



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**INFLUÊNCIA DE FATORES AMBIENTAIS NA INCIDÊNCIA DO VÍRUS DA
INFECÇÃO HIPODERMAL E NECROSE HEMATOPOIÉTICA (IHHNV) NO
CAMARÃO *Litopenaeus vannamei* CULTIVADO EM FAZENDAS DO ESTADO
DO RIO GRANDE DO NORTE (RN)**

CIMÁRIA PORFIRIO RODRIGUES DE OLIVEIRA DA SILVA

ORIENTADOR: Prof. Dr. Mauricio Pereira de Sales

CO-ORIENTADOR: Prof^a. Dr^a. Regina de Fátima dos Santos Braz

NATAL / RN

2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

CIMÁRIA PORFIRIO RODRIGUES DE OLIVEIRA DA SILVA

INFLUÊNCIA DE FATORES AMBIENTAIS NA INCIDÊNCIA DO VÍRUS DA INFECÇÃO HIPODERMAL E NECROSE HEMATOPOIÉTICA (IHHNV) NO CAMARÃO *Litopenaeus vannamei* CULTIVADO EM FAZENDAS DO ESTADO DO RIO GRANDE DO NORTE (RN)

ORIENTADOR: Prof. Dr. Mauricio Pereira de Sales

Departamento de Bioquímica / CB / UFRN

CO-ORIENTADOR: Prof^a. Dr^a. Regina de Fátima dos Santos Braz

Departamento de Microbiologia e Parasitologia / CB / UFRN

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, no Centro de Biociências, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como um dos requisitos à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, na área de concentração da biologia estrutural e funcional.

NATAL / RN

Agosto de 2008

Divisão de Serviços Técnicos

Catalogação da Publicação na Fonte. UFRN / Biblioteca Central Zila Mamede

Silva, Cimária Porfírio Rodrigues de Oliveira da.

Influência de fatores ambientais na incidência do vírus da infecção hipodermal e necrose hematopoiética (IHHNV) no camarão *Litopenaeus vannamei* cultivado em fazendas do Estado do Rio Grande do Norte (RN) / Cimária Porfírio Rodrigues de Oliveira da Silva. – Natal, RN, 2008.

90 f. : il.

Orientador: Maurício Pereira de Sales.

Co-orientador: Regina de Fátima dos Santos Braz.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas.

1. Camarão – Criação – Dissertação. 2. Camarão – Saúde – Dissertação. 3. Infecção Hipodermal – Dissertação. 4. Necrose Hematopoiética – Dissertação. I. Sales, Maurício Pereira de. II. Braz, Regina de Fátima dos Santos. III. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. IV. Título.

RN/UF/BCZM

CDU 639.512 (043.2)

CIMÁRIA PORFIRIO RODRIGUES DE OLIVEIRA DA SILVA**INFLUÊNCIA DE FATORES AMBIENTAIS NA INCIDÊNCIA DO VÍRUS DA INFECÇÃO HIPODERMAL E NECROSE HEMATOPOIÉTICA (IHHNV) NO CAMARÃO *Litopenaeus vannamei* CULTIVADO EM FAZENDAS DO ESTADO DO RIO GRANDE DO NORTE (RN)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, no Centro de Biociências, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como um dos requisitos à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, na área de concentração da biologia estrutural e funcional. **Orientador:** Prof. Dr. Mauricio Pereira de Sales.

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Cibele Soares Pontes
Universidade Federal Rural do Semi-árido (UFERSA)

Prof. Dr. Wagner Franco Molina
Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN)

Prof^a. Dr^a. Regina de Fátima dos Santos Braz
Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN)

“O Senhor é o meu rochedo, e o meu lugar forte, e o meu libertador; o meu Deus, a minha fortaleza, em quem confio; o meu escudo, a força da minha salvação, e o meu alto refúgio. ” (**Sl. 18:2**)

AGRADECIMENTOS

Dedico este trabalho e todo o tempo usado para a realização do mesmo a Deus, fortaleza de minha alma, razão do meu viver, consolo da minha vida.

Ao meu esposo David William, por suas palavras de motivação em momentos difíceis e por apoiar e acreditar nos meus sonhos. Você é um presente de Deus.

Aos meus pais, Cícero e Eva, que durante toda a minha vida e em especial nesses últimos dois anos, me deram força e confiança. Agradeço a Deus por ter me dado o privilégio de ter pais como vocês.

Aos meus sogros, Elisabete e Janildo, que em todo momento me incentivaram para continuar em frente.

Aos meus familiares que de alguma maneira me ajudaram a realizar os meus sonhos.

À Prof^a. Dr^a Regina de Fátima dos Santos Braz, pela amizade, por sua orientação durante todos esses anos, pelos ensinamentos e por tudo que me acrescentou profissionalmente e pessoalmente.

Ao Prof. Dr. Mauricio Pereira de Sales por todo apoio e paciência durante a realização desse trabalho.

Ao Prof. José Veríssimo Fernandes e à Prof^a. Rosely de Vasconcellos Meissner pela cooperação na realização do trabalho experimental, cedendo reagentes e espaço físico dos seus laboratórios.

Ao Prof. Milson Bezerra de Gouveia pela valiosa ajuda na parte estatística desse trabalho.

À todos os professores, funcionários e estagiários do Departamento de Microbiologia e Parasitologia (DMP) que de alguma forma contribuíram na realização desse trabalho, contribuindo para o meu aprendizado de vida.

A todos os professores da Pós-graduação em Ciências Biológicas que no decorrer desses dois anos cooperarão para o meu crescimento pessoal e profissional.

À EMPARN pelo auxílio nas coletas do material utilizado neste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro na forma de bolsa, durante esse tempo.

Aos carcinicultores, pelo acesso as fazendas possibilitando a coleta do material utilizado neste trabalho.

À Ligete, mais conhecida por Lígia, companheira de uma grande caminhada de estudo; compartilhando alegrias e tristezas. Agradeço por sua amizade. Sua companhia me ensinou bastante.

À Emerton pela amizade e as experiências compartilhadas.

Aos colegas do mestrado que marcaram uma importante fase da vida. Não esquecerei de nenhum de vocês (Ciáxares, Emiliano, Isabele, Carol, Ubiratan, Armando e Gustavo).

Aos colegas do laboratório, Luciana, Aline, Tiago, Maycon e Julianne, que me ajudaram bastante durante o período experimental do meu trabalho, tanto na parte braçal como também nos momentos de descontração.

Em geral, a todos que direta ou indiretamente contribuíram na realização desse trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS

cDNA – Ácido Desoxirribonucléico complementar

CTAB – Brometo de Hexatrimetilamino

DNA – Ácido Desoxirribonucléico

dNTP's – Desoxirribonucleosídeos Trifosfatado

dsDNA - Ácido Desoxirribonucléico fita dupla

Kb – Kilo bases

nm - nanômetros

PCR – Reação de Polimerase em Cadeia

RT-PCR – Reação da Polimerase em Cadeia transcriptase reversa

pb– Par(es) de Base(s)

RNA – Ácido Ribonucléico

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio

ssDNA - Ácido Desoxirribonucléico fita simples

Taq – Thermus Aquaticus

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Anatomia externa do camarão peneídeo.	20
Figura 2. Anatomia interna do camarão peneídeo.	21
Figura 3. Espécimes de <i>L. vannamei</i> infectados pelo IHHNV, apresentando deformação no rosto (setas) (A) e acentuada redução do seu tamanho (setas) comparado com os camarões não infectados (B).	26
Figura 4. Localização das fazendas de cultivo do camarão <i>L. vannamei</i> , nos municípios de Ceará-Mirim, Tangará, Nísia-Floresta, Guamaré, Barra de Cunhaú e São Bento do Norte, no Rio Grande do Norte, nordeste brasileiro.	33
Figura 5. Espécime de <i>L. vannamei</i> .	35
Figura 6. Coleta da hemolinfa no camarão <i>L. vannamei</i> .	36

ARTIGO I

Fig.1. Histology of IHHNV-infected <i>L. vannamei</i> . H&E staining of gonad showing pathognomonic eosinophilic Cowdry A (arrows).	50
Fig. 2. Eletrophoresed 8% polyacrilamide gel of A: PCR amplification product of 185 bp IHHNV- specific fragment. B: PCR amplification product of 339 bp β -actin- fragment of <i>Litopenaeus vannamei</i> as DNA extraction control. Lane 1: 100bp DNA ladder, lane 2: negative control for IHHNV, lane 3: positive control, lane 4-9: samples of IHHNV-positive <i>L. vannamei</i> , lane 10: sample of IHHNV-negative <i>L. vannamei</i> .	51
Fig. 3. IHHNV prevalences on seven farms located in northeastern Brazil. Each bar represents the mean value from six (farm F1), two (farm F2), one (farm F3), three (farm F4), seven (farm F5), four (farms F6 and F7) ponds. Asterisks over bars indicate farms with IHHNV prevalence significantly different from the mean prevalence.	52

ARTIGO II

Fig.1. 8% polyacrylamide gel electrophoresis of the PCR amplification product of 185 bp IHHNV- specific fragment detected in juvenile <i>L. vannamei</i> . Lane 1: 100 bp DNA ladder, lane 2: negative control (ultrapure water), lane 3: positive control (from IHHNV Kit, Diagxotics, USA), lanes 4-9: samples of IHHNV-positive <i>L. vannamei</i> , lane 10: sample of IHHNV-negative <i>L. vannamei</i> .	68
---	----

Fig.2. IHHNV infection rate in *L. vannamei* in relation to (A) dissolved oxygen concentration and (B) temperature in ponds at the time of collection ($P>0.05$). 70

Fig.3. The IHHNV infection rate in *L. vannamei* cultured in different levels of salinity. 71
*Indicates a significant difference ($P<0.001$).

Fig.4. Correlation between IHHNV infection rate in *L. vannamei* and different salinity 71
($P<0.01$).

Fig.5. Correlation between IHHNV infection rate in *L. vannamei* and the rainfall index 72
($P>0.05$).

Fig.6. The IHHNV infection rate in *L. vannamei* cultured in different stocking densities 73
levels. * Indicates a significant difference ($P<0.01$).

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	13
ABSTRACT	15
1. INTRODUÇÃO	17
1.1. Considerações Gerais	18
1.2. <i>Litopenaeus vannamei</i>	19
1.2.1. Características morfológicas	20
1.2.2. Sistema de defesa	21
1.3. A saúde do camarão	22
1.3.1. Influência de fatores ambientais na saúde do camarão	22
1.3.2. Doenças infecciosas do camarão	25
1.4. Método de diagnóstico de infecções	27
1.5. Medidas de controle e prevenção das enfermidades	28
2. OBJETIVOS DA PESQUISA	30
2.1. Objetivo geral	30
2.2 Objetivos específicos	30
3. MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1. Área de estudo	32
3.2. Caracterização da área em estudo	32
3.3. Taxonomia e descrição da espécie em estudo	34
3.4. Coleta do material	34
3.4.1. Coleta dos parâmetros ambientais	34
3.4.2. Coleta do camarão	35
3.4.2.1. Extração de DNA	36
3.4.2.2. Reação de Polimerase em Cadeia	37
3.4.2.3. Eletroforese para visualização do produto da PCR	38
3.4.2.4. Sequenciamento do fragmento específico do IHNV	38
3.4.2.5. Histopatologia	39
4.2. Análise estatística dos dados	39
5. RESULTADOS	40
Artigo I - Prevalence of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis	42

virus (IHHNV) in *Litopenaeus vannamei* cultured in northeastern Brazil.

Abstract	44
1. Introduction	45
2. Materials and methods	46
3. Results	49
4. Discussion	52
References	55
Artigo II - The influence of salinity, temperature, dissolved oxygen, stocking density and rainfall on the infection hypodermal and haematopoietic necrosis (IHHN) in <i>Litopenaeus vannamei</i> reared in ponds.	59
Abstract	61
1. Introduction	62
2. Materials and methods	65
3. Results	68
4. Discussion	74
References	77
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87

RESUMO

A carcinicultura é a área da aquicultura mais rentável do Rio Grande do Norte (RN), que é um dos maiores produtores do Brasil. Porém, as infecções que acometem os camarões vêm causando importantes perdas econômicas. A infecção é resultado da interação entre o camarão, o meio ambiente e o patógeno. A alteração desses fatores, pode levar a uma situação de estresse e suscetibilidade à infecções oportunistas. Uma dessas infecções, causada pelo vírus da Infecção Hipodermal e Necrose Hematopoiética (IHHNV), encontra-se largamente distribuída em vários países e apresenta uma grande variedade de hospedeiros. Para otimizar as condições de produção do camarão de cultivo *Litopenaeus vannamei*, a espécie mais cultivada no Brasil, é necessário compreender os efeitos dos fatores ambientais na suscetibilidade dessa espécie às infecções. O presente estudo teve por objetivo determinar a prevalência do IHHNV e investigar a influência de fatores ambientais como a salinidade, temperatura, densidade de estocagem, oxigênio dissolvido e pluviosidade na incidência do IHHNV em fazendas de cultivo do *L. vannamei*, no estado do RN. Para determinar a prevalência do IHHNV foram utilizados 1089 amostras de *L. vannamei* coletados de sete fazendas. Para a realização do estudo sobre a influência de fatores ambientais 525 amostras do camarão *L. vannamei* foram coletadas em oito fazendas localizadas em regiões de águas oligohalinas (0-1%), mesohalinas (21-30%) e hipersalinas (38-57%), utilizando sistema de densidade de estocagem extensivo (≤ 15 camarões/m²), semi-intensivo (18-27 camarões/m²) e intensivo (>30 camarões/m²). A infecção pelo IHHNV foi determinada em pleópodos e hemolinfa utilizando a reação da polimerase em cadeia (PCR). Os fatores ambientais foram registrados durante a coleta dos animais nos viveiros das fazendas, utilizando um refratômetro para medir a salinidade e um medidor multi-parâmetro para medir a temperatura e o oxigênio dissolvido da água. A prevalência do IHHNV no RN foi 43% (468 camarões infectados de 1089), variando nas diferentes fazendas. Nas sete fazendas estudadas, a prevalência do IHHNV variou de 18,6% a 54,8%. As taxas de infecção nas fazendas de águas oligohalinas, mesohalinas e hipersalinas foram respectivamente 43,10% (125/290), 31,2% (15/48) e 24,6% (46/187) e foi significativamente maior em camarões cultivados em águas oligohalinas ($P<0,001$). As taxas de infecção nos viveiros de sistema extensivo, semi-intensivo e intensivo foram respectivamente, 28,7%, 28,28% e 47,84% e foi significativamente maior em alta densidade de estocagem ($P<0,001$). Neste trabalho foi encontrado uma alta prevalência do IHHNV e um efeito significativo da salinidade e da densidade de estocagem, mas não da

temperatura, pluviosidade e concentração do oxigênio dissolvido sobre a taxa de infecção pelo IHHNV no camarão *L. vannamei* cultivado no Nordeste brasileiro.

Palavra-chave: Fatores ambientais; vírus da infecção hipodermal e necrose hematopoiética (IHHNV); taxa de infecção; *Litopenaeus vannamei*; PCR.

ABSTRACT

The shrimp farming industry is the most profitable area of the aquaculture at Rio Grande do Norte (RN) state, which is one of the largest producers in Brazil. However the infections that affect the shrimp cause major economic losses. The infection is a result of the interaction between the shrimp, the environment and pathogen. The change of these factors may lead to a condition of stress and susceptibility to opportunistic infections. One of these infections caused by Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus (IHHNV) is widely distributed in several countries and affects a wide range of hosts. To optimize conditions for production of *Litopenaeus vannamei* shrimp, the more species cultivated in Brazil, it is necessary to understand the effects of environmental factors in the susceptibility of this species to infections. The aim of this study was to determine the IHHNV prevalence and to investigate the influence of environmental factors as salinity, temperature, stocking density, dissolved oxygen and rainfall in the IHHNV incidence in *L. vannamei* grown in farms, in the RN state. To determine the IHHNV prevalence were used 1089 samples of *L. vannamei* collected in seven farms. To perform the study about the influence of environmental factors, 525 samples of *L. vannamei* shrimp were collected in eight farms located in regions of low (0-1%), medium (21-30%) and high (38-57%) salinity, using extensive (≤ 15 shrimp/m²), semi-intensive (18-33 shrimp/m²) or intensive (>36 shrimp/m²) stocking density systems. The IHHNV infection was determined in pleopod and hemolymph using the polymerase chain reaction (PCR). The environmental factors were recorded during the collection of animals, using a refractometer to measure the salinity and a multi-parameter meter to measure the temperature and concentration of dissolved oxygen in the water. The IHHNV prevalence in RN was 43% (468 infected shrimp out of 1089), varying on different farms. On the seven farms studied, IHHNV prevalence ranged from 18.6% to 54.8%. The infection rates in the shrimp cultured in low, medium and high salinity were respectively 43.10% (125/290), 31.2% (15/48) and 24.6% (46/187) and was significantly higher in shrimp grown in low salinity ($P<0.001$). The infection rates in ponds of extensive, semi-intensive and intensive systems were respectively, 28.7%, 28.28% and 47.84%, and was significantly higher in high stocking densities ($P<0.001$). This study indicated a high IHHNV prevalence and a significant effect of salinity and stocking density, but not of the temperature, rainfall and dissolved oxygen on the IHHNV infection rate in the *L. vannamei* shrimp cultured in the northeastern Brazil.

Keywords: Environmental factors; infection hypodermal and haematopoietic necrosis virus (IHHNV); infection rate; *Litopenaeus vannamei*; PCR.

An aerial photograph of a large industrial complex, likely a salt or chemical processing plant. The image shows a network of numerous rectangular ponds of varying sizes, some filled with water and others with a light-colored, possibly mineral-rich substance. These ponds are interconnected by a complex system of pipes and channels. The surrounding land is mostly flat and appears to be covered in green vegetation, possibly salt marshes or scrubland. The overall layout is highly organized and repetitive.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Considerações Gerais

A aquicultura tem crescido bastante no mundo durante os últimos 50 anos, tendo atingido uma produção de 59,4 milhões de toneladas em 2004. Esta atividade tem desempenhado um papel importante no desenvolvimento econômico de muitos países das Américas, em particular Brasil, Chile, Equador e México (FAO, 2006). Entre os diversos segmentos da aquicultura, a carcinicultura tem apresentado um ótimo crescimento (HERNÁNDEZ, 2000).

O Brasil possui um litoral adequado para o cultivo de camarão marinho e em particular, o litoral nordestino, com 7.800 ha de cultivo em operação e 300.000 ha propícios para a atividade, oferece as melhores condições para o desenvolvimento da carcinicultura (ROCHA, 2000).

O cultivo comercial de camarões marinhos na região nordeste do Brasil teve início na década de 70, com a introdução da espécie exótica *Marsupenaeus japonicus*, o maior desenvolvimento dessa atividade ocorreu com o domínio do ciclo reprodutivo e da produção em escala comercial de pós-larvas de espécies nativas *Farfantepenaeus brasiliensis*, *Farfantepenaeus subtilis* e *Litopenaeus schmitti*. No final da década de 80, utilizou-se cinco espécies de camarões, visando alcançar uma produção constante o ano todo: *Litopenaeus schmitti*; *Litopenaeus stylirostris*; *Litopenaeus vannamei*; *Farfantepenaeus penicillatus* e *Penaeus monodon*. *L. vannamei* apresentou um elevado grau de rusticidade, crescendo bem em uma grande gama de condições ambientais e apresentando níveis de produtividade e de competitividade muito superiores aos alcançados com as espécies até então cultivadas no país (BARBIERI; OSTRENSKY, 2002).

Segundo resultados do Censo de 2003, realizado pela ABCC (Associação Brasileira de Criadores de Camarão), o crescimento na carcinicultura brasileira é confirmado pela introdução de *L. vannamei*. O salto de produtividade passou de 1.051 kg/ha/ano em 1997 para 6.084 kg/ha/ano em 2003, representando um aumento de cerca de 500%. Cerca de 95% da produção nacional de camarões é proveniente das fazendas localizadas no Nordeste (PANORAMA DA AQÜICULTURA, 2004), onde o clima adequado, com relativa estabilidade e altas temperaturas, com pequena variação anual (22°C a 30°C), favorecem esta atividade econômica (QUAGLIA, 1993). A maior produção do Nordeste

está predominantemente concentrada nos estados do Rio Grande do Norte, Ceará, Bahia, Pernambuco, Piauí e Paraíba (PANORAMA DA AQÜICULTURA, 2004).

No litoral norte do Estado do RN, encontra-se um dos maiores pólos de produção de camarões em cativeiros do Brasil. As fazendas localizam-se nas margens dos estuários e lagoas costeiras, onde cultivam a espécie *L. vannamei*. A atividade se desenvolve, principalmente, em sete estuários do litoral potiguar, apresentando características distintas, sendo eles os estuários dos rios Apodi-Mossoró; Piranhas-Açú; Galinhos-Guamaré; Ceará-Mirim; Potengi; Guaraíras e Cunhaú/Curimataú (ALFREDO, 2003).

A carcinicultura no Rio Grande do Norte tem alcançado elevados índices na exportação do camarão *L. vannamei* (PANORAMA DA AQUICULTURA, 2000). Em 2003, o estado liderou o mercado brasileiro, seguido pelos estados do Ceará e Bahia (PANORAMA DA AQÜICULTURA, 2004). Segundo dados do Secex (Secretaria de Comércio Exterior, 2004), o RN foi responsável por 41% do valor exportado pelo Nordeste e em 2005 foi também o maior exportador do Brasil, superando o Ceará, com uma produção de 15.962 toneladas. Porém, em 2006 a produção caiu para 10.899 toneladas, tendo sido o Ceará o maior exportador (ABCC, 2007).

Portanto, a carcinicultura no Rio Grande do Norte representa uma atividade econômica capaz de promover a diversificação da atividade industrial no estado e região, gerando divisas, bem como aumentando a oferta de empregos e o suprimento de alimentos. O sucesso dessa atividade não depende apenas das características ambientais, mas também de medidas necessárias à manutenção da qualidade do produto (MORE; FRELIER, 2002). As doenças infecciosas são um dos fatores responsáveis pela baixa qualidade do produto, afetando a exportação, devido às barreiras sanitárias exigidas pelos países importadores, além de causar grandes perdas econômicas (LIGHTNER; REDMAN, 1998; BACHÈRE, 2000).

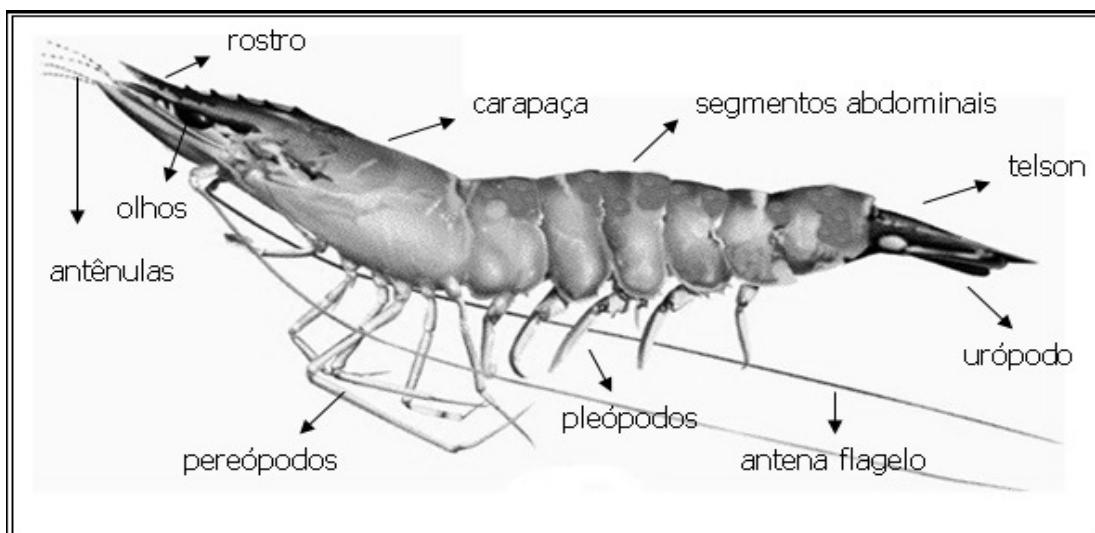
1.2. *Litopenaeus vannamei*

L. vannamei, conhecido como “camarão branco”, é um crustáceo da ordem Decapoda da família Penaeidae. Essa espécie é de grande importância no cultivo semi-intensivo e intensivo em muitas fazendas da América Latina (PONCE-PALAFOX *et al.*, 1997), além de contribuir com mais de 90% da produção total das Américas (LIGTNER, 2003).

Espécie endêmica do Oceano Pacífico, sendo encontrada de Sonora (México) até Tumbes (norte do Peru) (BROCK; MAIN, 1994; BARBIERI; OSTRENSKY, 2002).

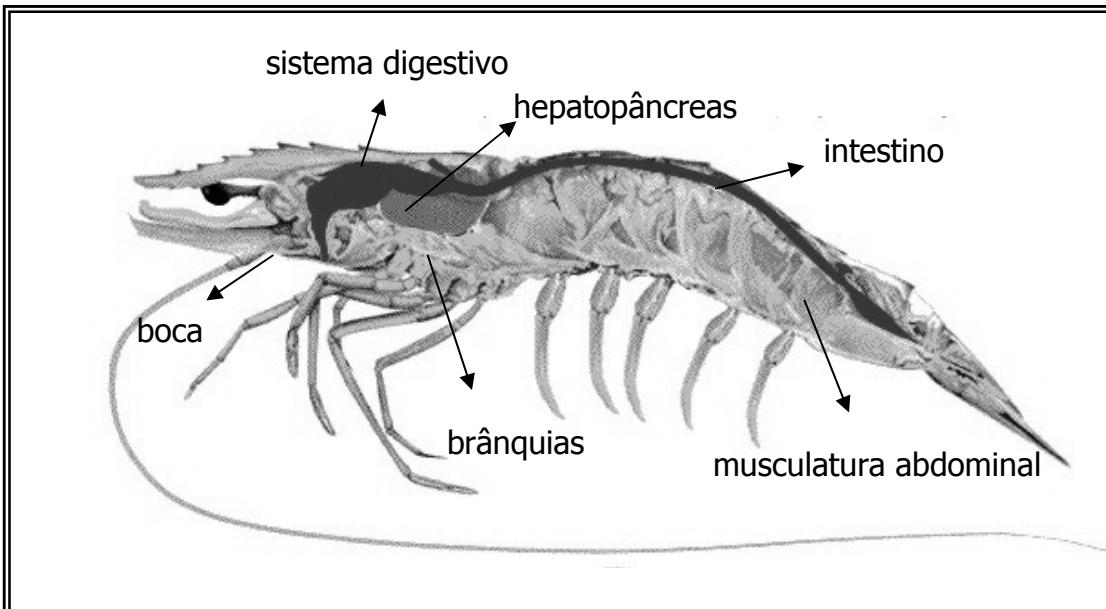
1.2.1. Características morfológicas

L. vannamei possui o corpo alongado, comprimido lateralmente, coberto por um exoesqueleto calcificado, segmentado e dividido em duas regiões: ocefalotórax (cabeça e tórax fundidos) e o abdômen. Na porção anterior docefalotórax, estão presentes a carapaça que protege os principais órgãos funcionais (as brânquias, o estômago, o coração e hepatopâncreas), os olhos pedunculados, um par de antenas e antênulas, e o rostro, estrutura de defesa do animal. Na região ventral docefalotórax são encontrados os maxilípedes e pereiópodos, estruturas de detecção, captura e manipulação do alimento. O abdômen subdividido em segmentos estende-se desde a parte final docefalotórax até a porção terminal do animal onde se encontra o telson. Na região ventral do abdômen estão localizadas estruturas natatórias (os pleópodos e os urópodos), o apêndice reprodutivo dos machos e parte do cordão nervoso. Além disso, é no abdômen que se concentra a maior parte da musculatura do camarão (Figura 1 e 2) (BROCK; MAIN, 1994; NUNES; MARTINS, 2002).



Fonte: Modificada de WAS (1999).

Figura 1. Anatomia externa do camarão peneídeo.



Fonte: Modificada de WAS (1999).

Figura 2. Anatomia interna do camarão peneídeo.

1.2.2. Sistema de defesa

Os crustáceos possuem um sistema circulatório aberto onde a hemolinfa transporta hemocianina, proteína coagulativa, hemócitos e outros componentes humorais (RODRÍGUEZ; MOULLAC, 2000). A sua integridade corpórea é mantida por um sistema imunológico e uma cutícula rígida que funciona como barreira física contra agressões e invasão de patógenos. Embora sejam desprovidos do sistema imune adquirido, específico dos vertebrados, são capazes de colonizar habitats, muitas vezes ricos em microorganismos e outros patógenos, resistindo de forma eficiente às infecções (LEE; SÖDERHÄLL, 2002; BARRACCO, 2004). O sistema imune inato encontrado nesse animal é baseado em hemócitos (WICKINS; O'C LEE, 2002), células que removem partículas estranhas da hemolinfa através da fagocitose ou encapsulação, e no processo de rápida cicatrização, prevenindo a perda da hemolinfa e evitando a entrada de partículas estranhas através de feridas expostas (SÖDERHÄLL; CERENIUS, 1992). Os hemócitos são normalmente ativados por proteínas e carboidratos específicos da superfície celular de bactérias, fungos e protozoários patogênicos. Porém sua capacidade para reconhecer vírus é limitada, pois a maioria dos vírus apresentam uma superfície molecular semelhante à das células do hospedeiro (WICKINS; O'C LEE, 2002). Os hemócitos dos crustáceos são produzidos em tecidos hematopoiéticos, geralmente constituídos por lóbulos celulares densos, situados na região epigástrica (região dorsal e dorso-lateral do estômago e do intestino anterior),

enquanto nos camarões peneídeos estes tecidos também são encontrados na base dos maxilípedes (BARRACCO, 2004).

A carapaça é a primeira linha de defesa dos crustáceos, contra a invasão microbiana. Quando há quebra dessa barreira física por algum patógeno, hemócitos e proteínas plasmáticas reconhecem o corpo estranho, ocorrendo coagulação da hemolinfa na tentativa de imobilizar o invasor, e os hemócitos circulantes podem encapsular ou formar nódulos melanizados no local em que os patógenos se encontram (SODERHALL; CERENIUS, 1992). A resistência natural dos hospedeiros contra a infecção pode variar de acordo com o estágio de vida, de muda, caracteres genéticos e o estresse a que o organismo é exposto (WICKINS; O'C LEE, 2002).

1.3. A saúde do camarão

A saúde dos camarões cultivados é resultante da sua interação com o ambiente, e patógenos. A alteração de um ou mais desses fatores, pode levar a uma situação de estresse e suscetibilidade à doenças oportunistas (BROCK; MAIN, 1994; LIGHTNER; REDMAN, 1998; BARBIERI; OSTRENSKY, 2001). Os componentes ambientais envolvem fatores abióticos como os extremos de pH e temperatura, baixas concentrações de oxigênio dissolvido, saturação de gases (BROCK; MAIN, 1994), mudanças abruptas na salinidade (BROCK; MAIN, 1994; LE MOULLAC; HAFFNER, 2000; LIU *et al.*, 2006), altas concentrações de compostos nitrogenados (BARBIERI; OSTRENSKY, 2001) e a presença de substâncias tóxicas, incluindo metais pesados e pesticidas, que influenciam a sobrevivência dos organismos aquáticos. Com relação aos fatores bióticos temos a propagação de bactérias oportunistas, protozoários e microalgas; aquisição de pós-larvas infectadas (NUNES; MARTINS, 2002), densidade de estocagem nos viveiros (KAUTSKY *et al.*, 2000; LI *et al.*, 2006; JOHNSTON *et al.*, 2006), fatores genéticos, estado nutricional e imunológico dos camarões (BARBIERI; OSTRENSKY, 2001; MORE; FRELIER, 2002).

1.3.1. Influência de fatores ambientais na saúde do camarão

As práticas de manejo exercidas nas fazendas influenciam a qualidade físico-química da água (MILSTEIN *et al.*, 2005) e desta forma afetam o metabolismo,

crescimento, muda e sobrevivência dos camarões (LE MOULLAC; HAFFNER, 2000). As altas incidências de enfermidades ocorrem quando não são seguidas as práticas de manejo sustentável, adequadas para uma boa condição de saúde nos animais cultivados (HERNÁNDEZ; NUNES, 2001). A manutenção da qualidade da água permite reduzir o estresse ambiental, mantendo populações estáveis de microalgas e baixas concentrações de substâncias tóxicas que podem afetar o comportamento e a fisiologia do camarão (MORE; FRELIER, 2002).

A incidência de enfermidades é fortemente influenciada pela intensidade da produção do sistema de cultivo (KAUTSKY *et al.*, 2000), sendo este classificado em sistema extensivo (50-500 kg/ha/ano), semi-intensivo (500-5000 kg/ha/ano) e intensivo (5000-10000 kg/ha/ano) (BROCK; MAIN, 1994). Muitas fazendas comerciais encorajadas pelo aumento do preço e demanda de mercado estocam de 100.000-250.000 camarões/ha (extensivo a semi-intensivo) a 300.000-6.000.000 camarões/ha (intensivo a super-intensivo) (LI *et al.*, 2006). O confinamento de animais com altas densidades de estocagem, no sistema intensivo, cria uma situação de estresse, propiciando o estabelecimento de doenças (BROCK; MAIN, 1994) e favorecendo a rápida transmissão de patógenos pela água através do canibalismo (BARRACO, 2004; ARNOLD *et al.*, 2006).

A densidade de estocagem é um importante fator no cultivo de camarão, afetando o crescimento do animal, sobrevivência (RAY; CHIEN, 1991; MARTIN *et al.*, 1998; ARNOLD *et al.*, 2006) e produção (ALLAN; MAGUIRE, 1992). A produção do peneídeo cresce de acordo com o aumento da densidade de estocagem, embora ocorra a redução do crescimento dos animais cultivados em altas densidades. A sobrevivência do camarão *Fenneropenaeus chinensis* é afetada quando a densidade de cultivo é maior que 200 camarões/m³ (LI *et al.*, 2006). De acordo com Ray; Chien (1991), a taxa de crescimento do camarão *Penaeus monodon* foi maior no cultivo com 72 camarões/m² do que com 144 e 108 camarões/m², enquanto que a taxa de sobrevivência foi menor nos cultivos com 144 camarões/m².

As mudanças climáticas também atuam de forma direta na produção dos camarões de cultivo. As águas que abastecem os viveiros são influenciadas pela pluviosidade da região, influenciando a temperatura, a salinidade, a concentração de matéria orgânica dissolvida e a disponibilidade do alimento natural. A luz tem um papel essencial na produção primária aquática e é um fator limitante no crescimento do fitoplâncton, alimento

natural nos viveiros de camarão (PONCE-PALAFIX, *et al.*, 1997; LE MOULLAC; HAFFNER, 2000; GAREN; MARTIN, 2002; MILSTEIN *et al.*, 2005).

A temperatura da água afeta diretamente o metabolismo, consumo de oxigênio, crescimento, muda e sobrevivência dos camarões, além de influenciar outros parâmetros ambientais como salinidade e oxigenação da água (LE MOULLAC; HAFFNER, 2000). Estudos relatam que o aumento da temperatura da água influencia o aumento do número de hemócitos no camarão de água doce *Macrobrachium rosenbergui*, aumentando sua capacidade imunológica e consequentemente sua resistência a patógenos (CHENG; CHEN, 2000).

A salinidade atua diretamente no metabolismo dos crustáceos, induzindo gasto energético para manter a homeostase corporal. Todavia, em organismos eurialinos a energia requerida para a regulação osmótica pode ser relativamente pequena. Contudo em condições inapropriadas para a saúde do animal como infecção viral, o estresse provocado pela alta salinidade retarda o crescimento, favorecendo a infecção (BRAY *et al.*, 1994; LE MOULLAC; HAFFNER, 2000). O efeito da salinidade na resposta imune de camarão foi observada no estudo de Cheng; Chen (2000), onde o número de hemócitos do camarão de água doce *Macrobrachium rosenbergii* foi diretamente proporcional a salinidade.

Segundo Ponce-Palafox *et al.* (1997), a taxa de sobrevivência e crescimento da pós-larva de *L. vannamei* depende da temperatura, salinidade e da interação temperatura-salinidade. Os seus resultados mostram que o *L. vannamei* têm melhor taxa de sobrevivência e crescimento entre as temperaturas de 28 a 30°C e salinidades de 33 a 40‰. De acordo com a ABCC (2005), a faixa ideal da temperatura e salinidade nos viveiros das fazendas é de 26 a 32°C e de 15 a 25‰, respectivamente.

O oxigênio dissolvido é outro importante fator limitante na aquicultura (ZHANG *et al.*, 2006), sendo o valor recomendado nos viveiros maior que 5 mg/L (ABCC, 2005). O oxigênio dissolvido na água dos viveiros depende da atividade do fitoplâncton, que é o maior produtor de oxigênio nesses ambientes. Porém a sua solubilidade dependente da temperatura, salinidade e da pressão atmosférica (BARBIERI; OSTRENSKY, 2002). A baixa concentração de oxigênio dificulta a performance metabólica do camarão, podendo reduzir o seu crescimento, freqüência de muda e afetar seu sistema imune, como a contagem total de hemócitos (THC), além de causar morte (LE MOULLAC; HAFFNER, 2000). Jian *et al.* (2005) demonstrou que em *L. vannamei* exposto a níveis de hipoxia (3,5 e 2,0 mg/L), o número de seus hemócitos foram reduzidos, induzindo uma maior suscetibilidade a doenças infecciosas.

1.3.2. Doenças infecciosas do camarão

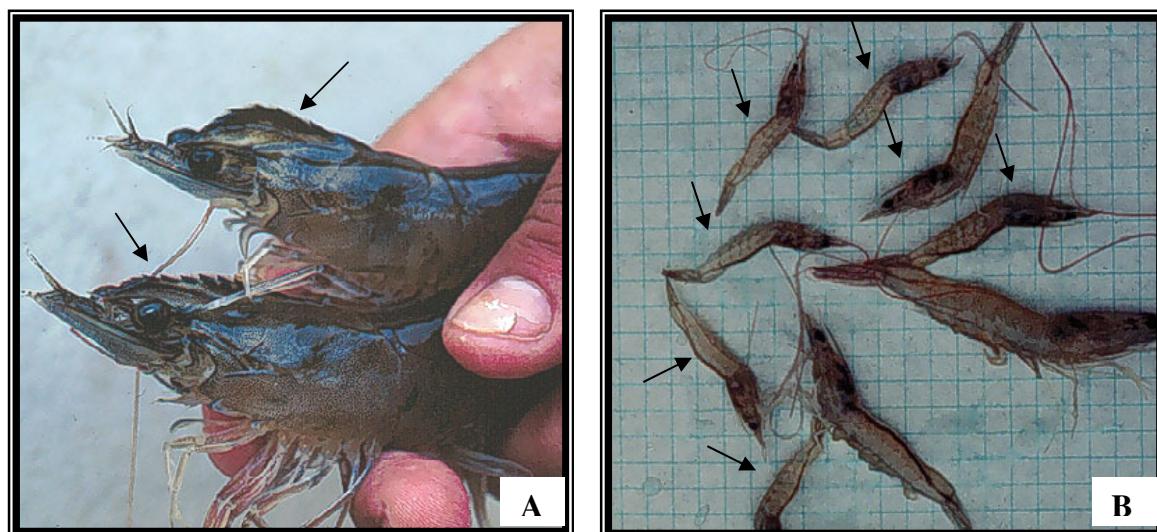
As variações ambientais induzem mudanças no estado imune dos crustáceos. Essas variações são frequentemente estressantes para o animal, resultando em uma redução da quantidade de hemócitos, ativação da profenoloxidase, índice de fagocitose e a liberação de radicais livres de oxigênio. O baixo número de hemócitos em circulação nos crustáceos está fortemente correlacionado com uma alta predisposição a enfermidades infecciosas (LE MOULLAC; HAFFNER, 2000).

No final dos anos 80 e na década de 90, as doenças infecciosas tiveram um efeito devastador no cultivo de camarão marinho, causando o colapso na produção de grandes países produtores. A partir de então, as enfermidades passaram a ser vistas como um obstáculo econômico e uma ameaça à viabilidade da atividade (NUNES; MARTINS, 2002).

As enfermidades infecciosas podem ser causadas por vírus, bactérias, fungos, protozoários e metazoários. Entre as infecções mais importantes destacam-se aquelas de etiologia viral e bacteriana (LIGHTNER; REDMAN, 1998; MARTINS, 2004). O Vírus da Cabeça Amarela (YHV) têm causado altas taxas de mortalidades em camarões cultivados no Sudoeste Asiático. Nas Américas, o Vírus da Infecção Hipodermal e Necrose Hematopoiética (IHHNV), o Vírus da Síndrome de Taura (TSV) e o Vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV) (ROCHA, 2000) têm provocado grandes perdas econômicas (BROCK; MAIN, 1994; LIGHTNER, 2003). O Vírus da Mionecrose Infecciosa (IMNV), descoberto no Nordeste brasileiro, representa um grande problema para a carcinicultura da região (NUNES *et al.*, 2004). As doenças bacterianas mais comuns são as provocadas por bactérias extracelulares gram-negativas do gênero *Vibrio* (WICKINS; O'C LEE, 2002) e por bactérias intracelulares gram-negativas que causam a Hepatopancreatite Necrosante (NHP) (LOY *et al.*, 1996; RÍO-RODRÍGUES *et al.*, 2006).

Dentre as enfermidades de etiologia viral a Infecção Hipodermal e Necrose Hematopoiética (IHHN) é uma das mais severas doenças no cultivo de camarão peneídeo (LIGHTNER *et al.*, 1983a; LIGHTNER; REDMAN, 1991; NUNAN *et al.*, 2000). Está largamente distribuída em vários países, apresentando variação nucleotídica entre espécimes isolados em diferentes áreas geográficas (TANG *et al.*, 2003). Inicialmente foi detectado no Havaí em 1981, em populações juvenis do *L. stylirostris* (LIGHTNER *et al.*, 1983ab; NUNAN *et al.*, 2000), desde então o vírus tem sido detectado em vários estágios de vida nos peneideos da América, Oceania, leste e sudeste Asiático (LIGHTNER, 1996b; TANG

et al., 2003). Esse vírus possui 22 nm de diâmetro, ssDNA genômico de aproximadamente 4,1 Kb, não envelopado possuindo capsídeo icosaédrico e pertecendo a família *Parvoviridae* de acordo com suas características fisico-químicas e morfológicas (BONAMI *et al.*, 1990; YANG *et al.*, 2007). Com base nas características genômicas o vírus está fortemente relacionado com o Mosquito Brevidensoviruses (SHIKE *et al.*, 2000). O IHHNV causa perdas catastróficas no *L. stylirostris*, com mortalidade acima de 90% (LIGHTNER *et al.*, 1983ab; HSIEH *et al.*, 2006), enquanto que em *L. vannamei* o vírus causa uma acentuada redução no tamanho e perda de equilíbrio, deformação na cutícula, afetando o rostro (Figura 3), antenas, áreas da região torácica e abdominal, características da enfermidade conhecida como RDS (*Runt Deformity Syndrome*) (KALAGAYAN *et al.*, 1991; BROCK; MAIN, 1994; PRIMAVERA; QUINITIO, 2000). A redução do tamanho tem um significativo impacto na produção do *L. vannamei* com perdas econômicas que variam de 10% a 50% em comparação com o cultivo livre de IHHNV (LIGHTNER; REDMAN, 1998). Nas fazendas, o IHHNV pode ser transmitido horizontalmente ou verticalmente através da ingestão de indivíduos ou ovos infectados, respectivamente (LOTZ, 1997; MOTTE *et al.*, 2003). A prevalência do IHHNV no camarão *L. vannamei* selvagem capturado na Costa do Panamá foi de 27% (NUNAN *et al.*, 2001). No camarão selvagem e cultivado no Equador, a prevalência de IHHNV determinada por nested-PCR foi, respectivamente 47% e 63% (MOTTE *et al.*, 2003) e na China foi de 59,5% (YANG *et al.*, 2007).



Fonte: Modificada de Lightner (1996b)

Figura 3. Espécimes de *L. vannamei* infectados pelo IHHNV, apresentando deformação no rostro (seta) (A) e acentuada redução do seu tamanho (setas) comparado com os camarões não infectados (B).

1.4. Método de diagnóstico de infecções

A presença das enfermidades nas fazendas de cultivo de camarão determina a importância da implementação de medidas de biossegurança. A utilização de protocolos eficientes de diagnóstico possibilita agilizar a tomada de decisões na fazenda para a contenção e/ou exclusão da doença (NUNES; MARTINS, 2002). Procedimentos para diagnosticar o estado de saúde do camarão, servem para detectar precocemente problemas no cultivo, permitindo que o produtor tome as medidas cabíveis para salvar a população de camarão, como também comprovar ausência de patógenos, necessária à obtenção de certificado sanitário exigido para a exportação do produto.

O diagnóstico de doenças em organismos aquáticos é constituído de um conjunto de observações de campo e testes de laboratório, como exame à fresco, quadro clínico, histopatologia, microscopia eletrônica, identificação microbiológica, métodos sorológicos e moleculares (LIGHTNER; REDMAN, 1998; NUNES; MARTINS, 2002). A infecção pelo IHHNV em tecidos de camarões tem sido detectada pelo monitoramento de sinais clínicos, métodos histológicos, e técnicas moleculares como hibridização *in situ* (LIGHTNER; REDMAN, 1998; DHAR *et al.*, 2001), dot blot (CARR *et al.*, 1996), PCR (NUNAN *et al.*, 2000), real-time PCR (DHAR *et al.*, 2001; TANG; LIGHTNER, 2001) e PCR quantitativa por detecção colorimétrica e análise de imagem (QUÉRÉ *et al.*, 2002).

A determinação do genoma viral em animais infectados tem sido um dos mais importantes meios para o monitoramento das doenças de camarão, sendo também conveniente na detecção de infecções assintomáticas (NUNES; MARTINS, 2002). Dentre as diferentes técnicas moleculares comumente utilizadas na detecção genômica dos patógenos a PCR, reações de polimerase em cadeia, tem grande importância no diagnóstico, devido à alta especificidade e sensibilidade. A PCR permite a detecção e amplificação do DNA do patógeno, mesmo quando este está em baixo número (NUNAN *et al.*, 2000), incapaz de desenvolver os sintomas característicos da enfermidade. A RT-PCR técnica do mesmo princípio do PCR, permite a detecção e amplificação do RNA do patógeno apresentando uma etapa adicional onde se transforma o RNA em cDNA, utilizando a enzima transcriptase reversa (TANG; LIGHTNER, 2001).

Desta forma, é necessário desenvolver métodos de diagnósticos rápidos e sensíveis para detectar a presença de patógenos, mesmo nos animais sem sinais clínicos da doença (NUNES; MARTINS, 2002). A utilização de um protocolo alternativo, reações da

polimerase em cadeia, possibilitará um baixo custo em comparação ao diagnóstico baseado em kits importados, tornando essa técnica mais acessível ao pequeno produtor.

1.5. Medidas de controle e prevenção das enfermidades

Considerando que os camarões não possuem imunidade específica e memória imunológica que possibilitem a indução de imunidade mediante a vacinação contra as infecções (LEE; SODERHALL, 2002; BARRACO, 2004), torna-se necessário a implementação de medidas de biossegurança e manejo que venham prevenir e controlar as infecções nas fazendas ou mesmo reduzir os fatores de estresse durante o cultivo (NUNES; MARTINS, 2002).

Segundo Cárdenas (2001), novos tratamentos não convencionais, dispensando o uso indiscriminado de antibióticos ou de produtos químicos, são utilizados no controle das enfermidades de camarões de cultivo. Agentes infecciosos, em geral, não são completamente eliminados do viveiro, sendo importante compreender o equilíbrio das complexas relações entre comunidades de microrganismos e desta forma controlar a incidência do patógeno. Dentre os métodos utilizados para controlar infecções, cabe destacar o uso de cultivos probióticos para melhorar as condições do meio, o uso de imunoestimulantes como beta-glucanas, lipopolissacarídeos e peptídeos componentes da parede celular de fungos e bactérias, que são adicionadas no alimento dos crustáceos para estimular seu sistema de defesa (RAA *et al.*, 2000; WICKINS; O'C LEE, 2002). Além desses, também contribuem para o controle de infecções o manejo que envolve a utilização de densidade de povoamento adequada, o controle da qualidade da água nos viveiros, reduzindo os fatores de estresse (oxigênio insuficiente, mudanças extremas ou rápidas na salinidade e temperatura) durante o cultivo (MORE; FREPLIER, 2002; ABCC, 2005). Com estas tendências de manejo, se busca favorecer a imunidade dos indivíduos, atuando na resistência natural da espécie e minimizando os pontos críticos da carcinicultura, como o uso de produtos químicos e fármacos que causam resistência do patógeno e afetam o meio ambiente (CÁRDENAS, 2001).

Muitos animais podem sobreviver por todo o período de cultivo infectados por um vírus e não expressar a doença. Contudo a alteração de algum fator ambiental pode converter a infecção latente para a forma clínica (LIU *et al.*, 2006), através da replicação viral (KAUTSKY *et al.*, 2000). Estudos comprovam que mudanças bruscas de salinidade atuam na rápida proliferação do vírus WSSV no camarão *Fenneropenaeus chinensis* (LIU

et al., 2006) e a temperatura de 32°C reduz a replicação de IHNV no *L. vannamei* (MONTGOMERY-BROCK *et al.*, 2007).

As informações disponíveis de estudos experimentais com o camarão peneídeo não são sempre consistentes com o observado no campo. Além de que, estudos de campo sobre a influência de fatores abióticos e bióticos na prevalência de infecções no *L. vannamei* são bastante escassos. Para entender as condições desfavoráveis do ambiente relacionados com a incidência de doenças na espécie *L. vannamei*, é necessário investigar os efeitos dos fatores ambientais como salinidade, temperatura, densidade de estocagem, oxigênio dissolvido e pluviosidade na prevalência de infecções nos camarões de cultivo.

2. OBJETIVOS DA PESQUISA

2.1. Objetivo geral

Investigar a influência de fatores bióticos e abióticos na incidência do vírus da Infecção Hipodermal e Necrose Hematopietica (IHHNV) no camarão *Litopenaeus vannamei* em fazendas de cultivo no estado do Rio Grande do Norte (RN).

2.2. Objetivos específicos

- Determinar a taxa de infecção pelo IHHNV em camarões *L. vannamei*, coletados em fazendas do RN, através da Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) e Histopatologia. (Artigo I)

- Verificar a influência da salinidade, densidade de estocagem, temperatura, oxigênio dissolvido e pluviosidade sobre a infecção do camarão *L. vannamei* pelo IHHNV em viveiros de cultivo. (Artigo II)



MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Área de Estudo

Para a realização desse trabalho foram coletadas amostras do camarão branco juvenil da espécie *L. vannamei* em oito fazendas comerciais de cultivo, do Rio Grande do Norte, nordeste brasileiro, localizado de $4^{\circ}48'.$ Sul a $6^{\circ}56'.$ Sul e $38^{\circ}33'.$ Oeste a $35^{\circ}03'.$ Oeste. Segundo a resolução do CONAMA nº 274, as regiões de coleta se estendem em áreas de águas desde oligo a hipersalina.

3.2. Caracterização da área em estudo

Cerca de 60% do Estado do Rio Grande do Norte predomina o clima semi-árido. São regiões sujeitas à seca e com maior influência dos ventos alísios secos do Nordeste, que incidem no Litoral Norte e se interiorizam pelo território potiguar. O clima úmido e sub-úmido é predominante no Litoral Oriental do Estado, onde os ventos alísios e úmidos do sudeste nesta região amenizam a ação do sol. A temperatura média anual do Estado do Rio Grande do Norte está em torno de $25,5^{\circ}\text{C}$, com máxima de $31,3^{\circ}\text{C}$ e mínima de $21,1^{\circ}\text{C}$, apresentando pouca variação por ano no número de horas de insolação (IDEMA, 2001).

As coletas foram realizadas no Litoral Norte e Oriental do Estado do Rio Grande do Norte. O Litoral Norte apresenta baixa precipitação pluviométrica, variando de 400 a 600 mm por ano, distribuída nos meses de janeiro a abril; e o Litoral Oriental com uma precipitação que varia entre 800 a 1.200 mm por ano, com chuvas distribuídas entre os meses de fevereiro a julho (IDEMA, 2001).

As fazendas em estudo estão localizadas nos municípios de Ceará-Mirim (Lat $05^{\circ}38'04$ Sul e Long $35^{\circ}25'32$ Oeste), Tangará (Lat $06^{\circ}11'58$ Sul e Long $35^{\circ}48'06$ Oeste), Nísia-Floresta (Lat $06^{\circ}05'28$ Sul e Long $35^{\circ}12'31$ Oeste) e Barra de Cunhaú (Lat $06^{\circ}19'05$ Sul e Long $35^{\circ}03'03$ Oeste) presentes no Litoral Oriental, e em Guamaré (Lat $05^{\circ}06'27$ Sul e Long $36^{\circ}19'13$ Oeste) e São Bento do Norte (Lat $05^{\circ}03'59$ Sul e Long $36^{\circ}02'17$ Oeste) localizados no Litoral Norte do Estado (Figura 4).

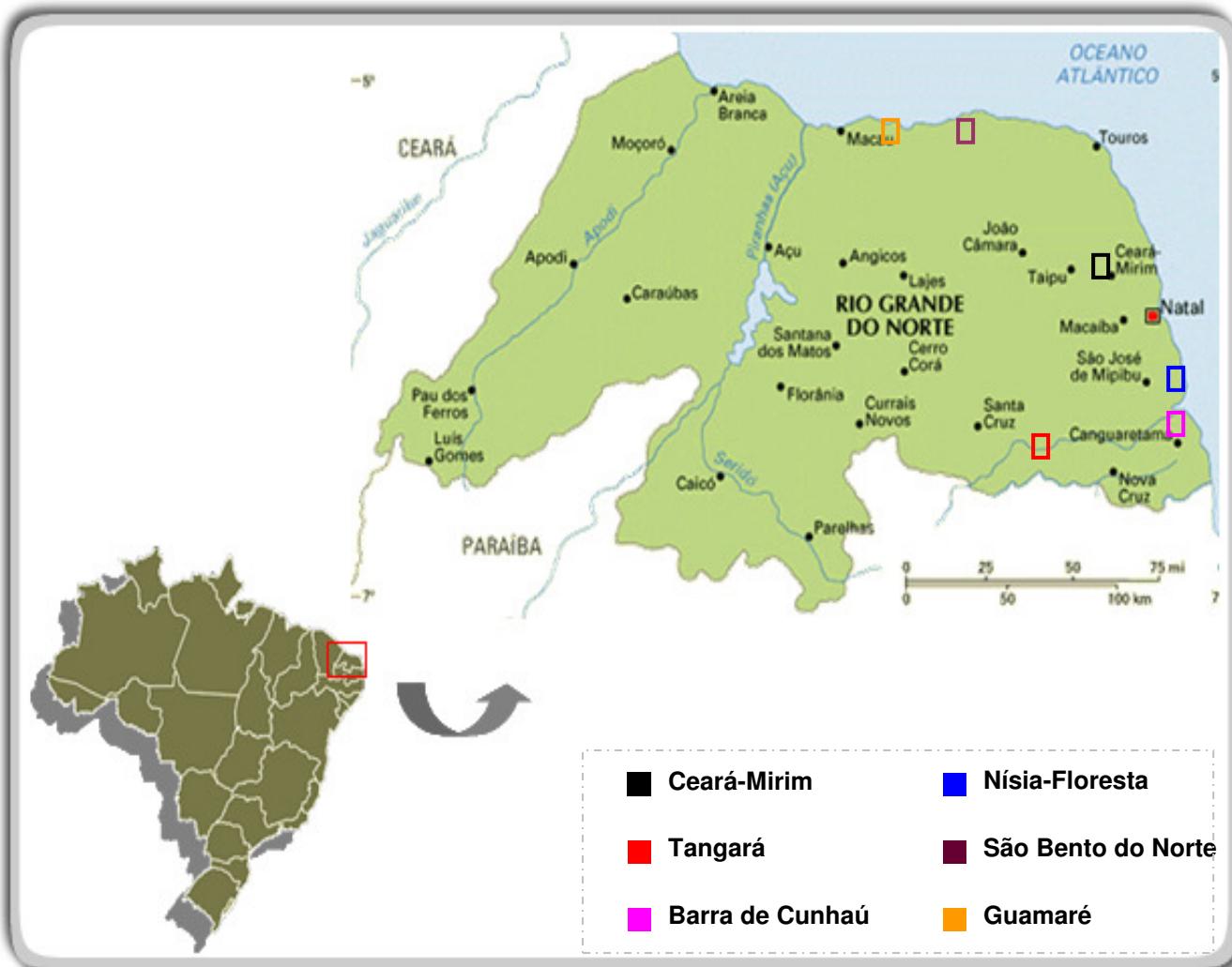


Figura 4. Localização das fazendas de cultivo do camarão *L. vannamei*, nos municípios de Ceará-Mirim, Tangará, Nísia-Floresta, Guamaré, Barra de Cunhaú e São Bento do Norte, no Rio Grande do Norte, Nordeste brasileiro.

A fazenda F1 do município de Ceará-Mirim é abastecida pelo rio Ceará-Mirim; em Tangará as águas do Açude Trairí são utilizadas na fazenda F2. Em Nísia-Floresta as águas do estuário Guaraíras abastece a fazenda F4; a fazenda F6 e F7 de Guamaré utilizam as águas do estuário Galinhos-Guamaré; em Barra de Cunhaú a F3 e F5 utiliza o estuário Curimataú e em São Bento do Norte a praia de Caiçara é a área de captação para a fazenda F8 (IBGE, 2007).

3.3. Taxonomia e descrição da espécie em estudo

De acordo com a classificação de Perez-Farfante; Kensley (1997), temos a seguinte classificação do *L. vannamei*:

Filo	Arthropoda
Sub filo	Crustacea
Classe	Malacostraca
Sub classe	Eumalacostraca
Superordem	Eucarida
Ordem	Decapoda
Subordem	Dendrobranchiata
Superfamília	Penaeoidea
Família	Penaeidae
Gênero	<i>Litopenaeus</i>
Espécie	<i>Litopenaeus vannamei</i>

Essa espécie possui grande capacidade de adaptação às mais variadas condições de cultivo, apresentando alto rendimento em elevada densidade populacional e em águas hiper a oligohalinas, além de suportar amplitudes térmicas de 9 a 34°C. A capacidade de suportar essas mudanças de temperatura e salinidade é um dos fatores que fazem com que essa espécie seja um atrativo para a aquicultura (BROCK; MAIN, 1994; PONCE-PALAFIX, 1997; BARBIERI; OSTRENSKY, 2002).

3.4. Coleta do material

3.4.1. Coleta dos parâmetros ambientais

Os parâmetros ambientais presentes nesse estudo foram registrados durante a coleta dos animais, no período da manhã, nos viveiros das fazendas. A temperatura da água, o oxigênio dissolvido e a salinidade foram obtidos através de uma sonda multiparâmetros (Horiba U-22). Os dados pluviométricos mensais dos municípios Ceará-Mirim, Tangará,

Barra de Cunhaú, Nísia-Forestá, Guamaré e São Bento do Norte em que localizam-se as fazendas, foram fornecidos pela EMPARN (Empresa de Pesquisa Agropecuária do RN). A densidade populacional de cada viveiro foi registrada segundo informações da gerência da fazenda.

3.4.2. Coleta do camarão

Para determinar a prevalência do IHNV foram utilizadas 1089 amostras de *L. vannamei* (Figura 5) coletados de sete fazendas. Para investigar a influência de fatores ambientais 525 amostras do camarão *L. vannamei* foram coletadas em oito fazendas. O número de viveiros estudados nas fazendas F1, F2, F3, F4, F5, F6, F7 e F8 foram respectivamente: 7, 3, 2, 1, 4, 1, 2 e 1.

Os animais foram coletados aleatoriamente dos viveiros, no período de agosto/2004 a abril/2007 e deles foram retirados os pleópodos e a hemolinfa para a extração de DNA e subsequente análise por PCR para determinar a taxa de infecção pelo IHNV. A taxa de infecção foi determinada pela porcentagem de camarões infectados pelo IHNV na amostra colhida (NUNAN *et al.*, 2001; MOTTE *et al.*, 2003; YANG *et al.*, 2007).



Fonte: Foto do autor.

Figura 5. Espécime de *L. vannamei*.

O pleópodo e 200 µl de hemolinfa de cada camarão foram separados com a finalidade de extrair o DNA. Com auxílio de uma pinça estéril foi retirado um dos pleópodos do segundo par, fixando-o com etanol 95%. Aproximadamente 200 µl de hemolinfa foram coletados por punção dos seios venosos com uma seringa estéril de 3 ml, contendo 200 µl de citrato de sódio 10% (Figura 6). A hemolinfa e o pleópodo foram mantidos a -20°C até o momento da extração de DNA.



Fonte: Foto do autor.

Figura 6. Coleta da hemolinfa no camarão *L. vannamei*.

3.4.2.1. Extração de DNA

A obtenção do DNA nos materiais coletados foi realizada conforme o protocolo modificado a partir de Sambrook *et al.* (1989). Inicialmente, as amostras coletadas foram descongeladas a temperatura ambiente. No caso dos pleópodos, o etanol 95% foi descartado e o tecido lavado duas vezes com solução TE 1X [Tris base 10 mM; EDTA 1 mM (Invitrogen, São Paulo - Brasil); pH 8,0].

Para proceder a extração, foram adicionados 500 µl de TE 1X com SDS 1% (Dodecil Sulfato de Sódio) e 10 µl de proteinase K (Invitrogen São Paulo - Brasil) por amostra. Os pleópodos foram macerados e triturados utilizando uma haste de madeira esterilizada. A maceração e a trituração não foram necessárias para a extração de DNA de

hemolinfa. Em seguida, foi feita uma incubação em banho-maria a 65°C por 1 hora. Após a incubação, foram adicionados 72 µl de NaCl 5 M e 52 µl de CTAB 10% (Brometo de hexatrimetilamino - Sigma: St. Louis, EUA) e feita outra incubação a 55°C, por 1 hora. Foi adicionado 1 volume de clorofórmio (Merck) : álcool isoamílico (Synth, São Paulo - Brasil) (24:1) misturando-se por inversão várias vezes, seguindo-se uma centrifugação (Eppendorf Centrifuge, Hamburgo-Alemanha) por 5 minutos a 20.200 g, a temperatura ambiente. O sobrenadante foi coletado e esta etapa foi repetida até obter o sobrenadante claro. Ao sobrenadante foram adicionados 600 µl de isopropanol (Merck), centrifugando-se a 10.300 g, durante 5 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspensido com 250 µl de etanol 70% (Merck) gelado e centrifugado a 1.300 g, durante 15 minutos, a 4°C. Posteriormente, o etanol foi descartado e o procedimento de lavagem foi repetido. Foi deixado evaporar o etanol residual à temperatura ambiente e o DNA foi ressuspensido em 100 µl de Água Milli-Q esterilizada e armazenado a -20°C.

3.4.2.2. Reação de Polimerase em Cadeia

Alíquotas de DNA extraído das amostras foram submetidas à amplificação pela Reação de Polimerase em Cadeia (PCR), na qual foram utilizados oligonucleotídeos selecionados a partir de seqüência genômica do IHHNV (acesso nº. 218266, Gen Bank), específicos para uma região codificadora de proteína não estrutural, sobreposta com região de proteína estrutural do IHHNV. Os oligonucleotídeos foram 5'-AACAGCCAGTACGA CATCAACC-3' (sense) e 5'-CGGCGTGTCTTCGTCTTCATT-3' (antisense).

A reação foi realizada em uma mistura de volume final de 25 µl, contendo água Milli-Q estéril, 0,5 µM de cada oligonucleotídeo, 0,2 mM de dNTPs, 3 mM de MgCl₂, tampão 10X (20 mM de Tris-Hcl, 50 mM de KCl, pH 8,3), 0,5 U de Taq-DNA polimerase (Invitrogen, São Paulo - Brasil) e 2,5 µl de DNA. Foram utilizados como controle negativo e positivo, respectivamente, água Milli-Q estéril e DNA extraído de camarão positivo para IHHNV, gentilmente cedido pelo CEDOC (Centro de Diagnóstico de Doenças do Camarão). A reação foi realizada em termociclador (Mastercycler Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) nas seguintes condições: 1 ciclo de desnaturação a 95°/5 minutos, seguido por 40 ciclos de desnaturação a 95°/1 minuto, anelamento a 62°/1minuto e extensão a 72°/1 minuto e 1 ciclo de extensão final a 72°/7 minutos.

Uma segunda PCR foi realizada como controle da extração de DNA, utilizando os oligonucleotídeos específicos para o gene da β -actina de *L. vannamei* e as mesmas condições de amplificação descritas acima. As amostras de DNA foram utilizadas desde não-diluídas até a diluição 1/200, para obter uma concentração de DNA que permitisse amplificar o fragmento de β -actina.

3.4.2.3. Eletroforese para visualização do produto da PCR

O produto da PCR foi analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% em tampão TBE 1X e corado pela prata, conforme Sanguinetti *et al.* (1994).

Para a corrida eletroforética foram misturados 3 μ l do tampão de corrida e 3 μ l do produto da PCR, aplicados no gel, mergulhado no tampão TBE 1X [Tris base 0,08 M; Ácido bórico 0,08 M; EDTA 0,002 M; pH 8,0]. Após a corrida eletroforética, feita a 90 V, 40 mA, por aproximadamente 1 h, os géis foram corados pelo nitrato de prata. O gel colocado em uma solução fixadora (etanol 10%, ácido acético 0,8%) foi agitado durante 5 minutos em um agitador magnético. Em seguida foi adicionada uma solução de nitrato de prata 3% e repetida a agitação por 15 minutos. Após esse procedimento o gel foi lavado duas vezes com água destilada, acrescentando-se posteriormente a solução reveladora (4,5 g de NaOH; 500 μ l de formol em 150 ml de água destilada) e novamente agitado por 15 minutos, até a visualização dos fragmentos de DNA. O tamanho do fragmento foi determinado em comparação a um padrão de DNA de 100 pb (Invitrogen, California, EUA).

3.4.2.4. Sequenciamento do fragmento específico do IHHNV

Para confirmar que o fragmento amplificado na PCR correspondia ao fragmento do DNA do IHHNV, foi realizado o sequenciamento do produto da PCR após prévio tratamento com as enzimas exonuclease I e fosfatase alcalina, utilizando o kit DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing e o MegaBACE DNA Analysis Systems (Amersham Bioscience). Após o sequenciamento, utilizou-se o programa BLAST 2004 para comparar a seqüência obtida com as demais seqüências já depositadas no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov).

3.4.2.5. Histopatologia

O camarão foi preservado na solução fixadora Davidson por 72 horas e em seguida transferido para concentrações crescentes de álcool etílico. Iniciando com etanol 70% e terminando com álcool absoluto. Após desidratação do tecido pelo etanol, o material foi submerso no xitol e em seguida impregnado pela parafina fundida. Posteriormente colocado em um molde retangular com parafina fundida, para obtenção de blocos, foi cortado no micrótomo, resultando em cortes finos, suficientemente transparentes para serem examinados ao microscópio. Para análise histopatológica, foram realizados procedimentos de rotina usando coloração pela hematoxilina e eosina (Bell; Lightner, 1988). Os cortes histológicos foram examinados ao microscópio óptico para observar lesões patognomônicas da infecção pelo IHHNV.

4.2. Análise estatística dos dados

A diferença nas prevalências de IHHNV entre as fazendas e nos viveiros da mesma fazenda foi analisada pelo teste binomial através do software BIOESTAT 4.0.

As taxas de incidência de IHHNV em diferentes salinidades e densidade de estocagem foram analisadas utilizando o teste qui-quadrado. A análise da influência dos parâmetros ambientais na infecção do camarão pelo IHHNV foi feito utilizando o teste de Spearman. A análise do efeito simultâneo dos vários parâmetros ambientais na infecção pelo IHHNV foi feita utilizando a Regressão Logística Múltipla. Os testes estatísticos foram feitos utilizando o software STATISTICA 7.1.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

- **Artigo I:**

Prevalence of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) in *Litopenaeus vannamei* cultured in northeastern Brazil.

- **Artigo II:**

The influence of salinity, temperature, dissolved oxygen, stocking density and rainfall on the infection hypodermal and haematopoietic necrosis (IHHN) in *Litopenaeus vannamei* reared in ponds.

ARTIGO I

**Prevalence of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) in
Litopenaeus vannamei cultured in northeastern Brazil.**

Artigo submetido à
Revista Aquaculture
ISSN: 0044-8486
Revista Internacional Qualis-A.

**Prevalence of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) in
Litopenaeus vannamei cultured in northeastern Brazil.**

Cimária Porfirio Rodrigues de Oliveira da Silva¹, Daniela Gomes de Lima¹, Lígia Garcia Reis¹, Fabiana Lima Bezerra¹, Rosely Vasconcelos Meissner¹, Maurício Pereira de Sales², Regina de Fátima dos Santos Braz^{1,*}.

Federal University of Rio Grande do Norte, Center of Biological Sciences, ¹Department of Microbiology and Parasitology, ² Department of Biochemistry, CEP 59072- 970, Natal-RN, Brazil.

* Correspondig author. Tel/fax:55 84 32119210.

E-mail address: braz@ufrnet.br (R. F. S. Braz).

Abstract

Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) is a shrimp disease that causes deformities, reduction in growth and consequent economic losses in the shrimp aquaculture industry worldwide. The purpose of this study was to compare IHHNV diagnosis using histological and one-step polymerase chain reaction (PCR) methods, as well to determine the prevalence of IHHNV in *Litopenaeus vannamei* cultured in northeastern Brazil, the highest shrimp producing area in the country. The IHHNV infection rate determined by histological analysis of 59 shrimp specimens was 6.8%. Using one-step PCR, we amplified a 185 bp fragment of IHHNV genome, resulting in an infection rate of 28.2%. This more sensitive method was used to determine the IHHNV prevalence on seven local farms. A high IHHNV prevalence of 43% (468 infected shrimp out of 1089) was detected. Significant differences in IHHNV prevalences among farms and in ponds from the same farm were found. These differences might be associated to different larval origins, handling techniques and environmental factors. The high IHHNV prevalence in penaeid shrimp creates problems for the shrimp culture industry, due to horizontal and vertical transmission, which increases the infection rate and leads to economic losses.

Keywords: Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV), *Litopenaeus vannamei*, histology, PCR, prevalence.

1. Introduction

Viral diseases are a serious problem in cultured penaeid shrimp. Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) is a shrimp pathogen responsible for economic losses in the shrimp aquaculture industry worldwide. IHHNV is an icosahedral unenveloped virus, 22 nm in diameter and approximately 4.1 kb in size (Mari et al., 1993). This virus is considered a member of the Parvoviridae family, due to its morphology and biochemical structure (Bonami et al., 1990). On the basis of virus genome characteristics, IHHNV is strongly related to the Mosquito Brevidensoviruses (Shike et al., 2000). The infection was first detected in 1981, in juvenile *Litopenaeus stylirostris* imported into Hawaii from Costa Rica and Ecuador (Lightner et al., 1983). This infection resulted in mortality rates of up to 90% in *L. stylirostris* (Lightner et al., 1983). The virus has subsequently spread out worldwide as a consequence of the movement of host stocks for aquaculture (Lightner, 1996a). IHHNV infection has been reported in other cultured shrimp species such as *Penaeus monodon*, *Marsupenaeus japonicus* and *Litopenaeus vannamei* but the virus does not cause lethal infection in these penaeid species (Bell and Lightner, 1984, Lightner et al., 1997). Chronic infection in *L. vannamei*, in addition to retarding growth, causes cuticular deformities of the rostrum, antenna, thoracic and abdominal areas, which taken together are known as runt deformity syndrome (RDS) (Kalagayan et al., 1991). Shrimp with RDS have variable growth rates, which reduces their market value by 10% to 50%, depending on the level of infection (Lightner and Redman, 1998).

IHHNV infection can occur by horizontal transmission through the ingestion of dead infected shrimp or by contact with water containing infected animals (Lotz, 1997). Moreover, vertical transmission has been suggested by the presence of viruses in the

ovaries of infected *L. vannamei* females (Motte et al., 2003). Vertical transmission can occur through viral particles shed at the time of spawning and ingested by larvae at first feeding (Lotz, 1997). Thus, vertical transmission may increase IHHNV prevalence in cultured shrimp. Determining IHHNV prevalence in cultured shrimp is important because of the negative impact that IHHNV can have on shrimp farming. In this study, histology and one-step PCR were compared as diagnostic methods for detecting IHHNV. PCR, the more sensitive of the two methods, was applied to determine IHHNV prevalence in *L. vannamei* penaeid shrimp, collected on farms in northeastern Brazil.

2. Materials and methods

2.1. Shrimp samples

Cultured juvenile white shrimp *Litopenaeus vannamei* were collected from seven farms, denominated F1 to F7, in northeastern Brazil. Fifty nine specimens were used to compare IHHNV diagnosis using histological and one-step polymerase chain reaction (PCR) methods. Another sample with 1089 specimens was used to determine IHHNV prevalence by one-step PCR and to verify for signs of RDS.

The shrimp were disinfected with 70% ethanol. Approximately 200µl of hemolymph was collected from the ventral sinus, using a 3-cc syringe containing 200 µl of 10% sodium citrate, then stored at -20°C until processing. One pleopod from the second pair was collected and kept in 95% ethanol until PCR processing. The remainder of the body was preserved in Davidson's fixative solution for histological procedures.

2.2. Histopathology

Shrimp samples (n=59) were preserved in Davidson's fixative solution for 72 h and then transferred to 70% ethanol. For histopathological analysis, routine procedures using hematoxylin and eosin (H & E) were performed (Bell and Lightner, 1988). The sections from the cephalothorax were examined under light microscope for pathognomonic IHHNV lesions.

2.3. DNA extraction

DNA extraction from hemolymph and pleopods (n=1089+59) was performed using lysis buffer (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, SDS 1%, pH 8,0) and 10 mg/ml proteinase K. Pleopods were homogenized and both tissues were incubated at 65°C for 1 hour. After this time, 5 M NaCl and 10% CTAB were added and incubated at 55°C for 1 hour. The DNA was separated from the protein by centrifugation in a chloroform-isoamyl alcohol mixture. DNA was precipitated in isopropanol and the pellet was washed in 70% ethanol. Dried DNA was dissolved in ultra pure water and stored at -20°C (modified from Sambrook et al., 1989).

2.4. PCR amplification of IHHNV

One-step PCR was done using extracted DNA from hemolymph and pleopod homogenate as the template. Negative (ultra-pure water) and positive control (from the IHHNV kit, Diagxotics, USA, kindly donated by the Center for Shrimp Diseases-CEDOC-RN-Brazil) were also included. PCR primers were designed based on the published IHHNV genomic sequence (GenBank, accession number AF 218266). Primers amplify a nucleotide sequence located in a region that encodes a non-structural protein (816-2816 nucleotides), overlapped with a structural protein region (2758-3747 nucleotides). The

primers were 5'-AACAGCCAGTACGA CATCAACC-3' (sense) and 5'-CGGCGTGTCTCGTCTTCATT-3' (antisense). The PCR reaction mixture contained 2.5 µl of DNA; 0.5 µM of each primer; 0.2 µM dNTPs; 3 mM MgCl₂; 1x Taq reaction buffer (20 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 8.3); 0.5 U Taq DNA polymerase (Invitrogen, São Paulo, Brazil), in a 25 µl final volume reaction. Reagents were covered with mineral oil to prevent evaporation and PCR was performed in an automatic thermocycler (Mastercycler Eppendorf, Hamburg, Germany). The PCR cycling conditions were 95°C for 5 minutes, followed by 40 cycles of 95°C for 1 minute, 62°C for 1 minute and 72°C for 1 minute, with a final elongation step at 72°C for 7 minutes. A 5 µl PCR product of each sample was analyzed by 8% polyacrylamide gel electrophoresis, with a 100-bp DNA ladder as a marker (Invitrogen, California, USA) and stained by silver nitrate (Sanguinetti et al., 1994). To gauge the success of the extraction process and determine DNA quality, the *L. vannamei* β-actin gene was amplified in parallel with IHHNV DNA. The primers 5'-AGCAAGCGAG GTATCCTCAC-3' (sense) and 5'-TATCCCTCGTAGATGGGCAC-3' (antisense) for the *L. vannamei* β-actin gene were selected from a published sequence (accession no. AF300705, GenBank). To confirm that the PCR fragment observed by electrophoresis was specific to IHHNV, the PCR product was sequenced using DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing kit for MegaBACE DNA Analysis Systems (Amersham Bioscience). A search for significant similarities between the amplified fragment and IHHNV sequences in GenBank was performed using BLAST at the National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov).

2.5. Clinical signs of RDS

Shrimp were collected in grow-out ponds and clinical signs characteristic of RDS, such as smaller body size, body color, shell hardness, rostrum and antennal flagella shape, were observed (Kalagayan et al., 1991, Primavera and Quinitio, 2000).

2.6. Statistical analysis

The different IHHNV prevalences among farms and in ponds on the same farm were analyzed by binomial test (BioStat 2007), a non-parametric test based on binomial distribution of dichotomous dependent variables (infection versus non-infection), compared to the probability of mean IHHNV prevalence occurrence.

3. Results

3.1. Histopathological IHHNV diagnosis

Histopathology and DNA amplification using PCR was performed to diagnose IHHNV infection in 59 shrimp collected on two farms. Histologic sections showed eosinophilic, intranuclear Cowdry type A inclusion bodies in the hypodermal epithelium, lymphoid organ, gills and gonads (Fig. 1). These inclusion bodies were observed in 6.8% of the shrimp (4 out of 59). Based on the number of Cowdry type A inclusion bodies observed in the target tissues, the infection severity was considered to be grade 2, which means an average of 2 CAI/field observed in 20 fields (Lightner, 1996b).

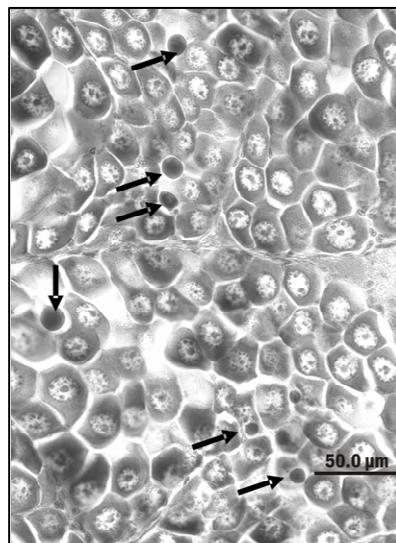


Fig. 1. Histology of IHHNV-infected *L. vannamei*. H&E staining of gonad showing pathognomonic eosinophilic Cowdry A (arrows).

3.2. IHHNV diagnosis by one-step PCR

Under standardized one-step PCR conditions using specific primers, a single 185 bp product was amplified from IHHNV genome (Fig.2). The percentage of infected penaeid samples was 28.8% (17 out of 59). Nucleotide sequencing confirmed that the 185 bp fragment obtained by one-step PCR was specific to the IHHNV genome. A PCR for the β -actin gene of *L. vannamei* was used as a control for DNA extraction and a 339 bp PCR product was found (Fig. 2). Sequencing showed 56 nucleotides with good legibility from the 185 bp PCR fragment. This 56-nucleotide sequence had a 98% identity in relation to the five IHHNV sequences available in the BLAST program, GenBank (EF 633688.1, AY 355308.1, AY 355306.1, AY 362548.1, AF 218266.1), confirming that the 185 bp fragment obtained by one-step PCR was specific to the IHHNV genome.

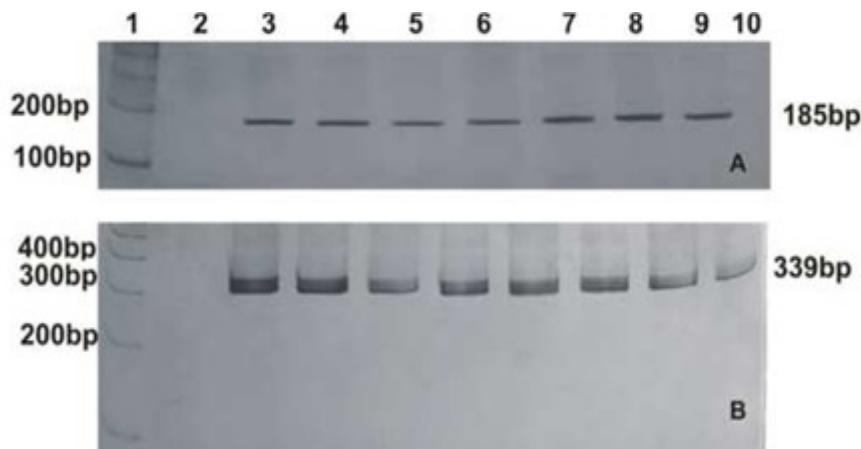


Fig. 2. Electrophoresed 8% polyacrylamide gel of A: PCR amplification product of 185 bp IHHNV-specific fragment. B: PCR amplification product of 339 bp β -actin-fragment of *Litopenaeus vannamei* as DNA extraction control. Lane 1: 100 bp DNA ladder, lane 2: negative control for IHHNV, lane 3: positive control, lane 4-9: samples of IHHNV-positive *L. vannamei*, lane 10: sample of IHHNV-negative *L. vannamei*.

3.3. Prevalence determination and signs of RDS

L. vannamei shrimp samples ($n=1089$) collected on seven farms located in northeastern Brazil, were grown in ponds for 6 to 29 weeks. They had an average body weight of 4-29 g. IHHNV prevalence, determined by one-step PCR, was 43% (468 infected shrimp out of 1089), varying on different farms. On the seven farms studied, IHHNV prevalence ranged from 18.6% to 54.8%. Significant differences in mean prevalence were found in F4 ($p=0.005$), which had a prevalence above the mean and on farms F2 and F3 ($p=0.001$), which had the lowest prevalences (Fig. 3). Significant differences were also found in 57.1% of the farms (4 out of 7), in relation to IHHNV infection rates in different ponds on the same farm. Despite the high IHHNV prevalence in this shrimp population, clinical signs of RDS, such as smaller body size and shortened rostrum, were observed after 12 weeks of growth in 1.8% (20 out of 1089) of the animals identified by PCR as IHHNV-positive.

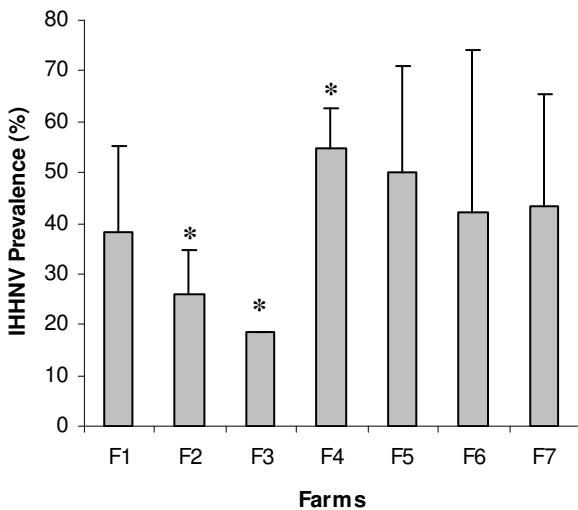


Fig. 3. IHHNV prevalences on seven farms located in northeastern Brazil. Each bar represents the mean value from six (farm F1), two (farm F2), one (farm F3), three (farm F4), seven (farm F5), four (farms F6 and F7) ponds. Asterisks over bars indicate farms with IHHNV prevalence significantly different from the mean prevalence.

4. Discussion

Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus is a cosmopolitan and highly pathogenic virus of penaeid shrimp (Lightner, 1996a). *P. stylirostris*, one of the most commercially important species of shrimp in the Americas, is highly susceptible to IHHNV. Although IHHNV infection is not lethal to *L. vannamei*, the virus retards growth and causes many deformities known as runt deformity syndrome (Kalagayan et al., 1991). Natural IHHNV infection was also reported in *Macrobrachium rosenbergii* postlarvae and in sub-adults, causing 80-100% mortality (Hsieh et al., 2006), in addition to being found in crab samples (Yang et al., 2007).

IHHNV infection has been detected by monitoring clinical signs, bioassays using indicator hosts and histological methods (Lightner and Redman, 1998). This last method shows eosinophilic intranuclear inclusion bodies within chromatin-marginated, hypertrophied cell nuclei, in tissues of ectodermal and mesodermal origin (Lightner,

1996b). However, the difficulty in histologically diagnosing a shrimp farm pathogen lies in the time-consuming process of analyzing numerous slides in a large sample and the consequent delay in obtaining the information needed for effective control of the infection (Alvarez-Borrego and Chávez-Sánchez, 2001). After the IHHNV genome was cloned, probes and molecular detection methods were developed for the virus (Mari et al., 1993). Among these methods, in situ hybridization using specific gene probes has low detection limits when compared to PCR, a rapid and sensitive method (Lightner and Redman, 1998; Nunan et al., 2000; Dhar et al., 2001).

Our results showed higher IHHNV prevalence by one-step PCR using specific primers than that of conventional histology. IHHNV was detected by PCR in 28.8% of the samples, whereas evidence of infection using conventional histology was found in 6.8%. These findings may be explained by early or low-level infection and consequently no Cowdry type A inclusion bodies were observed in the tissues of positive PCR samples. IHHNV infection is not easily identified by histology and depends on the stage of the virus, the difference in size and shape of Cowdry type A inclusion bodies in different organs as well as staining quality (Alvarez-Borego and Chávez-Sánchez, 2001). Sensitivity is an advantage of conventional PCR over other virus infection diagnosis methods. The PCR assay detects low DNA virus levels in the infected tissue, when compared to histopathology or even other molecular techniques such as dot blot hybridization (Nunan et al., 2001).

The mean IHHNV prevalence in a shrimp population cultured on seven farms located in northeastern Brazil was 43%, similar to that found in wild Equatorian broodstocks (47%) and lower than that observed in domesticated broodstocks from Equator and Panama (63% and 95%, respectively), based on nested-PCR analysis (Motte et al., 2003). In wild *L. vannamei* captured off the Pacific coast of Panama, the prevalence of

IHHNV using dot blot hybridization was 27% (Nunan et al., 2001). Our data showed a wide variability of IHHNV prevalence in ponds from the same farm, as well as among different farms, which could be attributed to the different larval origins, handling techniques and environmental factors.

IHHNV vertical transmission has been shown by analyzing infection in embryos and larvae produced by IHHNV-infected and IHHNV-free females fertilized by IHHNV-free males. Nested-PCR analysis confirmed that the embryos and larvae produced from IHHNV-free females were IHHNV-free, whereas those produced from IHHNV-infected females were infected (Motte et al., 2003). The high IHHNV prevalence in penaeid juveniles and the vertical transmission to larvae have a negative impact on *L. vannamei* production. Thus, prevention of this viral disease is a chief priority for the shrimp farming industry in Latin America (Motte et al., 2003). The shrimp industry of the future will be based on specific pathogen-free and genetically improved shrimp stocks. Thus, the identification of IHHNV-free and other specific pathogen-free shrimp stocks may improve the quality of both breeders and nauplii, contributing to overcoming disease threats (Lotz, 1997).

In conclusion, the one-step PCR standardized in this study can be used to detect low IHHNV infection levels in shrimp tissue and prevent the use of infected breeders, decreasing the vertical and horizontal transmission and the prevalence of IHHNV in penaeids. The low RDS occurrence found in the present study was probably a consequence of the low infection grade observed in the tissues. Further studies are needed to evaluate the factors that cause high IHHNV infection levels in pond-bred penaeids and to determine whether controlling these factors can decrease IHHNV infection levels.

Acknowledgements

Support for this research was provided by ETENE/FUNDECI-BNB, Brazil. The authors thank Ms. Naisandra Bezerra da Silva for her assistance with the histological method.

References:

- Alvarez-Borego, J., Chávez-Sánchez, M. C., 2001. Detection of IHHNV virus in shrimp tissue by digital color correlation. *Aquaculture* 194, 1-9.
- Bell, T. A., Lightner, D. V., 1984. IHHN virus: infectivity and pathogenicity studies in *Penaeus stylirostris* and *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 38, 185-194.
- Bell, T. A., Lightner, D. V., 1988. A handbook of normal penaeid shrimp Histology. World Aquac. Soc., Baton Rouge, LA, USA.
- Bonami, J. R., Trumper, B., Mari, J., Brehelin, M., Lightner, D.V., 1990. Purification and characterization of the infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus of penaeid shrimp. *J. Gen. Virol.* 71, 2637-2664.
- Dhar, A. K., Roux, M. M., Kliment, K. R., 2001. Detection and quantification of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus and white spot virus in shrimp using real-time quantitative PCR and SYBR green chemistry. *J. Clin. Microb.* 39, 2835-2845.

- Hsieh, C. Y., Chuang, P. C., Chen, L. C., Tu, C., Chien, M. S., Huang, K. C., Kao, H. F., Tung, M. C., Tsai, S. S., 2006. Infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus (IHHNV) infections in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. Aquaculture 258, 73-79.
- Kalagayan, G., Godin, D., Kanna, R., Hagino, G., Sweeney, J., Wyban, J., Brock, J., 1991. IHHNV virus as an etiological factor in runt-deformity syndrome of juvenile *Penaeus vannamei* cultured in Hawaii. J. World Aquac. Soc. 22, 235-243.
- Lightner, D. V., Redman, T. A., Bell, T. A., 1983. Detection of IHHN virus in *Penaeus stylirostris* and *P. vannamei* imported into Hawaii. J. World. Maric. Soc. 14, 212-225.
- Lightner, D. V., 1996a. Epizootiology, distribution and the impact on international trade of two penaeid shrimp viruses in the Americas. Rev. Sci. Tech. 15, 579-601.
- Lightner, D. V. (Ed.), 1996b. A handbook of pathology and diagnostic procedures for diseases of penaeid shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LO, USA.
- Lightner, D. V., Redman, R. M., Poulos, B. T., Nunan, L. M., Mari, J. L., Hasson, K. W., 1997. Risk of spread of penaeid shrimp viruses in the Americans by the international movement of live and frozen shrimp. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epizoot. 16, 146-160.
- Lightner, D. V., Redman, R. M., 1998. Shrimp diseases and current diagnostic methods. Aquaculture 164, 201-220.

Lotz, J. M., 1997. Special topic review: viruses, biosecurity and specific pathogen-free stocks in shrimp aquaculture. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 13, 405-413.

Mari, J., Bonami, J. R., Lightner, D.V., 1993. Partial cloning of the genome of infectious hypodermal and haemopoietic necrosis virus, an unusual parvovirus pathogenic for penaeid shrimp; diagnosis of the disease using a specific probe. *J. Gen. Virol.* 74, 2637-2643.

Motte, E., Yugcha, E., Luzardo, J., Castro, F., Leclercq, G., Rodríguez J., Miranda, P., Borja, O., Serrano, J., Terreron, M., Montalvo, K., Narváez, A., Tenorio, N., Cedeño, V., Mialhe, E., Boulo, V., 2003. Prevention of IHHNV vertical transmission in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 219, 57-70.

Nunan, L. M., Poulo, B. T., Lightner, D. V., 2000. Use of polymerase chain reaction for the detection of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in penaeid shrimp. *Mar. Biotechnol.* 2, 319-328.

Nunan, L. M., Arce, S. M., Staha, R. J., Lightner, D. V., 2001. Prevalence of infectious hypodermal and hematopoietc necrosis virus (IHHNV) and white spot syndrome virus (WSSV) in *Litopenaeus vannamei* in the Pacific ocean off the coast of Panama. *J. World Aquac. Soc.* 32, 330-334.

Primavera, J. H.; Quinitio, E. T., 2000. Runt-deformity syndrome incultured giant tiger praw *Penaeus monodon*. *J. Crust. Biol.* 20, 796-802.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2 ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, N. Y., USA.

Sanguinetti, C. J., Dias, E. N., Simpson, A. J. G., 1994. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrilamide gels. *Biotechniques* 175, 915-916.

Shike, H., Dhar, A., Burns, J., Shimizu, C., Jousset, F., Klimpe, K., Bergoin, M., 2000. Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus of shrimp is related to mosquito brevidensoviruses. *Virology* 276, 167-177.

Yang, B., Song, X. L., Huang, J., Shi, C. Y., Liu, L., 2007. Evidence of existence of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in *Penaeus* shrimp cultured in China. *Vet. Microbiol.* 120, 63-70.

ARTIGO II

**The influence of salinity, temperature, dissolved oxygen, stocking density and rainfall
on the infection hypodermal and haematopoietic necrosis (IHHN) in *Litopenaeus*
vannamei reared in ponds.**

Artigo submetido à
Revista Journal of Fish Diseases
ISSN: 1365-2761
Revista Internacional Qualis-A.

The influence of salinity, temperature, dissolved oxygen, stocking density and rainfall on the infection hypodermal and haematopoietic necrosis (IHHN) in *Litopenaeus vannamei* reared in ponds.

Cimária Porfirio Rodrigues de Oliveira da Silva¹, Lígia Garcia Reis¹, Fabiana Lima Bezerra¹, Ariane Ferreira Lacerda, Milson Bezerra de Gouveia², Mauricio Pereira de Sales³, Regina de Fátima dos Santos Braz^{1,*}

Federal University of Rio Grande do Norte, Center of Biological Sciences, ¹Department of Microbiology and Parasitology, ²Department of Genetics and Biology, ³Department of Biochemistry, CEP 59072- 970, Natal- RN, Brazil.

* Corresponding author. Tel/fax: 55 84 32119210.

E-mail address: braz@ufrnet.br (R. F. S. Braz)

Abstract

Diseases in shrimp farming are a result of interaction among shrimp, the environment, and pathogens. Some of the most important environmental factors that affect shrimp are temperature, dissolved oxygen, salinity, stocking density and rainfall. *Litopenaeus vannamei* are affected by the infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV), which causes reduced growth and physical deformities. The aim of this study was to investigate the influence of salinity, temperature, dissolved oxygen, stocking density and rainfall on the IHHNV infection rate in *L. vannamei* cultured on farms in northeastern Brazil. A total of 525 shrimp specimens were collected on eight farms. IHHNV infection was determined by detecting specific DNA in pleopod and hemolymph using one-step PCR. Environmental factors were recorded at the moment of collection. The infection rates in the shrimp cultured in low, medium and high salinity were 43.1%, 31.2% and 24.6%, respectively ($P<0.001$). The infection rates in shrimp cultured in ponds using extensive, semi-intensive and intensive systems of stocking density were 28.7%, 28.3% and 47.8%, respectively ($P<0.001$). Multiple Logistic Regression test indicated a significant effect of salinity ($P<0.05$) and stocking density ($P<0.001$), but not of temperature, rainfall and dissolved oxygen on the IHHNV infection rate in the *L. vannamei* shrimp.

Keywords: *Litopenaeus vannamei*; infection hypodermal and haematopoietic necrosis virus (IHHNV); infection rate; PCR, environmental factors.

1. Introduction

Aquaculture has played an important role in the economic development of many countries in the Americas. Approximately 76,000 tonnes of shrimp *Litopenaeus vannamei* were produced in Brazil in 2004 (FAO 2006). However the production is seriously affected by infectious diseases causing economic losses to the shrimp culture industry (Lightner & Redman 1998; Bachère 2000). Among the diseases of viral etiology, a major is caused by Infection Hipodermal and Haematopoietic Necrosis Virus (IHHNV) (Flegel 2006). The mortality rate caused by this infection, which was first detected in Hawaii in 1981, in juvenile population of *Litopenaeus stylirostris*, is over 90% (Lightner, Redman & Bell 1983ab). Since then the virus has been detected in other penaeid species from America, Oceania and Asia (Lightner *et al.* 1996b). IHHNV is a small, icosahedral, non-enveloped virus containing a single-stranded linear DNA genome of approximately 4.1 kb in length. It belongs to the Parvoviridae family owing to its morphology and biochemical structure (Bonami, Trumper, Mari & Lightner 1990). This virus is responsible for high rates of mortality in *L. stylirostris*. However, in *L. vannamei* IHHNV causes reduced growth and loss of balance, as well as cuticle deformation affecting the rostrum, antennas, areas of the chest and abdominal region, characteristic of the disease known as RDS (Runt Deformity Syndrome) (Kalagayan, Godin, Kanna, Hagino, Sweeney & Wyban 1991; Brock & Main 1994). This disease is responsible for the economic losses ranging from 10% to 50% (Lightner & Redman 1998). The IHHNV can be transmitted horizontally or vertically through the ingestion of dead individuals and infected eggs, respectively (Lotz 1997; Motte, Yugcha, Luzardo, Castro, Leclercq, Rodríguez, Miranda, Borja, Serrano, Terreron, Montalvo, Nárvaez, Tenorio, Cedeño, Mialhe & Boulo 2003).

Methods to diagnose IHHNV include histology, *in situ* hybridization (Lightner & Redman 1998), dot blot hybridization (Carr, Sweeney, Nunan, Lightner, Hisch & Reddington 1996), PCR (Nunan, Poulos & Lightner 2000) and real-time PCR (Dhar, Roux & Klimpel 2001; Tang & Lightner 2001). The PCR and real time PCR, the most sensitive methods, are able to detect low pathogen levels, undetectable by other methods (Nunan *et al.* 2000; Dhar *et al.* 2001).

Disease is the result of shrimp interaction with their environment, and the pathogen itself. Changing of one or more of these factors may lead to stress and susceptibility to opportunistic diseases (Brock & Main 1994; Lightner & Redman 1998). Some of the most important environmental factors that affect aquatic organisms growing in pond are the temperature, dissolved oxygen (Brock & Main 1994), salinity (Le Moullac & Haffner 2000), the stocking density (Kautsky, Ronnback, Tedengren & Troell 2000; Li, Li & Wang 2006; Johnston, Melville-Smith, Hendriks, Maguire & Phillips 2006) and rainfall (Garen & Martin 2002).

Temperature, salinity and dissolved oxygen affect the metabolism, growth and survival of marine organisms (Ponce-Palafox, Martinez-Palacios & Ross 1997; Le Moullac & Haffner 2000; Zhang, Li & Huang 2006). The best of *L. vannamei* growth rates were obtained between temperatures of 25 and 35°C (Ponce-Palafox *et al.* 1997). This species inhabit wild ranges of salinity, from 1-2‰ to 40‰ (Wang & Chen 2005), with an iso-osmotic point next to 20‰ (Ponce-Palafox *et al.* 1997). In euryhaline organisms the energy required for osmotic regulation may be relatively small. However, the stress provoked by high salinity further augments growth retardation produced by the infection (Bray, Lawrence & Leung-Trujillo 1994). Dissolved oxygen is affected by many environmental factors, including the population of phytoplankton and zooplankton populations, as well as the decomposition of accumulated organic matter in ponds (Jiang, Pan & Fang-Bo 2005).

Dissolved oxygen values higher than 5 mg L⁻¹ have been recommended for intensive culture practices (Cheng, Liu & Kuo 2003; Zhang *et al.* 2006).

Many of shrimp farms, encouraged by the increase market demand and price, use intensive to super-intensive culture system (Li *et al.* 2006). However, stocking density affect the growth, survival and production (Ray & Chien 1991; Allan & Maguire 1992; Martin, Veran, Guelorget & Pham 1998; Arnold, Sellars & Coman 2006). The stress generated by the confinement of animals in high densities favors the establishment of disease (Brock & Main 1994).

Seasonality also directly affects the production of cultured shrimp. The waters that supply the ponds are influenced by rainfall, affecting the temperature, salinity, the concentration of several chemical components of the water and the natural food availability, all of which compromise growth and survival of shrimp (Garen & Martin 2002; Milstein, Islam, Wahab, Kamal & Dewan 2005).

Most studies focuses on the effect of environmental variables under experimental conditions. But the experimental information are not always consistent with field observations. To optimize production conditions for *L. vannamei* and other penaeids, one must understand the effects of environmental factors on the infection rate of pathogens in natural pond conditions. Thus the aim of this study was to investigate the influence of environmental factors as salinity, temperature, dissolved oxygen, rainfall and stocking density on the IHHNV infection rate in juvenile *L. vannamei* cultured on farms in northeastern Brazil.

2. Materials and methods

2.1. Shrimp samples

The juvenile white shrimp *L. vannamei* (n=525) were collected from August 2004 to April 2007 on eight farms in the state of Rio Grande do Norte, in northeastern Brazil ($4^{\circ} 48'S$ - $6^{\circ} 56'S$ and $38^{\circ} 33'W$ - $35^{\circ} 03'W$). The farms (each assigned a number) and municipalities in which they were located, geographical coordinates and number of ponds were the following: F1, Ceará-Mirim, (Lat $05^{\circ}38'S$, Long $35^{\circ}25'W$), 7 ponds; F2 , Tangará, (Lat $06^{\circ}11'S$, Long $35^{\circ}48'W$), 3 ponds; F3 and F5 , Barra de Cunhaú, (Lat $06^{\circ}19'S$, Long $35^{\circ}03' W$), 2 and 4 ponds, respectively; F4 farm, Nísia-Floresta, (Lat $06^{\circ}05'S$, Long $35^{\circ}12'W$), 1 pond; F6 and F7 farms, Guamaré, (Lat $05^{\circ}06'S$, Long $36^{\circ}19' W$), 1 and 2 ponds, respectively and F8 farm, São Bento do Norte, (Lat $05^{\circ}03'S$, Long $36^{\circ}02'W$), 1 pond.

2.2. Record of environmental factors

Temperature, dissolved oxygen concentration and salinity were recorded during animal collection at the farm ponds. Water temperature, dissolved oxygen concentration and salinity were measured using a multi-parameter probe (Horiba U-22). Salinity levels were classified as low (0-1%), medium (21-30%) and high (38-57%) according to the National Council for the Environment (CONAMA, Brazil). Rainfall data from each municipality, recorded for a month before collection, were supplied by the Agriculture Research Enterprise of Rio Grande do Norte (EMPARN, Brazil). The stocking density of each pond was considered extensive (≤ 15 shrimp m^{-2}), semi-intensive (from 18 to 27 shrimp m^{-2}) and intensive (> 30 shrimp m^{-2}) (Li *et al.* 2006) and this information was supplied by the farm management.

2.3. Shrimp sample preparation for DNA extraction and PCR analysis

The randomly collected animals were disinfected with 70% ethanol. One pleopod from the second pair was removed and kept in 95% ethanol. Approximately 200 µl of hemolymph was drawn from the ventral sinus, using a 3 ml syringe and 22G needle, with 10% sodium citrate. The pleopods and hemolymph were kept at -20°C until the time of DNA extraction.

2.4. DNA extraction

DNA extraction was performed using protocol modified from that proposed by Sambrook, Fritsch & Maniatis (1989). In the case of the pleopods, the 95% ethanol was discarded; the pleopods was then washed twice with TE buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0). To perform the extraction lysis buffer (TE, SDS 1% and 10 mg/ml proteinase K) was added, and the mixture was incubated at 65°C for 1 hour. For this step we had to crush the pleopods. After that, 5M NaCl and 10% CTAB were added and the mixture was incubated at 55°C for 1 hour. DNA was separated from protein by centrifugation at 20,000 g for 5 minutes in a mix of chloroform: isoamyl alcohol. The DNA was precipitated in isopropanol by centrifugation at 10,000 g for 5 minutes. The supernatant fluid was discarded and the DNA precipitate washed in 70% ethanol by centrifugation at 1,300 g for 15 minutes. The DNA was left dry and then dissolved in 100 µl water and stored at -20°C.

2.5. PCR amplification for IHHNV diagnosis

The PCR experiments were performed using DNA extracted from pleopods homogenate and hemolymph as the template. The PCR primer were selected from published IHHNV genomic sequence (accession nº. AF218266, GenBank). Primers

specific to a region that encodes for structural protein corresponding to nucleotides 2758-3747, 5'-AACAGCCAGTACGACATCAACC-3' (sense) and 5'-CGGCGTGTCTTCGTCTTCATT-3' (antisense), were used to amplify a 185 bp DNA fragment. The PCR was carried out in 25 µl reaction volume containing 2.5 µl of DNA template; 0.5 µM of each primer; 0.2 µM dNTPs; 3 mM MgCl₂; 1x reaction buffer (20 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 8.3); 0.5 U Taq DNA polimerase (Invitrogen, São Paulo, Brazil) and ultra-pure water to adjust the final volume. The PCR was performed by denaturation at 95°C for 5 minutes, followed by 40 cycles of denaturation at 95°C for 1 minute, annealing at 62°C for 1 minute and polimerazation at 72°C for 1 minute, with a final polymerization at 72°C for 7 minutes. As control of the extraction of DNA, a fragment of *L. vannamei* β actin gene was amplified. The PCR product was analyzed on a 8% polyacrilamide gel electrophoresis, stained by silver nitrate (Sanguinetti, Dias & Simpson 1994). A 100-bp DNA ladder was used as a marker (Invitrogen, California, USA). The PCR product was sequenced using DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing kit, for MegaBACE DNA Analysis Systems (Amersham Bioscience). The resulting sequence was compared with available sequences, using the BLAST program, GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov).

2.6. Statistical analysis

Spearman test was used to test the influence of each environmental factor on the infection of *L. vannamei* by IHHNV. The chi-square test was used to check for significant differences among IHHNV infection rates in different salinities and stocking densities. The Multiple Logistic Regression test was used to analyze the effect of several environmental factors simultaneously. The statistical analyses were carried out using STATISTICA 7.1. software.

3. Results

3.1. Influence of environmental factors on the IHHNV infection rate in *L. vannamei*:

An epidemiological survey was performed from August 2004 to April 2007 along the Rio Grande do Norte coast, northeastern Brazil, with a total of 525 cultured juvenile shrimps from the rearing ponds being analyzed for IHHNV detection using one-step PCR. A single 185bp product was amplified from IHHNV genome (Fig. 1) and the nucleotide sequencing showed 98% of identity for five IHHNV sequences available in the BLAST program, GenBank, confirming that the 185 bp fragment was specific to the IHHNV genome.

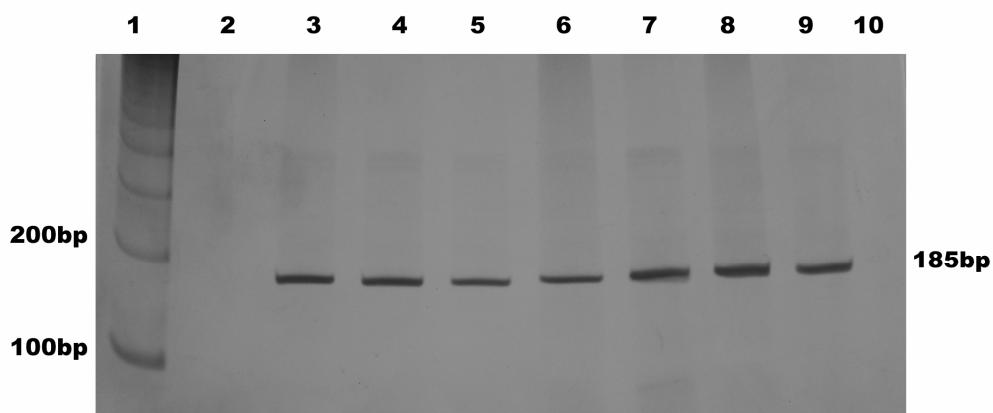


Fig.1. 8% polyacrylamide gel electrophoresis of the PCR amplification product of 185 bp IHHNV-specific fragment detected in juvenile *L. vannamei*. Lane 1: 100 bp DNA ladder, lane 2: negative control (ultrapure water), lane 3: positive control (from IHHNV Kit, Diagxotics, USA), lanes 4-9: samples of IHHNV-positive *L. vannamei*, lane 10: sample of IHHNV-negative *L. vannamei*.

The infection rate was obtained by percentage of IHHNV-infected shrimp from the total number of shrimp analyzed. Environmental factors (temperature, dissolved oxygen, salinity, rainfall, and stocking density) were recorded and their correlation with the

infection rate of each pond was investigated. The values of environmental factors and infection rate of each pond are summarized in Table 1.

Table 1.

Environmental factors and IHHNV infection rate in ponds of eight farms in the northeastern Brazil.

Farm	Pond	Salinity (%)	Rainfall (mm)	T (°C)	DO (mg L ⁻¹)	Density (shrimp m ⁻²)	Infection (%)
F1	1	0	35.4	26.8	5.5	53	69
	2	0	0	26.9	3.9	36.8	55.5
	3	0	0	27	4.8	45	56.6
	4	1	8.4	28.2	4.4	33	20
	5	0	8.4	29.9	6.7	31	23.3
	6	0	88.8	27.1	7.1	33	66.6
	7	0	153.6	28.3	3.0	15	36.6
F2	8	0	1.5	29.9	4.6	15	37.5
	9	0.5	1.8	28	6.2	15	33.3
	10	0	4.2	28	10.2	15	33.3
F3	11	21	298.6	26.5	4.7	25.8	44.4
	12	24	298.6	25.7	5.4	26.5	33.3
F4	13	30	3.9	31.6	6.8	18	26.6
F5	14	40	24	29.9	4.7	7	30
	15	40	24	29.9	5.0	40	40
	16	38	48	30	3.6	25	26
	17	40	48	30	4.9	6	27.6
	18	40	154.1	28.5	4.8	10	17.8
F6	19	45	28.5	27.2	4.7	15	26.6
	20	57	5.7	26.1	6.4	15	17.2
F8	21	44	5.7	26.5	4.5	25.1	25

DO: Dissolved Oxygen; T°C: Temperature.

3.1.1. Influence of dissolved oxygen (DO) and temperature on the IHHNV infection rate

The mean DO and standard deviation (SD) were 5.0 ± 1.4 mg L⁻¹ in farm F1; 7 ± 2.88 mg L⁻¹ in farm F2; 5.0 ± 0.49 mg L⁻¹ in farm F3; 4.5 ± 0.64 mg L⁻¹ in farm F5; 5.5 ± 1.20 mg L⁻¹ in farm F7; and the farms F4, F6 and F8 where only one pond was studied, the DO recorded were 6.8 mg L⁻¹, 4.8 mg L⁻¹ and 4.5 mg L⁻¹, respectively (Table 1). DO concentration ranged from 3 to 10.2 mg L⁻¹. The mean DO and SD from all ponds was 5.3 ± 1.53 mg L⁻¹. The IHHNV infection rates in ponds with DO less than or equal to 4.5

mg L^{-1} , between 4.5 and 5.5 mg L^{-1} and greater than 5.5 mg L^{-1} were 32.6%, 39.0% and 33.5%, respectively.

The mean temperature and SD recorded were $27.7 \pm 1.1^\circ\text{C}$, $28.6 \pm 1.09^\circ\text{C}$, $26.1 \pm 0.56^\circ\text{C}$, $29.9 \pm 0.07^\circ\text{C}$ and $26.65^\circ\text{C} \pm 0.57^\circ\text{C}$, respectively in farms F1, F2, F3, F5 and F7. The temperature recorded in farms F4, F6 and F8, where one pond was studied, were 31.6°C , 28.5°C and 26.5°C , respectively (Table 1). The mean temperature and SD of all ponds studied was $28.1 \pm 1.63^\circ\text{C}$. The IHHNV infection rate in ponds with temperature less than or equal to 27°C , between 27 and 29°C and above 29°C were, 44.7%, 28.3% and 28.8%, respectively.

However, no significant influence of DO or temperature ($P > 0.05$) on the IHHNV infection rate in *L. vannamei* was found using Spearman and Multiple Logistic Regression tests (Fig. 2 and Table 2).

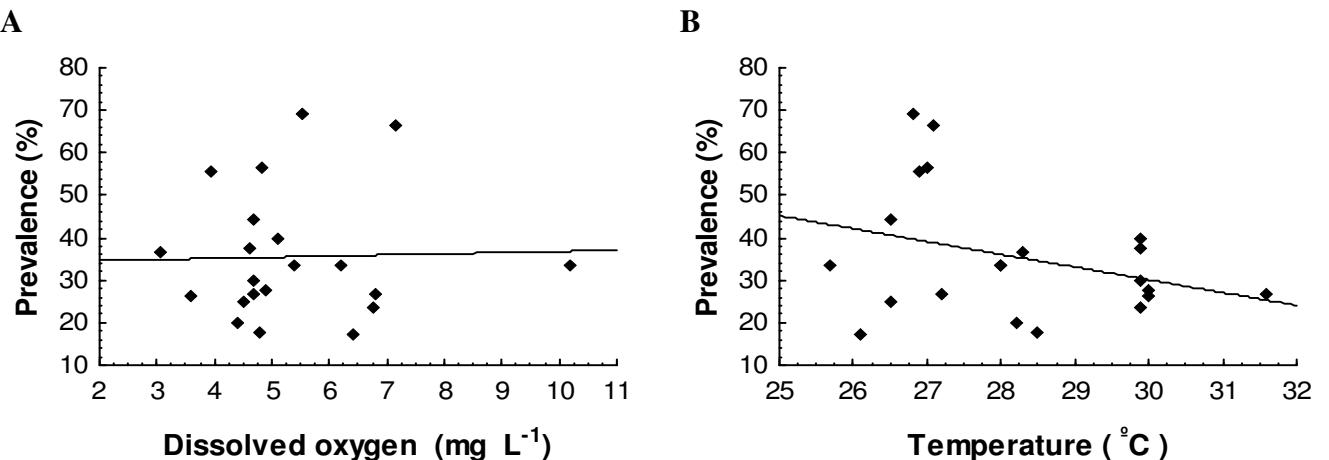


Fig.2. IHHNV infection rate in *L. vannamei* in relation to (A) dissolved oxygen concentration and (B) temperature in ponds at the time of collection ($P > 0.05$).

3.1.2. Influence of salinity on the IHHNV infection rate

The mean salinity and SD in ponds with low (0-1%), medium (21-30%) and high (38-57%) salinity were $0.1 \pm 0.33\%$, $25 \pm 4.58\%$ and $43 \pm 6.11\%$, respectively. The IHHNV

infection rate in ponds of low, medium and high salinity were 43.1%, 31.2% and 24.6%, respectively (Fig. 3) ($\chi^2=16.93$, $P<0.001$).

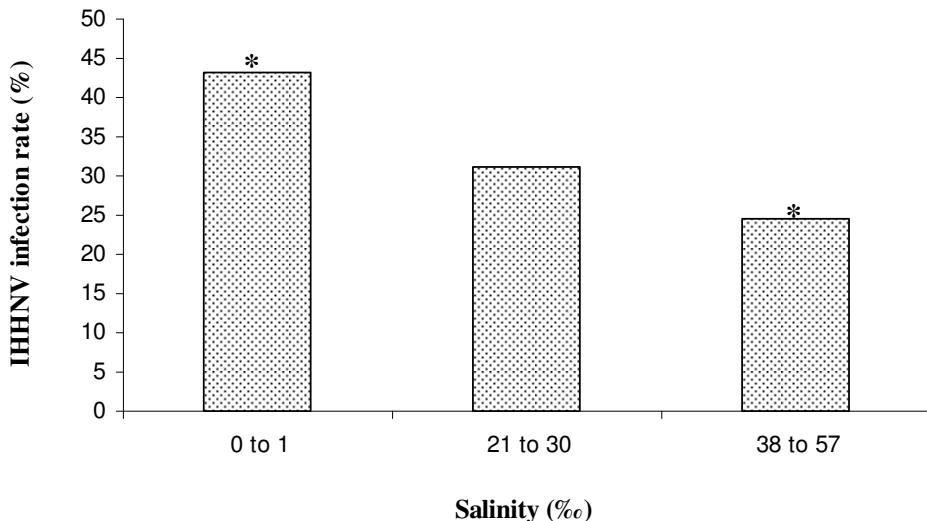


Fig.3. The IHHNV infection rate in *L. vannamei* cultured in different levels of salinity. * Indicates a significant difference ($P<0.001$).

Statistical analysis using Spearman tests indicates that salinity had a negative and significant influence ($P<0.01$) on the IHHNV infection rate in *L. vannamei* (Fig. 4). The Multiple Logistic Regression test indicates a significant influence ($P<0.05$) of salinity on the IHHNV infection rate in *L. vannamei* (Table 2).

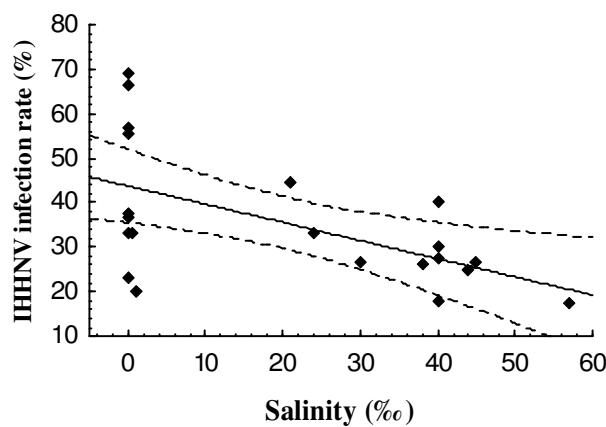


Fig.4. Correlation between IHHNV infection rate in *L. vannamei* and different salinity ($P<0.01$).

3.1.3. Influence of the rainfall on the IHHNV infection rate

Shrimp samples were collected on farms near the northern and eastern coast of Rio Grande do Norte. The northern coast has a semi-arid climate, with rainfall ranging from 400 to 600 mm per year, mainly between January and April. The eastern coast has a humid and sub-humid climate, with rainfall ranging from 800 to 1,200 mm per year, predominantly between February and July (www.rn.gov.br/secretarias/idema/perfilrn/Aspectos-fisicos.pdf).

In this study, the rainfall recorded for one month before each collection ranged from 28.6 to 298.6 mm, in the rainy season and from 0 to 35.4 mm, in the dry season. The IHHNV infection rates during the rainy and dry season were 34.57% and 35.90%, respectively (Table 1). Rainfall did not significantly influence ($P>0.05$) the IHHNV infection rate in *L. vannamei*, according to Spearman and Multiple Logistic Regression tests (Fig. 5 and Table 2).

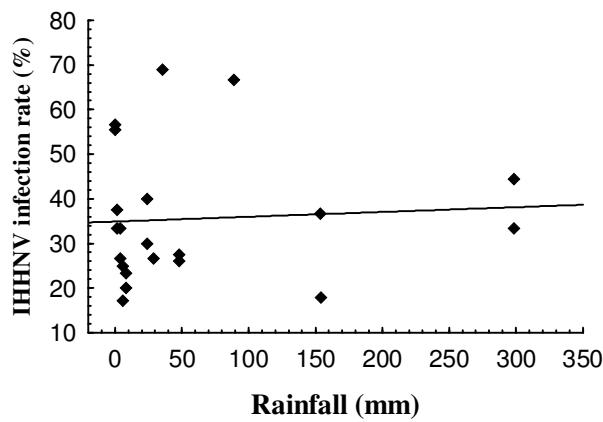


Fig.5. The Correlation between IHHNV infection rate in *L. vannamei* and the rainfall index ($P>0.05$).

3.1.4. Influence of stocking density on the IHHNV infection rate

The IHHNV infection rate in *L. vannamei* cultured in extensive (≤ 15 shrimp m^{-2}), semi-intensive (from 18 to 27 shrimp m^{-2}) and intensive (> 30 shrimp m^{-2}) stocking density systems were 28.7%, 28.3% and 47.8%, respectively, and was significantly higher in high

stocking densities ($\chi^2 = 16.38$, $P < 0.001$) (Fig. 6). Statistical analysis using Spearman test showed that stocking density has significant and positive influence on the IHHNV infection rate in *L. vannamei* reared in ponds ($P < 0.05$) (Fig. 7 and Table 2).

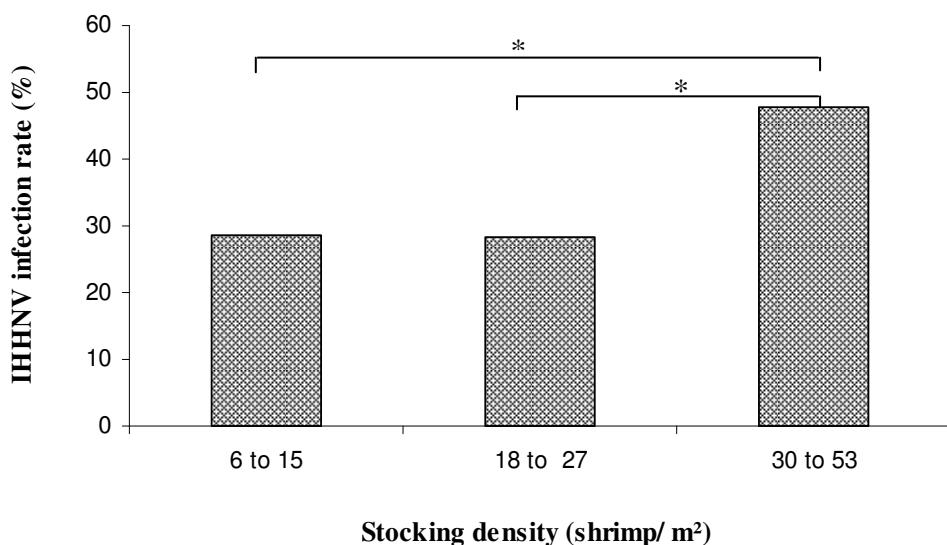


Fig.6. The IHHNV infection rate in *L. vannamei* cultured in different stocking densities levels.
* Indicates a significant difference ($P < 0.01$).

The Multiple Logistic Regression test analyzing the simultaneous effect of all environmental factors studied, showed significant influence ($P < 0.01$) of stocking density in the IHHNV infection rate in *L. vannamei* (Table 2).

Table 2.

Significance of environmental factors influence on the IHHNV infection rate in *L.vannamei* reared in ponds according to Spearman and multiple logistic regression test.

Environmental parameters	Spearman		Multiple Logistic Regression	
	r _s	P	Coefficient	P
Salinity	-0.618	**0.002	-0.012	*0.025
Temperature	-0.242	0.288	-0.066	0.301
Dissolved oxygen	0.059	0.798	0.022	0.710
Rainfall	-0.031	0.892	0.001	0.335
Stocking density	0.489	*0.024	0.027	**0.003

*p<0.05, **p<0.01.

4. Discussion

Owing to the economic importance of penaeid shrimp worldwide, many studies have been conducted to understand their physiology. This includes researches about the influence of environmental factors on the shrimp growth, survival and immune system (Franco, Ferreira & Nobre 2006). The interest in controlling shrimp diseases has led to the development of researches about the effects of environmental factors on bacterial and viral infections (Cheng *et al.* 2003; Cheng, Juang & Chen 2004; Liu & Chen 2004; Liu, Yu, Song, Guan, Jian & He 2006; Wang & Chen 2006), but few studies mention the influence of these factors on IHHNV infection in *L. vannamei* (Bray *et al.* 1994; Montgomery-Brock, Tacon, Poulos & Lightner 2007). A few studies about cultured shrimp have been conducted in outdoor tanks (Nunan, Arce, Staha & Lightner 2001; Motte *et al.* 2003; Yang, Song, Huang, Shi & Liu 2007). The present study about the influence of environmental factors on the IHHNV infection in *L. vannamei* was performed in ponds of farms where these factors act simultaneously.

The low concentration of dissolved oxygen can interfere with shrimp growth and

survival (Clark 1986; Madenjian, Rogers & Fast 1987; Aquacop, Bedier & Soyez 1988; Allan & Maguire 1991). Seidman & Lawrence (1985) reported that dissolved oxygen concentrations below 2 mg L⁻¹ significantly reduce the growth rate of *Litopenaeus vannamei* and *Panaeus monodon*. The effect of hypoxia has been shown to reduce the total haemocyte count (THC) of crustaceans and lead to an enhanced sensitivity to pathogens (Le Moullac, Soyez, Saulnier, Ansquer, Avarre & Levy 1998; Le Moullac & Haffner 2000; Cheng, Liu, Hsu & Chen 2002; Jian *et al.* 2005). Studies have shown that low levels of dissolved oxygen can also induce the proliferation of Yellow Head Virus (YHV) and increase penaeid susceptibility to vibriosis (Kautsky *et al.* 2000). In the present study, dissolved oxygen levels ranged from 3.0 to 10.2 mg L⁻¹, did not significantly influence the IHHNV infection rate, probably due to other factors in the ponds influencing shrimp resistance to pathogens.

Many studies show that the temperature affects directly the shrimp physiology, total haemocyte count (THC) (Le Moullac & Haffner 2000; Cheng & Chen 2000) and susceptibility to pathogens (Wang & Chen 2006). In *L. vannamei*, growth rates (Ponce-Palafox *et al.* 1997) and THC (Lu-Qing, Bo, Liang-Xu & Jiag 2007) were higher above 30°C than below 20°C. IHHNV replication in this specie decreased at 32°C when compared at 25-27°C (Montgomery-Brock *et al.* 2007).

The mean annual air temperature in Rio Grande do Norte is around 25.5°C, with a maximum of 31.3 and minimum of 21.1°C (www.emparn.rn.gov.br/links/meteorologia/Climatologia/temperatura.asp#). In the present study the temperature in ponds ranged from 25.7 to 31.6°C and no significant temperature influence on the IHHNV infection rate in *L. vannamei* was found.

Salinity acts directly on animal metabolism, inducing energy expenditure to maintain body homeostasis. However, salinity has little effect on the metabolic rate of

euhaline shrimp, but under unhealthy conditions, such as viral infection, the stress provoked by high salinity further augments growth retardation produced by the infections (Le Moullac & Haffner 2000). The isoosmotic point has been associated with optimum growth conditions for penaeid shrimp. On the other hand, when comparing different isoosmotic points and optimum salinity for growth in different shrimp species, Brito *et al.* (2000) found that better growth does not always coincide with the isoosmotic point. They reported that *L. vannamei* had best growth rates in salinity below their isoosmotic point. Many studies have showed optimal growth and survival rates when *L. vannamei* were reared in low salinity (Bray *et al.* 1994; Lamore, Lamore & Scarpa 2001). However, Ponce-Palafox *et al.* (1997) found best growth and survival of juvenile *L. vannamei* in salinity between 33 to 40‰. IHHNV-infected *L. vannamei* showed higher growth at 25‰ than at 49‰ (Bray *et al.* 1994). Some studies report a decrease in pathogen resistance (Wang & Chen 2005) and in total haemocyte count (THC) of shrimp reared in low salinities (Le Moullac & Haffner 2000; Perazzolo, Gargioni, Ogliari & Barracco 2002). Our results showed that the IHHNV infection rate in low (0-1‰) salinity ponds was significantly higher than that of high (38-57‰) salinity ponds. The high IHHNV infection rate at low salinity may be due to reduced haemocytes in *L. vannamei* (Le Moullac & Haffner 2000).

Periods of dry and wet weather affect the concentration of various chemical components, changing the water quality that supplies the shrimp ponds (Milstein *et al.* 2005). In the present study, the different rainfall rates during the rainy and dry seasons had no significant influence on the IHHNV infection rate in *L. vannamei*.

Culture intensification affects growth, survival and production of shrimp. The use of high stocking density has caused low survival rates in *Penaeus esculentus* (Arnold *et al.* 2006), *Penaeus monodon* (Ray & Chien 1991; Allan & Maguire 1992), *L. stylirostris*

(Martin *et al.* 1998), *Fenneropenaeus chinensis* (Li *et al.* 2006) and in the lobster *Panulirus cygnus* (Johnston *et al.* 2006). The risk of disease in ponds is also associated with high stocking density. IHHNV prevalence in several wild populations of *Penaeus monodon* has been correlated to shrimp culture intensification. Moreover, high levels of viral load have been found in areas with intensive shrimp culture systems (Kautsky *et al.* 2000). The aforementioned data are consistent with the results of the present study, in which the IHHNV infection rate in *L. vannamei* reared in intensive systems (30-53 shrimp m⁻²) increased. The use of high densities and resulting competition for space and food leads to cannibalism (Arnold *et al.* 2006), increasing the occurrence of horizontal transmission and lowering survival rates.

In conclusion, low salinity and high stocking density are stressful conditions for *L. vannamei* cultured in ponds. These conditions likely make the shrimp more susceptible to infections by pathogens such as IHHNV. Both stressful conditions significantly influenced the high IHHNV infection rate found in the ponds, but temperature, dissolved oxygen and rainfall had no such influence.

Acknowledgements

Support for this research was provided by ETENE/FUNDECI-BNB and MCT, Brazil.

References:

- Allan G. L. & Maguire G. B. (1991) Lethal levels of low dissolved oxygen and effects of short-term oxygen stress on subsequent growth of juvenile *Penaeus monodon*. *Aquaculture* **94**, 27-37.

Allan G. L. & Maguire G. B. (1992) Effects of stocking density on production of *Penaeus monodon* Fabricius in model farming ponds. *Aquaculture* **107**, 49-66.

Aquacop, Bedier E. & Soyez C. (1988) Effect of dissolved oxygen concentration on survival and growth of *Penaeus vannamei* and *Penaeus stylirostris*. *Journal of the World Aquaculture Society* **19**, 13A.

Arnold S. J., Sellars M. J. C. & Coman G. J. (2006) An evaluation of stocking density on the production of juvenile brown tiger shrimp (*Penaeus esculentus*). *Aquaculture* **256**, 174-179.

Bachère E. (2000) Shrimp immunity and disease control. *Aquaculture* **191**, 3-11.

Bonami J. R., Trumper B., Mari J., Brehélin M. & Lightner D. V., (1990) Purification and characterization of the infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus of penaeid shrimp. *Journal of General Virology* **71**, 2637-2664.

Bray W. A., Lawrence A. L. & Leung-Trujillo J. R. (1994) The effect of salinity on growth and survival of *Penaeus vannamei*, with observations on the interaction of IHHNV virus and salinity. *Aquaculture* **122**, 133-146.

Brito R., Chimal M. E. & Rosas C. (2000) Effect of salinity in survival, growth, and osmotic capacity of early juveniles of *Farfantepenaeus brasiliensis* (decapoda: penaeid). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **244**, 253-263.

Brock J. A. & Main K. L. (1994) Guide to the Common Problems and Diseases of Cultured *Penaeus vannamei*. World Aquaculture Society. The Oceanic Institute, Makapuu Point, P.O.Box 25280, Honolulu, HI, 241 pp.

Carr W. H., Sweeney J. N., Nunan L., Lightner D. V., Hisch H. H. & Reddington J. J. (1996) The use of an infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus gene probe serodiagnostic field kit for the screening of candidate specific pathogen-free *Penaeus vannamei* broodstock. *Aquaculture* **147**, 1-8.

Cheng W. & Chen J. C. (2000) Effects of pH, temperature and salinity on immune parameters of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish & Shellfish Immunology* **10**, 387-391.

Cheng W., Liu C. H., Hsu J. P. & Chen J. C. (2002) Effect of hypoxia on the immune response of giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* and susceptibility to pathogen Enterococcus. *Fish & Shellfish Immunology* **13**, 351-65.

Cheng W., Liu C. H. & Kuo C. M. (2003) Effects of dissolved oxygen on hemolymph parameters of freshwater giant prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *Aquaculture* **220**, 843-856.

Cheng W., Juang F. M. & Chen J. C. (2004) The immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus* at different salinity levels. *Fish & Shellfish Immunology* **16**, 295-306.

Clark J. V. (1986) Inhibition of molting in *Penaeus semisulcatus* by long-term hypoxia. *Aquaculture* **52**, 253-4.

Dhar A. K., Roux M. M. & Kliment K. R. (2001) Detection and quantification of Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus and White Spot Virus in shrimp using real-time quantitative PCR and SYBR green chemistry. *Journal of Clinical Microbiology* **39**, 2835-2845.

Flegel T. W. (2006) Detection of major penaeid shrimp viruses in Asia, a historical perspective with emphasis on Thailand. *Aquaculture* **258**, 1-33.

Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO (2006) State of world aquaculture: 2006. *Fisheries Technical Paper*. N°. 500. Rome, Italy, 134pp.

Franco A. R., Ferreira J. G. & Nobre A. M. (2006) Development of growth model for penaeid shrimp. *Aquaculture* **259**, 268-277.

Garen P. & Martin J. L. M. (2002) Could a seasonal-like reduction in light radiation intensity affect cultured shrimp (*Penaeus stylirostris stimpson*) yield? *Aquaculture International* **10**, 43-55.

Instituto de Defesa do Meio Ambiente - IDEMA (2001) Anuário Estatístico do Brasil: Aspectos físicos do Rio Grande do Norte. <http://www.rn.gov.br/secretarias/idema/perfilrn/Aspectos-fisicos.pdf>.

Jiang L., Pan, L. & Fang-Bo (2005) Effect of dissolved oxygen on immune parameters of the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology* **18**, 185-188.

Johston D., Melville-Smith R., Hendriks B., Maguire G. B., Phillips B. (2006) Stocking density and shelter type for the optimal growth and survival of western rock lobster *Panulirus Cygnus* (George). *Aquaculture* **206**, 114-127.

Kalagayan H., Godin D., Kanna R., Hagino G., Sweeney J. & Wyban J. (1991) IHHNV virus as an etiological factors in Runt-deformity syndrome (RDS) of juvenile *Penaeus vannamei* cultured in Hawaii. *Journal of the World Aquaculture Society* **22**, 235-243.

Kautsky N., Ronnback P., Tedengren M. & Troell M. (2000) Ecosystem perspectives on management of disease in shrimp pond farming. *Aquaculture* **191**, 145-161.

Lamore S., Lamore C. R. & Scarpa J. (2001) Effect of low salinity on growth and survival of postlarvae and juvenile *Litopenaeus vannamei*. *Journal of the World Aquaculture Society* **32**, 385-392.

Le Moullac G., Soyez C., Saulnier D., Ansquer D., Avarre C. J. & Levy P. (1998) Effect of hipoxie stress on the immune response and the resistance to vibriosis of the shrimp *Penaeus stylirostris*. *Fish & Shellfish Immunology* **8**, 621-9.

Le Moullac G. & Haffner, P. (2000) Environmental factors affecting immune responses in crustacean. *Aquaculture* **191**, 121-131.

Li Y., Li J. & Wang Q. (2006) The effects of dissolved oxygen concentration and stocking density on growth and non-specific immunity factors in Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. *Aquaculture* **256**, 608-616.

Lightner D. V., Redman R. M. & Bell T. A. (1983a) Infectious Hipodermal and Hematopietic necrosis a newly recognized virus disease of penaeid shrimp. *Journal of Invertebrate Pathology* **42**, 62-80.

Lightner D. V., Redman R. M. & Bell T. A. (1983b) Detection of IHHNV virus in *Penaeus stylirostris* and *P. vannamei* imported into Hawaii. *Journal of the World Aquaculture Society* **4**, 212-225.

Lightner D.V. (1996b) A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, L. A.

Lightner D. V. & Redman R. M. (1998) Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture* **164**, 201-220.

Liu C. & Chen J. (2004) Effect of ammonia on the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus*. *Fish & Shellfish Immunology* **16**, 321-334.

Liu B., Yu Z., Song X., Guan Y., Jian X. & He J. (2006) The effect of acute salinity change on white spot syndrome (WSS) outbreaks in *Fenneropenaeus chinesis*. *Aquaculture* **253**, 163-170.

Lotz J. M. (1997) Special topic review: Viruses, biosecurity and specific pathogen-free stocks in shrimp aquaculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **13**, 405-413.

Lu-Qing P., Bo F., Liang-Xu J. & Jiag L. (2007) The effect of temperature on Selected Immune Parameters of the White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Journal of the World Aquaculture Society* **38**, 326-332.

Madenjian C. M., Rogers G. L. & Fast A. W. (1987) Predicting night-time dissolved oxygen loss in prawn pond of Hawaii: part1. Evaluation of traditional methods. *Aquaculture Engineering* **6**, 191-208.

Martin J. L. M., Veran Y., Guelorget O. & Pham D. (1998) Shrimp rearing: stocking density, growth, impact on sediment, waste output and their relationships studied through the nitrogen budget in rearing ponds. *Aquaculture* **164**, 135-149.

Milstein A., Islam M. S., Wahab M. A., Kamal A. H. & Dewan S. (2005) Characterization of water quality in shrimp ponds of different sizes and with different management regimes using multivariate statistical analysis. *Aquaculture International* **13**, 501-518.

Montgomery-Brock D., Tacon A. G. T, Poulos B. & Lightner D. (2007) Reduced replication of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) in *Litopenaeus vannamei* held in warm water. *Aquaculture* **265**, 41-48.

Motte E., Yugcha E., Luzardo J., Castro F., Leclercq G., Rodríguez J., Miranda P., Borja O., Serrano J., Terreron M., Montalvo K., Nárvaez A., Tenorio N., Cedeño V., Mialhe E. & Boulo V. (2003) Prevention of IHHNV vertical transmission in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* **219**, 57-70.

Nunan L. M., Poulos B.T. & Lightner D. V. (2000) Use of Polymerase Chain reaction for the Detection of Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus in Penaeid Shrimp. *Marine Biotechnology* **2**, 319-328.

Nunan L. M., Arce S. M., Staha R. J. & Lightner D. V. (2001) Prevalence of Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus (IHHNV) and White Spot Syndrome Virus (WSSV) in *Litopenaeus vannamei* in Pacific Ocean off the Coast of Panama. *Journal of the World Aquaculture Society* **32**, 330-334.

Perazzolo L. M., Gargioni R., Ogliari P. & Barracco M. A. A. (2002) Evaluation of some hemato-immunological parameters in the shrimp *Farfantepenaeus paulensis* submitted to environmental and physiological stress. *Aquaculture* **214**, 19-33.

Ponce-Palafox J., Martinez-Palacios C. A., Ross L. G. (1997) The effects of salinity and temperature on the growth and survival rates of juvenile white shrimp, *Penaeus vannamei*, Boone, 1931. *Aquaculture* **157**, 107-115.

Ray W. M. & Chien Y. H. (1991) Effect of stocking density and aged sediment on tiger prawn, *Penaeus monodon*, pond system. *Aquaculture* **104**, 231-248.

Sambrook J., Fritsch E. F. & Maniatis T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. 2.ed. Cold Spring: Harbor Laboratory.

Sanguinetti C. J., Dias E. N. & Simpson A. J. G. (1994) Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamida gels. *Biotechniques* **175**, 915-916.

Seidman E.R. & Lawrence A. L. (1985) Growth, feed digestibility, and proximate body composition of juvenile *Penaeus vannamei* and *Penaeus monodon* grown at different dissolved oxygen levels. *Journal of the World Mariculture Society* **16**, 333-346.

Tang K. F. J. & Lightner D. V. (2001) Detection and quantification of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in peneid shrimp by real-time PCR. *Disease of Aquatic Organisms* **44**, 79 – 85.

Wang L. & Chen J. (2005) The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and susceptibility to *Vibrio alginolyticus* at salinity levels. *Fish & Shellfish Immunology* **18**, 269-278.

Wang F. & Chen J. (2006) Effect of salinity on the immune response of tiger shrimp *Penaeus monodon* and its susceptibility to *Photobacterium damselaе* subsp. *damselaе*. *Fish & Shellfish Immunology* **20**, 671-681.

Yang B., Song X., Huang J., Shi C. & Liu L. (2007) Evidence of existence of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in penaeid shrimp cultured in China. *Veterinary microbiology* **120**, 63-70.

Zhang P., Zhang X., Li J. & Huang G. (2006) 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* **256**, 579-587.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Associação Brasileira de Criadores de Camarão (ABCC), 2005. PROGRAMA DE BIOSSEGURANÇA PARA FAZENDAS DE CAMARÃO MARINHO. Boa Viagem, Recife, PE. 1^a edição.

Associação Brasileira de Criadores de Camarão (ABCC), 2007. Estatísticas Nacionais. Disponível em: www.abccam.com.br [10/05/07]

ALFREDO, J., 2003. Relatório de participação em missão oficial sobre carcinicultura, ocorrida no Estado do Rio Grande do Norte, nos empreendimentos de carcinicultura inseridos no Rio Potengi. Disponível em: www.jaoalfredo.org.br/relatorios/Relatorio3.doc. [03/10/07]

ALLAN, G. L.; MAGUIRE, G. B., 1991. Lethal levels of low dissolved oxygen and effects of short-term oxygen stress on subsequent growth of juvenile *Penaeus monodon*. **Aquaculture** 94, 27-37.

ALLAN, G. L.; MAGUIRE, G. B., 1992. Effects of stocking density on production of *Penaeus monodon* Fabricius in model farming ponds. **Aquaculture** 107, 49-66.

ALVAREZ-BOREGO, J.; CHÁVEZ-SÁNCHEZ, M. C., 2001. Detection of IHHNV virus in shrimp tissue by digital color correlation. **Aquaculture** 194, 1-9.

AQUACOP; BEDIER, E.; SOYEZ, C., 1988. Effect of dissolved oxygen concentration on survival and growth of *Panaeus vannamei* and *Penaeus stylirostris*. **J. World Aquac. Soc.** 19,13A.

ARNOLD, S. J.; SELLARS, M. J. C.; COMAN, G. J., 2006. An evaluation of stocking density on the production of juvenile brown tiger shrimp (*Penaeus esculentus*). **Aquaculture** 256, 174-179.

BACHÈRE, E., 2000. Shrimp immunity and disease control. **Aquaculture** 191, 3-11.

BARBIERI, R. C. J.; OSTRENSKY, A. N., 2001. **Camarões marinhos:** reprodução, maturação e larvicultura. Minas Gerais: Aprenda Fácil, v.1.

BARBIERI, R. C. J.; OSTRENSKY, A. N., 2002. **Camarões marinhos:** engorda. Minas Gerais: Aprenda Fácil, v. 2.

BARRACCO, M. A., 2004. Mecanismo de resistência a doenças em crustáceos. In: RANZANI-PAIVA, M. J. T.; PAKEMOTO, R. M.; LIZANA, M. delos A. P. (Ed). **Sanidade de organismos aquáticos**. Santa Catarina: Varela, cap. 2, 49–72.

BELL, T. A.; LIGHTNER, D. V., 1984. IHHN virus: infectivity and pathogenicity studies in *Penaeus stylirostris* and *Penaeus vannamei*. **Aquaculture** 38, 185-194.

BELL, T. A.; LIGHTNER, D. V., 1988. A handbook of normal penaeid shrimp Histology. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA.

BONAMI, J. R.; TRUMPER, B.; MARI, J.; BREHELIN, M.; LIGHTNER, D.V., 1990. Purification and characterization of the infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus of penaeid shrimp. **J. Gen. Virol.** 71, 2637-2664.

BRAY, W. A.; LAWRENCE, A. L.; LEUNG-TRUJILLO, J. R., 1994. The effect of salinity on growth and survival of *Penaeus vannamei*, with observations on the interaction of IHHNV virus and salinity. **Aquaculture** 122, 133-146.

BRITO, R.; CHIMAL, M.; ROSAS, C., 2000. Effect of salinity in survival, growth, and osmotic capacity of early juveniles of *Farfantepenaeus brasiliensis* (decapoda: penaeid). **J. Exp. Mar. Bio. Ecol.** 244, 253-263.

BROCK, J. A.; MAIN, K. L., 1994. Guide to the Common Problems and Diseases of Cultured *Penaeus vannamei*. World Aquaculture Society. The Oceanic Institute, Makapuu Point, P.O.Box 25280, Honolulu, HI, 241 pp.

CÁRDENAS, S. S., 2001. Nuevas tendencias en el control de enfermedades. **Panorama acuícola** 6, 42-43.

CARR, W. H.; SWEENEY, J. N.; NUNAN, L.; LIGHTNER, D. V.; HISCH, H. H.; REDDINGTON, J. J., 1996. The use of an infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus gene probe serodiagnostic field kit for the screening of candidate specific pathogen-free *Penaeus vannamei* broodstock. **Aquaculture** 147, 1-8.

CHENG, W.; CHEN, J., 2000. Effects of pH, temperature and salinity on immune parameters of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. **Fish Shellfish Immunol.** 10, 387-391.

CHENG, W.; LIU, C. H.; HSU, J. P.; CHEN, J. C., 2002. Effect of hypoxia on the immune response of giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* and susceptibility to pathogen Enterococcus. **Fish Shellfish Immunol.** 13, 351-65.

CHENG, W.; LIU, C. H.; KUO, C. M., 2003. Effects of dissolved oxygen on hemolymph parameters of freshwater giant prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). **Aquaculture** 220, 843-856.

CHENG, W.; JUANG, F.; CHEN, J., 2004. The immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus* at different salinity levels. **Fish Shellfish Immunol.** 16, 295-306.

CLARK, J. V., 1986. Inhibition of molting in *Penaeus semisulcatus* by long-term hypoxia. **Aquaculture** 52, 253-4.

DHAR, A. K.; ROUX, M. M.; KLIMPEL, K. R., 2001. Detection and quantification of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus and white spot virus in shrimp using real-time quantitative PCR and SYBR green chemistry. **J. Clin. Microb.** 39, 2835-2845.

FLEGEL, T. W., 2006. Detection of major penaeid shrimp viruses in Asia, a historial perspective with emphasis on Thailand. **Aquaculture** 258, 1-33.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2006. State of world aquaculture: 2006. *Fisheries Technical Paper*. N°. 500. Rome, Italy, 134pp.

FRANCO, A. R.; FERREIRA, J. G.; NOBRE, A. M., 2006. Development of growth model for penaeid shrimp. **Aquaculture** 259, 268-277.

GAREN, P.; MARTIN, J. L. M., 2002. Could a seasonal-like reduction in light radiation intensity affect cultured shrimp (*Penaeus stylorostis stimpson*) yield? **Aquaculture International** 10, 43-55.

HERNÁNDEZ, J. Z., 2000. Manual Purina de biosseguridade no cultivo de camarões marinhos. São Paulo: Agribrands do Brasil, Paulínia.

HERNÁNDEZ, J. Z.; NUNES, A. J. P., 2001. Biossegurança no cultivo de camarão marinho: incidência de enfermidades e métodos de diagnóstico. **Revista da ABCC** 1, 48-51.

HSIEH, C. Y.; CHUANG, P. C.; CHEN, L. C.; TU, C.; CHIEN, M. S.; HUANG, K. C.; KAO, H. F.; TUNG, M. C.; TSAI, S. S., 2006. Infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus (IHHNV) infections in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. **Aquaculture** 258, 73-79.

Instituto de Defesa do Meio Ambiente (IDEMA), 2001. Anuário Estatístico do Brasil: Aspectos físicos do Rio Grande do Norte. Disponível em: <http://www.rn.gov.br/secretarias/idema/perfilrn/Aspectos-fisicos.pdf>

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), 2007. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br> [10/12/07]

JIANG, L.; PAN, L.; FANG-BO, 2005. Effect of dissolved oxygen on immune parameters of the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Fish Shellfish Immunol.** 18, 185-188.

JOHSTON, D.; MELVILLE-SMITH, R.; HENDRIKS, B.; MAGUIRE, G. B.; PHILLIPS, B., 2006. Stocking density and shelter type for the optimal growth and survival of western rock lobster *Panulirus Cygnus* (George). **Aquaculture** 206, 114-127.

KALAGAYAN, G.; GODIN, D.; KANNA, R.; HAGINO, G.; SWEENEY, J.; WYBAN, J.; BROCK, J., 1991. IHHNV virus as an etiological factor in runt-deformity syndrome of juvenile *Penaeus vannamei* cultured in Hawaii. **J. World Aquac. Soc.** 22, 235-243.

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

LAMORE, S.; LAMORE, C. R.; SCARPA, J., 2001. Effect of low salinity on growth and survival of postlarvae and juvenile *Litopenaeus vannamei*. **J. World Aquac. Soc.** 32, 385-392.

LE MOULLAC, G.; SOYEZ, C.; SAULNIER, D.; ANSQUER, D.; AVARRE, C. J.; LEVY, P., 1998. Effect of hipoxie stress on the immune response and the resistance to vibriosis of the shrimp *Penaeus stylirostris*. **Fish Shellfish Immunol.** 8, 621-9.

LE MOULLAC, G.; HAFFNER, P., 2000. Environmental factors affecting immune responses in crustacean. **Aquaculture** 191, 121-131.

LEE, S. Y.; SÖDERHÄLL, K., 2002. Early events in crustacean innate immunity. **Fish Shellfish Immunol.** 12, 421-437.

LI, Y.; LI, J.; WANG, Q., 2006. The effects of dissolved oxygen concentration and stocking density on growth and non-specific immunity factors in Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. **Aquaculture** 256, 608-616.

LIGHTNER, D. V.; REDMAN, R. M.; BELL, T. A., 1983a. Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis, a newly recognized virus disease of penaeid shrimp. **J. Inverteb. Pathol.** 42, 62-70.

LIGHTNER, D. V.; REDMAN, T. A.; BELL, T. A., 1983b. Detection of IHHN virus in *Penaeus stylirostris* and *P. vannamei* imported into Hawaii. **J. World. Maric. Soc.** 14, 212-225.

LIGHTNER, D. V.; REDMAN, R. M., 1991. Hosts, geographic range and diagnostic procedures for the penaeid virus diseases of shrimp culturists in the Americas. In: DeLoach, P., Dougherty, W. J., Davidson, M. A. (Eds.), *Frontiers of Shrimp Research*. Elsevier, Amsterdam, 173-196.

LIGHTNER, D. V., 1996a. Epizootiology, distribution and the impact on international trade of two penaeid shrimp viruses in the Americas. **Rev. Sci. Tech.** 15, 579-601.

LIGHTNER, D. V. (Ed.), 1996b. *A handbook of pathology and diagnostic procedures for diseases of penaeid shrimp*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LO, USA.

LIGHTNER, D. V.; REDMAN, R. M.; POULOS, B. T.; NUNAN, L. M.; MARI, J. L.; HASSON, K. W., 1997. Risk of spread of penaeid shrimp viruses in the Americas by the international movement of live and frozen shrimp. **Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epizoot.** 16, 146-160.

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

LIGHTNER, D. V., 2003. The Penaeid Shrimp Viral Pandemics due to IHHNV, WSSV, TSV and YHV: History in the Americas and Current Status. University of Arizona, Tucson, USA. Disponível em: www.lib.noaa.gov [02/10/2007].

LIU, C.; CHEN, J., 2004. Effect of ammonia on the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus*. **Fish Shellfish Immunol.** 16, 321-334.

LIU, B.; YU, Z.; SONG, X.; GUAN, Y.; JIAN, X.; HE, J., 2006. The effect of acute salinity change on white spot syndrome (WSS) outbreaks in *Fenneropenaeus chinesis*. **Aquaculture** 253, 163-170.

LOTZ, J. M., 1997. Special topic review: viruses, biosecurity and specific pathogen-free stocks in shrimp aquaculture. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 13, 405-413.

LOY, J. K.; DEWHIRST, F. E.; WEBER, W.; FREPLIER, P. F.; GABAR, T. L.; TASCA, S. I.; TEMPLETON, J. W., 1996. Molecular phylogeny and in situ detection of the etiologic agent of Necrotizing Hepatopancreatitis in shrimp. **Appl. Environ. Microbiol.** 62, 3439 – 3445.

LU-QING, P.; BO, F.; LIANG-XU, J.; JIAG, L., 2007. The effect of temperature on Selected Immune Parameters of the White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **J. World Aquac. Soc.** 38, 326-332.

MADENJIAN, C. M.; ROGERS, G. L.; FAST, A. W., 1987. Predicting night-time dissolved oxygen loss in prawn pond of Hawaii: part1. Evaluation of traditional methods. **Aquaculture Engineering** 6, 191-208.

MARI, J.; BONAMI, J. R.; LIGHTNER, D.V., 1993. Partial cloning of the genome of infectious hypodermal and haemopoietic necrosis virus, an unusual parvovirus pathogenic for penaeid shrimp; diagnosis of the disease using a specific probe. **J. Gen. Virol.** 74, 2637-2643.

MARTIN, J. L. M.; VERAN, Y.; GUELORGET, O.; PHAM, D., 1998. Shrimp rearing: stocking density, growth, impact on sediment, waste output and their relationships studied through the nitrogen budget in rearing ponds. **Aquaculture** 164, 135-149.

MARTINS, P. C. C., 2004. Influência das condições ambientais e das técnicas do manejo de produção sobre a ocorrência de enfermidades no cultivo de camarão

marinho *Litopenaeus vannamei* no estado do Ceará. 117p. Tese (Pós-graduação em Ecologia e Recursos Naturais), Universidade Federal de São Carlos. São Paulo.

MILSTEIN, A.; ISLAM, M. S.; WAHAB, M. A.; KAMAL, A. H.; DEWAN, S., 2005. Characterization of water quality in shrimp ponds of different sizes and with different management regimes using multivariate statistical analysis. **Aquaculture International** 13, 501-518.

MONTGOMERY-BROCK, D.; TACON, A. G. T; POULOS, B.; LIGHTNER, D., 2007. Reduced replication of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) in *Litopenaeus vannamei* held in warm water. **Aquaculture** 265, 41-48.

MORE, W. R.; FRELIER, P., 2002. Desenvolvimento e implementação de programas de saúde exigem esforço integrado. **Revista ABCC** 3, 26-28.

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

NUNAN, L. M.; POULO, B. T.; LIGHTNER, D. V., 2000. Use of polymerase chain reaction for the detection of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in penaeid shrimp. **Mar. Biotechnol.** 2, 319-328.

NUNAN, L. M.; ARCE, S. M.; STAHA, R. J.; LIGHTNER, D. V., 2001. Prevalence of infectious hypodermal and hematopoietc necrosis virus (IHHNV) and white spot syndrome virus (WSSV) in *Litopenaeus vannamei* in the Pacific Ocean off the coast of Panama. **J. World Aquac. Soc.** 32, 330-334.

NUNES, A. J. P.; MARTINS, P. C., 2002. Avaliando o Estado de Saúde de Camarões Marinhos de Engorda. **Panorama da Aqüicultura**, 23-33.

NUNES, A. J. P.; MARTINS, P. C.; GESTEIRA, T. C. V., 2004. Carcinicultura Ameaçada. Produtores sofrem com as mortalidades decorrentes do Vírus da Mionecrose Infecciosa (IMNV). **Panorama da Aqüicultura**, 37-51.

Panorama da Aqüicultura, 2000. Camarão: Nunca se exportou tanto, 15-18 p.

Panorama da Aqüicultura, 2004. Carcinicultura Brasileira: O Censo de 2003. 14, 23-25.

PERAZZOLO, L. M.; GARGIONI, R.; OGLIARI, P.; BARRACCO, M. A. A., 2002. Evaluation of some hemato-immunological parameters in the shrimp *Farfantepenaeus paulensis* submitted to environmental and physiological stress. **Aquaculture** 214, 19-33.

PEREZ-FARFANTE, I.; KENSLEY, B. F., 1997. Penaeoid and sergestoid shrimp and prawns of the world: key of diagnosis to the families and genera. **Museum National d'Histoire Naturelle**, Paris, 175, 233 p.

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

PRIMAVERA, J. H.; QUINITIO, E. T., 2000. Runt-deformity syndrome incultured giant tiger prawn *Penaeus monodon*. **Journal of Crustacean Biology** 20, 796-802.

QUAGLIA, L. J. C., 1993. Estudo da qualidade da água do canal de Taperoá (Valença-BA): implicações na carcinicultura marinha, 118p. Tese de mestrado (Curso de Mestrado em Produção Aquática do Instituto de Biologia da Universidade Federal da Bahia).

QUÉRÉ, R.; COMMES, T.; MARTI, J.; BONAMI, J. R.; PIQUEMAL, D., 2002. White spot syndrome vírus and infectious hypodermal and hematopoietic necrosis vírus simultaneous diagnosis by miniarray system with colorimetry detection. **Journal of Virological Methods** 105, 189 – 196.

RAA, J.; CRUZ-SUÁREZ, L. E.; RICQUE-MARIE, D.; TAPIA-SALAZAR, M.; OLVERA-NOVOA, M. A.; CIVERA-CEVERA-CEREcedo, R., 2000. The use of immune-stimulants in fish and shellfish feeds. In: Simposium Internacional de Nutrición Acuícola, Avances en Nutrición Acuícola, México, 5, 19-22.

RAY, W. M.; CHIEN, Y. H., 1991. Effect of stocking density and aged sediment on tiger prawn, *Penaeus monodon*, pond system. **Aquaculture** 104, 231-248.

RÍO-RODRÍGUEZ, R. E. ; SOTO-RODRÍGUEZ, S.; LARA-FLORES, M.; CU-ESCAMILLA, A. D.; GOMEZ-SOLANO, M. I., 2006. A necrotizing

hepatopancreatitis (NHP) outbreak in shrimp farm in compeche, Mexico: A first case report. **Aquaculture** 255, 606-609.

ROCHA, I. P., 2000. Agro-negocio de Camarón Cultivado em Brasil: Una realidad. **Panorama acuícola** 5, 34-35.

RODRÍGUEZ, J.; MOULLAC, G. L., 2000. State of the art of immunological tools and health control of penaeid shrimp. **Aquaculture** 191, 110-119.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T., 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2 ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, N. Y., USA.

SANGUINETTI, C. J.; DIAS, E. N.; SIMPSON, A. J. G., 1994. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrilamide gels. **Biotechniques** 175, 915-916.

SEIDMAN, E. R.; LAWRENCE, A. L., 1985. Growth, feed digestibility, and proximate body composition of juvenile *Penaeus vannamei* and *Penaeus monodon* grown at different dissolved oxygen levels. **J. World Maric. Soc.** 16, 333-346.

SHIKE, H.; DHAR, A.; BURNS, J.; SHIMIZU, C.; JOUSSET, F.; KLIMPE, K.; BERGOIN, M., 2000. Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus of shrimp is related to mosquito brevidensoviruses. **Virology** 276, 167-177.

SÖDERHÄLL, K.; CERENIUS, L., 1992. Crustacean Immunity. **Annual Rev. of Fish Diseases**, 3-23.

TANG, K. F. J.; LIGHTNER, D. V., 2001. Detection and quantification of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in peneid shrimp by real-time PCR. **Dis. Aquati. Org.** 44, 79 – 85.

TANG, K. F. J.; POULOS, B. T.; WANG, J.; REDMAN, R. M.; SHIH, H.; LIGHTNER, D. V., 2003. Geographic variation among infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) isolates and characteristics of their infection. **Dis. Aquati. Org.** 53, 91-99.

WANG, L.; CHEN, J., 2005. The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and susceptibility to *Vibrio alginolyticus* at salinity levels. **Fish Shellfish Immunol.** 18, 269-278.

WANG, F.; CHEN, J., 2006. Effect of salinity on the immune response of tiger shrimp *Penaeus monodon* and its susceptibility to *Photobacterium damselaе* subsp. *damselaе*. **Fish Shellfish Immunol.** 20, 671-681.

WAS - WORLD AQUACULTURE SOCIETY, 1999. Diagnosis of shrimp disease. Baton Rouge, 1999. ISNN 974.662.093-2. CD-ROM.

WICKINS, J. F.; O'C LEE, D., 2002. Crustacean farming: ranching and culture. 2nd ed., USA, Blackwell Science.

YANG, B.; SONG, X. L.; HUANG, J.; SHI, C.Y.; LIU, L., 2007. Evidence of existence of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus inenaeid shrimp cultured in China. **Vet. Microbiol.** 120, 63-70.

ZHANG, P.; ZHANG, X.; LI, J.; HUANG, G., 2006. 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** 256, 579-587.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)

[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)

[Baixar livros de Literatura Infantil](#)

[Baixar livros de Matemática](#)

[Baixar livros de Medicina](#)

[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)

[Baixar livros de Meio Ambiente](#)

[Baixar livros de Meteorologia](#)

[Baixar Monografias e TCC](#)

[Baixar livros Multidisciplinar](#)

[Baixar livros de Música](#)

[Baixar livros de Psicologia](#)

[Baixar livros de Química](#)

[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)

[Baixar livros de Serviço Social](#)

[Baixar livros de Sociologia](#)

[Baixar livros de Teologia](#)

[Baixar livros de Trabalho](#)

[Baixar livros de Turismo](#)