



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS PESQUEIROS E
AQUICULTURA

**EFEITO DA TEMPERATURA NA INFECÇÃO EXPERIMENTAL COM O VIRUS
DA MIONECROSE INFECCIOSA EM *Penaeus vannamei* (BOONE, 1931) MANTIDO
EM CULTIVO HETEROTRÓFICO**

Álvaro Cirino da Silva Júnior

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Aquicultura da Universidade Federal Rural de Pernambuco como exigência para obtenção de título de Mestre.

Prof.^a Dr.^a SUZIANNY MARIA BEZERRA CABRAL DA SILVA

Orientadora

Prof. Dr. LUIS OTAVIO BRITO DA SILVA

Coorientador

Recife,
Agosto/2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- S586e da Silva Júnior, Álvaro Cirino
EFEITO DA TEMPERATURA NA INFECÇÃO EXPERIMENTAL COM O VIRUS DA MIONECROSE
INFECCIOSA EM *Penaeus vannamei* (BOONE, 1931) MANTIDO EM CULTIVO HETEROTRÓFICO / Álvaro Cirino da
Silva Júnior. - 2022.
35 f.
- Orientadora: Suzianny Maria Bezerra Cabral da Silva.
Coorientador: Luis Otavio Brito da Silva.
Inclui referências e apêndice(s).
- Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Recursos
Pesqueiros e Aquicultura, Recife, 2022.
1. IMNV. 2. Camarão branco do Pacífico. 3. Temperatura da água. 4. BFT. 5. RT-PCR. I. Silva, Suzianny Maria
Bezerra Cabral da, orient. II. Silva, Luis Otavio Brito da, coorient. III. Título

CDD 639.3

SILVA JÚNIOR, Á C. Efeito da temperatura na infecção experimental com o vírus...

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS PESQUEIROS E
AQUICULTURA

EFEITO DA TEMPERATURA NA INFECÇÃO EXPERIMENTAL COM O VIRUS DA
MIONECROSE INFECCIOSA EM *Penaeus vannamei* (BOONE, 1931) MANTIDO EM
CULTIVO HETEROTRÓFICO

Álvaro Cirino da Silva Júnior

Dissertação julgada adequada para obtenção do
título de mestre em Recursos Pesqueiros e
Aquicultura. Defendida e aprovada em
31/08/2022 pela seguinte Banca Examinadora.

Prof.^a Dr.^a SUZIANNY MARIA BEZERRA CABRAL DA SILVA (Orientadora)

Departamento de Pesca e Aquicultura/Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof.^a Dr.^a GELCIRENE DE ALBUQUERQUE COSTA (Membro externo)

Departamento de Pesca e Aquicultura/Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof.^a Dr.^a JULIANA FERREIRA DOS SANTOS (Membro interno)

Departamento de Pesca e Aquicultura/Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dedicatória

Dedico este trabalho a todos estudantes de graduação e pós-graduação que fazem a ciência brasileira acontecer.

Agradecimentos

Primeiramente, gostaria de agradecer a minha família, que me estimulou a seguir com meus estudos e ao longo do mestrado me deu todo suporte que precisava. Mais especificamente a minha mãe, Jaqueline Maria, que me deu todo apoio que precisava. Ao meu pai, Álvaro Cirino, que me despertou na infância o interesse sobre o conhecimento científico. Ao meu irmão, Otávio Cirino, pelas noites que precisei ficar acordado escrevendo e atrapalhando o sono dele e pela ajuda na última coleta do meu experimento. A minha namorada Thayelen Karine, pela parceria, paciência pelos momentos que tivemos que ficar distantes durante o período experimental, cumplicidade, todo suporte que me foi dado durante toda essa trajetória e pela ajuda no momento da inoculação dos animais.

À equipe do Laboratório de Sanidade de Animais Aquáticos (LASAq). Especificamente Igor Felix, que contribuiu no manejo, dividindo escalas de domingo a domingo e com a realização das coletas. À Giselly Costa, pela ajuda com as coletas e por compartilhar as suas experiências práticas com a execução de experimentos no LASAq. A Gabriel Sobral, por todo suporte durante todas as coletas. À Paloma e Islaine pelo suporte durante a realização das análises.

A minha orientadora, professora Dra. Suzianny Cabral, pela orientação, confiança e liberdade em mim confiada durante a execução deste experimento e todas as análises.

Ao meu coorientador, professor Dr. Luis Otavio Brito da Silva, por ceder alguns insumos para realização do projeto, por compartilhar os seus conhecimentos com o manejo do biofoco e carcinicultura, pela atenção e disponibilidade.

À Marcele, Renata e a professora Dra. Raquel Coimbra por cederem o uso de equipamentos e insumos para realização dos experimentos e análises. Ao professor Dr. Fernando Leandro, Alluanan Adelson e Sandra Torres, pelo auxílio com as análises histológicas.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa cedida e a Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

À toda equipe do Departamento de Pesca e Aquicultura da UFRPE.

A todos os demais que contribuíram de forma direta ou indireta com a minha formação, na graduação e no mestrado.

Resumo

Com prejuízos econômicos no Brasil e Indonésia, entre 2002 e 2011, superiores a US\$ 1 bilhão de dólares, a Doença da Mionecrose Infecciosa (IMN) constitui-se como uma doença de notificação obrigatória à OIE (Organização Mundial de Saúde) responsável por perdas constantes na produção do camarão marinho *Penaeus vannamei*. Embora fatores ambientais como elevada amplitude térmica, alta concentração de compostos nitrogenados e mudança abrupta de salinidade possam alterar a taxa de infecção desta enfermidade, ainda não há estudos que avaliem o papel de diferentes temperaturas na infectividade do IMNV em *P. vannamei* cultivado em sistema heterotrófico. O presente trabalho teve por objetivo avaliar a influência da temperatura na infectividade do IMNV em *P. vannamei* cultivados em sistema heterotrófico. O experimento teve duração de 42 dias divididos em duas etapas: (i) submissão dos animais às diferentes temperaturas (26, 29, 32 e 35°C) por 21 dias e; (ii) desafio viral com IMNV via injeção intramuscular (100µL) (21 dias); com avaliação dos animais por nested-PCR, histopatologia e contagem total e diferencial de hemócitos. Os resultados obtidos indicaram que animais submetidos às maiores temperaturas avaliadas (32°C e 35°C) apresentaram as maiores taxas de sobrevivência pós-desafio viral (85,42% e 93,75%, respectivamente), com menor presença de lesões sugestivas de IMN, embora estes animais ainda estivessem positivos por nested-PCR. Não foram observadas diferenças significativas na contagem total de hemócitos entre os tratamentos pré e pós-desafio ($P>0,05$). Conclui-se que o uso de temperatura de 35°C reduziu a mortalidade dos animais e carga viral, porém alterou a absorção alimentar dos animais nesta temperatura, gerando redução no desempenho zootécnico.

Palavras-chave: IMNV, camarão branco do Pacífico, temperatura da água, BFT, RT-PCR.

Abstract

Causing economic losses in Brazil and Indonesia between 2002 and 2011 of over US\$ 1 billion, infectious myonecrosis (IMN) constitutes a disease of mandatory notification to WHO (World Health Organization) and is responsible for constant damages in the production of the marine shrimp *Penaeus vannamei*. Although environmental factors such as high thermal amplitude, high concentration of nitrogen compounds and abrupt changes in salinity can alter the infection rate of this disease, there are still no studies. Thus, the present work aimed to evaluate the influence of temperature on the infectivity of IMNV in *P. vannamei* culture in a heterotrophic system. The experiment lasted 42 days, divided into two stages: (i) subjecting the shrimps to different temperatures (26°C, 29°C, 32°C, and 35°C) for 21 days; and (ii) viral challenge with IMNV via intramuscular injection (100 µL) also for 21 days, with evaluation of the shrimps by nested-PCR, histopathology and total and differential hemocyte count. The results obtained indicated that shrimps submitted to the highest temperatures evaluated (32°C and 35°C) had the highest post-viral challenge survival rates (85.42% and 93.75%, respectively), with less presence of lesions suggestive of IMN, although these shrimps were still positive by nested-PCR. No significant differences were observed in total hemocyte counts between pre- and post-challenge treatments ($P > 0.05$). In conclusion, the use of a temperature of 35°C reduced mortality and viral load but altered the feed absorption, generating a reduction in zootechnical performance.

Key words: *IMNV, Pacific white shrimp, water temperature, Symbiotic, RT-PCR*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Variáveis de qualidade de água (valores médios e desvio padrão) avaliadas durante o período experimental.	20
Tabela 2 - Variáveis de desempenho zootécnico de <i>P. vannamei</i> (valores médios e desvio padrão) nos diferentes tratamentos, para cada etapa do experimento.	21
Tabela 3 - PCRs e taxa de sobrevivência submetidos ao teste Qui-quadrado de Pearson para os diferentes tratamentos.....	23
Tabela 4 - Contagem total e diferencial de hemócitos obtidos nos diferentes tratamentos, pré e pós-desafio experimental.....	24
Tabela 5 - Lesões histopatológicas encontradas nos animais pertencentes aos diferentes tratamentos após desafio viral (Resultado da análise histológica, valores expressos em média e desvio padrão).	25

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
1.1	CONTEXTUALIZAÇÃO DA PESQUISA	9
1.2	OBJETIVOS.....	11
1.2.1	Objetivo geral	11
1.2.2	Objetivos específicos.....	11
1.3	HIPÓTESES.....	11
2	ARTIGO.....	12
2.1	INTRODUÇÃO.....	13
2.2	METODOLOGIA	15
2.2.1	Material infeccioso	15
2.2.2	Preparação do sistema de cultivo.....	15
2.2.3	Aquisição de animais e condições experimentais.....	16
2.2.4	Desafio viral	17
2.2.5	Extração do RNA, RT-PCR e nested-PCR	17
2.2.6	Histopatologia	18
2.2.7	Variáveis hematológicas.....	18
2.2.8	Análise estatística	19
2.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
2.4	CONCLUSÕES.....	25
2.5	REFERÊNCIAS	25
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	31
4	REFERÊNCIAS	32

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONTEXTUALIZAÇÃO DA PESQUISA

A produção da carcinicultura mundial apresentou crescimento histórico devido a rápida disseminação do cultivo de peneídeos, partindo de aproximadamente 200.000 toneladas no ano de 1998 (FISHSTAT, 2016) para 5.696.000 toneladas em 2018 (FAO, 2020). Com o desenvolvimento deste setor e o surgimento de novas tecnologias de cultivo, os produtores passaram a migrar para sistemas de maiores densidades populacionais, devido a necessidade de otimização da produção (STENTIFORD et al., 2012). Porém, com a intensificação da quantidade de camarões por unidade de área ou volume, os patógenos tornaram-se mais constantes, apresentando-se hoje, como a maior barreira na eficiência destes sistemas, com cerca de 60% das doenças associadas a agentes virais (FLEGEL, 2011; STENTIFORD, 2012).

Atualmente, nove enfermidades que acometem crustáceos cultivados são classificadas como doenças de notificação obrigatória em todo o mundo segundo a Organização Mundial da Saúde Animal (OIE) e, dentre estas, as viroses são a parcela mais significativa, com seis das nove doenças, a saber: Necrose Infecciosa Hipodermal e Hematopoiética (IHHN), Mionecrose Infecciosa (IMN), Síndrome de Taura (TS), Síndrome da Mancha Branca (WSD), Doença da Cabeça Amarela (YHD1) e a Doença da Cauda Branca (WTD) (OIE, 2019). Dentre estas, as doenças causadas pelos Vírus da Mionecrose Infecciosa (IMNV) e da Síndrome da Mancha Branca (WSSV) são responsáveis pelas grandes perdas econômicas para a indústria do camarão cultivado (LIGHTNER, 2011).

No que diz respeito ao IMN, esta é uma doença que tem sua origem no Nordeste brasileiro, com o *Penaeus vannamei* sendo a espécie mais acometida por esta enfermidade (CNA, 2018). Seu agente é o Vírus da Mionecrose Infecciosa (IMNV) que possui um RNA de fita dupla (dsRNA), não envelopado e uma molécula com 8226-8230 pb, variando em diferentes cepas, sendo o músculo esquelético, o principal tecido afetado pelo IMNV (NAIM et al., 2015; DANTAS, 2019), resultando em opacidade muscular e áreas vermelhas necróticas dos segmentos abdominais e leque caudal (POULOS e LIGHTNER, 2006).

Em termos de mortalidade, a infecção por IMNV pode culminar em taxas de mortalidade de até 70%, com mais de 40% desta mortalidade ocorrendo no final do ciclo produtivo, existindo assim, além das perdas por morte dos animais, uma significativa redução do valor de mercado dos sobreviventes devido ao músculo da cauda visivelmente necrótico (TANG et al., 2019). Para se ter uma estimativa destas perdas produtivas, Lightner et al. (2011) relatam que os prejuízos econômicos durante os surtos de IMNV no Brasil, entre 2002 e 2005, foram

próximos a US\$ 440 milhões de dólares, sendo calculados os valores acumulados do Brasil e Indonésia, entre 2002 e 2011, como superiores a US\$ 1 bilhão de dólares.

Dentre as formas de transmissão do IMNV, encontram-se relatadas a transmissão horizontal e vertical deste patógeno. Para a transmissão horizontal, há demonstração via canibalismo, principal rota de propagação horizontal deste agente (LIGHTNER, 2011) e, via vetor, como é o caso da *Artemia franciscana* (SILVA et al., 2015a), enquanto que a rota de transmissão vertical foi confirmada em reprodutores de *P. vannamei* a partir da detecção positiva de IMNV em ovários de fêmeas naturalmente e experimentalmente infectadas, em espermatóforos de machos naturalmente e experimentalmente infectados e ovos (fertilizados ou não), com maior probabilidade de transmissão vertical deste vírus atrelada ao parental materno (SILVA et al., 2016).

No que concerne à elevação de incidência do IMNV, diversos são os fatores estressantes apontados como gatilhos ao aumento das taxas de infecção por este vírus no cultivo de *P. vannamei*: elevada amplitude térmica, alta concentração de compostos nitrogenados, manejo incorreto dos animais (PRASAD et al., 2017) e redução de salinidade (VIEIRA-GIRÃO et al., 2015). No caso da salinidade, foi demonstrado em estudo de infecção experimental que a redução da salinidade de 35 ppt (condição normal) para 5 ppt (condição de estresse) afeta o tempo de geração de IMNV, passando de 57,4 para 25,2 minutos, ocasionado maior proliferação viral (VIEIRA-GIRÃO et al., 2015), não existindo até o presente momento estudos relacionados aos demais fatores.

Entre as estratégias de produção adotadas após os surtos de patógenos nos cultivos, destacam-se: sistemas com menor taxa de renovação de água, evitando a entrada destes agentes e aumentando a biosegurança (BURFORD et al., 2003; PIÉRRRI et al., 2015); o uso de estufas, no qual o aumento e controle da temperatura do sistema, reduz a amplitude térmica diária e garante a homeostase dos animais e; a adoção de fases no cultivo, como os berçários, que promovem maior controle na produção de pós-larvas (EMERENCIANO et al., 2012; WASIELESKY et al., 2013).

Com relação aos sistemas com menor taxa de renovação de água, um que tem se destacado é o sistema heterotrófico, também conhecido popularmente como bioflocos (BFT), devido a formação de agregados de matéria inerte e outros microrganismos decorrentes da adição controlada de carbono orgânico. As bactérias heterotróficas presentes em grande quantidade neste sistema, possuem a capacidade de transformar amônia em biomassa bacteriana, que serve de suplementação alimentar para os animais, reduzindo custos com

alimentação, enquanto as autotróficas, atuam na oxidação amoniacal, transformando a amônia em compostos menos tóxicos para os animais (nitritos e nitratos), reduzindo a necessidade de renovação de água (MCINTOSH et al., 2000; BURFORD et al., 2003; PIÉRRRI et al., 2015).

Para o IMNV, este sistema tem resultado em um aumento da imunidade e sobrevivência de *P. vannamei* dos grupos mantidos em bioflocos quando comparados ao tratamento controle após desafio viral, independentemente da fonte de carbono orgânico usada para produzir os flocos, quando estes animais foram mantidos em temperaturas entre 27 e 28°C (EKASARI et al., 2014), não sendo conhecido o efeito das diferentes temperaturas sobre a infectividade do IMNV em *P. vannamei* cultivados em BFT. Deste modo, o presente trabalho avaliou a influência da temperatura no desempenho zootécnico e sobrevivência de animais infectados experimentalmente com a IMNV em sistema de cultivo heterotrófico.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

- Avaliar a influência da temperatura na infectividade do IMNV em *P. vannamei*.

1.2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o desempenho zootécnico (sobrevivência; ganho em peso; taxa de crescimento específico e conversão alimentar aparente) dos camarões cultivados em sistema de bioflocos sob diferentes temperaturas e desafiados com IMNV;
- Determinar a taxa de infecção dos animais desafiados submetidos as diferentes temperaturas;
- Determinar os parâmetros hemato-imunológicos dos camarões desafiados submetidos as diferentes temperaturas;
- Avaliar a presença de lesões teciduais sugestivas de infecção por IMNV nos camarões desafiados submetidos as diferentes temperaturas por meio de histologia.

1.3 HIPÓTESES

- A elevação da temperatura afetará a taxa de infecção do IMNV em *P. vannamei* cultivado em bioflocos;
- A elevação da temperatura afetará a taxa de sobrevivência de *P. vannamei* desafiado por IMNV cultivado em bioflocos.

2 ARTIGO

Com os resultados obtidos, foi elaborado um artigo científico intitulado de “**Avaliação do efeito da temperatura em *Penaeus vannamei* cultivados em sistema heterotrófico e infectados experimentalmente com o Vírus da Mionecrose Infecciosa**”, devendo ser submetido para a revista Aquaculture.

Avaliação do efeito da temperatura em *Penaeus vannamei* cultivados em sistema heterotrófico e infectados experimentalmente com o Vírus da Mionecrose Infecciosa

2.1 INTRODUÇÃO

A produção de pescado atingiu no ano de 2020, 178 milhões de toneladas, de acordo com a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura - FAO (2022). Desse montante, a aquicultura foi responsável por uma produção estimada de 88 milhões de toneladas, o que a torna responsável por 49% da produção de proteína de origem aquática (FAO, 2022).

Dentre as modalidades de cultivo da aquicultura, a carcinicultura produz uma *comodity* que atingiu no ano de 2020, uma produção total de 11,2 milhões de toneladas a nível mundial, com 51,7% deste total sendo representado pela espécie de camarão marinho *Penaeus vannamei* (FAO, 2022). Este valor é dado principalmente pelo aumento da densidade dos animais nos cultivos que otimiza a produção por área (EKASARI *et al.*, 2021) e, embora essa prática possibilite maior produtividade, também aumenta as chances da proliferação de doenças infecciosas, estimando-se perdas por enfermidades de cerca de 40% do potencial produtivo da carcinicultura mundial (FLEGEL, 2011; STENTIFORD, 2012). Deste valor, as doenças de origem viral são as que mais acometem a carcinicultura, correspondendo a 60% do total de doenças (OIE, 2022).

Devido às limitações imunológicas dos camarões, decorrentes da dependência exclusiva do sistema imune inato (AMATUL-SAMAHAH *et al.*, 2020), atrelado a falta de boas práticas de manejo e a expansão da carcinicultura, é possível observar um grande aumento no número de doenças listadas pela OIE (Organização Mundial da Saúde Animal) nos últimos anos, tendo hoje um total de dez doenças listadas, que são: Hepatopancreatite Necrosante Aguda (AHPND), Praga do Lagostim (*Crayfish Plague*), *Infection with Decapod Iridescent Virus 1* (DIV 1), Necrose Hipodérmica Hematopoiética Infecciosa (IHHN), Mionecrose Infecciosa (IMN), Hepatopancreatite Necrosante (*Necrotising Hepatopancreatitis (Hepatobacter penaei)*), Síndrome de Taura (TS), Doença da Mancha Branca (WSD), Doença da Cauda Branca (WTD) e a Doença da Cabeça Amarela (YHD) (OIE, 2022). Desse total, seis são de origem viral, e estas são as que mais causam prejuízos a produção da carcinicultura mundial (LEE *et al.*, 2022).

Mais especificamente sobre a Mionecrose Infecciosa, esta é uma doença que tem origem no nordeste do Brasil, com seu primeiro relato em agosto de 2002. A sua rápida proliferação pela região costeira, gerou significativas perdas para o setor nos anos de 2004 e 2005 (COELHO

et al., 2009). Em 2006, ocorreu o primeiro relato de infecção desta doença na Indonésia, que segundo Seibert *et al.* (2010) foi ocasionada devido ao transporte inadequado de pós-larvas de *Penaeus vannamei* do Brasil para este país. Além dos países citados, este vírus foi identificado recentemente em cultivos na Índia (2016) e Malásia (2018), com a ocorrência de uma nova cepa na Indonésia em 2018, tendo gerado novos surtos desta doença (LEE *et al.*, 2022; MAI *et al.* 2019).

A IMN tem como agente etiológico, o Vírus da Mionecrose Infecciosa, constituído por RNA de fita dupla, com extensão de 7561–8230bp não envelopado, sendo classificado taxonomicamente como um vírus do gênero *Totivirus*, pertencente à família Totiviridae (LEE *et al.*, 2022). É um agente que tem como principal forma de transmissão, a transmissão horizontal, podendo ocorrer de forma direta, através do canibalismo, ou indireta, por veículos como o ambiente ou vetores como a *Artemia franciscana* (SILVA *et al.*, 2015a). Além do *P. vannamei*, o IMNV pode atingir mais três espécies de peneídeos, que são: *Farfantepenaeus subtilis*, *P. monodon* e *P. stylirostris*, mostrando em todas estas, apenas mortalidade nas fases juvenil e adulta, onde desenvolvem as características clássicas da infecção, com necrose muscular no músculo abdominal (PRASAD *et al.*, 2017; MAI *et al.*, 2019).

Com os problemas correlacionados ao controle de doenças nos cultivos convencionais, principalmente por causa de patógenos, foram desenvolvidos sistemas de cultivos heterotróficos, comumente conhecidos como bioflocos (BURFORD *et al.*, 2003). Esse sistema tem por característica a mínima renovação da água, que ocorre devido a adição do carbono orgânico para manter uma relação C/N que estimula a conversão dos nitrogenados em biomassa bacteriana pelas bactérias heterotróficas, reduzindo a concentração desses compostos e, assim, possibilitando o aumento da estocagem dos animais e aprimorando a produtividade (CHEN *et al.*, 2020; LUO *et al.*, 2020; EKASARI *et al.*, 2021).

O sistema de cultivo em bioflocos possibilita grandes benefícios as produções, como maiores taxas de sobrevivência, se comparado com animais cultivados em águas claras (EKASARI *et al.*, 2014). A exemplo da WSSV, conforme trabalho realizado por Rahman *et al.* (2006), foi possível constatar que elevadas temperaturas atreladas a este tipo de cultivo contribuem positivamente com a sobrevivência dos animais infectados experimentalmente com esse vírus.

Para o IMNV, este sistema tem resultado em um aumento da imunidade e sobrevivência de *P. vannamei* dos grupos mantidos em bioflocos quando comparados ao tratamento controle após desafio viral, devido à ação de imunoestimulante dos flocos, independentemente do tipo

de fonte de carbono orgânica usada para sua produção, quando estes animais foram mantidos em temperaturas entre 27 e 28°C (EKASARI et al., 2014), não sendo conhecido o efeito das diferentes temperaturas sobre a infectividade do IMNV em *P. vannamei* cultivados em BFT. Deste modo, o presente trabalho avaliou a influência da temperatura no desempenho zootécnico, taxa de infecção, imunoparâmetros e lesões histopatológicas de *P. vannamei* cultivados em bioflocos e experimentalmente desafiados com IMNV.

2.2 METODOLOGIA

2.2.1 Material infeccioso

O material infeccioso (inóculo viral diluído a 10^{-7}) usado no desafio foi preparado conforme Silva et al. (2015b), a partir do tecido muscular abdominal de *P. vannamei*, coletado durante surto de Mionecrose Infecciosa em fazendas comerciais de *P. vannamei* no Brasil. Todo material foi previamente triado por RT-PCR para confirmar a presença do Vírus da Mionecrose Infecciosa (IMNV) (PINHEIRO et al., 2007) e posteriormente quantificado via PCR em tempo real (SILVA et al., 2011; $1,1 \times 10^3$ cópias de IMNV/ μ g de RNA), sendo armazenado a -80°C até sua utilização no desafio viral.

2.2.2 Preparação do sistema de cultivo

A maturação do sistema ocorreu por um período de 40 dias antes da estocagem dos camarões nas unidades experimentais, as quais foram abastecidas com água salgada (30 g L^{-1}), previamente filtrada ($30 \mu\text{m}$), clorada (10 ppm de cloro ativo) e declorada através da utilização de aeração constante. Durante o experimento, não ocorreu troca de água, exceto a adição de água doce previamente tratada (10 ppm de cloro ativo) para compensar as perdas por evaporação. Em seguida, foi feita a fertilização orgânica a partir do uso de farelo de arroz (24 horas em anaerobiose seguidas de 24 horas em aerobiose), com o uso de probiótico comercial na concentração de $7,4 \times 10^9$ UFC/g composto por *Bacillus sp.*, *Pseudomonas putida*, *P. denitrificans*, *Nitrosomonas sp.* e *Nitrobacter sp.* (SANTOS et al., 2021). Para manter a alcalinidade acima de 120 mg L^{-1} e pH próximo a 7,8 foi utilizado bicarbonato de sódio (NaHCO_3). Após a maturação da água, foi feito o povoamento com pós-larvas adquiridas de laboratórios comerciais, negativas para IMNV por PCR, que foram mantidas no sistema até atingirem 2g, peso médio inicial usado no experimento.

2.2.3 Aquisição de animais e condições experimentais

As pós-larvas de *P. vannamei* com dez dias (PL₁₀) negativadas por diagnóstico confirmatório, foram adquiridas de larvicultura comercial (Empresa, estado, país) e estocadas em unidades experimentais na densidade inicial de 1000 animais/m³ até alcançarem 2 g de peso médio (peso médio mínimo usado para marcação com elastômero em unidades produtivas). Ao atingirem este peso médio, os animais foram redistribuídos em unidades de 40L a densidade de 500 camarões/m³ (densidade utilizada em fazendas intensivas comerciais).

O experimento foi composto por 4 tratamentos com três repetições cada, sendo: (1) 26°C - T26; (2) 29°C – T29 [temperatura de referência usada em desafios com IMNV, segundo Silva *et al.* (2015b)]; (3) 32°C – T32 e; (4) 35°C – T35; com duração de 21 dias. Cada unidade foi telada para conter os aerossóis, sendo mantidas sob aeração constante e intensa, com fotoperíodo natural. A fim de reduzir a perda por evaporação e aumentar o equilíbrio térmico, além de diminuir o tempo de atuação dos aquecedores, as laterais das unidades experimentais dos tratamentos com temperaturas de 32°C e 35°C foram isoladas com isopor e todas as unidades cobertas com lonas plásticas transparentes.

Para realizar o controle térmico nas temperaturas dos tratamentos e desafio viral, foram desenvolvidos controladores térmicos baseados na plataforma *Arduino*. Os componentes utilizados para montagem foram: três unidades *Arduino nano* (microcontrolador *Atemega 328p*); doze unidades do sensor de temperatura *Dallas Semiconductor DS18B20*; três módulos com quatro relés cada para o acionamento automático dos termostatos e; doze termostatos. Cada controlador possuía a capacidade de ajustar a temperatura de quatro unidades experimentais de forma individual, através da leitura dos sensores, que possibilitava o acionamento dos termostatos até atingirem as temperaturas configuradas de cada unidade. O código fonte criado e esquemático está disponível no link (https://github.com/Alvarojr255/temperature_cont.git).

Durante todo o experimento e desafio viral, os camarões foram alimentados com ração comercial (35% proteína bruta, 8% extrato etéreo, 13% umidade, 4% fibra bruta, 12% material mineral, 3% cálcio, e 1,3% de fósforo, tipo, marca, país) à 5% da biomassa, tendo a quantidade ajustada, de acordo estimativa de consumo e mortalidade segundo metodologia de Van-Wyk *et al* (1999). A frequência de fornecimento foi de quatro vezes ao dia (8, 11, 15 e 17 horas) e, a fonte de carbono orgânico (melaço de cana de açúcar e farelo de arroz fermentado), foi adicionada a fim de manter a relação C:N de 6:1.

Oxigênio dissolvido, temperatura, pH e a salinidade de cada unidade experimental foram aferidos duas vezes ao dia (8 e 14 horas), com a utilização do multiparâmetro (Hanna

Instruments - HI98194, EUA). Os sólidos sedimentáveis foram mensurados semanalmente através do cone Imhoff, onde amostras de um litro de água de cada unidade experimental foram transferidas para os cones e após 20 minutos em repouso, o volume correspondente a estes sólidos sedimentados foi medido (AVNIMELECH, 2014). As análises de amônia e nitrito foram realizadas semanalmente a partir de testes colorimétricos comerciais (Alcon Labcon, Camboriú, Santa Catarina, Brazil), e alcalinidade a partir do uso da titulação (BRIDGEWATER, 2012).

Semanalmente, biometrias foram realizadas para observação do desempenho zootécnico dos camarões e ajuste da ração fornecida, no qual foi possível determinar o peso médio final; sobrevivência; fator de conversão alimentar (FCA); taxa de crescimento específico (TCE) e produtividade.

2.2.4 Desafio viral

Após os animais serem mantidos nos diferentes tratamentos (temperaturas de 26°C, 29°C, 32°C e 35°C, respectivamente) por um período de 21 dias, foi iniciado o desafio viral. Nesta fase, os animais foram inoculados através de injeção intramuscular de 100µL do inóculo de IMNV diluído a 10^{-7} , conforme metodologia adotado por Silva *et al.* (2015b).

As condições experimentais foram as mesmas descritas na primeira fase, e durante todo o desafio viral (21 dias), todos os indivíduos mortos e sobreviventes ao final do experimento foram coletados e estocados a -80°C para análise de nested-PCR, visando a confirmação da infecção por IMNV. Os animais sobreviventes oriundos de todos os tratamentos foram submetidos a contagens total e diferencial de hemócitos (CTH e CDH), enquanto três animais de cada unidade (preferencialmente os moribundos) foram fixados para análise histopatológica.

2.2.5 Extração do RNA, RT-PCR e nested-PCR

Para a extração do RNA total dos camarões desafiados (*pool* de 2 animais para todos os tratamentos), foi utilizado 50 mg de tecido do músculo abdominal, seguindo o protocolo do kit *ReliaPrep™ Viral TNA Miniprep System* (Promega, Madison, WI, USA), conforme as instruções do fabricante. O RNA extraído foi avaliado por espectrofotometria e armazenado a -80°C, para posterior construção do cDNA. O cDNA foi obtido através do kit *Improm-II™ Reverse Transcription System* (Promega, Madison, WI, USA), conforme as instruções do fabricante. O cDNA produzido foi armazenado a -20°C, até sua utilização na nested-PCR.

A nested-PCR foi conduzida para a confirmação da infecção por IMNV segundo protocolo estabelecido por Poulos e Lightner (2006), diagnóstico confirmatório de IMNV

recomendado pela OIE (2019). As condições da PCR e ciclo térmico foram os mesmos descritos por Poulos e Lightner (2006). Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio e o tamanho dos fragmentos foram estimados a partir do uso de marcadores de peso molecular de 50pb e 100pb (*Invitrogen, EUA*). Em todas as reações de PCR foram inseridos controles positivos (amostra positiva para IMNV) e negativos (água ultrapura).

2.2.6 Histopatologia

Para realização da análise histológica, foram coletados quatro animais por tratamento (um animal de cada unidade experimental) durante a primeira fase (21 dias) e, três animais por tratamento (animais moribundos), ao final do desafio viral (segunda fase).

Todas as amostras foram fixadas em solução Davidson AFA por 48 horas, e em seguida, transferidas para uma solução de etanol a 70%, onde foram mantidas até serem processadas. A metodologia usada para a histologia foi a mesma descrita por Bell e Lightner (1988). Em todas as lâminas foram avaliadas a presença de lesões sugestivas do IMNV através do microscópio óptico *Olympus* (mod. BX41). Quando constatada a presença de infiltrados hemocíticos, as amostras foram submetidas a análises quantitativas através da contagem de hemócitos por infiltrado, a partir do uso de microscópio óptico com ampliação 40x. Para realizar a medição da área das lesões, foi utilizado régua graduada acoplada a ocular do microscópio.

2.2.7 Variáveis hematológicas

Similarmente à análise histológica, na primeira fase (21 dias) foram coletados quatro animais por tratamento (um animal de cada unidade experimental) e, na segunda fase (final do desafio viral), três animais por tratamento (animais moribundos), para determinação da contagem total e diferencial de hemócitos (células imunocompetentes).

A coleta da hemolinfa e a contagem total de hemócitos (CTH) foi realizada através do protocolo descrito por Guertler *et al.* (2013). Cem microlitros de hemolinfa coletada foi diluída em solução anticoagulante de Alsever modificada (MAS) (336 mmol L⁻¹NaCl, 115 mmol L⁻¹ glicose, 27 mmol L⁻¹ citrato de sódio, 9 mmol L⁻¹ EDTA, pH 7,2) com formaldeído a 4%, na proporção de 1:2 (v:v). O número das células foi estimado em câmara de Neubauer, em duplicata e, a contagem diferencial de hemócitos (CDH), foi realizada em microscopia de contraste de fase em triplicata, segundo o protocolo adaptado de Celi *et al.* (2013).

2.2.8 Análise estatística

Os dados adquiridos foram previamente analisados quanto à homogeneidade das variâncias e normalidade pelos testes de Bartlett e Shapiro-Wilk, respectivamente, com significância de 5% ($P \leq 0,05$). Como mostraram-se não paramétricos, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido do *post hoc* de Dunn, quando observada diferença significativa ($P \leq 0,05$). Os dados dos animais infectados e de sobrevivência ao final do período (pré-inoculação e pós-inoculação), foram agrupados em tabelas de contingência e submetidos ao teste qui-quadrado de Pearson ($P \leq 0,05$), com correção proposta por MacDonald e Gardner (2000). Foram feitas análises dos resíduos para verificar diferenças significativas, com o teste exato de Fisher aplicado para os dados que apresentaram frequência esperada inferior a 5. Todas as análises foram feitas através do *software* R versão 4.2.0.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos das variáveis de qualidade de água durante todo o período experimental, encontram-se resumidos na Tabela 1. Foram registradas diferenças significativas para as variáveis de oxigênio dissolvido, salinidade e nitrito ($P \leq 0,05$), não existindo diferença significativa para os valores médios de pH, amônia total, alcalinidade e sólidos sedimentáveis (Tabela 1).

Segundo Boyd (2020), as concentrações de oxigênio dissolvido e outros gases atmosféricos dissolvidos em água variam com as pressões parciais e solubilidades dos gases, com a temperatura e salinidade da água, havendo diminuição das concentrações de oxigênio dissolvido e outros gases diante da elevação da salinidade e temperatura. Este fenômeno ocorre porque o movimento das moléculas de água e gás aumenta em função da temperatura e, à medida que a temperatura aumenta, as moléculas que se movem mais rapidamente colidem com mais frequência para impedir a entrada de moléculas de gás na água (BOYD, 2020). Assim, no presente estudo, no tratamento de maior temperatura (T35), foi registrada a menor concentração de oxigênio dissolvido (Tabela 1).

A salinidade diferiu nos tratamentos de menores temperaturas (T26 e T29) quando comparado com os de maiores (T32 e T35). De acordo com AL-Shammiri (2022), maiores taxas de evaporação são determinadas quando há aumento da temperatura, velocidade do ar e redução da salinidade da água, indicando no presente trabalho que as maiores salinidades encontradas nos tratamentos de temperaturas mais elevadas estariam associadas à taxa de evaporação.

Para o nitrito, embora tenha sido determinada diferença significativa no tratamento T29 em relação aos demais, este valor médio ficou dentro da faixa recomendada para a criação de camarões marinhos em sistema intensivo (SAMOCHA, 2019). As demais variáveis (pH, amônia total, alcalinidade e sólidos sedimentáveis), também estiveram dentro dos parâmetros recomendados para o cultivo de *P. vannamei* (ZHANG *et al.*, 2006; ESPARZA-LEAL *et al.*, 2016).

Tabela 1 - Variáveis de qualidade de água (valores médios e desvio padrão) avaliadas durante o período experimental.

Variáveis	T26°C	T29°C	T32°C	T35°C
Oxigênio dissolvido (mg/L)	5,72 ± 0,39 ^a	5,25 ± 0,39 ^b	4,94 ± 0,38 ^c	4,55 ± 0,34 ^d
pH	7,85 ± 0,36 ^a	7,87 ± 0,17 ^a	7,90 ± 0,14 ^a	7,88 ± 0,36 ^a
Temperatura (°C)	26,25 ± 0,12 ^a	29,16 ± 0,12 ^b	32,11 ± 0,13 ^c	34,95 ± 0,09 ^d
Salinidade (PSU)	29,19 ± 0,49 ^a	29,27 ± 1,22 ^a	29,62 ± 0,86 ^b	29,64 ± 1,30 ^b
Amônia total (mg/L)	0,55 ± 0,38 ^a	0,57 ± 0,37 ^a	0,58 ± 0,36 ^a	0,58 ± 0,36 ^a
Nitrito (mg/L)	1,40 ± 0,42 ^a	1,86 ± 0,42 ^b	1,71 ± 0,46 ^{ab}	1,41 ± 0,49 ^a
Alcalinidade (mg/L)	169,4±36,09 ^a	167,8±37,58 ^a	166,7±41,51 ^a	153,6±34,10 ^a
Sólidos sedimentáveis (mL/L)	4,46 ± 1,52 ^a	3,56 ± 1,88 ^a	4,12 ± 3,30 ^a	5,43 ± 2,61 ^a

Fonte: Elaborado pelo autor. Letras diferentes significam diferença significativa para o teste de Kruskal-Wallis com significância $P \geq 0,05$, com *post hoc* de Dunn, caso observado diferença significativa ($P \geq 0,05$).

A respeito das variáveis de desempenho zootécnico (Tabela 2), não houve diferenças significativas para a taxa média de sobrevivência quando os animais foram submetidos às diferentes temperaturas durante o período de pré-desafio (21 dias) ($P < 0,05$). Por outro lado, no desafio viral, foi observada diferença significativa entre os tratamentos (X^2 9,29; $P < 0,05$) (Tabela 2). De acordo com a análise de resíduos padronizados (Tabela 3), há maior probabilidade de mortalidade dos animais infectados e submetidos ao tratamento com temperatura de 29°C (T29), enquanto os animais submetidos à temperatura de 35°C (T35), que tiveram as menores probabilidades de mortalidade.

Resultados similares aos obtidos na sobrevivência dos animais desafiados para o IMNV no presente estudo, foram identificados em experimentos com infecção experimental em *P. vannamei* pelo WSSV, sendo observado menores taxas de mortalidade quando os animais foram submetidos as maiores temperaturas (RAHMAN *et al.*, 2006; RAHMAN *et al.*, 2007b; MOSER *et al.*, 2012).

Para o IMNV, a temperatura tem desempenhado um papel crucial na ocorrência da doença, sendo descrito que o aumento da temperatura pode levar à alimentação excessiva e,

portanto, à produção de amônia acima do nível normal, sendo este um fator estressor para o camarão em condições de cultivo, que culminaria em mortalidade elevada (PRASAD *et al.*, 2017). No presente estudo e, sob condições controladas de cultivo, incluindo a concentração de amônia total, maiores temperaturas, levaram a menores taxas de mortalidade e de infecção, indicando que este composto nitrogenado e, não a temperatura, teria um efeito negativo no animal infectado com IMNV.

Silva *et al.* (2015b), relatam que juvenis de *P. vannamei* (2g) mantidos a 28°C e desafiados para IMNV com diluições entre 10^{-1} e 10^{-7} apresentaram níveis médios de infecção mais elevados do que aqueles encontrados para diluições entre 10^{-5} e 10^{-7} para camarões mantidos a 26°C, sendo observadas taxas de infecção e cargas virais médias semelhantes para ambas as temperaturas para as diluições de 10^{-8} e 10^{-9} , resultados similares aos encontrados neste estudo.

Quanto aos valores médios de ganho de biomassa diário, resultados inferiores foram encontrados no tratamento T35 ($P \leq 0,05$), indicando influência da elevada temperatura no crescimento dos animais. Já os resultados de desempenho zootécnico observados no desafio viral, demonstraram que apenas as variáveis produtividade, biomassa média final e peso médio final diferiram significativamente ($P \leq 0,05$), com menores valores no tratamento T35. Todos os resultados de desempenho zootécnico para ambas as fases estão elencados na Tabela 2.

Segundo Wyban *et al.* (1995), os efeitos térmicos no crescimento de *P. vannamei* são tamanho-específico. Nos camarões pequenos e médios (<10g), o crescimento está diretamente relacionado à temperatura, sendo que os animais crescem mais rápido em temperaturas mais altas da água (até 30°C). Já em camarões maiores (>15g), o crescimento a 30°C não se mostrou diferente do crescimento a 27°C. As demais variáveis (produtividade, biomassa média e peso médio final) não mostraram diferenças significativas entre os tratamentos durante este período ($P < 0,05$). Resultados diferentes aos encontrados no experimento foram observados por Ponce-Palafox *et al.* (1997). Avaliando o cultivo de *P. vannamei*, em diferentes faixas térmicas, temperaturas de 30 e 35°C não mostraram diferenças significativas em salinidade próxima ao avaliado no presente trabalho.

Tabela 2 - Variáveis de desempenho zootécnico de *P. vannamei* (valores médios e desvio padrão) nos diferentes tratamentos, para cada etapa do experimento.

1ª Fase (Pré-inoculação) – 21 dias				
Variáveis avaliadas	T26°C	T29°C	T32°C	T35°C

Peso médio final (g)	4,54 ± 0,06 ^a	4,87 ± 0,23 ^a	4,31 ± 0,14 ^a	3,91 ± 0,37 ^a
Sobrevivência (%)	98.33 ^a ± 2,86	98.33 ^a ± 2,86	93.33 ^a ± 5,77	95.00 ^a ± 8,66
FCA	1.10 ± 0,07 ^a	0,95 ± 0,04 ^{ab}	1,12 ± 0,06 ^{ab}	1,49 ± 0,08 ^b
TCE (%dia)	3,78 ± 0,16 ^a	4,21 ± 0,08 ^a	3,77 ± 0,40 ^a	2,94 ± 0,38 ^a
Produtividade (Kg.m ⁻³)	2,24 ± 0,92 ^a	2,39 ± 0,14 ^a	2,01 ± 0,10 ^a	1,85 ± 0,82 ^a
2 ^a Fase (Desafio viral) – 21 dias				
Variáveis avaliadas	T26°C	T29°C	T32°C	T35°C
Peso médio final (g)	8,58 ± 0,44 ^a	8,37 ± 0,76 ^a	6,98 ± 0,58 ^{ab}	5,60 ± 0,28 ^b
Sobrevivência (%)	79.17 ^a ± 15,73	70.83 ^{b*} ± 9,55	85.42 ^a ± 3,61	93.75 ^{c*} ± 6,25
FCA	1,55 ± 0,29 ^a	1,93 ± 0,30 ^a	1,90 ± 0,41 ^a	2,15 ± 0,11 ^a
TCE (%dia)	2,00 ± 0,11 ^a	1,80 ± 0,45 ^a	1,66 ± 0,30 ^a	1,41 ± 0,07 ^a
Produtividade (Kg.m ⁻³)	2,73 ± 0,66 ^a	2,35 ± 0,16 ^a	2,38 ± 0,23 ^{ab}	2,10 ± 0,08 ^b

Letras diferentes significam diferença significativa para o teste Kruskal-Wallis com significância $P \geq 0,05$, com *post hoc* de Dunn, caso observado diferença significativa ($P \leq 0,05$).

“*” indicam que os resultados obtidos diferiram estatisticamente para o teste Qui-quadrado de Pearson ($P \leq 0,05$).

Sobre a taxa de infecção, o teste Qui-quadrado mostrou que há relação entre a temperatura e a presença de animais infectados com IMNV na primeira PCR (X^2 17,87; $p < 0,001$), com maior incidência de *P. vannamei* positivos no tratamento T29 e, menor, no tratamento T35 (Tabela 3). Para a segunda PCR, não foi observado diferença significativa, com todos os resultados positivos para presença de infecção por Mionecrose Infeciosa, independente do tratamento submetido (Tabela 3).

Segundo Poulos e Lightner (2006), os primers usados, na primeira etapa do método de nested RT-PCR, tem-se um limite de detecção de 100 cópias do genoma IMNV, enquanto na segunda etapa, o limite de detecção é aumentado para 10 cópias, indicando no presente estudo que menores cargas virais foram encontradas em animais submetidos às maiores temperaturas (32°C e 35°C).

Segundo estudo realizado por Raj *et al.* (2012) e Rahman *et al.* (2007ab) em animais desafiados pelo vírus WSSV e submetidos a diferentes temperaturas, inclusive acima de 32°C mostraram maiores taxas de sobrevivência, mesmo assim, a segunda PCR mostrou positiva, mostrando que ainda os animais abrigavam o WSSV. Isso é explicado, pois a temperatura afeta de forma significativa a replicação do vírus no hospedeiro para o WSSV, sugerindo efeito similar para os resultados obtidos neste experimento com o IMNV.

Tabela 3 - PCRs e taxa de sobrevivência submetidos ao teste Qui-quadrado de Pearson para os diferentes tratamentos.

Dados analisados	Tratamentos			
	T26°C	T29°C	T32°C	T35°C
Infectados na 1ªPCR (%)	33,33	40,00*	13,33	0,00*
Infectados na 2ª PCR (%)	100	100	100	100
Sobrevivência pré-desafio (%)	98,33	98,33	93,33	95,00
Sobrevivência pós-desafio (%)	79,17	70,83*	85,42	93,75*

Fonte: Elaborado pelo autor. “*” indicam que os resultados obtidos diferiram estatisticamente para o teste Qui-quadrado de Pearson ($P \leq 0,05$).

Quanto às variáveis hematológicas, não foram observadas diferenças significativas na contagem total de hemócitos entre os tratamentos pré e pós-desafio ($P > 0,05$) (Tabela 4). Segundo Ponce-Palafox *et al.* (1997), essas temperaturas avaliadas ainda conseguem prover condições de conforto fisiológico para os animais, o que possivelmente pode favorecer maior padronização dos resultados hematológicos nessas condições. Similarmente, a contagem diferencial de hemócitos não diferiu entre os tratamentos pré-desafio viral, embora os dados pós-desafio para esta contagem tenham diferido entre os tratamentos ($P \leq 0,05$) (Tabela 4).

Costa *et al.* (2009), em estudo realizado com *P. vannamei* naturalmente infectado com IMNV, relataram que os resultados de CTH variaram consideravelmente dentro do mesmo grupo de camarões, com grande desvio padrão, independentemente se os camarões eram assintomáticos, com sinais clínicos iniciais ou avançados de infecção por IMN. Tal resultado, também foi observado no presente estudo, indicando que a temperatura não foi responsável por este comportamento da variável e que, isto independe se o animal foi naturalmente ou experimentalmente infectado com IMNV.

Ainda neste estudo, Costa *et al.* (2009), também descrevem que os hemócitos granulares (SG e G) sempre foram predominantes sobre os hemócitos hialinos (H), representando aproximadamente 70% do total de células circulantes, independentemente do grupo de camarões (animais assintomáticos, com sinais clínicos iniciais ou avançados de infecção por IMN). Da mesma forma, no presente estudo, também foi determinada predominância de hemócitos hialinos ao invés de granulares (SG e G), que de acordo com Tang *et al.* (2005), Poulos *et al.* (2006), Costa *et al.* (2009) e Silva *et al.* (2011), reflete a presença de elevada infiltração de hemócitos nas fibras musculares encontradas em animais com sinais clínicos típicos de IMN, associada a baixa substituição celular ou morte destas células por apoptose.

Em outro estudo, Ekasari *et al.* (2014), após manter juvenis de *P. vannamei* (2,02g) em quatro tipos de sistemas de bioflocos (melaço, tapioca, subproduto de tapioca e farelo de arroz),

verificaram que após o desafio com IMNV, houve redução da CTH em todos os tratamentos em comparação com o controle negativo (camarão não desafiado). Embora estes autores não tenham efetuado a análise diferencial deste tipo celular, percebe-se a migração de células para o sítio de infecção, pela redução de células circulantes, fenômeno também determinado no presente estudo.

Sobre os resultados da análise histológica, foram encontradas lesões sugestivas de infecção por IMNV em todos os animais após o período de desafio, com marcada presença dos infiltrados hemocíticos nas fibras musculares dos animais. Em relação ao número de lesões, maior quantidade foi observada nos animais mantidos a 29°C, indicando que os animais foram mais afetados pela infecção por IMNV ($P \geq 0,05$) (Tabela 5). O número de hemócitos por lesão, a área da lesão e a densidade de hemócitos não diferiu entre os tratamentos avaliados (Tabela 5). A

Tabela 4 - Contagem total e diferencial de hemócitos obtidos nos diferentes tratamentos, pré e pós-desafio experimental.

Variáveis		Tratamentos (Pré-desafio) ($\times 10^6 \text{ ml}^{-1}$)			
		T26	T29	T32	T35
CTH (Céls/mL)		5,9 $\pm$ 5,7 ^a	7,4 $\pm$ 1,2 ^a	5,6 $\pm$ 0,9 ^a	7,0 $\pm$ 0,8 ^a
Variáveis		Tratamentos (Pós-desafio viral) ($\times 10^6 \text{ ml}^{-1}$)			
		T26	T29	T32	T35
CTH (Céls/mL)		6,6 $\pm$ 4,7 ^a	3,4 $\pm$ 1,0 ^a	3,9 $\pm$ 2,6 ^a	4,3 $\pm$ 3,2 ^a
Variáveis		Tratamentos (Pré-desafio viral)			
		T26	T29	T32	T35
CDH (%)	H	84,86 $\pm$ 7,18 ^a	91,07 $\pm$ 3,49 ^a	89,92 $\pm$ 0,98 ^a	86,92 $\pm$ 5,77 ^a
	SG	13,49 $\pm$ 6,69 ^a	7,68 $\pm$ 3,26 ^a	8,57 $\pm$ 1,03 ^a	11,79 $\pm$ 5,17 ^a
	G	1,64 $\pm$ 0,50 ^a	1,25 $\pm$ 0,52 ^a	1,50 $\pm$ 0,05 ^a	1,28 $\pm$ 0,59 ^a
Variáveis		Tratamentos (Pós-desafio viral)			
		T26	T29	T32	T35
CDH (%)	H	91,50 $\pm$ 1,43 ^{ab}	71,16 $\pm$ 20,19 ^a	75,28 $\pm$ 6,43 ^{ab}	87,40 $\pm$ 4,03 ^b
	SG	7,11 $\pm$ 1,50 ^{ab}	28,31 $\pm$ 20,05 ^a	22,36 $\pm$ 5,02 ^{ab}	12,18 $\pm$ 3,81 ^b
	G	1,38 $\pm$ 0,24 ^{ab}	0,53 $\pm$ 0,23 ^a	2,35 $\pm$ 2,45 ^b	0,41 $\pm$ 0,28 ^{ab}

Fonte: Elaborado pelo autor.

CTH – Contagem Total de Hemócitos, CDH – Contagem Diferencial de Hemócitos, BFT – Bioflocos, H – Hialinas, SG – Semi-granulares, G – Granulares

Letras diferentes significam diferença significativa para o teste de Kruskal-Wallis com significância $P \geq 0,05$, com *post hoc* de Dunn, caso observado diferença significativa ($P \leq 0,05$).

Tabela 5 - Lesões histopatológicas encontradas nos animais pertencentes aos diferentes tratamentos após desafio viral (Resultado da análise histológica, valores expressos em média e desvio padrão).

Variáveis	T26°C	T29°C	T32°C	T35°
Números de lesões por animal amostrado (N)	4,1±0,92 ^a	8,1±2,7 ^b	4,6±2,6 ^{ab}	3,1±2,0 ^a
Número de hemócitos por lesão (N)	31,3±20,6 ^a	25,8±25,7 ^a	21,0±14,7 ^a	14±10,7 ^a
Área da lesão (µm ²)	460,1±139,8 ^a	386,4±208,7 ^a	451,5±201,0 ^a	244,9±165,5 ^a
Densidade de hemócitos (N/µm ²)	6,5±2,0x10 ^{2a}	6,2±3,1x10 ^{2a}	4,6±1,9x10 ^{2a}	5,8±2,0x10 ^{2a}

Fonte: Elaborado pelo autor. Letras diferentes significam diferença significativa para o teste de Kruskal-Wallis com significância $P \geq 0,05$, com *post hoc* de Dunn, caso observado diferença significativa ($P \leq 0,05$).

Em estudo histopatológico realizado por Silva *et al.* (2010), em animais oriundos de fazendas de engorda de *P. vannamei*, foram encontradas como lesões sugestivas de IMN, necrose coagulativa caracterizada por edema entre as fibras musculares no cefalotórax e, infiltração hemocítica entre as fibras musculares no abdômen, achados histopatológicos similares aos encontrados nos camarões submetidos às diferentes temperaturas avaliadas.

2.4 CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos é possível concluir que há influência da temperatura na infectividade de IMNV em *P. vannamei* cultivado em sistema heterotrófico, sendo determinado que os animais submetidos às maiores temperaturas avaliadas (32°C e 35°C) apresentaram as maiores taxas de sobrevivência pós-desafio viral (85,42% e 93,75%, respectivamente), com menor presença de lesões sugestivas de IMN, embora estes animais estivessem positivos por nested-PCR. Esses resultados indicam uma possível estratégia prática ao controle de IMNV em *P. vannamei* cultivado em ambientes controlados com baixa taxa de renovação de água, porém é necessário realizar melhor avaliação do desempenho zootécnico dos animais cultivados nestas condições.

2.5 REFERÊNCIAS

AL-SHAMMIRI, M. Evaporation rate as a function of water salinity. **Desalination**, v.150, p.189-203, 2002.

AMATUL-SAMAHAH, M. A.; WAN OMAR, W. H. H.; MOHD IKHSAN, N. F.; AMAL AZMAI, M. N.; ZAMRI-SAAD, M.; INA-SALWANY, M. Y. Vaccination trials against vibriosis in shrimp: **A review. Aquaculture reports**, v.18, p.1-11, 2020.

AVNIMELECH, Y. **Biofloc Technology** - A Practical Guidebook: Baton Rouge: **World Aquaculture Society**, 2014. 258p.

BELL, T.A.; LIGHTNER, D.V. A Handbook of Normal Shrimp Histology. Baton Rouge: **World Aquaculture Society**, 1988. 114p.

BOYD, C.E. Water Quality: An Introduction. Berlim: Springer Science & Business Media, 2020. 440p.

BRIDGEWATER, L. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Washington: American Public Health Association, 2012. 724p.

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, p.393–411, 2003.

CELI, M.; FILICIOTTO, F.; PARRINELLO, D.; BUSCAINO, G.; DAMIANO, M.A.; CUTTITTA, A.; D'ANGELO, S.; MAZZOLA, S.; VAZZANA, M. Physiological and agonistic behavioural response of *Procambarus clarkii* to an acoustic stimulus. **The Journal of Experimental Biology**, v.216, p.709-718.

CHEN, X.; LUO, G.; TAN, J.; TAN, H.; YAO, M. Effects of carbohydrate supply strategies and biofloc concentrations on the growth performance of african catfish (*clarias gariepinus*) cultured in biofloc systems. **Aquaculture**, v.517, p.1-10, 2020

COELHO, M.G.L.; SILVA, A.C.G.; NOVA, C.M.V.V.; NETO, J.M.O.; LIMA, A.C.N.; FEIJÓ, R.G.; APOLINÁRIO, D.F.; MAGGIONI, R.; GESTEIRA, T.C.V. Susceptibility of the wild southern brown shrimp (*Farfantepenaeus subtilis*) to infectious hypodermal and

hematopoietic necrosis (IHHN) and infectious myonecrosis (IMN). **Aquaculture**, v.294, p.1-4, 2009.

COSTA, A.M.; BUGLIONE, C.C.; BEZERRA FL.; MARTINS, P.C.C.; BARRACCO, M.A. Immune assessment of farm-reared *Penaeus vannamei* shrimp naturally infected by IMNV in NE Brazil. **Aquaculture**, v.291, p.141-146, 2009.

EKASARI, J.; NUGROHO, U.A.; FATIMAH, N.; ANGELA, D.; HASTUTI, Y.P.; PANDE, G.S.J.; NATRAH, F. M. I. Improvement of biofloc quality and growth of *Macrobrachium rosenbergii* in biofloc systems by *Chlorella* addition. **Aquaculture International**, v.29, p.2305-2317, 2021.

EKASARI, J.; AZHAR, M.H.; SURAWIDJAJA, E.H.; NURYATI, S.; SCHRYVER, P.D.; BOSSIER, P. Immune response and disease resistance of shrimp fed biofloc grown on different carbon sources. **Fish & Shellfish Immunology**, v.41, p.332-339, 2014.

ESPARZA-LEAL, H. M.; AMARAL XAVIER, J. A.; WASIELESKY, W. Performance of *Litopenaeus vannamei* postlarvae reared in indoor nursery tanks under biofloc conditions at different salinities and zero-water exchange. **Aquaculture International**, v.24, p.1435–1447, 2016.

FLEGEL, T. W.; SRITUNYALUCKSANA, K. Shrimp Molecular Responses to Viral Pathogens. **Marine Biotechnology**, v.13, p.587-607, 2011.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). The State of World Fisheries and Aquaculture 2020: Sustainability in action. Roma, 2022. Disponível em: < <https://www.fao.org/3/cc0461en/cc0461en.pdf>>. Acesso em: 16 agosto de 2022.

GUERTLER, C.; RIEG, T.; MEJÍA-RUÍZ, C.H.; LEHMANN, M.; BARRACCO, M.A.; PERAZZOLO, L.M. Hemograma e sobrevivência de camarões marinhos após silenciamento do WSSV por RNA de interferência. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.48, p.983-990, 2013.

LEE, D.; YU, Y.B.; CHOI, J.H.; JO, A.H.; HONG, S.M.; KANG, J.C.; KIM, J.H. Viral Shrimp Diseases Listed by the OIE: A Review. **Viruses**, v.14, p.1-62, 2022.

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

LUO, G.; CHEN, X.; TAN, J.; ABAKARI, G.; TAN, H. Effects of carbohydrate addition strategy and biofloc levels on the establishment of nitrification in biofloc technology aquaculture systems. **Aquaculture**, v.514, p.1-11, 2020.

MACDONALD, P. L.; GARDNER, R. C. Type I error rate comparisons of post hoc procedures for I j Chi-Square tables. **Educational and psychological measurement**, v.60, p.735-754, 2000.

MAI, H.N.; HANGGONO, B.; CARO, L.F.A.; KOMARUDDIN, U.; NUR'AINI, Y.L.; DHAR, A.K. Novel infectious myonecrosis virus (IMNV) genotypes associated with disease outbreaks on *Penaeus vannamei* shrimp farms in Indonesia. **Archives of Virology**, v.164, p.3051-3057, 2019.

OIE - World Organisation For Animal Health. Aquatic Animal Health Code. 2022. Disponível em: <<https://www.oie.int/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/aquatic-code-online-access/>> Acesso em: 19 abril 2022.

OIE - World Organisation For Animal Health. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals - Infection with Infectious Myonecrosis Virus. 2019. Disponível em: <https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahm/current/chapitre_infectious_myonecrosis.pdf>. Acesso em 02 de out de 2020.

POULOS, B.T.; LIGHTNER, D.V. Detection of infectious myonecrosis virus (IMNV) of penaeid shrimp by reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). **Diseases of Aquatic Organisms**, v.73, p.69-72, 2006.

PINHEIRO, A.C.A.S.; LIMA, A.P.S.; SOUZA, M. E.; NETO, E.C.L.; ADRIÃO, M.; GONÇALVES V.S.P.; COIMBRA, M.R.M. Epidemiological status of Taura syndrome and Infectious myonecrosis viruses in *Penaeus vannamei* reared in Pernambuco (Brazil). **Aquaculture**, v.262, p.17-22, 2007.

PONCE-PALAFOX, J.; MARTINEZ-PALACIOS, M.A; ROSS, L.G. The effects of salinity and temperature on the growth and survival rates of juvenile white shrimp, *Penaeus vannamei*, Boone, 1931. **Aquaculture**, v.157, p.107-115, 1997.

PRASAD, K. P.; SHYAM K.U.; BANU H.; JEENA K.; KRISHNAN, R. Infectious MyonecrosisVirus (IMNV) – An alarming viral pathogen to Penaeid shrimps. **Aquaculture**, v.477, p.99-105, 2017.

MOSER, J.R.; GALVÁN-ÁLVAREZ, D.A.; CANO, F.M.; GARCIA, T.E.; MOLINA, D.E.C.; CLARK, G.P.; MARQUES; M.R.F.; BARAJAS, F.J.M.; LÓPEZ, J.H. Water temperature influences viral load and detection of White Spot Syndrome Virus (WSSV) in *Litopenaeus vannamei* and wild crustaceans. **Aquaculture**, v.326–329, p.9-14, 2012.

RAHMAN, M.M.; ESCOBEDO-BONILLA, C.M.; CORTEEL, M.; DANTAS-LIMA, J.J.; WILLE, M.; ALDAY-SANZ, V.; PENSAERT, M.B.; SORGELOOS, P.; NAUWYNCK, H.J.; Effect of high water temperature (33 °C) on the clinical and virological outcome of experimental infections with White Spot Syndrome Virus (wssv) in specific pathogen-free (spf) *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, v.261, p.842-849, 2006.

RAHMAN, M.M.; CORTEEL, M.; WILLE, M.; ALDAY-SANZ, V.; PENSAERT M.B.; SORGELOOS P.; NAUWYNCK, H.J. The effect of raising water temperature to 33 °C in *Penaeus vannamei* juveniles at different stages of infection with white spot syndrome virus (WSSV). **Aquaculture**, v.272, p.240-245, 2007a.

RAHMAN, M.M.; CORTEEL, M.; DANTAS-LIMA, J.J.; WILLE, M.; ALDAY-SANZ, V.; PENSAERT, M.B.; SORGELOOS, P.; NAUWYNCK, H.J. Impact of daily fluctuations of optimum (27 °C) and high water temperature (33 °C) on *Penaeus vannamei* juveniles infected with white spot syndrome virus (WSSV). **Aquaculture**, v.269, p.107–113, 2007b.

RAJ, S; VIJAYAN, K.K.; ALAVANDI, S.V.; BALASUBRAMANIAN, C.P.; SANTIAGO, T.C. Effect of temperature and salinity on the infectivity pattern of white spot syndrome virus (WSSV) in giant tiger shrimp *Penaeus monodon* (Fabricius, 1837). **Indian Journal of Fisheries**, v.59, p.109-115, 2012.

SAMOCHA, T.M. Sustainable Biofloc Systems for Marine Shrimp. EUA: Academic Press, p.463.

SANTOS, R. B.; COELHO, P. A.F.; GONÇALVES, A. P.; SANTOS, R. A.; RODRIGUES, M.L.; CORREIA, E.S.; OLIVEIRA, V. Q.; BRITO, L. O. Effects of organic carbon sources on water quality, microbial flocs protein and performance of *Macrobrachium rosenbergii* post-larvae reared in biofloc and synbiotic systems. **Aquaculture Research**, v.53, p.388– 397, 2021.

SEIBERT, C.H.; BORSA, M.; ROSA, R.D.; CARGNIN-FERREIRA, E.; PEREIRA, A.M.L.; GRISARD, E.C.; ZANETTI, C.R.; PINTO, A.R. Detection of major capsid protein of Infectious Myonecrosis Virus in shrimps using monoclonal antibodies. **Journal of Virology Methods**, v.169, p169-175, 2010.

STENTIFORD, G.D.; NEIL, D.M.; PEELER, E.J.; SHIELDS, J.D.; SMALL, H.J. FLEGEL, T.W.; VLAK, J.M.; JONES, B.; MORADO, F.; MOSS, S.; LOTZI, J.; BARTHOLOMAY, L.; BEHRINGER, D.C.; HAUTON, C.; LIGHTNER, D.V. Disease will limit future food supply from the global crustacean fishery and aquaculture sectors. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.110, p.141-157, 2012.

SILVA, V.A.; SANTOS, F.L.; BEZERRA, S.S.; PEDROSA, V.F.; MENDES, P.P.; MENDES, E.S. A multi-season survey for infectious myonecrosis in farmed shrimp, *Litopenaeus vannamei*, in Pernambuco, Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology**. v.104, p.161-165, 2010.

SILVA, S.M.B.C. DA; PINHEIRO, A.C.A.S.; COIMBRA, M.R.M. Quantitation of infectious myonecrosis virus in different tissues of naturally infected Pacific white shrimp, *Litopenaeus*

vannamei, using real-time PCR with SYBR Green chemistry. **Journal of Virological Methods**, v.177, p.197-201, 2011.

SILVA, S.M.B.C. da; LAVANDER, H.D.; LUNA, M.M.S.; SILVA, A.O.M.E. da; GÁLVEZ, A.O.; COIMBRA, M.R.M. *Artemia franciscana* as a vector for Infectious Myonecrosis Virus (IMNV) to *Litopenaeus vannamei* juvenile. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.126, p.1-5, 2015a.

SILVA, S.M.B.C. da; ROCHA, J.L.; MARTINS P.C.C.; GÁLVEZ, A.O.; SANTOS, F. L. dos; ANDRADE, H. A.; COIMBRA, M.R.M. Experimental infection of Infectious Myonecrosis Virus (IMNV) in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). **Aquaculture International**, v.23, p.563–576, 2015b.

VAN-WYK, P.; HODGKINS, M.D.; LARAMORE, R; MAIN, K.L.; MOUNTAIN, J.; SCARPA, J. Water quality requirements and management. **Farming marine shrimp in recirculating freshwater systems**, p.141-162, 1999.

WYBAN, J.; WALSH, W.A. GODIN, D.M. Temperature effects on growth, feeding rate and feed conversion of the Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*). **Aquaculture**, v.138, p.267-279, 1995.

ZHANG, P.; ZHANG, X.; LI, J.; HUANG, G. The effects of body weight, temperature, salinity, pH, light intensity and feeding condition on lethal DO levels of whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). **Aquaculture**, v.256, p.579–587, 2006.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Em sistema heterotrófico, a temperatura influencia a infectividade de IMNV em *P. vannamei*, com maiores temperaturas induzindo a menores taxas de mortalidade e carga virais;
- A temperatura de 35°C pode ser utilizada em sistema heterotrófico como estratégia prática ao controle de IMNV em *P. vannamei*, sendo necessário apenas novo estudo que reproduza um ciclo produtivo completo para validação dos resultados.

4 REFERÊNCIAS

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, p.393-411, 2003.

CNA - Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil. Doenças de Animais Aquáticos de Importância para o Brasil: Manual de identificação no campo. 2018. Disponível em: <https://www.cnabrazil.org.br/assets/arquivos/guia_-_doencas_de_animais_aquaticos.pdf>. Acesso em 01 de out de 2019.

DANTAS, M.D.A. Estudo dos genomas dos principais vírus que acometem a carcinicultura no Brasil. 2019. 133p. **Tese (Doutorado)** – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal.

EKASARI, J.; AZHAR, M.H.; SURAWIDJAJA, E.H.; NURYATI, S; SCHRYVER, P.D.; BOSSIER, P. Immune response and disease resistance of shrimp fed biofloc grown on different carbon sources. **Fish & Shellfish Immunology**, v.41, p.332-339, 2014.

EMERENCIANO, M.; BALLESTER, E. L. C.; CAVALLI, R. O.; WASIELESKY, W. Biofloc technology application as a food source in a limited water exchange nursery system for pink shrimp *Farfantepenaeus brasiliensis* (Latreille, 1817). **Aquaculture Research**, v. 43, 447-457, 2012.

FAO. Fishery Information, Data and Statistics Unit. FishStat plus: universal software for fisherystatistical time series. Version 3.05.3 Roma, 2016. Disponível em: <<http://www.fao.org/fishery/statistics/software/fishstatj/en>>. Acesso em: 01 outubro 2019.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. The State of World Fisheries and Aquaculture 2020: Sustainability in action. Roma, 2020. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/ca9229en/CA9229EN.pdf>>. Acesso em: 26 outubro de 2020.

FLEGEL, T. W.; SRITUNYALUCKSANA, K. Shrimp Molecular Responses to Viral Pathogens. **Marine Biotechnology**, v.13, p.587-607, 2011.

LIGHTNER, D.V. Virus diseases of farmed shrimp in the Western Hemisphere (theAmericas): a review. **Journal of InvertebratePathology**. v.106, p.110-130, 2011.

MCINTOSH, D.; SAMOCHA, T.M.; JONES, E.R.; LAWRENCE, A.L.; MCKEE, D.A.; HOROWITZ, S.; HOROWITZ, A. The effect of a commercial bacterial supplement on the highdensity culturing of *Litopenaeus vannamei* with a low-protein diet in an outdoor tank system and no water exchange. **Aquacultural Engineering**, v.21, p. 215-227, 2000.

NAIM, S.; TANG, K.F.J.; YANG, M.; LIGHTNER, D.V.; NIBERT, M.L. Extended genome sequences of penaeid shrimp infectious myonecrosis vírus strains from Brazil and Indonesia. **Archives of Virology**, v.160, p.1579–1583, 2015.

OIE - World Organisation For Animal Health. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals - Infection with Infectious Myonecrosis Virus. 2019. Disponível em: <https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahm/current/chapitre_infectious_myonecrosis.pdf>. Acesso em 02 de out de 2020.

OIE - World Organisation For Animal Health. OIE-Listed diseases, infections and infestations in force in 2019. Disponível em: <<https://www.oie.int/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2019/>>. Acesso em 02 de out de 2020.

PIÉRRRI, V.; SEVERINO, V.D.; OLIVEIRA, G.K.; SANTO, M.E.C.; VIEIRA, N.F.; SEIFFERT, Q.W. Cultivation of marine shrimp in biofloc technology (BFT) system under different water alkalinities. **Brazilian Journal of Biology**. v.75, p.558-564, 2015.

PRASAD, K. P.; SHYAM K.U.; BANU H.; JEENA K.; KRISHNAN, R. Infectious MyonecrosisVirus (IMNV) - Analarmining viral pathogento Penaeid shrimps. **Aquaculture**, v.477, p.99-105, 2017.

SILVA, S.M.B.C. da; LAVANDER, H.D.; LUNA, M.M.S.; SILVA, A.O.M.E. da; GÁLVEZ, A.O.; COIMBRA, M.R.M. *Artemia franciscana* as a vector for Infectious Myonecrosis Virus

(IMNV) to *Litopenaeus vannamei* juvenile. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.126, p.1-5, 2015a.

SILVA, S.M.B.C. da; ROCHA, J.L.; MARTINS P.C.C.; GÁLVEZ, A.O.; SANTOS, F. L. dos; ANDRADE, H. A.; COIMBRA, M.R.M. Experimental infection of Infectious Myonecrosis Virus (IMNV) in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). **Aquaculture International**, v. 23, p.563–576, 2015b.

SILVA, S.M.B.C. da; SILVA, A.D.R. da; LAVANDER, H.D.; CHAVES, T.C.B.; PEIXOTO, S.; GÁLVEZ, A.O.; COIMBRA, M.R.M. Vertical transmission of Infectious Myonecrosis Virus in *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, v.459, p.216–222, 2016.

STENTIFORD, G.D.; NEIL, D.M.; PEELER, E.J.; SHIELDS, J.D.; SMALL, H.J. FLEGEL, T.W.; VLAK, J.M.; JONES, B.; MORADO, F.; MOSS, S.; LOTZI, J.; BARTHOLOMAY, L.; BEHRINGER, D.C.; HAUTON, C.; LIGHTNER, D.V. Disease will limit future food supply from the global crustacean fishery and aquaculture sectors. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.110, p.141-157, 2012.

TANG, K.F.J.; REANTASO, M.G.B.; ARTHUR, J.R. **Shrimp Infectious Myonecrosis strategy manual**. Roma: FAO Fisheries and Aquaculture, 2019. 44p.

VIEIRA-GIRÃO, P.R.N.; ROCHA, I.R.C.B.; GAZZIENO, M.; VIEIRA, P.R.N.; LUCENA, H.M.R.; COSTA, F.H.F.; BAPTISTA, R. Low Salinity Facilitates the Replication of Infectious Myonecrosis Virus and Viral Co-Infection in the Shrimp *Litopenaeus Vannamei*. **Journal of Aquaculture**, v.6, p.1-6, 2015.

WASIELESKY, W.; FROES, C.; FÓES, G.; KRUMMENAUER, D.; LARA, G.; POERSCH, L. Nursery of *Litopenaeus vannamei* reared in a biofloc system: The effect of stocking densities and compensatory growth. **Journal of shellfish research**, v.32, p.799-806, 2013.