *et al.* Transcriptional analysis of the ribonucleotide reductase genes of shrimp white spot syndrome virus. **Virology**, [s. l.], v. 277, n. 1, p. 92–99, 2000.

VALDERRAMA, Diego *et al.* The Economic Impacts of Emerging Diseases in Shrimp Aquaculture. *In: North American Association of Fisheries Economists, 2017, La Paz. Palestra...* La Paz: NAAFE Forum, 2017.

VAN HULTEN, Mariëlle C. W. *et al.* The white spot syndrome virus DNA genome sequence. **Virology**, [s. l.], v. 286, n. 1, p. 7–22, 2001.

VERBRUGGEN, Bas *et al.* Molecular mechanisms of white spot syndrome virus infection and perspectives on treatments. **Viruses**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 1–29, 2016.

XU, Dandan *et al.* Cellular immune responses against viral pathogens in shrimp. **Developmental and Comparative Immunology**, [s. l.], v. 47, n. 2, p. 287–297, 2014.

YANG, Feng *et al.* Complete Genome Sequence of the Shrimp White Spot Bacilliform Virus Complete Genome Sequence of the Shrimp White Spot Bacilliform Virus. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 75, n. 23, p. 11811–11820, 2001.

YEH, S. *et al.* Immune response of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after a concurrent infection with white spot syndrome virus and infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus. **Fish & Shellfish Immunology**, [s. l.], v. 26, p. 582-588, 2009.

YU, Yang *et al.* Genome survey and high-density genetic map construction provide genomic and genetic resources for the Pacific White Shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 5, n. October, p. 1–14, 2015.

ZORRIEZHARA, M. J.; BANAEDERAKHSHAN, R. Early Mortality Syndrome (EMS) as new Emerging threat in shrimp industry. **Advances in Animal and Veterinary Sciences**, [s. l.], v. 3, n. March, p. 64, 2015.

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

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

WITHYACHUMNARNKUL, Boonsirm. Results from black tiger shrimp *Penaeus monodon* culture ponds stocked with postlarvae PCR- positive or –negative for White spot syndrome virus (WSSV). **Diseases of Aquatic Organisms**, [s. l.], v. 39, p. 21-27. 1999.

**APÊNDICE A – CARGA VIRAL DETECTADA EM CAMARÕES *L. VANNAMEI*
COLETADOS NO MUNICÍPIO DE ARACATI (CE) NO PERÍODO DE 2012, 2016 E
2018.**

Amostras 2012	qPCR Cópia/µg de DNA	Amostras 2016	qPCR Cópia/µg de DNA	Amostras 2018	qPCR Cópia/µg de DNA
AR/12- 1	0,00E+00	AR/16 -1	4,80E+07	AR/18-01	4,59E+04
AR/12- 2	0,00E+00	AR/16 -2	1,06E+08	AR/18-02	4,57E+04
AR/12- 3	0,00E+00	AR/16 -3	3,30E+07	AR/18-03	0,00E+00
AR/12- 4	1,84E+03	AR/16 -4	1,07E+07	AR/18-04	0,00E+00
AR/12- 5	0,00E+00	AR/16 -5	1,23E+08	AR/18-05	0,00E+00
AR/12- 6	1,30E+02	AR/16 -6	2,22E+07	AR/18-06	0,00E+00
AR/12- 7	0,00E+00	AR/16 -7	0,00E+00	AR/18-07	0,00E+00
AR/12- 8	7,69E+02	AR/16 -8	1,07E+08	AR/18-08	9,66E+02
AR/12- 9	0,00E+00	AR/16 -9	6,33E+07	AR/18-09	0,00E+00
AR/12- 10	0,00E+00	AR/1 -10	2,06E+08	AR/18-10	4,54E+05
AR/12- 11	0,00E+00	AR/16-11	1,40E+08	AR/18-11	3,59E+01
AR/12- 12	0,00E+00	AR/16-12	1,00E+08	AR/18-12	1,70E+03
AR/12- 13	0,00E+00	AR/16-13	1,11E+04	AR/18-13	0,00E+00
AR/12- 14	0,00E+00	AR/16-14	0,00E+00	AR/18-14	1,81E+03
AR/12- 15	4,39E+01	AR/16-15	1,30E+08	AR/18-15	3,89E+02
AR/12- 16	8,01E+00	AR/16-16	2,24E+07	AR/18-16	0,00E+00
AR/12- 17	0,00E+00	AR/16-17	9,41E+07	AR/18-17	7,73E+01
AR/12- 18	0,00E+00	AR/16-18	0,00E+00	AR/18-18	3,95E+04
AR/12- 19	0,00E+00	AR/16-19	6,55E+05	AR/18-19	6,18E+02
AR/12- 20	0,00E+00	AR/16-20	1,27E+08	AR/18-20	0,00E+00
AR/12- 21	0,00E+00	AR/16-21	4,70E+07	AR/18-21	2,84E+03
AR/12- 22	1,24E+02	AR/16-22	1,01E+07	AR/18-22	0,00E+00
AR/12- 23	0,00E+00	AR/16-23	1,00E+08	AR/18-23	1,64E+02
AR/12- 24	0,00E+00	AR/16-24	2,86E+07	AR/18-24	0,00E+00
AR/12- 25	1,11E+02	AR/16-25	1,76E+08	AR/18-25	0,00E+00
AR/12- 26	0,00E+00	AR/16-26	2,53E+07	AR/18-26	6,08E+03
AR/12- 27	5,46E+01	AR/16-27	1,71E+07	AR/18-27	3,54E+03
AR/12- 28	4,32E+02	AR/16-28	8,42E+07	AR/18-28	5,27E+01
AR/12- 29	3,61E+01	AR/16-29	1,58E+08	AR/18-29	1,16E+04
AR/12- 30	8,62E+02	AR/16-30	1,07E+04	AR/18-30	9,47E+03
AR/12- 31	1,94E+03			AR/18-31	0,00E+00
AR/12- 32	0,00E+00			AR/18-32	1,91E+02
AR/12- 33	0,00E+00			AR/18-33	7,63E+03
AR/12- 34	0,00E+00			AR/18-34	3,89E+01
AR/12- 35	0,00E+00			AR/18-35	6,00E+00
AR/12- 36	0,00E+00			AR/18-36	0,00E+00
AR/12- 37	0,00E+00			AR/18-37	0,00E+00
AR/12- 40	0,00E+00			AR/18-38	0,00E+00

Amostras 2012	qPCR Cópia/μg de DNA	Amostras 2016	qPCR Cópia/μg de DNA	Amostras 2018	qPCR Cópia/μg de DNA
AR/12- 44	0,00E+00			AR/18-39	5,83E+03
AR/12- 47	0,00E+00			AR/18-40	0,00E+00
AR/12- 48	0,00E+00			AR/18-41	0,00E+00
AR/12- 49	0,00E+00			AR/18-42	1,23E+04
AR/12- 50	0,00E+00			AR/18-43	7,08E+02
AR/12- 53	0,00E+00			AR/18-44	0,00E+00
AR/12- 54	0,00E+00			AR/18-45	0,00E+00
AR/12- 55	0,00E+00			AR/18-46	4,58E+03
AR/12- 58	0,00E+00			AR/18-47	3,78E+05
AR/12- 59	0,00E+00			AR/18-48	1,12E+03
AR/12- 60	2,12E+02			AR/18-49	0,00E+00
AR/12- 61	0,00E+00			AR/18-50	0,00E+00
AR/12- 64	0,00E+00			AR/18-51	0,00E+00
AR/12- 66	0,00E+00			AR/18-52	0,00E+00
AR/12- 67	0,00E+00			AR/18-53	0,00E+00
AR/12- 72	0,00E+00			AR/18-54	0,00E+00
AR/12- 77	0,00E+00			AR/18-55	0,00E+00
AR/12- 135	0,00E+00			AR/18-56	0,00E+00
AR/12- 137	0,00E+00			AR/18-57	0,00E+00
AR/12- 140	0,00E+00			AR/18-58	0,00E+00
AR/12- 145	0,00E+00			AR/18-59	0,00E+00
AR/12- 147	0,00E+00			AR/18-60	0,00E+00

Fonte – Elaborada pelo autor