



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA

RAQUEL MORAES CAVALCANTE

AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA VARIABILIDADE GENÉTICA DO VÍRUS DA
SÍNDROME DA MANCHA BRANCA (WSSV)

FORTALEZA

2023

RAQUEL MORAES CAVALCANTE

AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA VARIABILIDADE GENÉTICA DO VÍRUS DA
SÍNDROME DA MANCHA BRANCA (WSSV)

Monografia apresentada ao Curso de Engenharia de Pesca, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Engenheiro de Pesca.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Maggioni.
Coorientador: Dr. Rafael dos Santos Rocha.

FORTALEZA

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- C364a Cavalcante, Raquel Moraes.
Avaliação preliminar da variabilidade genética do vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV) /
Raquel Moraes Cavalcante. – 2023.
73 f. : il. color.
- Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências
Agrárias, Curso de Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2023.
Orientação: Prof. Dr. Rodrigo Maggioni.
Coorientação: Prof. Dr. Rafael dos Santos Rocha.
1. Carcinicultura. 2. Virologia. 3. Genética. I. Título.

CDD 639.2

RAQUEL MORAES CAVALCANTE

AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA VARIABILIDADE GENÉTICA DO VÍRUS DA
SÍNDROME DA MANCHA BRANCA (WSSV)

Monografia apresentada ao Curso de Engenharia de Pesca, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Engenheiro de Pesca.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Maggioni.
Coorientador: Dr. Rafael dos Santos Rocha.

Aprovada em: 11/12/2023.

BANCA EXAMINADORA

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

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

Profa. Dra. Jéssica Lucinda Saldanha da Silva
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Adriana Ferreira da Silva
Universidad Autónoma de Yucatán (UADY)

*A minha querida avó Maria do Socorro Machado
Cavalcante (in memoriam).*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, o altíssimo, por ter me dado forças quando eu pedi, nos momentos em que eu achei que não conseguiria e iria esmorecer, um sentimento imediato me manteve de pé, nas várias noites sem dormir, muitas vezes em despescas, estagiando em lugares que eu nunca pensei que estaria, me manteve firme em busca do meu sonho mostrando estar comigo em todos os momentos.

À minha mãe, Marcia Lúcia Moraes, por ser a pessoa mais forte e bondosa que conheço, que me inspira todos os dias a ser forte como ela é, que me ensinou a ter garra, nunca desistir e permanecer humilde apesar de tudo.

Ao meu pai Tarcísio Costa Cavalcante Júnior que ensinou o caminho da vida digna, através dos estudos, que possui um exímio gosto musical, por me apoiar nos momentos difíceis, por fomentar a minha autenticidade, por me mostrar o caminho da fé.

Aos meus irmãos Francisco Rafael Moraes Cavalcante, e Expedito Moraes Cavalcante, pela vida juntos até hoje, mesmo que distante em alguns momentos, o amor, apoio e torcida permanecem, para nós nunca há tempo ruim.

À minha avó Maria do Socorro Machado Cavalcante (in memoriam) e ao meu tio Carlos rederick Machado Cavalcante, que formaram a base da minha educação escolar, que estimularam todo o gosto que tenho por literatura, arte, filosofia, biologia e estudo da vida aquática, por proporcionarem fortes memórias afetivas que caminham comigo até hoje.

Ao meu avô Tarcísio Costa Cavalcante (in memoriam), por me proporcionar momentos que ficaram marcados na infância, pelos primeiros ensinamentos, os quais utilizo até os dias de hoje.

À Universidade Federal do Ceará, pelo ensino gratuito e de qualidade.

Ao doutor e técnico do Centro de Enfermidade de Organismos Aquáticos (CEDECAM) Rafael dos Santos Rocha, pelo exímio treinamento em biologia molecular, por ter me recebido no laboratório, por explicar conceitos complexos de forma clara, prática e compreensível, sendo essencial para a minha formação, contribuindo para o meu apreço pela área de patologia viral na carcinicultura, pela ajuda, confiança e conselhos.

Ao professor doutor Rodrigo Maggioni, por me receber no CEDECAM e aceitar a orientação do meu trabalho, permitindo autonomia no desenvolvimento da pesquisa, e a consolidação do presente estudo.

Às amigas Karen Karoline, Cibele Castro e Villany Menezes pela companhia, parceria no laboratório, pela expressiva contribuição no desenvolvimento do trabalho e por serem mulheres inspiradoras.

Ao Jhonatas Teixeira e Juliana Freitas pelos ensinamentos em extração de DNA e histologia, pela companhia de bancada e pela amizade.

À empresa júnior do departamento de Engenharia de Pesca, CORAq-Consultoria em Recursos Aquáticos por me proporcionar a experiência do mercado de trabalho ainda na graduação, permitindo o meu crescimento profissional na área que amo, a aquicultura.

Aos amigos de faculdade Maria Aucilene e Eugênio Castro pelos momentos de felicidade e descontração em noites árduas de fim de semestre.

À Pró-Reitoria de Assistência Estudantil pelos programas de iniciação acadêmica, auxílio moradia e residência universitária, que possibilitaram a minha permanência na universidade e conclusão do curso.

Ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica PIBIC/UFC, por despertar em mim a vocação científica, permitindo que o meu trabalho de conclusão de curso, fosse uma extensão da pesquisa desenvolvida durante o período de vigência da bolsa.

A mim, por nunca desistir dos meus objetivos, sempre com coragem mantendo os pés no chão, e por fim, a todos que contribuíram de forma direta e indireta para a realização da minha conquista.

“Nós todos nascemos *anlagen*, como o potencial no núcleo de uma célula: em biologia, a *Anlage* é a parte da célula caracterizada como “aquilo que se tornará”. Dentro da *Anlage* está a substância fundamental que, com o tempo, irá se desenvolver fazendo com que nos tornemos uma pessoa inteira. Portanto, nossas vidas, enquanto mulheres, consistem em acelerar a *Anlage*.”

(Clarissa Pinkola).

RESUMO

Entre as patologias existentes que interferem no desempenho da produção carcinícola, as que mais se expressam de forma significativa gerando prejuízo econômico são as de origem viral. A Síndrome da Mancha Branca (*White Spot Syndrome - WSS*), se destaca como mais comum, ocorrendo em diversos continentes. O diagnóstico molecular é essencial para identificar a infecção viral, porém a presença de mutações pode afetar a precisão do resultado, havendo a necessidade de estudos voltados para essa problemática. Portanto, o objetivo geral desta pesquisa foi avaliar, preliminarmente, a presença de polimorfismo no WSSV a partir da análise de diferentes regiões ORF. Como objetivos específicos, foram estabelecidos: analisar o genoma do WSSV em diferentes amostras de camarão, depositadas no banco genômico público (*GenBank*), discutir a possível interferência de falsos negativos no diagnóstico molecular, em decorrência da provável variabilidade genética do patógeno elencado e verificar qual ORF possui melhor perfil de variabilidade genética para o WSSV, patógeno do camarão marinho *Penaeus vannamei*. A partir de uma de PCR in silico foi possível validar se os primers das ORFs 23/24 a, 14/15 a, 94 a, e 75 a, amplificaram para as sequências selecionadas. Após, foram utilizados o software MEGA e PopArt para verificar cada região potencial de polimorfismo e a similaridade entre as sequências, os dados foram analisados em dendrogramas e gráficos filogenéticos ou rede de haplótipos, visando identificar o número de perfis polimórficos presente em cada alinhamento. As ORFs apresentaram variação quanto ao número de perfis, sendo obtido 9 perfis polimórficos para a ORF 23/24 a, em que das 30 sequências selecionadas, apenas 14 foram alinhadas. Já para a ORF 14/15a, 14 perfis polimórficos foram indicados, a partir de 23 sequências, para a ORF 94 a, foram identificados 17 perfis, a partir de 21 amostras alinhadas, e para a ORF 75 a foi possível observar a presença de 12 perfis polimórficos a partir das 26 sequências completas alinhadas. Portanto, o estudo das árvores filogenéticas nos permitem observar que houve mais polimorfismo nos alinhamentos correspondentes à ORF 94 a, exprimindo-se com eficiência para a presente análise, podendo ser aplicada em possíveis estudos epidemiológicos, verificação da variabilidade genética e disseminação do vírus da Síndrome da Mancha Branca.

Palavras chave: Carcinicultura, virologia, genética

ABSTRACT

Among the existing pathologies that interfere with the performance of shrimp farming, those of viral origin are the ones that most significantly express themselves, causing economic losses. White Spot Syndrome (WSS), stands out as the most common, occurring on various continents. Molecular diagnosis is essential to identify viral infection, but the presence of mutations can affect the accuracy of the result, necessitating studies focused on this issue. Therefore, the general objective of this research was to preliminarily evaluate the presence of polymorphism in WSSV through the analysis of different ORF regions. Specific objectives were established: analyze the WSSV genome in different shrimp samples deposited in the public genomic bank (GenBank), discuss the possible interference of false negatives in molecular diagnosis due to the probable genetic variability of the listed pathogen, and determine which ORF has the best genetic variability profile for WSSV, a pathogen of the marine shrimp *Penaeus vannamei*. Through *in silico* PCR, it was possible to validate whether the primers of ORFs 23/24 a, 14/15 a, 94 a, and 75 a amplified for the selected sequences. Subsequently, the MEGA and PopArt software were used to check each potential polymorphic region and the similarity between sequences. The data were analyzed in dendrograms and phylogenetic graphs or haplotype networks to identify the number of polymorphic profiles present in each alignment. The ORFs showed variation in the number of profiles, with 9 polymorphic profiles obtained for ORF 23/24 a, where out of 30 selected sequences, only 14 were aligned. For ORF 14/15 a, 14 polymorphic profiles were indicated from 23 sequences, and for ORF 94 a, 17 profiles were identified from 21 aligned samples. For ORF 75 a, 12 polymorphic profiles were observed from the 26 complete aligned sequences. Therefore, the study of phylogenetic trees allows us to observe that there was more polymorphism in the alignments corresponding to ORF 94 a, expressing itself efficiently for the present analysis and can be applied in possible epidemiological studies, verification of genetic variability, and spread of White Spot Syndrome virus.

Keywords: Shrimp farming, virology, genetics

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Depósitos de cálcio na carapaça do camarão com WSSV.....	26
Figura 2 - Camarão com indicativo de mancha branca à esquerda	27
Figura 3 -Relação filogenética entre as sequências para a ORF 14/15a.....	35
Figura 4-Relação filogenética entre as sequências para a ORF 23/24a.....	37
Figura 5-Relação filogenética entre as sequências para a ORF 94a	39
Figura 6-Relação filogenética entre as sequências para a ORF 75a.....	41

LISTA DE QUADROS

Quadro I - Desenvolvimento da carcinicultura mundial	18
Quadro II - Níveis ótimos dos parâmetros para o cultivo de <i>Penaeus vannamei</i>	21
Quadro III - Espécies suscetíveis aos patógenos virais.....	22
Quadro IV-Primers das ORFs indicadas pela OIE/WOAH utilizados na Pcr <i>in silico</i> para WSSV.....	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequências obtidas no Banco Genômico <i>GenBank</i>	33
Tabela 2 - Amostras incluídas no maior núcleo de variabilidade da Orf 14/15 a.....	35
Tabela 3 -Amostras incluídas nos dois maiores núcleos de variabilidade para a Orf 23/24 a..	37
Tabela 4 - Amostras incluídas nos três maiores núcleos de variabilidade para a Orf 94 a.....	38
Tabela 5 -Amostras incluídas nos três maiores núcleos de variabilidade para a Orf 75 a.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

WSSV	White Spot Syndrome Virus
ORF	Open reading Frame
PCR	Polymerase chain reaction
IHHNV	Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus
IMNV	infectious myonecrosis virus
OIE	Organização mundial para a saúde animal
WOAH	World Organisation for Animal Health
TSV	Taura syndrome virus
DNA	DeoxyriboNucleic Acid
RNA	RiboNucleic Acid
pb	Pares de base
kg	Kilograma

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	17
2.1 Carcinicultura.....	17
2.1.2 <i>Penaeus vannamei</i>	19
2.2 Patologias de Origem Viral.....	22
2.3 Vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV).....	24
2.4 Variabilidade Genética em Vírus.....	27
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3.1 Origem das Sequências.....	30
3.2 PCR in silico.....	30
3.3 Avaliação do polimorfismo.....	31
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
4.1 ORF 14/15 a.....	34
4.2 ORF 23/24 a.....	36
4.3 ORF 94 a.....	37
4.4 ORF 75 a.....	39
5 CONCLUSÃO.....	43
REFERÊNCIAS.....	44
APÊNDICES.....	52
ANEXOS.....	57

1 INTRODUÇÃO

As patologias de origem viral estão entre os principais problemas que acometem a carcinicultura mundial. À proporção que o desenvolvimento da aquicultura é exponencial, faz-se necessário o avanço em estudos que visem minimizar, por prevenção e remediação, a ação de agentes patogênicos que causam grande mortalidade nos cultivos (MARQUES *et al.*, 2006). A carcinicultura marinha se destaca na produção aquícola, com a espécie de camarão *Penaeus vannamei*, dotada de características que permitem bons resultados em cultivo, como altas taxas de crescimento e conversão alimentar em tempo hábil (FUNGE-SMITH; BRIGGS *et al.*, 2005).

P. vannamei é oriunda da costa Leste do Pacífico, do México até o Peru, em áreas de clima tropical, o que favoreceu o desenvolvimento das técnicas de cultivo no Brasil, possibilitando rápida adaptabilidade da espécie (MAGALHÃES, 2004). A densidade de estocagem é uma variável importante e está diretamente ligada ao resultado final da produção, pois caso o dimensionamento do sistema seja feito de maneira incorreta, o alto adensamento ocasionará estresse no animal, condição que facilita a ação de agentes etiológicos devido a vulnerabilidade do indivíduo, o que por consequência irá afetar a rentabilidade do cultivo, situação influenciada diretamente pelo método de manejo adotado (NEVES *et al.*, 2021).

Entre as patologias existentes que interferem no desempenho da produção carcinícola, as que mais se expressam de forma significativa gerando prejuízo econômico são as de origem viral. Desse modo, a Síndrome da Mancha Branca (*White Spot Syndrome - WSS*), se destaca como mais comumente disseminado no mundo, ocorrendo em diversos continentes (KARUNASAGAR; ABABOUCHE, 2012). A patologia foi relatada no Brasil em 2004, havendo alta disseminação nos anos seguintes em diferentes regiões do país. Em 2016 já havia se instalado nos principais municípios produtores do Nordeste (SARDOU *et al.*, 2022).

A WSS pode se manifestar na produção de camarão de acordo com a qualidade dos manejos adotados, havendo relação com a manutenção dos parâmetros físicos e químicos (KAUTSKY *et al.*, 2000). A transmissão viral pode ocorrer por meio de camarões infectados, por canibalismo ou transportadores do vírus, como por exemplo, uma ave que se alimenta de um animal moribundo em um viveiro e transporta os restos desse indivíduo para outro tanque povoado, além disso, o vírus pode estar diluído na própria água de cultivo (ROYO *et al.*, 1999).

O diagnóstico viral utilizando a biologia molecular são aliadas para prevenir possíveis surtos epizooticos e identificar variantes virais resistentes que possam ser subnotificadas em carcinoculturas de *P. vannamei*. O método clássico para identificação da presença do vírus é a reação em cadeia pela polimerase (PCR), que pode ser realizada para regiões alvo do genoma, utilizando as *Open reading frames* (ORFs), que permitem analisar o conjunto de genes, e validar regiões potencialmente polimórficas, identificando possíveis variantes virais (NATIVIDAD *et al.*, 2008).

Em estudos de virologia já se observou isolados do *White Spot Syndrome Virus*-WSSV com polimorfismo genético em diversos países, incluindo o Brasil, assunto importante, pois há ocorrência de variantes virais não detectáveis em diagnóstico molecular, que podem causar a subnotificação de uma enfermidade, e conseqüentemente, refletir em prejuízo para pequenos, médios e grandes produtores do *P. vannamei*, caso seja realizado o comércio de uma pós larva ou juvenil enfermo, não diagnosticado com a doença, devido a presença de polimorfismos que não foram detectados por métodos moleculares (VIANA, 2022). Com o conhecimento das mutações presentes em patógenos de origem viral que acometem a carcinocultura, em curto e em médio prazo, haverá aumento da produtividade em cultivos, pois a pesquisa auxiliará no manejo adequado e personalizado para cada variante viral, sobretudo nos laboratórios de pós larvas e na tomada de decisão para despesca, permitindo o controle da enfermidade em contexto epidemiológico (DANTAS, 2019).

Portanto, o objetivo geral deste trabalho foi avaliar a presença de polimorfismo no WSSV a partir da análise de diferentes regiões ORF. Como objetivos específicos, foram delineados: (a) analisar o genoma do WSSV depositados no banco genômico público (*GenBank*) por local de registro, (b) verificar qual região ORF oferece um melhor perfil para avaliação da variabilidade genética de WSSV no grupo amostrado e (c) verificar o polimorfismo nas amostras com base no local de registro.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Carcinicultura

A busca pela alimentação saudável e de qualidade vem favorecendo o aumento da produção de alimentos com maior valor nutricional, este fato contribui diretamente para a produção de organismos aquáticos (CAMARGO *et al.*, 2006). Sendo assim, é possível ressaltar que a inclusão de crustáceos na alimentação tem diversas vantagens, como a prevenção de doenças que estão relacionadas ao estresse oxidativo como câncer, catarata, arteriosclerose e atraso do envelhecimento precoce (RIBEIRO; SERAVALLI, 2004). Isto se dá devido a presença de carotenóides que atuam eliminando radicais livres, além de vitaminas e ácidos graxos essenciais, sendo de suma importância para alimentação humana (BATISTA *et al.*, 2006). Logo, o hábito alimentar moderno gera uma demanda de investimento para a aquicultura, principalmente para carcinicultura que uma das principais atividades aquícolas, alcançando exímios resultados produtivos ano após ano, termo este, que é utilizado para se referir ao cultivo de crustáceos em geral que possuem alto valor comercial, como o camarão, a lagosta, o caranguejo, entre outros. (FERREIRA *et al.*, 2023).

O cultivo de crustáceos teve seu início no continente asiático a partir da necessidade de subsistência dos pescadores da região Sudeste do continente, fazendo uso de métodos artesanais. Em 1930 a carcinicultura mundial contou com uma grande contribuição do pesquisador Motosaku, especialista japonês que conseguiu realizar a desova da espécie *Penaeus japonicus* em condições laboratoriais (FILHO;RONÇANI, 2018). Desse modo, a metodologia utilizada pelo técnico na década de 30 contribuiu para a larvicultura moderna de diferentes espécies de camarão, tendo em vista que foram utilizadas fêmeas coletadas em ambiente natural marinho para a condução do experimento (ARAÚJO *et al.*, 2003). Desde então, o cenário global da carcinicultura nos anos seguintes é marcado pelo desenvolvimento tecnológico e científico, partindo da investigação biológica das espécies de crustáceos, visando resultados passíveis de uma escala comercial (Quadro I).

Quadro I - Desenvolvimento da carcinicultura mundial.

Fase	Ano	Evento
1°	1930 a 1965	Desenvolvimento das técnicas de cultivo de camarão a partir da descoberta de Motosaku;
2°	1965 a 1975	Avanço do conhecimento científico voltado para criação de camarão em países como China, Taiwan e Estados Unidos. Além de estudos voltados para a produção de <i>P. monodon</i> e <i>P. stylirostris</i> .
3°	1975 a 1985	Investimento em técnicas de produção foram realizados em países como Taiwan, Indonésia, Filipinas, Tailândia e Brasil;
4°	1985 a 1995	Aumento progressivo das densidades de cultivo e ocorrência de agentes virais;
5°	1995 a 2003	Presença do vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV), originário da Ásia, na carcinicultura global.

Fonte: Modificado de Araújo (2003)

O último relatório publicado pela Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO), mostra que no intervalo entre 2015 e 2019 houve um declínio de 9,4% na pesca de camarão no mundo, enquanto a carcinicultura teve um aumento de 36%, havendo destaque para a produção mundial de crustáceos que totalizou 11,2 milhões de toneladas no ano seguinte. Entre os organismos cultivados, a espécie mais produzida no ano de 2020, com 5,8 milhões de kg, foi o camarão branco do pacífico *Penaeus vannamei*, representando 51,7% da produção carcinícola mundial (FAO, 2022).

Sabe-se, que no continente asiático se encontra a maior produção de camarão do mundo, se tratando de uma atividade secular, com o aperfeiçoamento dos manejos de produtivos, as américas também atuam veemente nos processos de evolução técnica e científica da produção de crustáceos, através de melhoramento genético, desenvolvimento nutricional, biossegurança, insumos e equipamentos (MOSS *et al.*, 2012).

Nas américas entre os anos de 2009 e 2021 o país que mais produziu camarões cultivados foi o Equador evoluindo de uma produção inferior a 300 mil toneladas para uma produção de aproximadamente 1.000.000 toneladas, seguido do México que obteve crescimento com oscilações ao longo de 2012 a 2014, porém com produção estimada em 2021 de 1.200.000 toneladas aproximadamente, os países Colômbia, Venezuela, Peru, se encontravam na lista de grandes produtores nesse período de 12 anos, incluindo o Brasil com produção estimada de 100 mil toneladas em 2021 (GIBSON, 2021).

A base para entrada do mercado da carcinicultura no Brasil teve seu estopim em meados da década 70 no Rio Grande do Norte, como uma estratégia para validar a eficiência econômica do cultivo de crustáceos, mais especificamente, espécies de camarão, como uma possível alternativa para substituir a exploração de sal, esse estudo foi intitulado “Projeto camarão”, iniciativa realizada pelo governo do estado no período em questão, em que se objetivou a construção de tanques de cultivo nos respectivos locais das salinas, visando produzir pelo método extensivo, caracterizado pela baixa renovação de água, baixa taxa de arraçamento, entre outras variáveis (SANTOS *et al.*, 2015). Ademais, o progresso da carcinicultura no Brasil se deu com pesquisas voltadas para a os estágios de reprodução, larvicultura e engorda, no estado de Santa Catarina, local em que foram produzidas as primeiras pós-larvas da América latina, em ambiente de laboratório, com condições controladas (ABCC, 2011).

De acordo com dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística -IBGE, a produção nacional de camarão obteve valores crescentes no que diz respeito a produção, em 2019 o registro foi de 56.667.254 kg, em 2020 e 2021 o cultivo nacional foi de 66.561.265 kg e 106.996.612 kg, respectivamente, já o dado mais recente, no ano de 2022 a produção catalogada foi de 113.300.618 kg (BRASIL, 2023). Desse modo, apesar do surto pandêmico ocasionado pelo SARS-CoV-2 no início de 2019, com a tomada de protocolos de biossegurança e medidas restritivas quanto a exportação, a carcinicultura demonstra ser uma atividade resistente a diferentes obstáculos econômicos, mantendo-se em níveis lucrativos.

2.1.2 *Penaeus vannamei*

O crustáceo mais cultivado no mundo, conhecido como camarão branco do pacífico ou camarão das patas brancas, *Penaeus vannamei*, é uma espécie de sucesso para a aquicultura, em decorrência do alto rendimento em densidades elevadas e tolerância a baixas salinidades, possibilitando a produção em maior variabilidade espacial, é nativa da costa do oceano Pacífico, ocorrendo desde o norte do México, passando pelo Golfo da Califórnia até a região central do Peru, possui hábito bentônico, e atua sobre a plataforma continental em profundidades que variam entre 5 e 72 metros (PÉREZ FARFANTE; KENSLEY, 1997).

Classificação sistemática do *Penaeus vannamei* (Boone 1931), de acordo com Grave, Sammy (2022): Última edição taxonômica realizada na WoRMS (*World register of marine species*).

Reino Animalia
 Filo Arthropoda
 Subfilo Crustacea
 Superclasse Multicrustacea
 Classe Malacostraca
 Subclasse Eumalacostraca
 Superordem Eucarida
 Ordem Decapoda
 Subordem Dendrobranchiata
 Superfamília Penaeoidea
 Família Penaeidae
 Gênero *Penaeus*
 Espécie *Penaeus vannamei*

No final da década de 60 e início da década de 70 o gênero *Penaeus* foi dividido em subgêneros, por intermédio de uma pesquisa que sugeriu uma revisão taxonômica, com dados fundamentados em características morfológicas (PÉREZ FARFANTE *et al.*, 1969). De acordo com Flegel (2007) a revisão taxonômica não influenciou negativamente a indústria camaroneira, pois raramente era utilizada em condições mercadológicas, concordante a isso, atualmente a mudança não desfavorece o comércio de camarões peneídeos. Consoante, a espécie conhecida nos dias atuais como *Penaeus vannamei* passou por uma recente revisão de nomenclatura, deixando de ser denominada de *Litopenaeus*, e voltando a ser reconhecida pelo gênero *Penaeus* em fevereiro de 2022, atualização publicada no WoRMS (*World register of marine species*).

O cultivo da espécie *P. vannamei* no Brasil sofre abrangência de diferentes aspectos relacionados à lucratividade, assim como os demais empreendimentos em que se faz a produção de organismos vivos. Do mesmo modo, os manejos comumente adotados pelos produtores rurais visam a redução de gastos em toda a cadeia produtiva do camarão marinho, havendo diminuição das trocas parciais de água, limitação de custos com bombeamento e estruturas hidráulicas, redução de custos com insumos como probióticos e ração de boa

qualidade, criando situações oportunas para a introdução de patógenos e desenvolvimento de doenças dentro do sistema de produção (WALKER; MOHAN, 2009).

Para se ter um cultivo bem sucedido é necessário entender os parâmetros que atuam sobre o ciclo de vida do *P. vannamei* (Quadro II), como as físicas que estão relacionadas à temperatura, turbidez da água, sólidos suspensos, variáveis químicas como pH, alcalinidade e dureza, gases dissolvidos, salinidade, compostos orgânicos e inorgânicos, variáveis biológicas como patógenos virais, a exemplo deste o WSSV (*White Spot Syndrome Virus*), variáveis relacionadas aos dados produtivos podendo ser consideradas tecnológicas como densidade, taxa de renovação de água, taxa de arraçoamento, fator de conversão alimentar, biomassa e as variáveis limnológicas como oxigênio e condutividade (PINHEIRO *et al.*; 2007). Logo, estes parâmetros devem ser constantemente monitorados e ajustados visando reproduzir condições análogas ao habitat natural da espécie e em simultâneo atingir bons resultados produtivos, a fim de reduzir os níveis de estresse e proporcionar conforto ao animal durante o ciclo, da forma mais sustentável possível.

Quadro II - Níveis ótimos dos parâmetros para o cultivo de *Penaeus vannamei*.

Parâmetro	Nível ótimo	Unidade	Referência
Oxigênio	4 a 6	mg/L	Páes-Osuna <i>et al.</i> (2001)
Temperatura	28 a 30	°C	Kubitza <i>et al.</i> (2003)
Salinidade	15 a 25	ppt	Vinatea (1997)
pH	8,1 a 9,0	-	Hernandez; Nunes (2001)
Alcalinidade	>100	mg/L de CaCO ₃	Elovaara <i>et al.</i> (2001)
Dureza	>150	mg/L de CaCO ₃	Wyk <i>et al.</i> (1999)
Amônia	0 a 1	Mg/L	Boyd (1998)
Nitrito	< 0,3	mg/L	Boyd (2000)
Nitrato	0,2 a 10	mg/L	Boyd (2000)
Transparência	30 a 40	cm	Sá (2012)
Condutividade	>100	µS/cm	Cetesb <i>et al.</i> (2008)

Por conseguir tolerar salinidade muito baixa (SOWERS *et al.*, 2005), o camarão branco do pacífico é cultivado em grande escala em águas interiores no Brasil e no mundo, sendo assim, o fato de ser um organismo de origem marinha corrobora para que o controle adequado dos parâmetros limnológicos seja um desafio, algumas variáveis podem ter efeito nocivo em baixa salinidade, como é o caso do nitrato que se torna mais tóxico (KUHN *et al.*, 2010). Além disso, valores de amônia e nitrito devem estar sempre próximos de 0 mg/L, tanto em ambiente oligohalino como em um meio com alta concentração de sais (BOYD, 2000). Ademais, níveis regulados de pH, alcalinidade e dureza em conjunto, contribuem para um processo de ecdise eficiente, ou seja, importante para o crescimento do animal.

2.2 Patologias de Origem Viral

O camarão marinho, por se tratar de um organismo invertebrado, não possui um sistema imunológico complexo e adaptativo, não é capaz de produzir anticorpos específicos equivalentes aos dos vertebrados (BARRACCO *et al.*, 2008). Sendo assim, diferentes agentes virais podem ocasionar surtos epidemiológicos em diferentes regiões em que se emprega o cultivo de crustáceos, seja para fins comerciais ou científicos, a Organização Mundial para a Saúde Animal (*World Organization for Animal Health - OIE*) considera que são de notificação obrigatória, dentre outras patologias, as de origem virais (Quadro III), como síndrome da mancha branca (*White spot syndrome - WSS*), infecção hipodermal e necrose hematopoiética (IHHN), mionecrose infecciosa (IMN), e vírus da síndrome de Taura (TSV) (OIE, 2020).

Quadro III - Espécies suscetíveis aos patógenos virais

Principais patógenos virais	Sigla	Espécies
Síndrome da mancha branca	WSS	Todos os crustáceos decápodes (Ordem Decapoda) provenientes de fontes marinhas, salobras e de água doce;
Infecção hipodermal e necrose hematopoiética	IHHN	Camarão de pata amarela (<i>Penaeus californiensis</i>), camarão tigre gigante (<i>Penaeus monodon</i>), camarão branco do norte (<i>Penaeus setiferus</i>), camarão azul (<i>Penaeus stylirostris</i>) e camarão branco do pacífico (<i>Penaeus vannamei</i>);
Mionecrose Infecciosa	IMN	Camarão banana (<i>Penaeus merguensis</i>), camarão tigre marrom (<i>Penaeus esculentus</i>) e camarão perna branca (<i>Penaeus vannamei</i>);
Síndrome de Taura	TSV	Camarão gorduroso (<i>Metapenaeus ensis</i>), camarão negro do norte (<i>Penaeus aztecus</i>), camarão tigre gigante (<i>Penaeus monodon</i>), camarão branco do norte (<i>Penaeus setiferus</i>), camarão azul (<i>Penaeus stylirostris</i>) e o camarão branco do pacífico (<i>Penaeus vannamei</i>);

Fonte. WOA (2023)

O *White spot syndrome* (WSS) foi visto pela primeira vez em Taiwan, de onde se espalhou rapidamente para regiões de cultivo de camarão no mundo, causando mortalidade massiva em diversas criações de crustáceos em diferentes localidades (CAI *et al.*, 1995). De

extrema virulência, o vírus da síndrome da mancha branca pode ser encontrado em brânquias, tecido cardíaco, pedúnculo ocular, músculo abdominal e hemolinfa, causando letargia nos indivíduos infectados, que deixam de se alimentar, em tanques ou viveiros os camarões reúnem-se nas águas rasas ao longo das margens onde são frequentemente canibalizados pelo camarão saudável (CHU-FANG LO *et al.*, 1996).

O vírus da infecção hipodermal e necrose hematopoiética (IHHNV) é o menor dos vírus conhecidos dos camarões peneídeos (NUNAN *et al.*, 2000). Tendo em vista isso, sabe-se que pelo menos dois genótipos distintos de IHHNV já foram identificados: O Tipo 1 das Américas e Leste Asiático (principalmente Filipinas) e o Tipo 2 do Sudeste Asiático (TANG *et al.*, 2003). Este vírus já foi detectado em todos os estágios de vida (ou seja, ovos, larvas, pós-larvas, juvenis e adultos) de *P. vannamei*, podemos ressaltar que os ovos produzidos por fêmeas infectadas com IHHNV com altas cargas de vírus geralmente não se desenvolvem e eclodem, já os náuplios produzidos a partir de reprodutores infectados que eclodem têm uma alta prevalência de infecção com IHHNV (MOTTE *et al.*, 2003).

O vírus da mionecrose infecciosa (IMNV) é um dos principais patógenos que acometem a carcinicultura mundial, o primeiro relato do vírus surgiu em uma fazenda de engorda de camarão marinho localizada no município de Parnaíba, Estado do Piauí, em setembro de 2002 (NUNES *et al.*, 2004). Após o surgimento, houve ocorrência do IMN em outras localidades do nordeste brasileiro, e ao redor do mundo, chegando no Sudeste Asiático, em que foi relatado casos da doença no leste de Java na Indonésia (SENAPIN *et al.*, 2007)

A intensificação dos sintomas ocasionados pela ação do IMNV em camarões de cultivo na época do primeiro caso clínico, foi associada ao estresse, incluindo as exposições às baixas temperaturas e baixas salinidades relacionadas ao período chuvoso (COSTA *et al.*, 2009). O principal sintoma da doença provocada pelo vírus é a perda de transparência do tecido abdominal, efeito da necrose dos músculos, em estágios mais avançados, as lesões abdominais esbranquiçadas adquirem coloração avermelhada, apresentando aparência de camarão “cozido” (TANG *et al.*, 2005). Quando comparado a outros vírus que infectam o camarão, o IMNV apresenta sintomas mais brandos que o vírus causador da síndrome da Mancha Branca (*White spot syndrome virus - WSSV*) e o vírus da Taura (*Taura syndrome virus - TSV*) (LU *et al.*, 1994).

O vírus da síndrome de Taura (TSV) foi identificado por volta de 1992, em fazendas de camarão no Equador perto do rio Taura, na província de Guayas, de lá se espalhou para as Américas, e chegou ao continente asiático. A característica clínica visível comumente causada pelos vírus TSV é a expansão dos cromatóforos, o organismo infectado

apresenta coloração vermelha ou rosada nos primeiros meses do ciclo e durante o processo de ecdise, o animal apresenta letargia, natação errática e flacidez no exoesqueleto (SUDHA *et al.*, 1998).

É importante frisar que o termo doença aplicado a aquicultura é resultado de uma interação complexa entre o hospedeiro, o ambiente que pode variar quanto a condições favoráveis e o patógeno que pode variar em relação ao nível de virulência, havendo possibilidade de em algumas situações essa relação existir sem efeitos adversos (SNIESZKO *et al.*, 1973). Do ponto de vista da genética clássica, nesta interação, o ambiente desempenha papel similar ao que é empregado na relação entre fenótipo, genótipo e ambiente. Concordante a isso, a Embrapa (BRASIL, 2003) cita que diferentes constituições genéticas de um organismo respondem de maneira única a depender do estímulo ambiental, sendo assim, no caso da ação de um organismo patogênico sobre uma espécie, pode haver ou não estímulo a mecanismos de defesa a depender do ambiente e se este interagir com o genótipo.

2.3 Vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV)

O Vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV) é um patógeno que interfere significativamente no comércio de camarões peneídeos (HULTEN, 2001). Desse modo, têm-se histórico de ocorrência do vírus em diversos continentes, por meio do comércio transnacional de crustáceos vivos e seus produtos (STENTIFORD; LIGHTNER, 2011).

Após o surgimento entre os anos de 1992 e 1993 no noroeste Asiático, houve a rápida disseminação do WSSV na maioria das regiões produtoras de camarão da Ásia e do Indo Pacífico incluindo China, Japão, Coreia, Tailândia, Indonésia, Taiwan, Vietnã, Malásia e Índia, e continuou se expandindo entre as demais regiões (PANTOJA; LIGHTNER, 2014).

No Brasil, a notificação oficial ao Departamento de Saúde Animal (DSA), do Ministério da Agricultura, ocorreu em 23 de maio de 2005 e ao Escritório Internacional de Epizootias (OIE), em 4 de agosto de 2005, em decorrência do primeiro episódio de manifestação do vírus no país ocorrido na região Sul, no Estado de Santa Catarina (NUNES *et al.*, 2005), neste mesmo ano, já havia relatos da chegada do vírus em cultivos de camarão no Nordeste do Brasil, a primeira ocorrência da doença na região foi em uma pequena fazenda de camarão localizada no Ceará, surtos epidêmicos do vírus atingiram de forma massiva fazendas do litoral oeste cearense ano de 2016, causando altas taxas de mortalidade (COUTINHO *et al.*, 2020).

Piamsomboon *et al.* (2016) constataram que em Chanthaburi, na Tailândia, os surtos de WSS estão associados a períodos com baixas temperaturas médias, com grandes variações, onde variações de 1 °C causaram aumentos de 8% no risco de ocorrência de surtos da enfermidade, mas que a chuva, na região estudada, não foi fator de risco para a doença. O mesmo autor comprovou que o uso de probióticos, adequado descanso dos viveiros e o processo de calagem diminuí os riscos de surtos de síndrome de mancha branca, assim como o uso de fontes comunais de água de abastecimento aumentam o risco de surtos da doença (PIAMSOMBOON *et al.*, 2015). Sendo assim, é possível reduzir ou eliminar por completo a mortalidade de camarões infectados voluntariamente com o vírus da Mancha Branca quando se emprega temperaturas da água muito elevada (32–33 °C) ou muito baixa (< 15 °C), pesquisas voltadas para este fim contribuíram para a utilização de estufas como uma alternativa preventiva ao patógeno (NUNES *et al.*, 2004), porém como ainda não se tinha o controle das altas temperaturas manejadas na estufa, foi estopim para surtos de IMNV, vírus que possui elevada patogenicidade em temperaturas elevadas.

O Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) designa o vírus da síndrome da mancha branca como o único membro do gênero *Whispovirus* dentro da família *Nimaviridae* e da classe *Naldaviricetes* (ICTV, 2020). Tendo em vista isso, no que diz respeito à características, podemos salientar que o WSSV possui forma ovóide, têm uma simetria regular e mede entre 80 e 120 nm de diâmetro e entre 250 e 380 nm de comprimento e além disso, uma extensão semelhante a um flagelo (apêndice) pôde ser relatada em uma das extremidades do vírus.

Em cultivo do *P. vannamei*, o vírus da mancha branca se expressa com a formação de depósitos de sais de cálcio no epitélio cuticular visível, com a forma de manchas brancas arredondadas, com diâmetro de 0,5 a 2 mm, que deram nome à síndrome. Geralmente há casos dos camarões doentes apresentarem também uma coloração marrom avermelhado, que é dita popularmente em fazendas de cultivo como uma “cor de telha”, isso ocorre devido a expansão de cromatóforos do epitélio cuticular, em alguns casos a presença de mancha branca pode ser limitada ou ausente (PANTOJA; LIGHTNER, 2014). No entanto, fatores como estresse ambiental, alta alcalinidade ou doença bacteriana também podem causar manchas brancas na carapaça do camarão, e que camarões doentes com infecção por WSSV podem ter poucas ou nenhuma mancha branca (OIE, 2021) (Figura 1).

Figura 1. Depósitos de cálcio na carapaça do camarão com WSSV



Fonte. Arquivo pessoal (2021)

O vírus causador da síndrome da mancha branca possui potencial de infecção em diversos crustáceos, sabe-se que camarões peneídeos são altamente predispostos ao contágio, o que afeta significativamente o desenvolvimento do indivíduo. Porém, algumas espécies de caranguejos, lagostins, camarões de água doce, lagostas, entre outras, podem adquirir a infecção por WSSV, mas há maior resistência de alguns organismos quanto à mortalidade como consequência da infecção (LO; KOU, 1998). Logo, para verificar a presença do WSSV em crustáceos, os melhores estágios de vida para detecção são os estágios finais de PL, juvenil e adulto (OIE, 2021). Além disso, os principais tecidos-alvo deste vírus são de origem embrionária ectodérmica e mesodérmica, especialmente o epitélio cuticular e os tecidos conectivos subcuticulares (MOMOYAMA *et al.*, 1994; WONGTEERASUPAYA *et al.*, 1995) (Figura 2).

Figura 2. Camarão com indicativo de mancha branca a esquerda (“Cor de telha”)



Fonte. A autora (2021)

2.4 Variabilidade Genética em Vírus

Mutação é uma alteração na sequência de DNA ou RNA de um organismo, ou seja recombinação nos nucleotídeos de um indivíduo e surgimento de novos alelos, o que interfere diretamente na replicação de material genético e causa a variabilidade genética. Logo, com o destaque dessa informação, podemos dizer que para uma mutação cromossômica afetar uma parte crucial do genoma, não necessariamente haverá algum efeito fenotípico e nem todas as mutações terão consequências clínicas (NUSSBAUM *et al.*, 2016).

A variabilidade genética de um vírus ocorre naturalmente, atingindo diversos pólos de cultivo de camarão marinho ao redor do mundo, sendo assim as análises de variabilidade genética na carcinicultura são importantes para um manejo eficiente das unidades conservadoras do material genético bem como, programas de melhoramento (MAGGIONI *et al.*, 2013).

Entre os métodos moleculares para identificação e recomendado para a maioria dos vírus que atingem a carcinicultura pela OIE (Organização Mundial da Saúde Animal), se destaca a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizada tanto para identificação de vírus de DNA como de RNA, técnica que revolucionou a biologia molecular por permitir a rápida amplificação do alvo através de um procedimento de bancada em que se homogeniza o DNA com um conjunto de reagentes específicos. Para que a reação ocorra, esse produto é colocado em um termociclador que permite a incubação em diferentes temperaturas pré-programadas, podendo ser convencional com posterior análise em gel de agarose ou em tempo real (qPCR) com resultado simultâneo (BROWN *et al.*, 2010).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) possui algumas etapas principais, são elas a desnaturação em que ocorre a separação da dupla fita de DNA, anelamento, em que ocorre a ligação dos primers às sequências complementares de DNA, e a extensão, em que a enzima taq polimerase se liga a fita sinalizada pelo primer, complementando-a, e inicia a sequência que será replicada, formando novamente uma fita dupla de DNA. Esta técnica se trata de um método *in vitro* rápido e versátil para a amplificação das sequências através de primers específicos para o que se deseja analisar. Geralmente, o método é programado para permitir a amplificação seletiva de uma sequência-alvo específica a partir de DNA total previamente extraído (VIEIRA *et al.*, 2011).

Apesar da sensibilidade do teste PCR ser superior a 90%, a prevalência de resultados falso negativos ou falso positivo, podem inevitavelmente contribuir para a propagação de infecções (GOMES, 2021). Neste caso, o potencial problema desses resultados, acarretam a uma não monitoração do patógeno e consequente alastramento das variantes virais (WEST *et al.*, 2020).

O polimorfismo genético é uma das principais causas de falsos resultados em testes moleculares, a alta capacidade de replicação do material genético determina a variabilidade a depender de fatores bióticos e abióticos (CULLEY *et al.*, 2018). Outrossim, são variações na sequência de DNA que podem criar ou destruir sítios de reconhecimento de enzimas de restrição, algumas dessas alterações ocorrerão em sequências não codificadoras do gene, que na maioria dos casos não terão efeito em suas funções, outras ocorrerão em sequências codificadoras, levando à produção de proteínas, estas que poderão expressar alguma característica deletéria no organismo, no caso de polimorfismos virais intensificando ou não ação do patógeno a depender da espécie e do ambiente (LODISH *et al.*, 2002).

Portanto, as sequências de leitura aberta, conhecidas por ORFs (Open Reading Frames) ou quadros de leitura aberta em português, podem ser aliadas no processo de

identificação de polimorfismo genético. As ORFs são uma região da sequência nucleotídica (DNA) que pode caracterizar um gene potencialmente polimórfico, pois encontra uma sequência de nucleotídeos que é eficiente para codificação de uma proteína, sendo caracterizada pela presença de um start e um stop códon, que respectivamente são termos utilizados para designar onde possivelmente se inicia e termina uma ORF (CRUZ *et al.*, 2016).

3 MATERIAL E MÉTODOS

No presente trabalho foram selecionadas e analisadas as 30 sequências genômicas completas do vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSS), patógeno do camarão marinho *Penaeus vannamei*, disponíveis no banco de dados genômico público *Genbank*. O grupo de sequências foi analisado em relação aos seguintes *primers* utilizados para a genotipagem do WSSV: Orfs 2324a, 1415a, 75a e Orf 94a, elencadas de acordo com a recomendação da OIE / WOA. H.

A metodologia utilizada nessa etapa do trabalho foi baseada naquela descrita por Hall (2013) utilizando o software MEGA (TAMURA *et al.*, 2011). Portanto, foi verificado o anelamento dos *primers* para o grupo de sequências através de PCR *in silico*, utilizando a ferramenta de software Primer-BLAST. Ademais, foi realizado o download em modo *Fasta* das sequências deferidas na triagem, que foram posteriormente alinhadas manualmente no software MEGA, a partir do modo *clustal*. Além disso, foram produzidos dendrogramas e gráficos filogeográficos a partir da rede de haplótipos correspondente aos alinhamentos.

3.1 Origem das Sequências

As 30 sequências do genoma completo do vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSS) foram extraídas do banco de dados genômico público *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), *Genbank* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Na aba de pesquisa, foi inserido o nome do vírus, através da seguinte expressão “*Complete Genome White Spot Syndrome Virus*” como palavra-chave, bem como selecionado o filtro para busca de nucleotídeos, visando somente a coleta de sequências constituídas por ácidos nucleicos, que intrinsecamente serviriam para armazenar e transportar informações genéticas.

3.2 PCR *in silico*

Foi realizada a PCR *in silico* para todas as sequências do vírus WSS obtidas utilizando o *Primer-BLAST*, que combina o *BLAST* com um algoritmo de alinhamento global para garantir um pareamento completo do iniciador-alvo, ferramenta capaz de detectar alvos que possuem um número significativo de incompatibilidades com os iniciadores e verificar a

especificidade de primers pré-existentes (YE *et al*;2012). Portanto, foi realizado o acesso ao *Primer-BLAST*, e foi priorizado realizar a análise na opção que designa a busca para alvos em um modelo “*primers for target on one template*”. Logo, na caixa de parâmetros iniciais foi inserido o *Primer Foward* e *Reverse* para a *Open reading frame* (ORF) de interesse, sendo realizado então 4 tratamentos, referente às ORFs em questão para o grupo de 30 sequências. Ademais, na caixa que diz respeito à especificação de Éxon e Intron foi selecionada a opção “sem preferência”, em parâmetros de verificação de especificidade do par de *primers* foi selecionado o modo automático de busca, e na base de dados foi fixada a opção “personalizado” para a inclusão dos números de acesso das 30 sequências previamente coletadas. Com o resultado da triagem inicial foi analisado de maneira qualitativa e quantitativa o *query cover* (do inglês, valor de cobertura) para a consulta, que permite avaliar a similaridade das sequências com base nos resultados do *BLAST* (NEWELL *et al*; 2013). Após, foi realizada uma investigação visual para certificar a eficácia do alinhamento em cada sequência, verificando o anelamento completo dos *primers*, e foi obtido o *download* em modo *Fasta* da região referente ao anelamento de cada sequência para posterior análise em *software*.

Quadro IV - Primers das ORFs indicadas pela OIE/WOAH utilizados na *Per in silico* para WSSV

Primers	Anelamento	Sequências
Orf 1415 a	F	AAT ATG GAA CGA CGG GTG
	R	GAC CAG CGC CTC TTC AG
Orf 94 a	F	AGGAACTTTTCGATACAGTAGGGTCT
	R	TAGTCTATTCTTCAACCACCGTCAC
Orf 23/24 a	F	GTA GTG CAT GTT TCT CTA AC
	R	GTA AGT TTA TTG CTG AGA AG
Orf 75 a	F	ATATGCCAGATTTCTTCCCCTACCC
	R	CAACAGGTGCGTAAAAGAAGTCGAG

Fonte. OIE (2023)

3.3 Avaliação do polimorfismo

Para a produção dos dendrogramas, foi utilizado o software MEGA, em que foi realizado o alinhamento das sequências, para cada *Open reading frame* (ORF). As sequências para as respectivas ORFs de interesse, foram catalogadas em um único documento textual no modo *FASTA*, e foram inseridas no software MEGA, após foram renomeadas com

informações referentes ao número de acesso, país e ano de origem visando melhor identificação. Logo, foi realizado o alinhamento a partir da seleção das respectivas opções disponíveis no presente software: *Edit/Build Alignment, Create a new alignment, DNA*, após, foi inserido o arquivo *FASTA*, clicando em menu e respectivamente em *Data, Open, Retrieve Sequences from File*. Logo, foi feito o alinhamento usando a opção do menu *Alignment* que solicita a seleção de todas as sequências, dessa forma o alinhamento foi efetuado usando a primeira opção disponível *Align by ClustalW*, dentro do próprio software, nesta etapa, nenhuma configuração dos parâmetros foi modificada, sendo mantidos como os *default* do software, o algoritmo utilizado pelo programa para o modo *clustal* faz um alinhamento progressivo, começando pelas sequências que melhor se alinham, reduzindo o tempo de processamento (TAMURA *et al.*, 2011). As redes filogenéticas ou dendrogramas, foram produzidas a partir da opção “*Phylogeny*”, a partir do modo “*Construct/Test Neighbor-Joining Tree*”, disponível na tela de entrada do software, sendo assim, foram inseridos os alinhamentos salvos em modo *FASTA*, os dados para cada ORF foram analisados e salvos. Visando validar os dados obtidos anteriormente nas análises no MEGA e PopArt, foi identificado visualmente nucleotídeos distintos dentro do alinhamento realizado pelo software online *Clustal Omega* (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Da busca feita pelo genoma completo de WSSV, foram obtidas 30 sequências, conforme detalhado na Tabela 1. Foi possível observar que a maior frequência de depósitos é de amostras do Japão, com 13 registros, seguido da China com um total de 7 amostras cadastradas. Foram identificadas variações quanto ao número de amostras para os diferentes continentes, desde a Ásia e Oceania, até países da América do Norte e do Sul, entre eles Estados Unidos, México, Equador e Brasil, sendo para este último, apenas uma amostra identificada para o Vírus da Síndrome da Mancha Branca no banco de dados *Genbank*.

Tabela 1- Sequências obtidas no Banco Genômico GenBank

País de Origem	Número de acesso	Ano	Tamanho pb
Japão	AP027278.1	1997	299.976
	AP027279.1	1997	293.923
	AP027280.1	1997	311.562
	AP027285.1	2016	289.287
	AP027281.1	2017	301.236
	AP027286.1	2017	289.353
	AP027287.1	2017	289.352
	AP027282.1	2018	301.054
	AP027288.1	2019	288.252
	AP027284.1	2020	298.496
	AP027290.1	2021	288.190
	AP027283.1	2023	295.104
	AP027289.1	2023	288.494
China	KT995472.1	1994	309.286
	NC 003225.3	1994	309.286
	AF332093.3	1996	305.119
	KT995471.1	2010	284.148
	KT995470.1	2010	294.261
	KY827813.1	2012	281.054
	KX686117.1	2015	300.223
NC 075105.1	2023	305.119	
India	MG702567.1	2013	280.591
Estados Unidos	MN840357.1	2017	305.094
México	KU216744.2	2008	300.087
Equador	MH090824.1	2015	288.997
Austrália	MF768985.1	2016	285.973
Coreia do Sul	JX515788.1	2011	295.884
Taiwan	AF440570.1	1994	307.287
Tailândia	AF369029.2	1996	292.967
Brasil	MG264599.1	2015	314.232

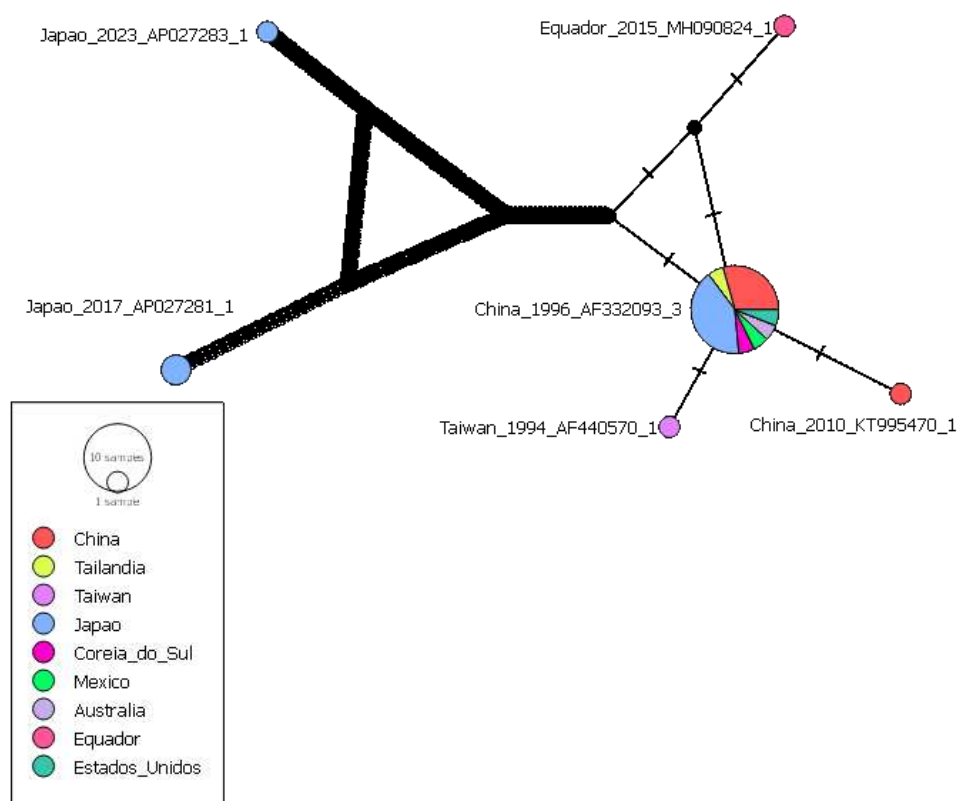
Fonte: GenBank (2023)

4.1 ORF 14/15 a

Foi possível identificar 14 perfis polimórficos através da análise do dendrogramas produzidos pelo software MEGA após realizar o alinhamento dos 30 genes das amostras do vírus WSS, 23 se anelaram a este *primer*. Logo, observou-se que as sequências AF369029.2, KU216744.2, AP027279.1, MF768985.1, KY827813.1, KT995471.1, KX686117.1, JX515788.1, AP027290.1, AP027289.1, AP027288.1 e AP027283.1, com origem nos países Tailândia, México, Japão, Austrália, China, e Coreia do Sul, respectivamente, estão inseridas em perfis polimórficos distintos nesta análise. Todavia, as sequências AF332093.3, NC_075105.1, de origem chinesa, juntamente com a amostra estadunidense MN840357.1 compõem um único possível perfil, podendo corroborar para a hipótese referente ao estabelecimento da rota de dispersão do vírus, que pode ter início através do comércio de camarões congelados provenientes de importação da Ásia para processamento nos Estados Unidos (SOUSA *et al.*, 2019). Além disso, observou-se que um grupo de amostras asiáticas se relacionam com apenas uma amostra do Equador, um dos países mais afetados pelo vírus da Síndrome da Mancha Branca, são estas as sequências estabelecidas no dendrograma AP027288.1, AP027287.1, AP027286.1, AP027285.1, AF440570.1, KT995470.1, e MH090824.1 em que a maioria é de origem japonesa e as duas últimas são respectivamente do Taiwan e da China seguidas da amostra equatoriana, também no último segmento da árvore observou-se duas sequências japonesas que se agrupam em um mesmo perfil, e possuem distância de apenas um ano de diferença, são estas AP027281.1 e AP027292.1.

Em uma análise mais objetiva, no software PopArt houve a presença de 6 perfis distintos para a ORF 14/15a, em que no maior grupo se encontram amostras da China, Tailândia, Japão, Coreia do Sul, México, Austrália e Estados Unidos, havendo correlação entre estas sequências, denotando que possuem o mesmo perfil de variabilidade genética, como pode-se observar na Figura 3 e Tabela 2, em que as sequências estão em ordem decrescente, do maior grupo para o menor.

Figura 3 - Relação filogenética entre as sequências para a ORF 14/15a



Fonte: A autora (2023)

Tabela 2 - Amostras incluídas no maior núcleo de variabilidade da Orf 1415 a

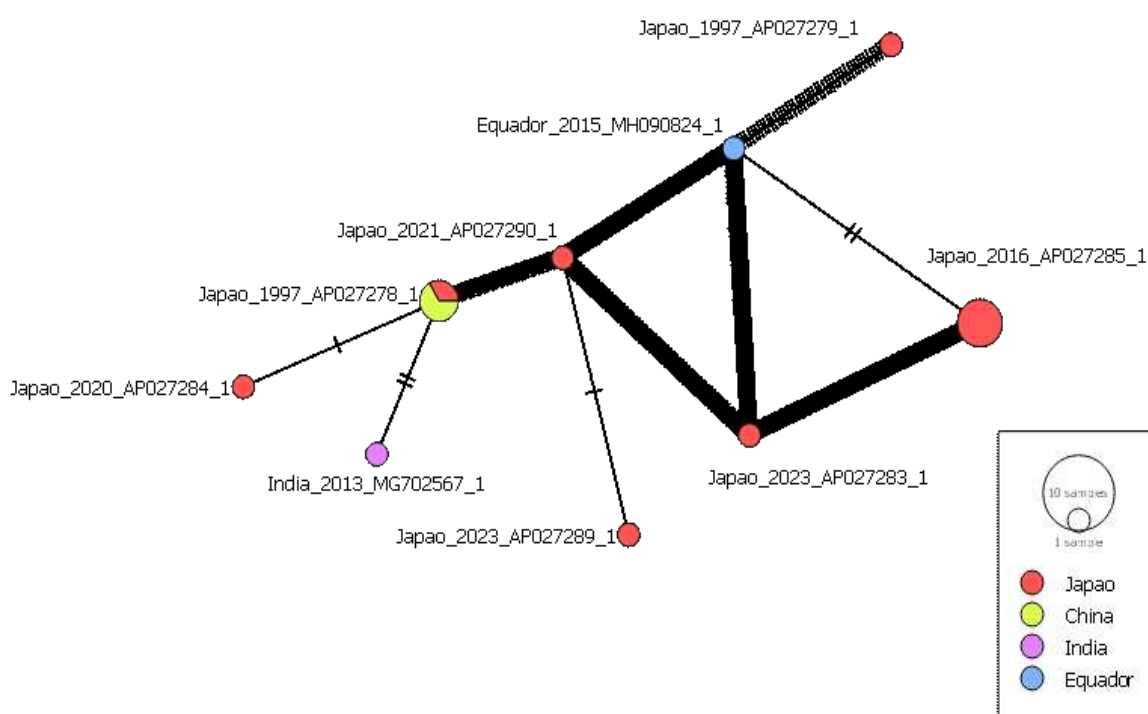
Nº de Acesso	País	Ano
AF332093.3	China	1996
AF369029.2	Tailândia	1996
AP027279.1	Japão	1997
AP027279.1	Japão	2016
AP027285.1	Japão	2017
AP027286.1	Japão	2017
AP027287.1	Japão	2019
AP027288.1	Japão	2023
AP027289.1	Japão	2021
AP027290.1	Coreia do Sul	2011
JX515788.1	China	2010
KU216744.2	México	2008
KX686117.1	China	2015
KY827813.1	China	2012
MF768985.1	Austrália	2016
MN840357.1	Estados Unidos	2017
NC_075105.1	China	2013

Fonte: A autora (2023)

4.2 ORF 23/24 a

Para a Orf 2324a foi possível identificar 9 perfis polimórficos através da análise do dendrogramas, após realizar o alinhamento dos 30 genes das amostras do vírus WSS, apenas 14 se anelaram a este primer. Logo, observou-se que no primeiro perfil polimórfico se encontram sequências em que a maioria é de origem asiática, dos países China, Japão e Índia, ademais apenas uma amostra do Equador, são elas KT995471.1, MG702567.1, AP027284.1, AP027278.1, KY827813.1. No segundo perfil identificado, observam-se duas sequências japonesas a AP027289.1 e a AP027290.1. Além disso, uma única sequência japonesa, cadastrada no ano de 2023 está em um perfil polimórfico distinto para este primer, a AP027283.1, observa-se também 7 amostras em seguidos perfis polimórficos isolados, sendo elas, a AP027285.1, AP027286.1, AP027288.1, AP027279.1 e MH090824.1, em que 6 destas amostras são do Japão e a última do Equador. Na análise pelo software popArt houve a presença de 9 perfis distintos para a ORF 2324 a, em que nos dois maiores grupos se encontram amostras da China e do Japão, como pode-se observar na Figura 4 e Tabela 3, em que as sequências estão em ordem decrescente , do maior grupo para o menor.

Figura 4 - Relação filogenética entre as sequências para a ORF 23/24a



Fonte: A autora (2023)

Tabela 3 - Amostras incluídas nos dois maiores núcleos de variabilidade para a Orf 2324 a

Nº de Acesso	País	Ano
AP027285.1	Japão	2016
AP027286.1	Japão	2017
AP027287.1	Japão	2017
AP027288.1	Japão	2019
AP027278.1	Japão	1997
KT995471.1	China	2010
KY827813.1	China	2012

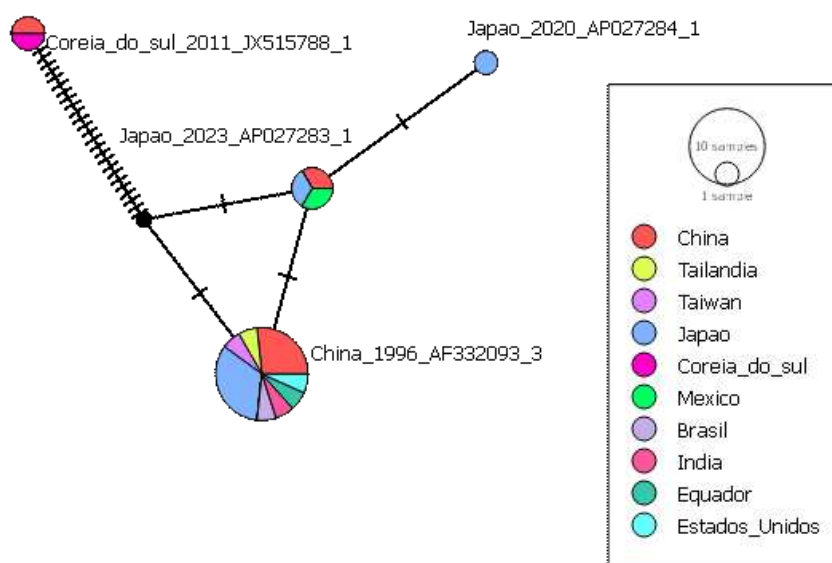
Fonte. A autora (2023)

4.3 ORF 94 a

Foi possível identificar 17 perfis polimórficos através da análise do dendrogramas produzidos pelo software MEGA, após realizar o alinhamento dos 30 genes das amostras do vírus WSS, 21 se anelaram a este primer. Logo, observou-se que poucas sequências compartilhavam perfil polimórfico em comum, sendo estas as sequências oriundas da Coreia do sul e da China JX515788.1 e KX686117.1, respectivamente, além disso, 3 amostras do ano de 1997 de origem no Japão, a AP027278.1, AP027279.1 e AP027280.1, na análise de dendrogramas para esta ORF, compartilham o mesmo perfil polimórfico, foi possível inferir também que duas sequências contendo uma distância temporal de 27 anos de diferença, compartilhavam o mesmo perfil, sendo elas AF332093.3 e NC_075105.1, o restante da sequências se manteve em perfis distintos. Todavia, ao inserir o alinhamento proveniente do MEGA no software popArt houve a identificação de apenas 4 perfis distintos para a ORF 94a, o que possibilitou uma análise sucinta dos grupos.

No menor grupo estão amostras da Coreia do Sul, e China, JX515788_1 e KX686117_1, respectivamente. Além disso pode-se observar um perfil polimórfico que demonstra a similaridade entre AP027283_1 do Japão, KT995470_1 da China e KU216744_1 oriunda do México. No maior grupo compartilham o mesmo perfil amostras da China, Tailândia, Japão, Coréia do Sul, México, Brasil, Índia, Equador e Estados Unidos, havendo indicativo através do genoma do vírus, que estas sequências compartilham polimorfismo e são similares como pode-se observar na Figura 5 e Tabela 4, em que as sequências estão em ordem decrescente, do maior grupo para o menor.

Figura 5 - Relação filogenética entre as sequências para a ORF 94a



Fonte: A autora (2023)

Tabela 4 - Amostras incluídas nos três maiores núcleos de variabilidade para a Orf 94 a

Nº de Acesso	País	Ano
AF332093 3	China	1996
KT995472 1	China	1994
NC 075105 1	China	2023
AF369029 2	Tailândia	1996
AF440570 1	Taiwan	1994
AP027278 1	Japao	1997
AP027279 1	Japao	1997
AP027280 1	Japao	1997
AP027281 1	Japao	2017
AP027282 1	Japao	2018
MG264599 1	Brasil	2015
MH090824 1	Equador	2015
MG702567 1	India	2013
MN840357 1	Estados Unidos	2017

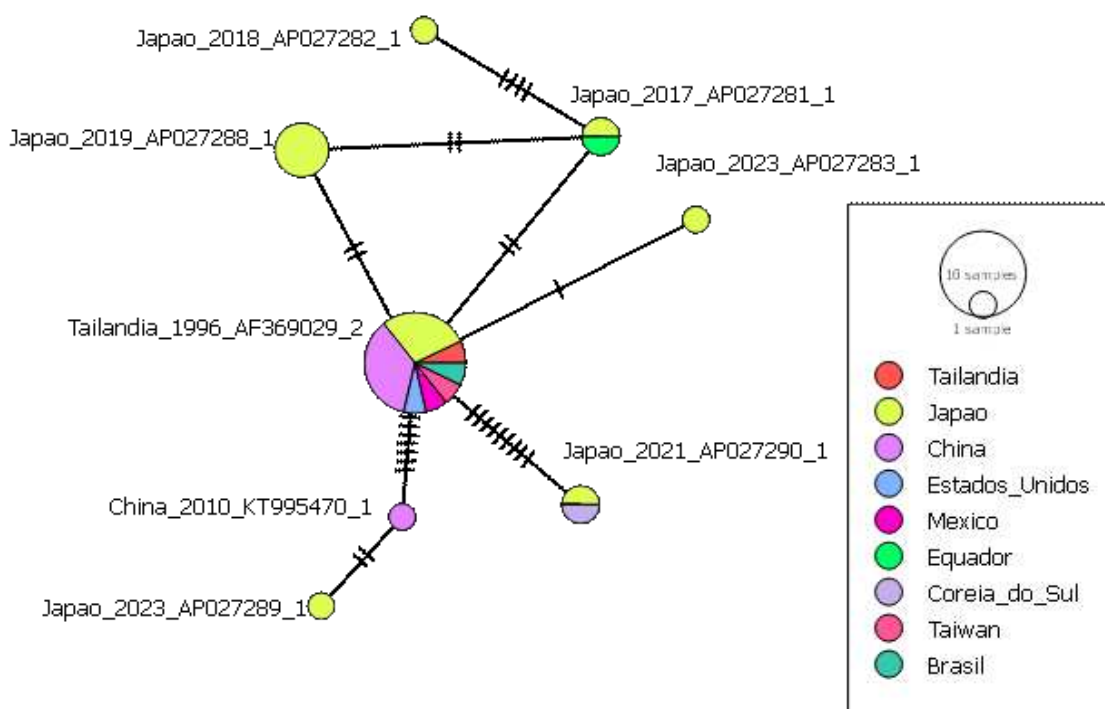
Fonte: A autora (2023)

4.4 ORF 75 a

Foi possível identificar 12 perfis polimórficos através da análise do dendrogramas produzidos pelo software MEGA após realizar o alinhamento dos 30 genes das amostras do vírus WSS, 26 sequências se anelaram a este primer . Logo, ao observar o dendograma para esta ORF observou-se um grande grupo polimórfico composto por 9 sequências, divididas entre China, Japão e apenas uma dos Estados Unidos, são elas AP027283_1, NC_003225_3, AP027278_1, AP027279_1, AP027280_1, MN840357_1, KT995472_1, NC_075105_1 e AF332093_3. Ademais, para a análise dessa ORF a sequência brasileira MG264599_1, se encontra em um mesmo perfil juntamente com a amostra de Taiwan, a AF440570_1, no dendograma em questão observa-se distintos perfis constituídos por sequências isoladas, sendo elas do Japão e China, para a análise desta Open reading Frame a sequência equatoriana MH090824_1 se manteve sozinha, sem apresentar similaridade com outra sequência em um mesmo perfil polimórfico, já as sequências japonesas mantêm similaridade entre elas, como é o caso das amostras AP027288_1, AP027287_1, AP027286_1 e AP027285_1, que juntas formam um único perfil.

No software popArt houve a presença de 8 perfis distintos para a ORF 75 a, em que no maior grupo se encontram amostras da China, Tailândia, Japão, Brasil, México, Taiwan, Estados Unidos, havendo correlação entre as sequências oriundas desses países, denotando que possuem o mesmo perfil de variabilidade genética, como pode-se observar na Figura 6 e Tabela 5, em que as sequências estão em ordem decrescente, do maior grupo para o menor.

Figura 6 - Relação filogenética entre as sequências para a ORF 75a



Fonte: A autora (2023)

Tabela 5 - Amostras incluídas nos três maiores núcleos de variabilidade para a Orf 75 a

Nº de Acesso	País	Ano
AF360929_2	Tailândia	1996
AP027284_1	Japão	2020
AP027279_1	Japão	1997
AP027278_1	Japão	1997
NC_003225_1	China	1994
MN840357_1	Estados Unidos	2017
KU216744	México	2008
KT995472_1	China	1994
KX686117_1	China	2015
AF440570_1	Taiwan	1994
NC_075105_1	China	2023
AF332093_3	China	1996
MG264599_1	Brasil	2015
MN840357_1	Estados Unidos	2017

Fonte: A autora (2023)

De acordo com os artigos de inclusão das amostras no *Genbank*, estas tiveram origem distintas e variam quanto a origem da infecção, podendo ser de animal naturalmente infectado preservado em etanol, amostras enviadas por agricultores locais, cepas de laboratórios, isolados de camarões contaminados, recuperados de amostras diagnósticas submetidas a órgãos governamentais que foram positivas para WSSV por PCR, e infecção viral a partir de ensaios *in vivo*. Os resultados da *pcr in silico* que foi realizada para fazer a análise das 30 sequências selecionadas para o estudo, pode ser visualizado nos apêndices e anexos, bem como os dendrogramas obtidos pelo *software* MEGA. Algumas sequências em cada ORF não se anelaram completamente, podendo sugerir uma possível mutação na região de anelamento dos primers em questão.

A carga de virulência de um patógeno viral pode estar relacionada com o tipo de variante viral que se encontra no ambiente e a sua interação com o meio, podendo causar altas mortalidade na produção de camarão (NUNES et al 2016). Os Locus de minissatélites ORF 94 a, ORF 75 a , ORF 2324 a e ORF 1415 a do genoma do WSSV são utilizados como marcadores moleculares em estudos epidemiológicos, porém não há muitas pesquisas que contextualizam a utilização destas até o momento.

Estudos mostraram que isolados do vírus da síndrome da mancha branca (WSSV) de diferentes localizações geográficas compartilham uma alta similaridade genética, com exceção das regiões variáveis em ORF 23/24 a e ORF 14/15 a, e número variável de repetições para a ORF 94 a, estudo que verificou o genótipo do vírus para estes três primers mencionados usando isolados de WSSV de amostras coletadas, em que a ORF 94 a forneceu mais informações para uma melhor análise do modo de transmissão espaço-temporal e da linhagem de evolução genética do WSSV (TAN *et al.*, 2011). No presente estudo a Orf 75 a se anelou com maior maior número de sequências propostas para a *pcr in silico*, porém obteve menor número de perfis polimórficos quando comparada a Orf 94 a, já em análise feita pelos gráficos extraídos do popArt o inverso se apresenta, podendo-se identificar de maneira eficiente a relação entre as sequências utilizando os dois primers em questão, porém a Orf 94 a se mostrou mais adequada, por apresentar ampla similaridade filogeográfica e maior número de perfis polimórficos, se traduzindo conveniente para análise de variabilidade genética. para o WSSV. No México, quando um monitoramento foi realizado a fim de verificar os níveis de variabilidade genética do WSSV foi possível observar ampla variação para a orf 94 a sugerindo que variantes genéticas deste vírus coexistem e são de origem geográficas distintas (AVELAR *et al*;2015).

Em estudos realizados na Ásia sobre a disseminação do vírus da síndrome da Mancha Branca utilizando a Orf 23/34 e 14/15, relacionam a primeira com o surto inicial de WSSV (ZWART et al;2010). Nesta pesquisa para o primer em questão foi o único que manteve o perfil de variabilidade, havendo mesmo número de perfil polimórfico tanto para os dendrogramas, quanto para o gráfico filogenético. A produção Mundial da aquicultura aumenta ano após ano, tendo as principais áreas de produção localizada no sudeste asiático, como China, Tailândia, Vietnã, Indonésia, e Índia, e nas américas o Equador, México e Brasil, países presentes na análise de todas as ORFs desta pesquisa.

Para uma análise preliminar de disseminação do WSSV é necessário, além de conhecer o genoma e analisar as relações filogeográficas a nível genético, considerar a prevalência do agente patogênico nos países exportadores, não cabendo individualizar o risco a determinado país e sim entender o histórico de virulência da carcinicultura local e inserir o país como a probabilidade de disseminação de novas estirpes virais visando obter resultados concretos, levando em consideração todo o manejo de exportação desde descarte de resíduos até possíveis desvios da matéria prima para outros métodos de subsistência como por exemplo a venda de iscas, que em muitos casos são negligenciados e esquecidos, podendo haver carga viral inserida e corroborar para um desequilíbrio ecológico. Ademais, para as 30 sequências analisadas de diferentes países cadastradas no *Genbank*, não se observou registro de notificação obrigatória no site da Organização Mundial para a Saúde Animal (OIE/WOAH) para estas sequências, fazendo-se necessário para análises posteriores.

5 CONCLUSÃO

Com o presente estudo preliminar, foi possível concluir que:

- O maior número de registros de genomas completos de WSSV são oriundos do continente asiático, o que pode limitar os estudos de variabilidade genética no contexto global;
- Foi possível inferir que a ORF 94 possibilitou uma análise mais ampla quanto ao polimorfismo genético presente em genomas completos do WSSV, disponíveis no *Genbank*, apresentando mais similaridade e maior número de perfis polimórficos entre as sequências, exprimindo-se com eficiência para a presente análise, podendo ser aplicada em possíveis estudos epidemiológicos, verificação da variabilidade genética e disseminação do vírus da Síndrome da Mancha Branca;
- Estudos de variabilidade genética viral são necessários para a constante avaliação do estado sanitário dos cultivos de camarão marinho, principalmente para o não diagnóstico de falsos positivos.

REFERÊNCIAS

- ABCC. **História da carcinicultura no Brasil**. Associação Brasileira de Criadores de Camarões, 2011. Disponível em: <<https://abccam.com.br/2011/02/historia-da-carcinicultura-no-brasil/>>. Acesso em: 28 out. 2023.
- ARAÚJO, D. C. Avaliação do Programa Nacional de Desenvolvimento da Aqüicultura – O Caso da Carcinicultura Marinha no Nordeste. 2003. **Dissertação** (Mestrado em Gestão Pública para Desenvolvimento do Nordeste). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2003.
- AVELAR, D; JESÚS, M; ENRÍQUEZ, P, R; ZARAGOZA, Z. Francisco. J; RODRÍGUEZ, M, L; JUÁREZ, V, R; PÉREZ, V, N. Genotyping WSSV isolates from northwestern Mexican shrimp farms affected by white spot disease outbreaks in 2010–2012. **Dis Aquat Org**, v. 114, p. 11–20, 2015.
- BARRACCO, M. A.; PERAZZOLO, L. M.; ROSA, R. D. **Inmunologia de crustaceos con enfasis en camarones. In. (eds) CYTES. Patologia y Inmunologia del camarón blanco Penaeus vannamei**. Panamá, 2008.
- BATISTA, M. A.; SANT'ANA, H. M. P.; CHAVES, J. B. P.; APARECIDA, F. Carotenos e provitamina A em bortalha e ervas aromáticas comercializadas em Viçosa, Estado de Minas Gerais, durante as quatro estações do ano. **Acta Scientiarum**, v.28, n.1, p.93-100, 2006.
- BJÖRNSSON, B. Effects of stocking density on growth rate of halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) reared in large circular tanks for three years. **Aquaculture**, v.123, p.259-270, 1994.
- BOYD, C. E. Manejo da qualidade de água na aquicultura e no cultivo do camarão marinho. São Paulo: **ABCC**, Tradução: Josemar Rodrigues, 2000.
- BOYD, C. E. Pond Water aeration systems aquaculture engineering. **Aquac. Eng.**, v.18, p.9-40, 1998
- BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. **Produção da Pecuária Municipal 2022**. 2023. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/ppm/quadros>>. Acesso em: 18 out. 2023
- BROWN, T. **Gene cloning and DNA analysis: an introduction**. New York: John Wiley & Sons, 2010.
- BURFORD, M.A.; THOMPSON, P.J.; MCINTOSH, R.P.; BAUMAN, R.H.; PEARSON, D.C. Nutrient and microbial dynamics in high-intensity, zero-exchange shrimp ponds in Belize. **Aquaculture**, v.219, n.1-4, p. 393–411. 2003.

CAI, S.L.; HUANG, J.; WANG, C.M.; SONG, X.L.; SUN, X.; YU, J.; ZHANG, Y.E.; YANG, C.H. Estudos epidemiológicos sobre a doença epidêmica explosiva do camarão em 1993-1994. **J. China Fish**, v.9, p.112–117. 1995.

CAMARGO, S. G. O.; POUHEY, J. L. O. F. Aquicultura: um mercado em expansão. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 11, n. 4, p. 393-396, out-dez, 2005.

CETESB, COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. Índices de qualidade das águas, critérios de avaliação da qualidade dos sedimentos e indicador de controle de fontes. In: Qualidade das águas interiores no Estado de São Paulo, Série Relatórios. São Paulo: **Secretaria de Estado de Meio Ambiente**, p.28. Apêndice B.2008.

COSTA, A. M.; MARTINS, P. C.C. Análise da contagem de hemócitos e da capacidade coagulante da hemolinfa do camarão *Litopenaeus vannamei* (Boone 1931), em cultivos com ocorrência de necrose muscular. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 35, n. 4, p. 545-551.2009.

CULLEY. New insight into the RNA aquatic virosphere via viromics. **Science Direct**, v 244, p.84-89, 15 january, 2018.

COUTINHO, J. L. F. **Prospecção de fatores de risco associados a mortalidade de camarões marinhos *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931) cultivados em viveiros sob a influência do vírus da síndrome da mancha branca (WSSV)**. 2020. 83 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Pesca) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2020.

CRUZ, L.K.S.; ANTUNES, A.M.; TELLES, M.P.C. Procurando agulha no palheiro predição de genes a partir de sequências genômicas. **Genética na Escola**, v.11, n.1, 2016.

DANTAS, M. D.A. Estudo dos genomas dos principais vírus que acometem a carcinicultura no Brasil. 2013. **Tese** (Doutorado em Bioquímica) - Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2019.

DECANET. **DecaNet. *Penaeus vannamei* Boone, 1931**. 2023. Disponível em: <<https://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=377748>>. Acesso em: 20 out. 2023.

ELOVAARA, A. K. Shrimp Farming manual. Practical Technology for intensive shrimp production. **A.K. Elovaara**, Florida, 2001.

FAO. **Global Aquaculture Production 1950-2020**. 2022. FAO Fishery Statistical Collections. Disponível em: <<https://www.fao.org/fishery/en/statistics/global-aquaculture-production/query/en>>. Acesso em: 15 out. 2023.

FERREIRA, M. W. M , FERREIRA, A.N.S , CARVALHO, B.L.F, BEZERRA, J.H.C , BRITO, P.S, GUIMARÃES,E.C , SOARES,J.A.L.S , CASTRO,C.U.S, Thales Passos de ANDRADE,T.P , SANTOS,J.P. Carcinicultura no estado do maranhão: Evolução e perspectivas.**Rev. Bras. Eng. Pesca**,v.14, n.1,p. 36-45,2023.

FILHO, G. A.; RONÇANI, L.D. Carcinicultura em Santa Catarina: da Euforia Desregulada à Crise Generalizada HALAC – História Ambiental, **Latinoamericana y Caribeña**, v.8, n.1, p.67-91, 2018.

FLEGEL, T.W. Detection of major penaeid shrimp viruses in Asia, a historical perspective with emphasis on Thailand. **Aquaculture**, v.258, p.1-33, 2007.

FUNGE-SMITH, S.; BRIGGS, M. The introduction of *Penaeus vannamei* and *P. stylirostris* into the Asia-Pacific region. International Mechanisms for the Control and Responsible Use of Alien Species in Aquatic Ecosystems. Report of an Ad Hoc Expert Consultation, 27-30 August 2003, **Xishuangbanna**, p.19–167. 2005.

GenBank, **Banco de dados genômico público**, disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/?term=white+spot+syndrome+virus>>. Acesso em: 20/06/2023 às 11:00h.

GIBSON, D. **O que 2022 reserva para os maiores produtores de camarão do mundo?** 2021. Disponível em:

<<https://www.undercurrentnews.com/2021/12/22/what-does-2022-have-in-store-for-the-worlds-largest-shrimp-producers/>>. Acesso em: 20 out. 2023

GOMES. G.H. Possíveis interferentes na qualidade dos testes rt-pcr para COVID-19. 2021. **Monografia** (Graduação em Farmácia) - Centro Universitário FG -UNIFG., 2021.

HALL, B. G. Building phylogenetic trees from molecular data with MEGA. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 5, p. 1229–1235, 2013.

HERNÁNDEZ, J. Z.; NUNES, A J. P. Biossegurança no cultivo de camarão marinho: qualidade da água e fatores ambientais. **Revista da ABCC**, v. 3, n. 2, p. 55-59, 2001

HULTEN, M,C,V. WITTEVELDT,J.PETERS,S. KLOOSTERBOER,N., TARCHINI,R., FIERS, M. H SANDBRINK,H. LANKHORST,R,K. VLAK.J.M.The white spot syndrome virus DNA genome sequence. **Virology**. v.286,n.1,p.7-22. 2001.

ICTV, International Committee on Taxonomy of Viruses. **Virus Taxonomy**. 2020. Disponível em: <<https://ictv.global/report/chapter/nimaviridae/nimaviridae/whispovirus>>. Acesso em: 23 de janeiro de 2023.

KARUNASAGAR, I., ABABOUC, L. Shrimp Viral Diseases, Import Risk Assessment and International Trade. **Indian J. Virol**. v.23, p.141–148, 2012.

KAUTSKY, N.; RONNBACK, P.; TEDENGREN, M.; TROELL, M. Ecosystem perspectives on management of disease in shrimp pond farming. **Aquaculture**, v.191, p.145-161, 2000.

KUBITZA, F. **Qualidade de água no cultivo de peixes e camarões**. São Paulo: Kubitza, 2003.

KUHN, D.D., SMITH, S.A., BOARDMAN, G.D., ANGIER, M.W., MARSH, L., FLICK, G.J. Chronic toxicity of nitrate to Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*: Impacts on survival, growth, antennae length, and pathology. **Aquaculture**, v.309, p.109–114, 2010.

LO, C.F.; KOU, G.H. Síndrome da mancha branca associada a vírus de camarão em Taiwan: uma revisão. **Fish Pathology**, v 33, p.365–371.1998.

LO, C.F., HO, P., PENG, S., CHEN, C., HSU, H., CHIU, Y., CHANG, C. White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods diseases of aquatic organisms., v.27; p.215-225.1996.

LODISH H, BERK A, ZIPURSKY SL, MATSUDAIRA P, BALTIMORE D, DARNELL J. Análise genética em biologia molecular. In: Nader HB, editor. **Biologia celular e molecular**. Rio de Janeiro: Revinter; 2002. p.255-93.

LU, Y. et al. Infection of the yellow head baculo-lake virus (YBV) in two species of penaeid shrimp, *Penaeus stylirostris* (Stimpson) and *Penaeus vannamei* (Boone), **J.fish Dis.**, v17, p.649-656, 1994.

MAGALHÃES, M. E. S. **Cultivo do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) em sistema multifásico**. 2004, 60 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Pesqueiros) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2004.

MAGGIONI, R; COIMBRA, M, R, M.COSTA, R, B; DINIZ, F,M; MOLINA, W, F; OLIVEIRA, D, M; P, A. Genetic variability of marine shrimp in the Brazilian industry. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 48, n. 8, p. 968-974, ago. 2013. DOI: 10.1590/S0100-204X2013000800023

MARQUES, M.R.F.; MOSER, J.R.; MULLER, I.C. Virologia de crustáceos e métodos moleculares de diagnóstico. In: SILVA-SOUZA, Ângela Teresa (Org.). **Sanidade de Organismos Aquáticos**. Maringá: ABRAPOA, 2006

MOMOYAMA K, HIAOKA, M, NAKANO, H, KOUBE, H, INOUE, K & OSEKO, N 1994, 'Mass mortalities of cultured kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, in Japan in 1993: histopathological study', **Fish Pathology**, vol. 29, n. 2, pp. 141-8, 1994.

MOSS, S.M.; MOSS, D.R.; ARCE, S.M.; LIGHTNER, D.V.; LOTZ, J.M. The role of selective breeding and biosecurity in the prevention of disease in penaeid shrimp aquaculture. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.110, p. 247–250, 2012.

MOTTE, M.; YUGCHA, E.; LUZARDO, J.; CASTRO, F.; LECLERCQ, G.; RODRÍGUEZ, J.; MIRANDA, P.; BORJA, O.; SERRANO, J.; TERREROS, M.; MONTALVO, K.; NARVÁEZ, A.; TENORIO, N.; CEDEÑO, V.; MIALH E.; BOULO, V. Prevention of IHNV vertical transmission in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 219, p. 57–70, 2003.

NATIVIDAD, K.D.; NOMURA, N.; MATSUMURA, M. Detection of White spot syndrome virus DNA in pond soil using a 2-step nested PCR, **J Virol Methods**. 2008 Apr;149(1):28-34. doi: 10.1016/j.jviromet.2008.01.013. Epub 2008 Mar 4.

NEVES SRA, MARTINS PCC. Surgimento das doenças virais na carcinicultura brasileira: impactos e estratégias da gestão de saúde. **Brazilian Journal of Development**. 2021; 7(6):61925-61944.

NEWELL,P.D. FRICKER.A.D. ROCO,A.CHANDRANGSU P, SUSAN M. MECKEL.A. Small-Group Activity Introducing the Use and Interpretation of BLAST. **Journal of Microbiology & Biology Education**, December 2013, p. 238-243.

NUNAN L.M., POULOS B.T. & LIGHTNER D.V. Use of polymerase chain reaction for the detection of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in penaeid shrimp. **Marine Biotechnology**. 2000, v 2, p. 319-328.

NUNES A.J.P. Carcinicultura ameaçada. **Panorama da aquicultura** , Rio de Janeiro, v.14,p.37-57,maio/jun.2004.

NUNES, A. J. P. Um ano de mudanças, perdas e ganhos. **Panorama da Aqüicultura**, v. 15, n.92, p. 26-33, nov/dez, 2005.

NUNES, A. J. P.; FEIJÓ, R. G. Convivência com o vírus da mancha branca no cultivo de camarão marinho no Brasil. **Revista da Associação Brasileira de Criadores de Camarão**, v. 2, p. 30–36, 2016.

NUSSBAUM, R, L. Roderick R McInnes, and Huntington F. Willard. 2016. “Principles of Clinical Cytogenetics and Genome Analysis.” In: **Thompson & Thompson Genetics in Medicine**., 8th ed., 57–74. Philadelphia, PA: Elsevier Health Sciences.

OIE. World Organization for Animal Health. **Manual Aquatic. 2020**. Disponível em: <<https://www.woah.org/en/home/>>. Acesso em 28 out.2023.

OIE. World Organization for Animal Health. **Manual Aquatic. 2021**. Disponível em: <<https://www.woah.org/en/home/>>. Acesso em 28 out.2023.

PÁEZ-OSUNA, F. The environmental impact of shrimp aquaculture: causes, effects and mitigating alternatives. **Environ.Manage**. v.28, p.131-140, 2001.

PANTOJA, C.; LIGHTNER, D.V. Virus del síndrome de la mancha blanca (white spot syndrome virus, WSSV) In: Morales, V. y J. Cuéllar-Anjel. Guía técnica: patología e inmunología de camarones penaeidos. Rep. de Panamá: **OIRSA**, p.111-120, 2014.

PÉREZ-FARFANTE I. **Western Atlantic shrimps of the genus Penaeus**. Fish B-NOAA 67: 462-591, 1969.

PÉREZ FARFANTE, I.; KENSLEY, B. F. Penaeoid and sergestoid Shrimps and Prawns of the world. Key and diagnoses for the families and genera. **Memories du museum national D'histoire naturelle**, v.175, p.1-233, 1997.

PIAMSOMBOON, P.; INCHAISRI, C.; WONGTAVATCHAI, J. Climate factors influence the occurrence of white spot disease in cultured penaeid shrimp in Chanthaburi province, Thailand. **Aquaculture Environment Interactions**, [s.l.], v. 8, n.1, p.331-337, 2016.

PIAMSOMBOON, P.; INCHAISRI, C.; WONGTAVATCHAI, J. White spot disease risk factors associated with shrimp farming practices and geographical location in Chanthaburi province, Thailand. **Diseases of Aquatic Organisms**, [s.l.], v. 117, n. 2, p.145-153, 2015.

RIBEIRO, E. P., SERAVALLI, E. A. G. Química de alimentos. São Paulo: **Edgard Blücher**, Instituto Mauá de Tecnologia, 2004. 184 p.

PINHEIRO, A. C. A. S. et al. Epidemiological status of Taura Syndrome and infectious myonecrosis viruses in *Penaeus vannamei* reared in Pernambuco (Brazil). **Aquaculture**, v.262, p.17-22, 2007.

ROYO, F., GIRONÉS, O.; ANIA, S. Laboratorio de Ictiopatología. Fac. de Veterinaria. Univ. de Zaragoza C/ Miguel Servet. **AquaTIC: revista electrónica de acuicultura**, ISSN-e 1578-4541, N.º. 8, 1999, págs. 2-3.

SÁ, M. V. C. Limnocultura: limnologia para aquicultura. Fortaleza: Edições UFC, 2012. 218 p.

SANTOS, C. de S.; ARAUJO, M. V. P. de; ALMEIDA, S. T. de. A Carcinicultura no Rio Grande do Norte: Perspectivas e desafios. Desenvolve: **Revista de Gestão do Unilasalle**, v.4, n.2, p.131-153, 2015. doi: 10.18316/2316-5537.15.7

SARDOU, S. S. T.; CALIXTO, F. A. A.; POMBO, C. R.; MESQUITA, E. F. M.; ALVES, V. S.; PINHEIRO JÚNIOR, A. A.. Ocorrência das principais doenças virais na carcinicultura brasileira – revisão de literatura. **Revista De Medicina Veterinária Do Unifeso** v. 2, n.1, 2022.

SENAPIN S., PHEWSAIYA, K., BRIGGS, M., FLEGEL, T. W. 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, p. 32-38, 2007.

SOWERS, A. D.; GATLIN, D. M.; YOUNG, S. P.; ISLEY, J. J.; BROWDY, C. L.; TOMASSO, J. R. Responses of *Litopenaeus vannamei* (Boone) in water containing low concentrations of total dissolved solids. **Aquaculture Research**, v.36, p.819-823, 2005.

SNIESZKO, S. F. Recent advances in scientific knowledge and development pertaining to diseases of fishes. **Adv. Vet. Sci. Comp. Med.**, San Diego, v. 17, p. 291-314, 1973.

- STENTIFORD,G.D. LIGHTNER.D.V., Cases of White Spot Disease (WSD) in European shrimp farms. 2011. *Aquaculture*, Volume 319, Issues 1–2, 1 September 2011, Pages 302-306
- SUDHA, P.; MOHAN, C.; SHANKAR, K.; HEGDE, A. Relationship between White Spot Syndrome Virus infection and clinical manifestation in Indian cultured penaeid shrimp. 1998. *Aquaculture*, [s.l.], v. 167, n. 1-2, p. 95-101
- TAN, Y.W; SHI, Z. Genotyping of white spot syndrome virus in Chinese cultured shrimp during 1998-1999. *Virol Sin*, v. 26, n. 2, p. 123-130, abr. 2011. DOI: 10.1007/s12250-011-3181-1. Epub 2011 Apr 7.
- TANG, K.F.J.; PANTOJA, C.R.; POULOS, B.T.; REDMAN, R.M.; LIGHTNER, D.V. Induced resistance to white spot syndrome virus infection in *Penaeus stylirostris* through pre-infection with infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus a preliminary study. *Aquaculture*, v, 216.p.19-29,2003.
- TANG K.F.J.; PANTOJA, C.R.; POULOS, B.T.; REDMAN, R.M.; LIGHTNER, D.V. In situ hybridization demonstrates that *Litopenaeus vannamei*, *L. stylirostris* and *Penaeus monodon* are susceptible to experimental infection with infectious myonecrosis virus (IMNV).*Dis. Aquat. Org.*, v.63, pp. 261-265.2005.
- TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol.*, v.28, p.2731–2739, 2011.
- VIANA J.T.; FREITAS J.O.; ROCHA R. S.; MAGGIONI R. **Variantes Virais**: uma ameaça à carcinicultura. *Aquaculture Brasil* . Out/dez 2021.
- VIEIRA,S. Genética Forense.20011.**Trabalho de conclusão de curso** (Especialização em Genética para Professores do Ensino Médio da Universidade Federal do Paraná),São Paulo,2011.
- VINATEA, L.A. Princípios químicos da qualidade de água em aquicultura. Florianópolis: **Editora da UFSC**, 1997.
- WALKER, P.J.; MOHAN, C.V. Viral disease emergence in shrimp aquaculture:origins, impact and the effectiveness of health management strategies. *Rev.Aquaculture*. v.1, p.125–154, 2009.
- WEST, C. *et al.* COVID-19 Testing: The Threat of False-Negative Results. **Mayo clinic proceedings**, 2020.
- WONGTEERASUPAYA C., VICKERS J.E., SRIURAIRAIRATANA S., NASH G.L., ALARAJAMORN A., BOONSAENG V., et al., A non-occluded, systemic baculovirus that occurs in cells of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in the black tiger prawn *Penaeus monodon*, **Dis. Aquat. Organ.** v.21, p.69–77, 1995.

WORMS EDITORIAL BOARD. Word register of Marine Species. 2022 Disponível em <<https://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=377748>>. Acesso em 22 de out de 2023.

WYK, V.P. Farming Marine Shrimp in Freshwater Systems: an economic development strategy for Florida. Florida: Final report. **Harbor Branch Oceanographic Institution**, 1999.

YOUNG B.A., WALKER B., DIXON A.E., WALKER V.A. Physiological adaptation to the environment. **Journal of Animal Science**, v.67, n.9, p. 2426-2432, 1989.

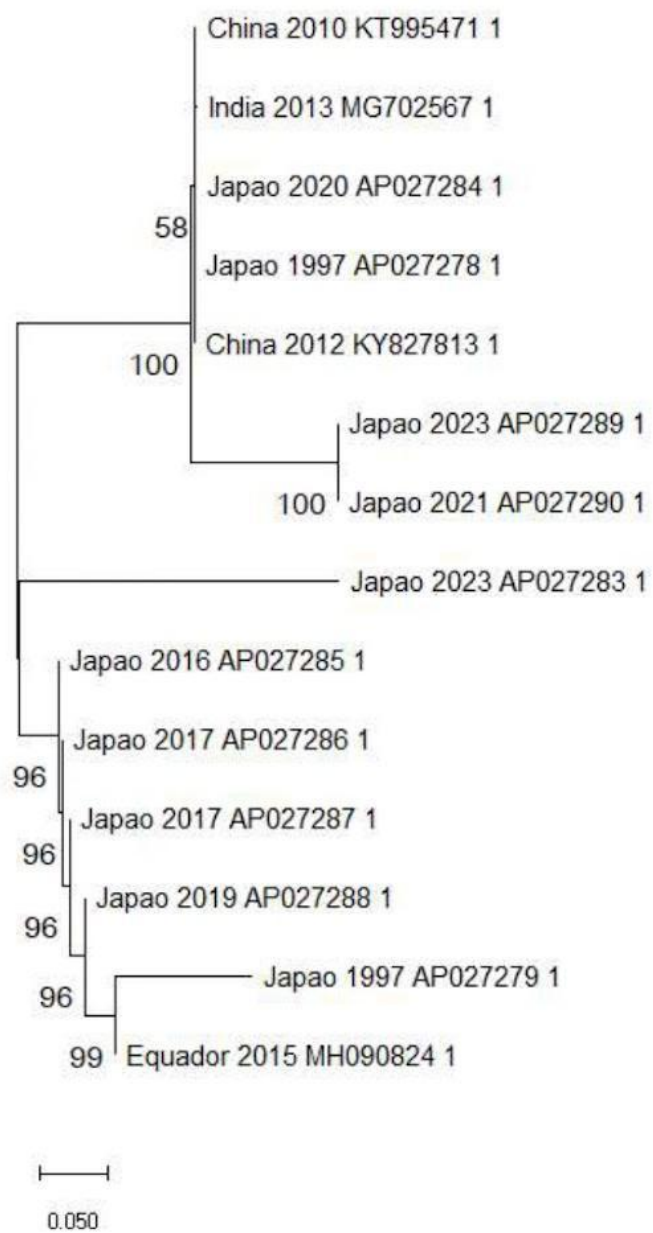
ZWART. M.P., Dieu B.T.M., HEMERIK L., Vlak J.M. Evolutionary trajectory of white spot syndrome virus (WSSV) genome shrinkage during spread in Asia. **PLoS ONE**.,v.5,2010. doi: 10.1371/journal.pone.0013400.

APÊNDICES

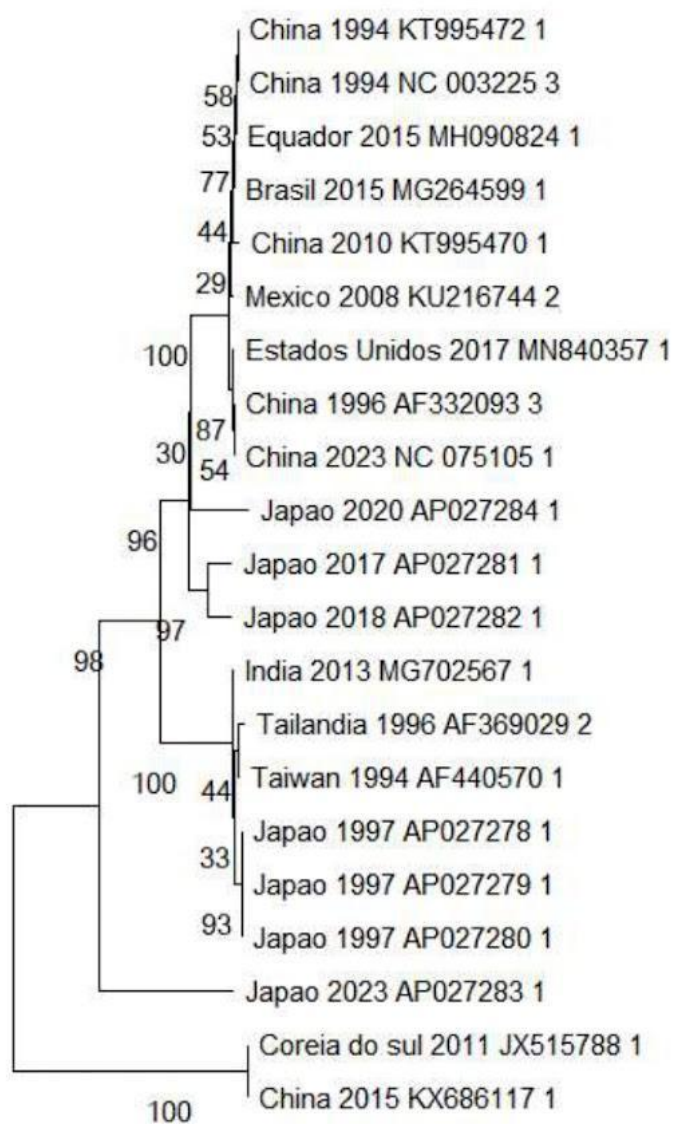
APÊNDICE A- Dendograma da ORF 14/15 a para as sequências alinhadas



APÊNDICE B- Dendograma da ORF 23/24 a para as sequências alinhadas

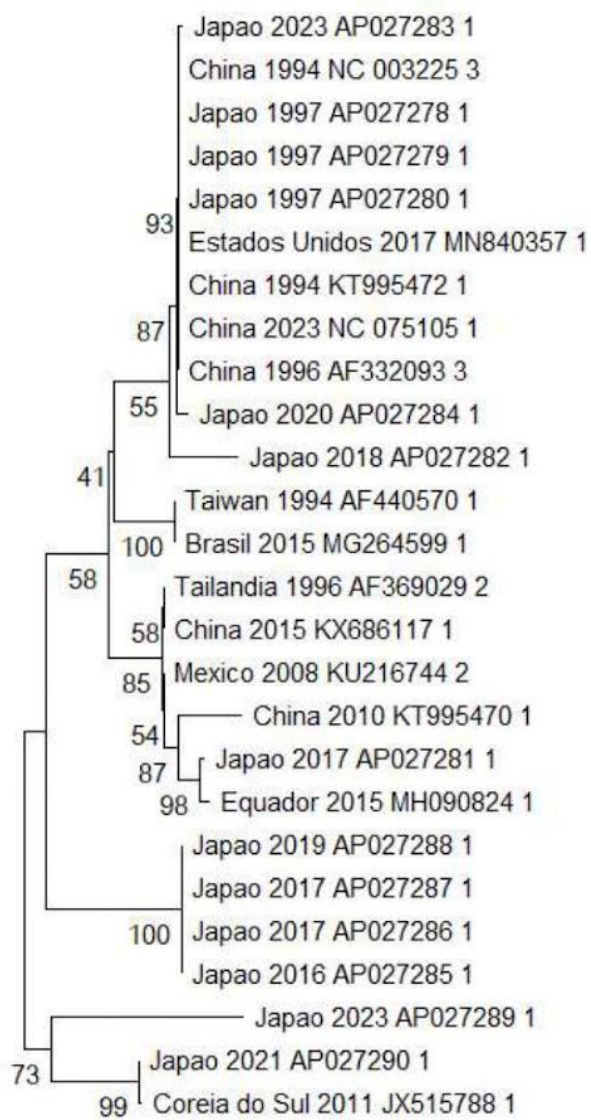


APÊNDICE C- Dendograma da ORF 94 a para as sequências alinhadas



0.10

APÊNDICE D- Dendograma da ORF 75 a para as sequências alinhadas



0.02

ANEXOS

ANEXO A- PCR *in silico* para a ORF 23/24 a

	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GTAGTGCATGTTTCTCTAAC	20	51.66	40.00	4.00	1.00
Reverse primer	GTAAGTTTATTGCTGAGAAG	20	49.50	35.00	4.00	1.00
Products on intended targets						
Products on allowed targets						
Products on allowed transcript variants						
Products on potentially unintended templates						
Products on target templates						

>KY827813.1 White spot syndrome virus strain CN04

```

product length = 1265
Forward primer 1      GTAGTGCATGTTTCTCTAAC  20
Template       265395  ..... 265414

Reverse primer 1      GTAAGTTTATTGCTGAGAAG  20
Template       266659  ..... 266640

```

>AP027290.1 MAG: White spot syndrome virus Miyako2021 DNA, complete genome

```

product length = 2807
Forward primer 1      GTAGTGCATGTTTCTCTAAC  20
Template       270992  ..... 271011

Reverse primer 1      GTAAGTTTATTGCTGAGAAG  20

```

09/10/2023, 17:23

Primer-Blast results

Template 273798 273779

>AP027289.1 MAG: White spot syndrome virus 1-4 DNA, complete genome

product length = 2811
 Forward primer 1 GTAGTGCATGTTTCTCTAAC 20
 Template 271292 271311
 Reverse primer 1 GTAAGTTTATTGCTGAGAAG 20
 Template 274102 274083

>AP027288.1 MAG: White spot syndrome virus 0722-1 DNA, complete genome

product length = 1140
 Forward primer 1 GTAGTGCATGTTTCTCTAAC 20
 Template 272718 272737
 Reverse primer 1 GTAAGTTTATTGCTGAGAAG 20
 Template 273857 273838

>AP027287.1 MAG: White spot syndrome virus E2 DNA, complete genome

product length = 1140
 Forward primer 1 GTAGTGCATGTTTCTCTAAC 20
 Template 273818 273837
 Reverse primer 1 GTAAGTTTATTGCTGAGAAG 20
 Template 274957 274938

>AP027286.1 MAG: White spot syndrome virus E1 DNA, complete genome

product length = 1140
 Forward primer 1 GTAGTGCATGTTTCTCTAAC 20
 Template 273819 273838
 Reverse primer 1 GTAAGTTTATTGCTGAGAAG 20
 Template 274958 274939

>AP027285.1 MAG: White spot syndrome virus S14 DNA, complete genome

product length = 1140
 Forward primer 1 GTAGTGCATGTTTCTCTAAC 20
 Template 273753 273772
 Reverse primer 1 GTAAGTTTATTGCTGAGAAG 20
 Template 274892 274873

>AP027284.1 MAG: White spot syndrome virus Pc2020 DNA, complete genome

product length = 1265
 Forward primer 1 GTAGTGCATGTTTCTCTAAC 20
 Template 282837 282856
 Reverse primer 1 GTAAGTTTATTGCTGAGAAG 20
 Template 284101 284082

09/10/2023, 17:23

Primer-Blast results

>AP027283.1 MAG: White spot syndrome virus 79 DNA, complete genome

```

product length = 2918
Forward primer 1      GTAGTGCATGTTTCTCTAAC  20
Template        277792 ..... 277811

Reverse primer 1      GTAAGTTTATTGCTGAGAAG  20
Template        280709 ..... 280690

```

>AP027279.1 MAG: White spot syndrome virus JP01B DNA, complete genome

```

product length = 803
Forward primer 1      GTAGTGCATGTTTCTCTAAC  20
Template        278727 ..... 278746

Reverse primer 1      GTAAGTTTATTGCTGAGAAG  20
Template        279529 ..... 279510

```

>AP027278.1 MAG: White spot syndrome virus JP01A DNA, complete genome

```

product length = 1265
Forward primer 1      GTAGTGCATGTTTCTCTAAC  20
Template        284316 ..... 284335

Reverse primer 1      GTAAGTTTATTGCTGAGAAG  20
Template        285580 ..... 285561

```

>MG702567.1 White spot syndrome virus isolate IN_AP4RU

```

product length = 1248
Forward primer 1      GTAGTGCATGTTTCTCTAAC  20
Template        88123 ..... 88142

Reverse primer 1      GTAAGTTTATTGCTGAGAAG  20
Template        89370 ..... 89351

```

>MH090824.1 White spot syndrome virus isolate WSSV-EC-15098

```

product length = 1149
Forward primer 1      GTAGTGCATGTTTCTCTAAC  20
Template        273453 ..... 273472

Reverse primer 1      GTAAGTTTATTGCTGAGAAG  20
Template        274601 ..... 274582

```

>KT995471.1 White spot syndrome virus strain CN03

```

product length = 1265
Forward primer 1      GTAGTGCATGTTTCTCTAAC  20
Template        268489 ..... 268508

Reverse primer 1      GTAAGTTTATTGCTGAGAAG  20
Template        269753 ..... 269734

```

>MF768985.1 White spot syndrome virus isolate WSSV-AU

09/10/2023, 17:23

Primer-Blast results

```
product length = 2966
Forward primer 1   GTAGTGCATGTTTCTCTAAC 20
Template         29819 ..... 29838

Forward primer 1   GTAGTGCATGTTTCTCTAAC 20
Template         32784 .....TC....A...C 32766
```

ANEXO B- PCR in silico para a ORF 14/15 a

	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	AATATGGAACGACGGGTG	18	54.38	50.00	4.00	0.00
Reverse primer	GACCAGCGCCTCTTCAG	17	57.32	64.71	4.00	2.00

Products on intended targets

Products on allowed targets

Products on allowed transcript variants

Products on potentially unintended templates

Products on target templates

>[KY827813.1](#) White spot syndrome virus strain CN04

```

product length = 1850
Forward primer 1      AATATGGAACGACGGGTG 18
Template       257983 ..... 258000

Reverse primer 1      GACCAGCGCCTCTTCAG 17
Template       259832 ..... 259816

```

>[AF369029.2](#) White spot syndrome virus, complete genome

```

product length = 2485
Forward primer 1      AATATGGAACGACGGGTG 18
Template       22229 ..... 22246

Reverse primer 1      GACCAGCGCCTCTTCAG 17

```

09/10/2023, 17:17

Primer-Blast results

Template 24713 24697

>AP027290.1 MAG: White spot syndrome virus Miyako2021 DNA, complete genome

product length = 2080
 Forward primer 1 AATATGGAACGACGGGTG 18
 Template 262947 262964
 Reverse primer 1 GACCAGCGCCTCTTCAG 17
 Template 265026 265010

>AP027289.1 MAG: White spot syndrome virus 1-4 DNA, complete genome

product length = 2112
 Forward primer 1 AATATGGAACGACGGGTG 18
 Template 263252 263269
 Reverse primer 1 GACCAGCGCCTCTTCAG 17
 Template 265363 265347

>AP027288.1 MAG: White spot syndrome virus 0722-1 DNA, complete genome

product length = 2660
 Forward primer 1 AATATGGAACGACGGGTG 18
 Template 264167 264184
 Reverse primer 1 GACCAGCGCCTCTTCAG 17
 Template 266826 266810

>AP027287.1 MAG: White spot syndrome virus E2 DNA, complete genome

product length = 2660
 Forward primer 1 AATATGGAACGACGGGTG 18
 Template 265267 265284
 Reverse primer 1 GACCAGCGCCTCTTCAG 17
 Template 267926 267910

>AP027286.1 MAG: White spot syndrome virus E1 DNA, complete genome

product length = 2660
 Forward primer 1 AATATGGAACGACGGGTG 18
 Template 265268 265285
 Reverse primer 1 GACCAGCGCCTCTTCAG 17
 Template 267927 267911

>AP027285.1 MAG: White spot syndrome virus S14 DNA, complete genome

product length = 2660
 Forward primer 1 AATATGGAACGACGGGTG 18
 Template 265202 265219
 Reverse primer 1 GACCAGCGCCTCTTCAG 17
 Template 267861 267845

09/10/2023, 17:17

Primer-Blast results

>AP027283.1 MAG: White spot syndrome virus 79 DNA, complete genome

```

product length = 3913
Forward primer 1      AATATGGAACGACGGGTG  18
Template       267988 ..... 268005

Reverse primer 1      GACCAGCGCCTCTTCAG  17
Template       271900 ..... 271884

```

>AP027282.1 MAG: White spot syndrome virus JP04 DNA, complete genome

```

product length = 3920
Forward primer 1      AATATGGAACGACGGGTG  18
Template       271741 ..... 271758

Reverse primer 1      GACCAGCGCCTCTTCAG  17
Template       275660 ..... 275644

```

>AP027281.1 MAG: White spot syndrome virus JP03 DNA, complete genome

```

product length = 3920
Forward primer 1      AATATGGAACGACGGGTG  18
Template       271925 ..... 271942

Reverse primer 1      GACCAGCGCCTCTTCAG  17
Template       275844 ..... 275828

```

>AP027279.1 MAG: White spot syndrome virus JP01B DNA, complete genome

```

product length = 2223
Forward primer 1      AATATGGAACGACGGGTG  18
Template       270616 ..... 270633

Reverse primer 1      GACCAGCGCCTCTTCAG  17
Template       272838 ..... 272822

```

>MN840357.1 White spot syndrome virus isolate CN_95_DFPE

```

product length = 2670
Forward primer 1      AATATGGAACGACGGGTG  18
Template       271064 ..... 271081

Reverse primer 1      GACCAGCGCCTCTTCAG  17
Template       273733 ..... 273717

```

>KU216744.2 White spot syndrome virus strain MEX2008

```

product length = 2097
Forward primer 1      AATATGGAACGACGGGTG  18
Template       22233 ..... 22250

Reverse primer 1      GACCAGCGCCTCTTCAG  17
Template       24329 ..... 24313

```

>MH090824.1 White spot syndrome virus isolate WSSV-EC-15098

09/10/2023, 17:17

Primer-Blast results

```

product length = 2662
Forward primer 1      AATATGGAACGACGGGTG 18
Template       264899 ..... 264916

Reverse primer 1      GACCAGCGCCTCTTCAG 17
Template       267560 ..... 267544

```

>MF768985.1 White spot syndrome virus isolate WSSV-AU

```

product length = 2024
Forward primer 1      AATATGGAACGACGGGTG 18
Template       22233 ..... 22250

Reverse primer 1      GACCAGCGCCTCTTCAG 17
Template       24256 ..... 24240

```

>KT995471.1 White spot syndrome virus strain CN03

```

product length = 1850
Forward primer 1      AATATGGAACGACGGGTG 18
Template       260751 ..... 260768

Reverse primer 1      GACCAGCGCCTCTTCAG 17
Template       262600 ..... 262584

```

>KT995470.1 White spot syndrome virus strain CN02

```

product length = 2662
Forward primer 1      AATATGGAACGACGGGTG 18
Template       264978 ..... 264995

Reverse primer 1      GACCAGCGCCTCTTCAG 17
Template       267639 ..... 267623

```

>KX686117.1 White spot syndrome virus strain PC

```

product length = 2080
Forward primer 1      AATATGGAACGACGGGTG 18
Template       108731 ..... 108748

Reverse primer 1      GACCAGCGCCTCTTCAG 17
Template       110810 ..... 110794

```

>JX515788.1 White spot syndrome virus strain K-LV1, complete genome

```

product length = 2080
Forward primer 1      AATATGGAACGACGGGTG 18
Template       263131 ..... 263148

Reverse primer 1      GACCAGCGCCTCTTCAG 17
Template       265210 ..... 265194

```

>AF440570.1 Shrimp white spot syndrome virus, complete genome

```

product length = 2662
Forward primer 1      AATATGGAACGACGGGTG 18

```

09/10/2023, 17:17

Primer-Blast results

Template 301090 301107

Reverse primer 1 GACCAGCGCCTCTCAG 17
Template 303751 303735

>[NC_075105.1](#) White spot syndrome virus, complete genome

product length = 2670

Forward primer 1 AATATGGAACGACGGGTG 18
Template 271093 271110

Reverse primer 1 GACCAGCGCCTCTCAG 17
Template 273762 273746

>[AF332093.3](#) White spot syndrome virus, complete genome

product length = 2670

Forward primer 1 AATATGGAACGACGGGTG 18
Template 271093 271110

Reverse primer 1 GACCAGCGCCTCTCAG 17
Template 273762 273746

ANEXO C- PCR *in silico* para a ORF 94 a

	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	AGGAACTTTCGATACAGTAGGGTCT	25	60.81	44.00	5.00	2.00
Reverse primer	TAGTCTATTCTTCAACCACCGTCAC	25	60.34	44.00	5.00	3.00

Products on intended targets

Products on allowed targets

Products on allowed transcript variants

Products on potentially unintended templates

Products on target templates

>[AF369029.2](#) White spot syndrome virus, complete genome

product length = 414

Forward primer 1 AGGAACTTTCGATACAGTAGGGTCT 25
 Template 142707 142731

Reverse primer 1 TAGTCTATTCTTCAACCACCGTCAC 25
 Template 143120 143096

>[AP027284.1](#) MAG: White spot syndrome virus Pc2020 DNA, complete genome

product length = 846

Forward primer 1 AGGAACTTTCGATACAGTAGGGTCT 25
 Template 98013 98037

Reverse primer 1 TAGTCTATTCTTCAACCACCGTCAC 25
 Template 98858 98834

>[AP027283.1](#) MAG: White spot syndrome virus 79 DNA, complete genome

09/10/2023, 17:21

Primer-Blast results

```

product length = 252
Forward primer 1 AGGAACTTTCGATACAGTAGGGTCT 25
Template 95528 ..... 95552

Reverse primer 1 TAGTCTATTCTTCAACCACCGTCAC 25
Template 95779 ..... 95755

```

>AP027282.1 MAG: White spot syndrome virus JP04 DNA, complete genome

```

product length = 1656
Forward primer 1 AGGAACTTTCGATACAGTAGGGTCT 25
Template 98813 ..... 98837

Reverse primer 1 TAGTCTATTCTTCAACCACCGTCAC 25
Template 100468 ..... 100444

```

>AP027281.1 MAG: White spot syndrome virus JP03 DNA, complete genome

```

product length = 1170
Forward primer 1 AGGAACTTTCGATACAGTAGGGTCT 25
Template 98743 ..... 98767

Reverse primer 1 TAGTCTATTCTTCAACCACCGTCAC 25
Template 99912 ..... 99888

```

>AP027280.1 MAG: White spot syndrome virus JP02 DNA, complete genome

```

product length = 414
Forward primer 1 AGGAACTTTCGATACAGTAGGGTCT 25
Template 98001 ..... 98025

Reverse primer 1 TAGTCTATTCTTCAACCACCGTCAC 25
Template 98414 ..... 98390

```

>AP027279.1 MAG: White spot syndrome virus JP01B DNA, complete genome

```

product length = 414
Forward primer 1 AGGAACTTTCGATACAGTAGGGTCT 25
Template 97976 ..... 98000

Reverse primer 1 TAGTCTATTCTTCAACCACCGTCAC 25
Template 98389 ..... 98365

```

>AP027278.1 MAG: White spot syndrome virus JP01A DNA, complete genome

```

product length = 414
Forward primer 1 AGGAACTTTCGATACAGTAGGGTCT 25
Template 97984 ..... 98008

Reverse primer 1 TAGTCTATTCTTCAACCACCGTCAC 25
Template 98397 ..... 98373

```

>NC_003225.3 White spot syndrome virus strain CN01, complete genome

```

product length = 738
Forward primer 1 AGGAACTTTCGATACAGTAGGGTCT 25
Template 97177 ..... 97201

```

09/10/2023, 17:21

Primer-Blast results

```
Reverse primer 1 TAGTCTATTCTTCAACCACCGTCAC 25
Template 97914 .....
```

>MG702567.1 White spot syndrome virus isolate IN_AP4RU

```
product length = 407
Forward primer 1 AGGAACTTTCGATACAGTAGGGTCT 25
Template 197979 .....
```

```
Reverse primer 1 TAGTCTATTCTTCAACCACCGTCAC 25
Template 198385 .....
```

>MN840357.1 White spot syndrome virus isolate CN_95_DFPE

```
product length = 738
Forward primer 1 AGGAACTTTCGATACAGTAGGGTCT 25
Template 98040 .....
```

```
Reverse primer 1 TAGTCTATTCTTCAACCACCGTCAC 25
Template 98777 .....
```

>KU216744.2 White spot syndrome virus strain MEX2008

```
product length = 738
Forward primer 1 AGGAACTTTCGATACAGTAGGGTCT 25
Template 149634 .....
```

```
Reverse primer 1 TAGTCTATTCTTCAACCACCGTCAC 25
Template 150371 .....
```

>MH090824.1 White spot syndrome virus isolate WSSV-EC-15098

```
product length = 738
Forward primer 1 AGGAACTTTCGATACAGTAGGGTCT 25
Template 96542 .....
```

```
Reverse primer 1 TAGTCTATTCTTCAACCACCGTCAC 25
Template 97279 .....
```

>KT995472.1 White spot syndrome virus strain CN01

```
product length = 738
Forward primer 1 AGGAACTTTCGATACAGTAGGGTCT 25
Template 97177 .....
```

```
Reverse primer 1 TAGTCTATTCTTCAACCACCGTCAC 25
Template 97914 .....
```

>KT995470.1 White spot syndrome virus strain CN02

```
product length = 738
Forward primer 1 AGGAACTTTCGATACAGTAGGGTCT 25
Template 97238 .....
```

```
Reverse primer 1 TAGTCTATTCTTCAACCACCGTCAC 25
Template 97975 .....
```

09/10/2023, 17:21

Primer-Blast results

>[KX686117.1](#) White spot syndrome virus strain PC

```

product length = 144
Forward primer 1      AGGAACTTTCGATACAGTAGGGTCT 25
Template        236538 ..... 236562

Reverse primer 1      TAGTCTATTCTTCAACCACCGTCAC 25
Template        236681 ..... 236657

```

>[JX515788.1](#) White spot syndrome virus strain K-LV1, complete genome

```

product length = 144
Forward primer 1      AGGAACTTTCGATACAGTAGGGTCT 25
Template        92098 ..... 92122

Reverse primer 1      TAGTCTATTCTTCAACCACCGTCAC 25
Template        92241 ..... 92217

```

>[AF440570.1](#) Shrimp white spot syndrome virus, complete genome

```

product length = 414
Forward primer 1      AGGAACTTTCGATACAGTAGGGTCT 25
Template        127351 ..... 127375

Reverse primer 1      TAGTCTATTCTTCAACCACCGTCAC 25
Template        127764 ..... 127740

```

>[NC_075105.1](#) White spot syndrome virus, complete genome

```

product length = 738
Forward primer 1      AGGAACTTTCGATACAGTAGGGTCT 25
Template        98047 ..... 98071

Reverse primer 1      TAGTCTATTCTTCAACCACCGTCAC 25
Template        98784 ..... 98760

```

>[AF332093.3](#) White spot syndrome virus, complete genome

```

product length = 738
Forward primer 1      AGGAACTTTCGATACAGTAGGGTCT 25
Template        98047 ..... 98071

Reverse primer 1      TAGTCTATTCTTCAACCACCGTCAC 25
Template        98784 ..... 98760

```

>[MG264599.1](#) White spot syndrome virus consensus sequence isolate WSSV-chimera, complete genome

```

product length = 738
Forward primer 1      AGGAACTTTCGATACAGTAGGGTCT 25
Template        161709 ..... 161733

Reverse primer 1      TAGTCTATTCTTCAACCACCGTCAC 25
Template        162446 ..... 162422

```

ANEXO D- PCR *in silico* para a ORF 75 a

	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	ATATGCCAGATTTCTTCCCCTACCC	25	62.00	48.00	5.00	0.00
Reverse primer	CAACAGGTGCGTAAAAGAAGTCGAG	25	62.51	48.00	4.00	2.00

Products on intended targets

Products on allowed targets

Products on allowed transcript variants

Products on potentially unintended templates

Products on target templates

>[AF369029.2](#) White spot syndrome virus, complete genome

```

product length = 837
Forward primer 1   ATATGCCAGATTTCTTCCCCTACCC 25
Template        107906 ..... 107930

Reverse primer 1   CAACAGGTGCGTAAAAGAAGTCGAG 25
Template        108742 ..... 108718

```

>[AP027290.1](#) MAG: White spot syndrome virus Miyako2021 DNA, complete genome

```

product length = 408
Forward primer 1   ATATGCCAGATTTCTTCCCCTACCC 25
Template        62210 ..... 62234

Reverse primer 1   CAACAGGTGCGTAAAAGAAGTCGAG 25
Template        62617 ..... 62593

```

>[AP027289.1](#) MAG: White spot syndrome virus 1-4 DNA, complete genome

09/10/2023, 17:25

Primer-Blast results

```

product length = 498
Forward primer 1 ATATGCCAGATTTCTTCCCCTACCC 25
Template 62212 ..... 62236

Reverse primer 1 CAACAGGTGCGTAAAAGAAGTCGAG 25
Template 62709 ..... 62685

```

>AP027288.1 MAG: White spot syndrome virus 0722-1 DNA, complete genome

```

product length = 645
Forward primer 1 ATATGCCAGATTTCTTCCCCTACCC 25
Template 61827 ..... 61851

Reverse primer 1 CAACAGGTGCGTAAAAGAAGTCGAG 25
Template 62471 ..... 62447

```

>AP027287.1 MAG: White spot syndrome virus E2 DNA, complete genome

```

product length = 645
Forward primer 1 ATATGCCAGATTTCTTCCCCTACCC 25
Template 62002 ..... 62026

Reverse primer 1 CAACAGGTGCGTAAAAGAAGTCGAG 25
Template 62646 ..... 62622

```

>AP027286.1 MAG: White spot syndrome virus E1 DNA, complete genome

```

product length = 645
Forward primer 1 ATATGCCAGATTTCTTCCCCTACCC 25
Template 62002 ..... 62026

Reverse primer 1 CAACAGGTGCGTAAAAGAAGTCGAG 25
Template 62646 ..... 62622

```

>AP027285.1 MAG: White spot syndrome virus S14 DNA, complete genome

```

product length = 645
Forward primer 1 ATATGCCAGATTTCTTCCCCTACCC 25
Template 62002 ..... 62026

Reverse primer 1 CAACAGGTGCGTAAAAGAAGTCGAG 25
Template 62646 ..... 62622

```

>AP027284.1 MAG: White spot syndrome virus Pc2020 DNA, complete genome

```

product length = 1074
Forward primer 1 ATATGCCAGATTTCTTCCCCTACCC 25
Template 63518 ..... 63542

Reverse primer 1 CAACAGGTGCGTAAAAGAAGTCGAG 25
Template 64591 ..... 64567

```

>AP027283.1 MAG: White spot syndrome virus 79 DNA, complete genome

```

product length = 940
Forward primer 1 ATATGCCAGATTTCTTCCCCTACCC 25
Template 61039 ..... 61063

```


09/10/2023, 17:25

Primer-Blast results

Reverse primer 1 CAACAGGTGCGTAAAAGAAGTCGAG 25
 Template 61978 61954

>AP027282.1 MAG: White spot syndrome virus JP04 DNA, complete genome

product length = 883
 Forward primer 1 ATATGCCAGATTTCTCCCTACCC 25
 Template 64527 64551

Reverse primer 1 CAACAGGTGCGTAAAAGAAGTCGAG 25
 Template 65409 65385

>AP027281.1 MAG: White spot syndrome virus JP03 DNA, complete genome

product length = 838
 Forward primer 1 ATATGCCAGATTTCTCCCTACCC 25
 Template 64502 64526

Reverse primer 1 CAACAGGTGCGTAAAAGAAGTCGAG 25
 Template 65339 65315

>AP027280.1 MAG: White spot syndrome virus JP02 DNA, complete genome

product length = 1029
 Forward primer 1 ATATGCCAGATTTCTCCCTACCC 25
 Template 63552 63576

Reverse primer 1 CAACAGGTGCGTAAAAGAAGTCGAG 25
 Template 64580 64556

>AP027279.1 MAG: White spot syndrome virus JP01B DNA, complete genome

product length = 1029
 Forward primer 1 ATATGCCAGATTTCTCCCTACCC 25
 Template 63527 63551

Reverse primer 1 CAACAGGTGCGTAAAAGAAGTCGAG 25
 Template 64555 64531

>AP027278.1 MAG: White spot syndrome virus JP01A DNA, complete genome

product length = 1029
 Forward primer 1 ATATGCCAGATTTCTCCCTACCC 25
 Template 63535 63559

Reverse primer 1 CAACAGGTGCGTAAAAGAAGTCGAG 25
 Template 64563 64539

>NC_003225.3 White spot syndrome virus strain CN01, complete genome

product length = 1029
 Forward primer 1 ATATGCCAGATTTCTCCCTACCC 25
 Template 62949 62973

Reverse primer 1 CAACAGGTGCGTAAAAGAAGTCGAG 25
 Template 63977 63953

09/10/2023, 17:25

Primer-Blast results

>MN840357.1 White spot syndrome virus isolate CN_95_DFPE

```

product length = 1029
Forward primer 1   ATATGCCAGATTTCTTCCCCTACCC 25
Template       63558 ..... 63582

Reverse primer 1   CAACAGGTGCGTAAAAGAAGTCGAG 25
Template       64586 ..... 64562

```

>KU216744.2 White spot syndrome virus strain MEX2008

```

product length = 837
Forward primer 1   ATATGCCAGATTTCTTCCCCTACCC 25
Template       115002 ..... 115026

Reverse primer 1   CAACAGGTGCGTAAAAGAAGTCGAG 25
Template       115838 ..... 115814

```

>MH090824.1 White spot syndrome virus isolate WSSV-EC-15098

```

product length = 747
Forward primer 1   ATATGCCAGATTTCTTCCCCTACCC 25
Template       62600 ..... 62624

Reverse primer 1   CAACAGGTGCGTAAAAGAAGTCGAG 25
Template       63346 ..... 63322

```

>KT995472.1 White spot syndrome virus strain CN01

```

product length = 1029
Forward primer 1   ATATGCCAGATTTCTTCCCCTACCC 25
Template       62949 ..... 62973

Reverse primer 1   CAACAGGTGCGTAAAAGAAGTCGAG 25
Template       63977 ..... 63953

```

>KT995470.1 White spot syndrome virus strain CN02

```

product length = 825
Forward primer 1   ATATGCCAGATTTCTTCCCCTACCC 25
Template       63129 ..... 63153

Reverse primer 1   CAACAGGTGCGTAAAAGAAGTCGAG 25
Template       63953 ..... 63929

```

>KX686117.1 White spot syndrome virus strain PC

```

product length = 837
Forward primer 1   ATATGCCAGATTTCTTCCCCTACCC 25
Template       201718 ..... 201742

Reverse primer 1   CAACAGGTGCGTAAAAGAAGTCGAG 25
Template       202554 ..... 202530

```

>JX515788.1 White spot syndrome virus strain K-LV1, complete genome

```

product length = 363

```

09/10/2023, 17:25

Primer-Blast results

```

Forward primer 1 ATATGCCAGATTTCTTCCCCTACCC 25
Template 58797 ..... 58821

Reverse primer 1 CAACAGGTGCGTAAAAGAAGTCGAG 25
Template 59159 ..... 59135

```

>[AF440570.1](#) Shrimp white spot syndrome virus, complete genome

```

product length = 1356
Forward primer 1 ATATGCCAGATTTCTTCCCCTACCC 25
Template 92536 ..... 92560

Reverse primer 1 CAACAGGTGCGTAAAAGAAGTCGAG 25
Template 93891 ..... 93867

```

>[NC_075105.1](#) White spot syndrome virus, complete genome

```

product length = 1029
Forward primer 1 ATATGCCAGATTTCTTCCCCTACCC 25
Template 63562 ..... 63586

Reverse primer 1 CAACAGGTGCGTAAAAGAAGTCGAG 25
Template 64590 ..... 64566

```

>[AF332093.3](#) White spot syndrome virus, complete genome

```

product length = 1029
Forward primer 1 ATATGCCAGATTTCTTCCCCTACCC 25
Template 63562 ..... 63586

Reverse primer 1 CAACAGGTGCGTAAAAGAAGTCGAG 25
Template 64590 ..... 64566

```

>[MG264599.1](#) White spot syndrome virus consensus sequence isolate WSSV-chimera, complete genome

```

product length = 1356
Forward primer 1 ATATGCCAGATTTCTTCCCCTACCC 25
Template 126276 ..... 126300

Reverse primer 1 CAACAGGTGCGTAAAAGAAGTCGAG 25
Template 127631 ..... 127607

```