



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE PESCA E AQUICULTURA
LABORATÓRIO DE SANIDADE DE ANIMAIS AQUÁTICOS

DETERMINAÇÃO DA TAXA DE SOBREVIVÊNCIA DE JUVENIS DE *Litopenaeus*
***vannamei* CULTIVADOS EM SISTEMA DE BIOFLOCOS E**
EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM O VÍRUS DA MIONECROSE
INFECCIOSA (IMNV).

Aluna: Tainan Silva de Araujo
Orientadora: Suzianny Maria Bezerra Cabral da Silva

Recife- 2019.

IDENTIFICAÇÃO:

ALUNA: Tainan Silva de Araujo

CURSO: Engenharia de Pesca

PROGRAMA: PIBIC/UFRPE

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Suzianny Maria Bezerra Cabral da Silva

DEPARTAMENTO: Pesca e Aquicultura (DEPAq) - UFRPE

RELATÓRIO: Final

TÍTULO DO PROJETO

BIOTECNOLOGIA APLICADA A ESPÉCIES AQUÁTICAS IMPORTANTES NA AQUICULTURA E PESCA DO NORDESTE.

TÍTULO DO PLANO

DETERMINAÇÃO DA TAXA DE SOBREVIVÊNCIA DE JUVENIS DE *Litopenaeus vannamei* CULTIVADOS EM SISTEMA DE BIOFLOCOS E EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM O VÍRUS DA MIONECROSE INFECCIOSA (IMNV).

SUMÁRIO

RESUMO	4
INTRODUÇÃO	5
OBJETIVOS.....	6
Objetivo geral:	6
Objetivos Específicos:	6
MATERIAL E MÉTODOS	7
a. Condições Experimentais	7
b. Desafio viral	7
c. Análise molecular	8
i. Extração de RNA e RT-PCR	8
ii. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	8
d. Análise estatística	8
RESULTADOS E DISCUSSÃO	10
CRONOGRAMA DAS ATIVIDADES	13
CONSIDERAÇÕES FINAIS	13
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	14
DFICULDADES ENCONTRADAS	18
PARECER DO ORIENTADOR	18

RESUMO

O estudo visava identificar a taxa de sobrevivência de juvenis do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* cultivados em sistema de bioflocos (BFT), experimentalmente infectados com o Vírus da Mionecrose Infecciosa (IMNV). Foram testados dois grupos experimentais: (1) juvenis de *L. vannamei* alimentados com tecido de camarão infectado (IMNV) e; (2) juvenis de *L. vannamei* alimentados com tecido de camarão não infectado (grupo controle), com três repetições com 10 animais cada (peso médio de 2,15 g). O grupo desafiado com IMNV teve seu desafio realizado por meio da ingestão do tecido de músculo abdominal picado de camarões contaminados com o IMNV (duas vezes ofertas por dia), durante sete dias. Para o grupo controle, a oferta foi conduzida da mesma forma substituindo o tecido contaminado por tecido de músculo abdominal picado de animais livres de patógenos específicos - SPF (não contaminado). Após este período, os animais de ambos os tratamentos foram alimentados com ração comercial à mesma biomassa, sendo monitorados diariamente por 20 dias para a observação de sinais clínicos de infecção por IMNV e mortalidade. Durante os dias de experimento, foram monitoradas as variáveis físico-químicas da água: pH e temperatura (diariamente) e; amônia total e nitrito (a cada 5 dias). As variáveis físico-químicas se mantiveram dentro dos valores adequados para *L. vannamei* cultivado em sistema de bioflocos. Os resultados mostram que a taxa de sobrevivência média ao final do experimento foi de 76,66% e 90% para os animais submetidos aos tratamentos com IMNV e controle, respectivamente, não sendo observada diferença significativa entre estes ($P \geq 0,05$). Quanto à taxa de infecção, não foram detectados o vírus em animais desafiados com o vírus, nem foram constatados nenhum sinal clínico nos animais de ambos os tratamentos. O presente estudo mostrou um efeito positivo do BFT sobre a taxa de sobrevivência e de infecção de juvenis de *L. vannamei* experimentalmente desafiados com IMNV (tratamento IMNV) e naturalmente infectados (grupo controle), uma vez que não foram observados sinais clínicos nos animais durante o experimento, indicando claramente o não desenvolvimento da doença.

INTRODUÇÃO

A produção de camarão marinho *Litopenaeus vannamei* no Brasil cresceu intensamente até meados de 2003, quando houve um declínio na maior região produtora, o Nordeste brasileiro. Este declínio foi provocado por um patógeno, que é conhecido atualmente como o Vírus da Mionecrose Infecciosa (IMNV) e, desde o primeiro surto, este vírus tem causado uma elevada perda econômica para a indústria do camarão cultivado no Brasil, tornando-se uma preocupação entre os produtores (COSTA et al., 2009). Os sinais clínicos do camarão infectado com IMNV são principalmente a necrose no músculo abdominal e na base da cauda e a presença de opacidade muscular, assemelhando-se com o camarão cozido (SENAPIN et al., 2007).

Entretanto, surtos de doenças não são produtos apenas da presença de um agente patogênico no sistema aquícola, mas da combinação desta com o estado de saúde dos animais cultivados e condições ambientais (De SCHRYVER et al., 2012).

Neste sentido, o sistema de bioflocos possibilita um bom estado de saúde animal devido a adequada manutenção da qualidade de água e oferta de agregados microbianos obtidos a partir do melhor aproveitamento dos nutrientes encontrados nos resíduos de ração e fezes (EKASARI et al., 2014), decorrente do estímulo de crescimento de bactérias heterotróficas por meio da adição de uma fonte orgânica de carbono em uma relação C:N específica (KRUMMENAUER et al., 2012). Apesar destas informações, ainda não há estudos sobre a influência do sistema de bioflocos na taxa de sobrevivência de *L. vannamei* experimentalmente desafiados por IMNV.

OBJETIVOS

Objetivo geral:

- Determinar a taxa de infectividade de juvenis de *L. vannamei* cultivados em sistema de bioflocos e experimentalmente infectados com o IMNV.

Objetivos Específicos:

- Determinar a frequência dos camarões desafiados infectados;
- Testar o protocolo de infecção viral experimental para juvenis de *L. vannamei* cultivados em sistema de bioflocos.

MATERIAL E MÉTODOS

a. Condições Experimentais

Para os desafios, indivíduos negativos de *L. vannamei* com peso médio de 2,15 g provenientes de fazenda de engorda e previamente triados por PCR para IMNV (PINHEIRO et al., 2007), considerando uma prevalência mínima estimada de 10% (CANNON e ROE, 1982), foram mantidos (densidade de 1 animal/1L) em bioflocos em baldes com 20L de capacidade, sob aeração constante e intensa. Os baldes foram cobertos com plástico para conter os aerossóis e o volume útil a ser utilizado foi de 15 litros, a temperatura de 28°C.

Neste sistema, o biofloco que veio com os animais foi mantido nas seguintes condições: água do mar (16 g L⁻¹) previamente clorada a 20 ppm por 24 horas antes de seu uso, temperatura de 28°C, aeração constante e intensa e, adição de fonte de carbono orgânico (melaço de cana de açúcar, 40% carbono) e nitrogênio (ração comercial de 40% de proteína bruta), visando uma relação de carbono:nitrogênio (C:N) de 12:1, calculada segundo Samocha et al. (2007) e Avnimelech et al. (2009). Além disso, cal hidratada (Ca(OH)₂) foi adicionada para a manutenção da alcalinidade (> 100 mg L⁻¹) e do pH (> 7.5) de acordo com Furtado et al. (2011). Os camarões foram alimentados com ração comercial (40% proteína bruta) quatro vezes ao dia (8h, 11h, 14h e 17h) e a quantidade foi ajustada de acordo com a estimativa de consumo, mortalidades e sobras, segundo metodologia de Van Wyk e Scarpa (1999).

Diariamente, as variáveis de qualidade de água, temperatura e pH foram verificadas duas vezes ao dia (8 e 16h). Semanalmente, análises colorimétricas da concentração de amônia e nitrito foram realizadas para verificação destas dentro dos limites ideais para peneídeos propostos por Van Wyk e Scarpa (1999). Além disso, amostras de água foram coletadas duas vezes por semana para monitoramento dos sólidos sedimentáveis (cone Imhoff) (AVNIMELECH, 2012).

b. Desafio viral

A fim de determinar o efeito do biofloco na taxa de sobrevivência de camarões experimentalmente infectados com IMNV, foram realizados dois tratamentos: (1) juvenis de *L. vannamei* alimentados com tecido de camarão infectado (IMNV) e; (2) juvenis de *L. vannamei* alimentados com tecido de camarão não infectado (grupo controle). O tratamento e o grupo controle constaram de 1 animal/L (10L de volume útil) e três repetições cada. O desafio viral (tratamento juvenis de *L. vannamei* alimentados com tecido de camarão infectado) foi realizado via ingestão de tecido picado de músculo abdominal contaminado

com IMNV previamente confirmado por PCR em tempo real e com carga viral média de 10^6 cópias μg^{-1} de RNA total, conforme Silva et al. (2015a). Este tecido foi cedido pelo Laboratório de Genética Aplicada (LAGA) da UFRPE. Neste desafio, os animais foram alimentados com músculo abdominal picado a 10% da biomassa/dia através da oferta de 5% da biomassa por duas vezes/dia, durante sete dias. Para o grupo controle, a oferta foi conduzida da mesma forma substituindo o tecido contaminado por tecido de músculo abdominal picado de animais livres de patógenos específicos (não contaminado). A partir do 8º dia, os camarões de ambos os tratamentos foram alimentados com ração comercial à mesma biomassa, com observação diária de sinais clínicos de infecção por IMNV e mortalidade por 20 dias. Ao longo deste período, os animais mortos e sobreviventes (sacrificados ao 20º dia pós-inoculação) foram coletados e estocados a -80°C para a análise molecular via PCR e determinação da taxa de sobrevivência.

c. Análise molecular

i. Extração de RNA e RT-PCR

A extração do RNA total foi feita a partir de 100 mg de amostras do músculo abdominal dos animais desafiados em 1 mL de Trizol (Invitrogen, EUA), conforme as instruções do fabricante. Em seguida, $300 \text{ ng}\mu\text{L}^{-1}$ de RNA total e $0,5 \mu\text{g}$ de oligo(dT)₁₅ foram usados na RT-PCR para a produção do cDNA. Esta reação foi realizada através do kit Improm-IITM Reverse Transcription System (Promega, Madison, WI, USA), conforme as instruções do fabricante. O cDNA foi armazenado a -20°C até posterior utilização nas análises de PCR.

ii. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

As condições de reação e os ciclos térmicos de PCR usados para a confirmação da infecção por IMNV, foram realizadas da mesma forma descrita por Pinheiro et al. (2007). Os produtos de PCR (tamanho esperado de 328 pb) foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio e o tamanho do fragmento estimado por um marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen, EUA).

d. Análise estatística

Os dados de taxa média de sobrevivência e de infecção (obtidos por PCR) foram submetidos ao teste de Cochran ao nível de 95% de probabilidade ($p \leq 0,05$) para verificação da homogeneidade e ao teste de Kolmogorov-Smirnov, para normalidade ($P \leq 0,05$). Em

seguida, estes dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguido do teste de comparação de médias Tukey (NELDER e WEDDERBURN, 1972; OTT, 1993) ao nível de 95% de probabilidade ($P \leq 0,05$). No caso das variáveis de qualidade de água, por não se mostrarem com distribuição normal e variância homogênea, foram submetidos ao teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis para a comparação dos resultados obtidos nos tratamentos. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa IBM SPSS Statistics 23.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores médios de pH não diferiram estatisticamente em ambos os tratamentos, ao longo das semanas de cultivo (Tabela 1). Já os valores médios de temperatura foram estatisticamente distintos entre o tratamento IMNV e grupo controle na segunda semana ($P \leq 0,05$) (Tabela 1). A amônia total (valores médios) não apresentou diferença estatística ao longo das semanas entre os tratamentos, porém os valores se mantiveram dentro dos esperados nesse sistema de cultivo e, para o nitrito (valores médios), houve diferença entre o grupo controle e IMNV apenas para a primeira semana de experimento ($P \leq 0,05$) (Tabela 1).

Tabela 1 - Valores das variáveis de qualidade de água (média e desvio padrão) obtidos nos grupos durante o experimento.

Semana	Tratamento	pH	Temperatura (°C)	Amônia total (mg.L ⁻¹)	Nitrito - NO ₂ (mg.L ⁻¹)
1°	IMNV	7,0±0,0 ^B	28,0±0,0 ^A	3,00±0,00 ^A	0,66±0,29 ^B
	Controle	7,0±0,0 ^B	28,0±0,0 ^A	3,00±0,00 ^A	1,25±0,43 ^A
2°	IMNV	7,3±0,0 ^{AB}	26,0±0,0 ^B	3,00±0,00 ^A	0,50±0,43 ^B
	Controle	7,3±0,0 ^B	27,0±1,0 ^{AB}	3,00±0,00 ^A	0,00±0,00 ^B
3°	IMNV	7,3±0,0 ^{AB}	28,0±0,0 ^A	3,00±0,00 ^A	0,08±0,14 ^B
	Controle	7,3±0,0 ^B	28,3±0,6 ^A	3,00±0,00 ^A	0,00±0,00 ^B

Letras diferentes indicam diferença estatística ($P \leq 0,05$).

De acordo com Kuhn et al. (2010), os valores de pH, temperatura, amônia e nitrito obtidos no presente trabalho, encontram-se dentro da faixa desejada para a manutenção da saúde do camarão *L. vannamei* em BFT. Similarmente, Xu e Pan (2012), também utilizando o sistema de bioflocos, encontraram valores semelhantes aos descritos no presente trabalho, mostrando que as variáveis encontravam-se dentro dos padrões para esta espécie neste tipo de sistema de cultivo. Em relação ao nitrito, houve um declínio da concentração na terceira semana que pode ser atribuído à nitrificação (conversão de amônia em nitrito, e conseqüentemente, de nitrito em nitrato), que é comum no sistema de bioflocos (AZIM e LITTLE, 2008; SCHRYVER et al., 2008).

Quanto à taxa média de sobrevivência, observou-se que não houve diferença estatística entre o tratamento com oferta de tecido contaminado (IMNV) e o grupo controle ($P \geq 0,05$),

com valores médios de 76,66% e 90%, respectivamente. As mortalidades observadas no grupo controle, em todas as suas repetições, foram associadas ao canibalismo.

Silva et al. (2015b) e Gitterle et al. (2005), também relataram a presença de canibalismo em *L. vannamei* em condições experimentais, sendo sugerido por Gitterle et al.(2005) que a erradicação do canibalismo seja difícil, uma vez que *L. vannamei* canibaliza naturalmente membros mortos ou fracos da população. No caso do tratamento em que juvenis de *L. vannamei* foram alimentados com tecido de camarão infectado (IMNV), os camarões mortos não foram canibalizados.

Em bioensaio por ingestão de tecido contaminado com IMNV em juvenis de *L. vannamei* em sistema semi-intensivo em águas claras com renovação de 50% de água diariamente, Silva et al. (2015a), relataram que os animais desafiados apresentaram uma taxa média de sobrevivência de 80% ao 20º dia pós-infecção, não sendo encontrados sinais clínicos da infecção. Similarmente, também em sistemas semi-intensivos em águas claras, através de infecção experimental Silva et al. (2015b), não observaram elevadas taxas de mortalidade em camarões inoculados por via oral, embora, os animais apresentassem carga viral média similar a uma infecção natural pelo IMNV (surto) e sinais clínicos típicos da doença.

Ekasari et al. (2014), ao conduzir desafios com IMNV via injeção intramuscular em animais mantidos em bioflocos, observaram que a taxa média de sobrevivência não diferiu nos animais desafiados versus o grupo controle, sendo sugerido por estes autores, um efeito positivo do bioflocos na resposta imunológica de *L. vannamei*.

Os resultados de PCR para confirmação da infecção por IMNV mostraram-se diferentes estatisticamente ($P \leq 0,05$), com positivos em 12,5% das amostras provenientes do tratamento controle, enquanto que para os animais desafiados com o vírus, os valores obtidos foram de 0% (Tabela 2). Estes resultados sugerem que os animais já estavam infectados pelo vírus no momento em que foram adquiridos na fazenda. Esta hipótese deve se levada em consideração devido ao fato de que a triagem prévia dos animais através de PCR (antes do experimento) considerou uma prevalência de 10%, conforme recomendação do Ministério da Pesca e Aquicultura em seu Manual de Coleta e Remessa de Amostras para Diagnóstico de Enfermidades de Animais Aquáticos (MPA, 2013) e, não, a triagem de todos os indivíduos. Em nenhum dos tratamentos foram observados sinais clínicos nos animais, mostrando que a doença não se desenvolveu.

Tabela 2 - Análise de associação dos resultados obtidos na PCR para detecção do IMNV.

Tratamento	N (Total de amostras testadas)	Positivas para IMNV	Valor de P
Controle	16	2(12,5%)	0,030*
IMNV	12	0 (0,0%)	

* Associação estatística significativa ($P \leq 0,05$).

Costa (2007) também constatou a positividade do vírus no cultivo de *Penaeus vannamei* provenientes de uma fazenda localizada em Natal. Nesse experimento, 100% dos resultados foram positivos para o IMNV. Isto deve estar associado à extrema difusão deste vírus no Brasil, principalmente nos estados produtores de camarão (nordeste brasileiro) (FEIJÓ et al., 2013). Da mesma forma, Silva (2010) constatou a positividade para o Vírus da Mionecrose Infecciosa em camarões naturalmente infectados provenientes de uma fazenda de engorda do litoral norte do estado de Pernambuco.

Feijó et al. (2013) através da obtenção de exemplares de *L.vannamei* de um cultivo comercial no Ceará observaram a presença de IMNV e WSSV em cativeiro, tendo sido notado que 90% das amostras foram positivas para IMNV no teste por PCR em tempo real, enfatizando a probabilidade de ocorrência deste patógeno.

CRONOGRAMA DAS ATIVIDADES

Período	Ano (2016)					Ano (2017)						
	A	S	O	N	D	J	F	M	A	M	J	J
Revisão bibliográfica	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Treinamento em técnicas de rotina laboratorial (preparo de soluções, esterilização de material, etc)	X	X										
Aquisição de material de consumo e instalação das unidades experimentais	X	X										
Desafio viral					X	X						
Análises laboratoriais	X	X	X	X	X	X						
Análise dos dados						X	X	X	X	X	X	X
Redação e apresentação dos relatórios parcial e final								X				X

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo mostrou um efeito positivo do BFT sobre a taxa de sobrevivência e de infecção de juvenis de *L. vannamei* experimentalmente desafiados com IMNV e naturalmente infectados (grupo controle), uma vez que não foram observados sinais clínicos nos animais durante o experimento, indicando claramente o não desenvolvimento da doença.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, T. P. D. et al. **Real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay using TaqMan probe for detection and quantification of Infectious myonecrosis virus (IMNV).** *Aquaculture* 264 (2007) 9–15.

AVNIMELECH, Y. (2009). *Biofloc Technology, a practical guide book*. World Aquaculture Society. P. 182.

AVNIMELECH, Y. (2012). *Biofloc technology: a practical guide book*. 2nd ed. Baton Rouge, United States: The World Aquaculture Society.

AZIM, M.E.; LITTLE, D.C. **The biofloc technology (BFT) in indoors tanks: Water quality, biofloc composition, and growth and welfare of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*).** *Aquaculture* 283 (2008) 29-35.

BALCAZÁR, J. L. et al. **Effect of the addition of four potential probiotic strains on the survival of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) following immersion challenge with *Vibrio parahaemolyticus*.** *Journal of Invertebrate Pathology* 96 (2007) 147–150.

CANNON, R. M., ROE, R. T (1982). *Livestock disease surveys: a field manual for veterinarians*. Australian Bureau of Animal Health. Canberra, p. 14-17.

COSTA, A. M. et al. **Immune assessment of farm-reared *Penaeus vannamei* shrimp naturally infected by IMNV in NE Brazil.** *Aquaculture* 291 (2009) 141–146.

COSTA, A.M. **Parâmetros hemato-imunológicos em camarões *Litopenaeus vannamei* durante o avanço da infecção pelo vírus da Mionecrose Infeciosa (IMNV).**52. Dissertação – Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2007.

EKASARI, J. et al. **Immune response and disease resistance of shrimp fed biofloc grown on different carbon sources.** *Fish & Shellfish Immunology* 41 (2014) 332e339.

FEIJÓ, R.G et al. **Infectious myonecrosis virus and white spot syndrome virus co-infection in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) farmed in Brazil.** *Aquaculture* 380-383 (2013) 1-5.

FURTADO, P. S., POERSCH, L. H., WASIELESKY, W. J. (2011). Effect of calcium hydroxide, carbonate and sodium bicarbonate on water quality and zootechnical performance of shrimp *Litopenaeus vannamei* reared in bio-flocs technology (BFT) systems. *Aquaculture* 321:130–135.

KUNANOPPARA, A. et al. **Detection of infectious myonecrosis virus using monoclonal antibody specific to N and C fragments of the capsid protein expressed heterologously.** *Journal of Virological Methods* 171 (2011) 141–148.

KRUMMENAUER, D. et al. **Cultivo de camarões marinhos em sistema de bioflocos: análise da reutilização da água.** *Atlântica, Rio Grande*, 34(2) 103-111, 2012.

LOPES, M. A. T. et al. **Natural co-infection with infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) and infectious myonecrosis virus (IMNV) in *Litopenaeus vannamei* in Brazil.** *Aquaculture* 312 (2011) 212–216.

LOY, J.D. et al. **dsRNA provides sequence-dependent protection against infectious myonecrosis virus in *Litopenaeus vannamei*.** *Journal of General Virology* 93 (2012) 880–888.

MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA. **Manual de Coleta e Remessa de Amostras para Diagnóstico de Enfermidades de Animais Aquáticos na Rede Nacional de Laboratórios do Ministério da Pesca e Aquicultura - RENAQUA.** Brasília: MPA, 2013. 67p.

NELDER, J.; WEDDERBURN, R.W.M. Generalized linear models. **Journal of the Royal Statistical Society**, A135, p.370–384, 1972.

OTT, R.L. **An Introduction to Statistical Methods and Data Analysis**, 4th ed. Wadsworth, Belmont, CA, USA., 1993.

OTTA, S. K. et al. **Association of dual viral infection with mortality of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in culture ponds in India.** *Virus Dis.* 25(1) (2014) 63–68.

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.

POULOS, B. T. e LIGHTNER, D. V. **Detection of infectious myonecrosis virus (IMNV) of penaeid shrimp by reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR).** *Diseases of aquatic organism* 73 (2006) 69–72.

SAMOCHA, T.M. et al. (2007). Use of molasses as carbon source in limited discharge nursery and grow-out systems for *Litopenaeus vannamei*. *Aquacultural Engineering*, v.36, p.184–191.

De SCHRYVER et al. **Biofloc -based aquiculture systems.** 278-301(2012).

SENAPIN, S. et al. **Dual infections of IMNV and MrNV in cultivated *Penaeus vannamei* from Indonesia.** *Aquaculture* 372-375 (2013) 70–73.

SENAPIN, S. et al. **Infections of MrNV (*Macrobrachium rosenbergii* nodavirus) in cultivated whiteleg shrimp *Penaeus vannamei* in Asia.** *Aquaculture* 338-341 (2012) 41–46.

SENAPIN, S. et al. **Outbreaks of Infectious myonecrosis virus (IMNV) in Indonesia confirmed by genome sequencing and use of an alternative RT-PCR detection method.** *Aquaculture* 266 (2007) 32–38.

SILVA, V. A et al. **A multi-season survey for infectious myonecrosis in farmed shrimp, *Litopenaeus vannamei*, in Pernambuco, Brazil.** *Journal of Invertebrate Pathology* 104 (2010) 161–165.

SILVA, S. M. B. C. **Análise quantitativa da carga viral do vírus da mionecrose infecciosa (IMNV) em diferentes tecidos do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* naturalmente infectado.** 78. Dissertação – Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, 2010.

SILVA, S. M. B. C. et al. **Quantitation of infectious myonecrosis virus in diferente tissues of naturally infected Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, using real-time PCR with SYBR Green chemistry.** *Journal of Virological Methods* 177 (2011) 197–201.

SILVA, S.M.B.C. et al. **Experimental infection of infectious myonecrosis virus (IMNV) in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931).** *Aquaculture Int.* 23 (2015) 563–576.

TANG, K.F.J. et al. **Development of in situ hybridization and RT-PCR assay for the detection of a nodavirus (PvNV) that causes muscle necrosis in *Penaeus vannamei*.** *Diseases of Aquatic Organisms* 75 (2007) 183–190.

VAN WYK, P & J SCARPA. (1999). Water Quality and Management. Farming Marine Shrimp in Recirculating Freshwater Systems. Florida Department of Agriculture and Consumer Services, Tallahassee, p. 128–138.

DFICULDADES ENCONTRADAS

Devido às constantes quedas de energia, houve perda de material (animais), fazendo-se necessária a coleta de novos exemplares, como também a montagem de um novo experimento.

PARECER DO ORIENTADOR

A bolsista Tainan Silva de Araujo apresentou um bom desempenho neste semestre, com cumprimento das atividades previstas no cronograma.

Recife, 06 de julho de 2017.

Prof^ª. Dr^ª. Suzianny Cabral
Orientadora.