

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DO MAR  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MARINHAS TROPICAIS

DESEMPENHO E RESISTÊNCIA  
IMUNOLÓGICA DO CAMARÃO *Litopenaeus*  
*vannamei* ALIMENTADO COM UMA DIETA  
RICA EM  $\beta$ -1,3/1,6-GLUCANO E ÁCIDO L-  
ASCÓRBICO-2-MONOFOSFATO FRENTE AO  
VÍRUS DA MIONECROSE INFECCIOSA (IMNV)

HASSAN SABRY NETO

Dissertação apresentada ao Mestrado em  
Ciências Marinhas Tropicais do Instituto  
de Ciências do Mar da Universidade  
Federal do Ceará, como requisito parcial  
à obtenção do título de MESTRE

Orientador: Alberto Jorge Pinto Nunes, Ph.D.

FORTALEZA – CE  
Outubro / 2007

A minha mãe pela grande e  
valiosa contribuição na  
minha educação e formação  
profissional.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por tornar possível a concretização de uma mais uma benção na minha vida.

Ao meu orientador, Dr. Alberto Jorge Pinto Nunes, por todo seu valioso apoio e confiança depositado em mim.

À minha esposa Ana Raphaela, pelo amor, compreensão e apoio.

Aos meus filhos Juan e Hayssa, pela alegria e razão para realização do trabalho.

À Professora Dra. Tereza Cristina V. Gesteira, pelo incentivo e orientação durante a realização dessa pesquisa.

À FUNCAP (Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pela concessão da bolsa que muito me ajudou durante esse período.

Aos colegas do Laboratório de Nutrição de Camarão do Labomar/UFC (Leandro, Silvio, Josiram, Josivania, Flávio, Bruno, Esaú e Antônio Carlos), pelo auxílio no estudo de laboratório e pelos momentos de descontração.

À minha irmã Rachel, pelo grande incentivo e apoio prestado.

A Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) pelo suporte financeiro para execução do presente estudo (Convênio Ref. 404/04)

## ÍNDICE

	<b>Página</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>v</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>viii</b>
<b>LISTA DE ANEXOS.....</b>	<b>x</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>xi</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xiii</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>01</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>04</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>07</b>
3.1 Local do Estudo.....	07
3.2 Sistema de Cultivo.....	07
3.3 Limpeza e Desinfecção da Unidade de Cultivo.....	07
3.4 Delineamento Experimental.....	09
3.5 Formulação e Fabricação de Ração.....	12
3.6 Coleta, Povoamento e Status Patológico dos Camarões Cultivados.....	15
3.7 Alimentação e Manejo do Sistema de Cultivo.....	15
3.8 Preparação do Homogenado com IMNV e Desafio <i>per os</i> .....	18
3.9 Avaliações Imunológicas.....	19
3.9.1 Desenho Amostral.....	19
3.9.2 Coleta de Hemolinfa e Preparação do Soro.....	19
3.9.3 Contagem Total de Hemócitos (THC).....	21
3.9.4 Determinação da Concentração Protéica.....	21
3.9.5 Determinação da Atividade da Enzima Fenoloxidase (PO).....	21
3.10 Análises Estatísticas.....	21
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>23</b>
4.1 Parâmetros de Qualidade de Água.....	23
4.2 Bromatologia das Rações Empregadas.....	23
4.3 Status Patológico dos Camarões Cultivados e do Homogenado.....	28
4.4 Crescimento dos Camarões Cultivados.....	28
4.5 Sobrevivência dos Camarões Cultivados.....	32
4.6 Parâmetros Imunológicos.....	32

	<b>Página</b>
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>41</b>
5.1 Qualidade e Efeito da Água sobre o Desempenho dos Camarões.....	41
5.2 Dinâmica da Mortalidade dos Camarões.....	42
5.3 Crescimento dos Camarões.....	44
5.4 Efeito do Ácido L-Ascórbico e do $\beta$ -1,3/1,6-Glucano.....	45
5.4.1 Sobre a Sobrevivência dos Camarões.....	45
5.4.2 Sobre os Parâmetros Imunológicos.....	47
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>51</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>52</b>

## LISTA DE TABELAS

	<b>Página</b>
<b>Tabela 1.</b> Detalhamento do delineamento experimental adotado durante o estudo de infectividade do camarão <i>Litopenaeus vannamei</i> com o vírus da Mionecrose Infecciosa (IMNV).....	10
<b>Tabela 2.</b> Composição das rações experimentais (g/kg de dieta) empregadas no estudo.....	13
<b>Tabela 3.</b> Tabela de arraçamento adotada no cultivo do <i>Litopenaeus vannamei</i> conduzido em tanques de 500 l de volume contendo água clara, desenvolvido segundo taxas de alimentação de NUNES & PARSONS (2000).....	17
<b>Tabela 4.</b> Média de pH, salinidade (‰) e temperatura (°C) ± desvio padrão da água empregada no cultivo do camarão <i>Litopenaeus vannamei</i> . Linhas com letras iguais indicam diferença estatística não significativa entre rações ao nível de $\alpha = 0,05$ segundo o teste <i>a posteriori</i> de Scheffé. Valores em parênteses indicam leituras mínimas e máximas.....	24
<b>Tabela 5.</b> Análise bromatológica das rações empregadas no estudo de desempenho zootécnico e imunológico do camarão <i>Litopenaeus vannamei</i> após infecção com o vírus da Mionecrose Infecciosa (IMNV). Valores apresentados como média ± desvio padrão. Todos os parâmetros bromatológicos foram realizados em duplicata, exceto energia bruta (EB) que foi conduzida em triplicata. Linhas com letras iguais indicam diferença estatística não significativa entre rações ao nível de $\alpha = 0,05$ segundo o teste <i>a posteriori</i> de Scheffé.....	27
<b>Tabela 6.</b> Resultado das análises de histopatológica e de PCR realizadas nos camarões povoados para o estudo, no homogenado empregado para o desafio <i>per os</i> e nos camarões despescados oriundo dos diferentes tratamentos estudados.....	29

## Página

<b>Tabela 7.</b>	Peso médio corporal (g) $\pm$ desvio padrão do camarão <i>Litopenaeus vannamei</i> ao longo de 70 dias de cultivo em tanques de 500 L com água clara. Médias representam o peso corporal de um total de 70 animais oriundos de cinco tanques de cultivo. Linhas com letras iguais indicam diferença estatística não significativa entre tratamentos ao nível de $\alpha = 0,05$ segundo o teste <i>a posteriori</i> de Scheffé. O desafio <i>per os</i> com o IMNV ocorreu entre o 30° e o 33° dia de cultivo nos tratamentos <b>Pos</b> , <b>VitC</b> , <b>VitBetG</b> e <b>BetG</b> .....	30
<b>Tabela 8.</b>	Correlação entre sobrevivência de camarões, crescimento corporal (g), ciclo lunar e tipo de ração utilizada segundo o Coeficiente de Pearson ( <i>r</i> ). As observações de sobrevivência empregadas nas análises de correlação representam valores diários (ciclo lunar e infecção com IMNV), semanais (crescimento) ou finais (tipo de ração). As interações significativas ao nível de $\alpha = 0,001$ segundo o Coeficiente de Pearson ( <i>r</i> ) são indicadas por ** .....	35
<b>Tabela 9.</b>	Número total de hemócitos (cels./mm <sup>3</sup> ) na hemolinfa do camarão <i>Litopenaeus vannamei</i> em três estágios de cultivo, antes e após um desafio <i>per os</i> com o vírus IMNV. Valores apresentados como média $\pm$ desvio padrão. Cada valor representa a média de três <i>pools</i> de um total de 15 animais por tratamento. As leituras foram realizadas em duplicata para cada <i>pool</i> . Letras em minúsculo e maiúsculo em comum indicam diferença estatística não significativa entre tratamentos (linhas) e dias de cultivo (colunas), respectivamente, ao nível de $\alpha = 0,05$ segundo o teste <i>a posteriori</i> de Scheffé.....	37

**Página**

- Tabela 10.** Concentração de proteínas totais (mg/l) no soro do camarão *Litopenaeus vannamei* estimada pelo método de Bradford (1976) em três estágios de cultivo, antes e após um desafio *per os* com o vírus IMNV. Valores apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. Cada valor representa a média de três *pools* de um total de 30 animais por tratamento. As análises foram realizadas em duplicata para cada *pool*. Letras em minúsculo e maiúsculo em comum indicam diferença estatística não significativa entre tratamentos (linhas) e dias de cultivo (colunas), respectivamente, ao nível de  $\alpha = 0,05$  segundo o teste *a posteriori* de Scheffé..... 38
- Tabela 11.** Atividade relativa (em função da concentração protéica) da enzima fenoxidase (PO, U/min/mg) no tempo de 0 – 5 min no soro do camarão *Litopenaeus vannamei* em três estágios de cultivo, antes e após desafio *per os* com o vírus IMNV. Valores apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. Cada valor representa a média de três *pools* de um total de 30 animais por tratamento. As análises foram realizadas em duplicata para cada *pool*. Letras em minúsculo e maiúsculo em comum indicam diferença estatística não significativa entre tratamentos (linhas) e dias de cultivo (colunas), respectivamente, ao nível de  $\alpha = 0,05$  segundo o teste *a posteriori* de Scheffé..... 39

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Vista aérea do Laboratório de Nutrição de Camarão (LNC) do Labomar/UFC às margens do Rio Pacoti (A) no município do Eusébio, Ceará. Tanques de cultivo empregados no presente estudo (B).....	08
<b>Figura 2.</b> Distribuição dos tanques de cultivo com seus respectivos tratamentos. <b>Ref</b> , ração comercial; <b>Neg</b> , ração controle negativo; <b>Pos</b> , ração controle positivo; <b>VitC</b> , ração contendo 250 mg/kg de ácido L-ascórbico-2-monofosfato; <b>VitCBetG</b> , ração contendo 1.160 mg/kg de ácido L-ascórbico-2-monofosfato em combinação com 600 mg/kg de $\beta$ -1,3/1,6-glucano; e <b>BetG</b> , ração contendo 600 mg/kg de $\beta$ -1,3/1,6-glucano.....	11
<b>Figura 3.</b> Marcação dos camarões com liga de borracha (A e B), seguido da coleta de hemolinfa (C e D).....	20
<b>Figura 4.</b> Variação diária nos parâmetros de qualidade de água ao longo do cultivo de 70 dias do <i>Litopenaeus vannamei</i> . <b>Ref</b> , ração comercial; <b>Neg</b> , ração controle negativo; <b>Pos</b> , ração controle positivo; <b>VitC</b> , ração contendo 250 mg/kg de ácido L-ascórbico-2-monofosfato; <b>VitCBetG</b> , ração contendo 1.160 mg/kg de ácido L-ascórbico-2-monofosfato em combinação com 600 mg/kg de $\beta$ -1,3/1,6-glucano; e <b>BetG</b> , ração contendo 600 mg/kg de $\beta$ -1,3/1,6-glucano.....	26
<b>Figura 5.</b> Ganho de peso semanal (g/semana) $\pm$ erro padrão ( $n = 30$ ) do camarão <i>Litopenaeus vannamei</i> alimentado com seis rações antes e depois de desafio per os com o IMNV. Os camarões dos tratamentos <b>Pos</b> , <b>VitC</b> , <b>VitBetG</b> e <b>BetG</b> foram desafiados com o IMNV entre o 30º e o 33º dias de cultivo. <b>Ref</b> , ração comercial; <b>Neg</b> , ração controle negativo; <b>Pos</b> , ração controle positivo; <b>VitC</b> , ração contendo 250 mg/kg de ácido L-ascórbico-2-monofosfato; <b>VitCBetG</b> , ração contendo 1.160 mg/kg de ácido L-ascórbico-2-monofosfato em combinação com 600	

## Página

- mg/kg de  $\beta$ -1,3/1,6-glucano; e **BetG**, ração contendo 600 mg/kg de  $\beta$ -1,3/1,6-glucano. Os valores de *P* segundo o Teste de Univariância (ANOVA) são apresentados na parte superior das barras..... 31
- Figura 6.** Variação na sobrevivência do *L. vannamei* ao longo de 70 dias de cultivo em relação ao peso médio corporal e a fase lunar. Linhas pontilhadas indicam primeiro dia (40º dia) da infecção oral com o vírus da Mionecrose Infecciosa (IMNV). **Ref**, ração comercial; **Neg**, ração controle negativo; **Pos**, ração controle positivo; **VitC**, ração contendo 250 mg/kg de ácido L-ascórbico-2-monofosfato; **VitCBetG**, ração contendo 1.160 mg/kg de ácido L-ascórbico-2-monofosfato em combinação com 600 mg/kg de  $\beta$ -1,3/1,6-glucano; e **BetG**, ração contendo 600 mg/kg de  $\beta$ -1,3/1,6-glucano. ● , lua nova; ☾ , lua quarto crescente; ○ , lua cheia; ☽ , lua quarto minguante. Linha horizontal pontilhada indica o 1º dia do desafio *per os* (30º dia)..... 33
- Figura 7.** Sobrevivência (%) média final  $\pm$  erro padrão do camarão *Litopenaeus vannamei* após 70 dias de cultivo e infecção com o vírus da Mionecrose Infecciosa (IMNV). Os animais foram alimentados com seis diferentes tipos de ração: **Ref**, ração comercial; **Neg**, ração controle negativo; **Pos**, ração controle positivo; **VitC**, ração contendo 250 mg/kg de ácido L-ascórbico-2-monofosfato; **VitCBetG**, ração contendo 1.160 mg/kg de ácido L-ascórbico-2-monofosfato em combinação com 600 mg/kg de  $\beta$ -1,3/1,6-glucano; e **BetG**, ração contendo 600 mg/kg de  $\beta$ -1,3/1,6-glucano. Colunas com letras iguais indicam diferença estatística não significativa entre tratamentos ao nível de  $\alpha = 0,05$  segundo o teste *a posteriori* de Scheffé..... 34

**LISTA DE ANEXOS**

	<b>Página</b>
<b>Anexo I.</b> Laudo de PCR emitido pelo Laboratório de Patologia em Aqüicultura da Universidade do Arizona a cerca da condição patológica dos camarões empregados no estudo (Sample#1) e homogenado utilizado no desafio <i>per os</i> (Sample#2).....	60
<b>Anexo II.</b> Laudo de histopatologia emitido pelo Centro de Diagnóstico de Enfermidades de Camarão Marinho (CEDECAM) a cerca da condição patológica dos camarões empregados no presente estudo.....	62
<b>Anexo III.</b> Laudo de RT-PCR em tempo real emitido pelo Laboratório de Patologia em Aqüicultura da Universidade do Arizona a cerca da carga viral no homogenado utilizado no desafio <i>per os</i> do presente estudo.....	63
<b>Anexo IV.</b> Laudo de PCR emitido pelo Laboratório de Patologia em Aqüicultura da Universidade do Arizona a cerca da presença do IMNV nos camarões despescados dos tratamentos <b>Ref</b> (T1), <b>Neg</b> (T2), <b>Pos</b> (T3), <b>VitC</b> (T4), <b>VitCBetG</b> (T5) e <b>BetG</b> (T6).....	65

## RESUMO

Desde 2002 que um novo agente patogênico denominado de Vírus da Mionecrose Infecciosa (IMNV) vem causando significativas perdas econômicas em fazendas de camarão na Região Nordeste do Brasil. Ao contrário dos vertebrados, os camarões não possuem um sistema imunológico com memória adaptativa, no entanto possuem um sistema imune inato, apresentando respostas de defesa menos complexas. O presente estudo teve como objetivo determinar a eficácia de uma dieta com dosagens elevadas de ácido L-ascórbico-2-monofosfato (**VitC**) em combinação com um  $\beta$ -1,3/1,6-glucano (**BetG**) sobre a sobrevivência, o crescimento e as respostas imunológicas do camarão *Litopenaeus vannamei* desafiado com o IMNV. O estudo foi realizado em 30 tanques de 500 l, operados com água clara e submetidos a aeração e renovação de água constante. Camarões com  $2,58 \pm 0,39$  g foram povoados com 100 animais/m<sup>2</sup> e cultivados por um período de 10 semanas. O desenho experimental foi composto por três tratamentos e três controles. Para cada tratamento foram designados cinco tanques, assim denominados: **Ref**, IMNV negativo e ração comercial; **Neg** e **Pos**, IMNV negativo e positivo respectivamente, alimentados com uma ração experimental contendo níveis normais de ácido L-ascórbico-2-monofosfato (**VitC**, 250 mg/kg) e sem  $\beta$ -1,3/1,6-glucano; **VitC**, (IMNV positivos, alimentados com uma ração experimental contendo 1.160 mg/kg de ácido L-ascórbico-2-monofosfato), **VitCBetG**, (IMNV positivos, alimentados com uma ração experimental contendo 1.160 mg/kg de **VitC** e 600 mg/kg de **BetG**); e, **BetG**, (IMNV positivos, alimentados com uma ração experimental contendo 600 mg/kg de  $\beta$ -1,3/1,6-glucano e níveis normais de **VitC**). As rações experimentais foram fabricadas em laboratório e a infecção dos camarões se deu através da administração *per os* de tecido infectado por IMNV ( $1,82 \times 10^3$  cópias de IMNV/ $\mu$ l RNA) durante três dias consecutivos, duas vezes ao dia. O desafio *per os* teve início no 27º dia de exposição dos camarões às rações, quando os animais alcançaram entre 4,93 g e 6,92 g. A contagem total de hemócitos (CTH), a concentração de proteínas totais do soro e a atividade específica da enzima fenoloxidase (PO) foram avaliadas no *L. vannamei* dois dias antes do desafio oral (27º dia de cultivo), 17 dias após o desafio *per os* (48º dia de cultivo) e na despesca (70º dia de cultivo). Os camarões cultivados foram efetivamente contaminados com o IMNV. Embora mortalidades de 100% não tenham sido observadas, os animais mostraram-se altamente susceptíveis ao vírus 29 dias após o primeiro dia do desafio. Na despesca, os camarões alcançaram um peso entre  $9,07 \pm$

1,48 g (**BetG**) e  $11,11 \pm 1,86$  g (**Pos**). A sobrevivência variou de um mínimo de  $22,8 \pm 4,9\%$  (**VitC**) a um máximo de  $69,5 \pm 5,7\%$  (Ref). O ganho de peso dos camarões foi progressivo e o crescimento semanal variou de 0,56 g no 14º dia de cultivo para 0,77 g na última semana, não havendo diferença estatística significativa entre tratamentos. A sobrevivência decresceu ao longo do cultivo, independente do tratamento adotado. A CTH apresentou um aumento em todos os tratamentos após o desafio *per os* com IMNV (*i.e.*, 17 dias após), entretanto nem todos foram significativos. Neste dia de amostragem, um maior número de células/mm<sup>3</sup> foi observado nos tratamentos voluntariamente infectados, os quais alcançaram uma menor sobrevivência final de camarões (**Pos** e **VitC**). Igualmente, o tratamento não infectado, **Ref**, também exibiu um aumento significativo na CTH no período de pós-infecção viral. De um modo geral, a concentração protéica do soro dos camarões e a atividade relativa da enzima fenoloxidase não se alteraram ao longo do cultivo ou entre os tratamentos avaliados. Através do presente estudo pode-se concluir que a inclusão de 600 mg/kg de  $\beta$ -1,3/1,6-glucano em uma dieta para o camarão *L. vannamei* proporcionou um aumento significativo na sobrevivência da espécie quando exposto ao IMNV. Ao contrário, a inclusão de 1.160 mg/kg de ácido L-ascórbico-2-monofosfato em dietas para espécie infectada com IMNV não resultou em um maior crescimento ou sobrevivência da espécie. No presente estudo, não foram detectados indícios de fadiga imunológica ou diminuição no crescimento da espécie quando exposta de forma contínua a uma dieta contendo 600 mg/kg de  $\beta$ -1,3/1,6-glucano.

**Palavras chave:** camarão, *Litopenaeus vannamei*, imunoestimulante, IMNV, betaglucanos, ácido ascórbico

## ABSTRACT

Since 2002, a new pathogen agent named Infectious Myonecrosis Virus (IMNV) has been causing significant economical losses in shrimp farms in NE Brazil. Contrary to vertebrates, shrimp do not possess an immunological system with an adaptative memory. However, they are equipped with an innate immune system with less complex defense responses. The present study aimed at determining the efficacy of high dosages of L-ascorbyl 2-monophosphate acid (**VitC**) in combination with a  $\beta$ -1,3/1,6-glucan (**BetG**) on the survival, growth and immune responses of the shrimp *Litopenaeus vannamei* challenged with IMNV. The study was conducted in 30 tanks of 500 l, operated with clear water conditions and constant water renewal and aeration. Shrimp of  $2.58 \pm 0.39$  g were stocked at 100 animals/m<sup>2</sup> and reared for 10 weeks. The experimental design consisted of three treatments and three controls. Five tanks were designated for each treatment and control, as follows: **Ref**, IMNV- (IMNV negative) fed a commercial feed; **Neg** and **Pos**, IMNV- and IMNV+ (IMNV positive), fed an experimental feed with normal levels of L-ascorbyl 2-monophosphate (**VitC**, 250 mg/kg) deprived of **BetG**; **VitC**, IMNV+, fed an experimental feed with 1,160 mg/kg of **VitC**; **VitCBetG**, IMNV+, fed an experimental feed with 1,160 mg/kg of **VitC** and 600 mg/kg of **BetG**; and, **BetG**, IMNV+, fed an experimental feed with 1,000 mg/kg of **BetG** and normal levels of **VitC**. Experimental feeds were manufactured with laboratory equipment, while shrimp viral challenge occurred through oral administration of IMNV+ inoculum ( $1.82 \times 10^3$  copies of IMNV/ $\mu$ l RNA) during three consecutive days, twice a day. *Per os* challenge began on the 27<sup>th</sup> day of exposure to the experimental feeds when animals had reached between 4.93 g and 6.92 g in body weight. The total haemocyte count (THC), the total protein concentration and the relative activity of the phenoloxidase enzyme (PO) were evaluated in *L. vannamei* two days prior to the oral challenge (27<sup>th</sup> day of rearing), 17 days after the challenge (48<sup>th</sup> day of rearing) and at harvest (70<sup>th</sup> day of rearing). Reared shrimp were effectively contaminated with IMNV. Although 100% mortalities were not observed, animals were highly susceptible to the virus 29 days after the first day of infection. At harvest, shrimp reached a body weight between  $9.07 \pm 1.48$  g (**BetG**) and  $11.11 \pm 1.86$  g (**Pos**). Survival varied from a minimum of  $22.8 \pm 4.9\%$  (**VitC**) to a maximum of  $69.5 \pm 5.7\%$ . Shrimp body weight gains were continuous with weekly growth ranging from 0.56 g on the 14<sup>th</sup> day of culture to 0.77 g in the last week of culture. Shrimp weekly growth did not vary

statistically between treatments. Survival reduced throughout the culture period, regardless of the treatment adopted. The THC showed a significant increase in all treatments after the *per os* challenge with IMNV (*i.e.*, 48<sup>th</sup> day of culture). On this sampling day, the highest number of cells/mm<sup>3</sup> were observed in treatments that were voluntarily challenged with IMNV, which were the ones that achieved the lowest final shrimp survival (**Pos** and **VitC**). Similarly, the non-challenged treatment (**Ref**) also displayed a significant increase in THC during the post-infection viral period. In general, the protein concentration and the relative activity of the phenoloxidase activity in shrimp serum did not change significantly throughout the culture period or between treatments. By this study it can be concluded that an inclusion of 600 mg/kg of  $\beta$ -1,3/1,6-glucan in a diet for the shrimp *L. vannamei* provided a significant increase in the species survival when exposed to IMNV. Conversely, the inclusion of 1,160 mg/kg of L-ascorbyl 2-monophosphate acid in diets for this species infected with IMNV did not result in a better growth or survival. In the present study, no signs of immunological fatigue or a detriment in growth could be detected when the species was continually exposed to a diet containing 600 mg/kg of  $\beta$ -1,3/1,6-glucan.

**Key words:** shrimp, *Litopenaeus vannamei*, immunostimulant, IMNV, betaglucan, ascorbyl acid

## 1. INTRODUÇÃO

Em 2004, a aquicultura alcançou uma produção global de 45,5 milhões de toneladas, representando 32,2% do volume mundial de pescado (FAO, 2007). Os camarões estão entre os organismos aquáticos mais cultivados (2.476.023 toneladas em 2004), citados como sendo a *commodity* mais relevante em termos monetários para o segmento aquícola (FAO, 2007). Apesar de um rápido crescimento anual (28,7% entre 2002 e 2004; FAO, 2007), o cultivo de camarões marinhos em cativeiro vem sofrendo, desde a última década, com contínuas perdas na produção, resultado de surtos virais.

A primeira enfermidade viral em uma espécie cultivada de peneídeo foi descrita em 1974 (*Baculovirus penaei* ou BP; COUCH, 1974a,b). Treze anos depois, no ano de 1987 em Taiwan, a indústria de cultivo de camarão sofreu o primeiro colapso na produção ocasionado por um vírus (LIGHTNER *et al.*, 1987; LIN, 1989). A ocorrência de pandemias de origem viral se acentuou na última década gerando profundos impactos de caráter social e econômico em países em desenvolvimento (LIGHTNER, 2003). Rosenberry (2001) estimou que em 2000, somente o vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV) gerou perdas na produção mundial de camarão em cativeiro da ordem de 200.000 toneladas, um prejuízo estimado em US\$ 1 bilhão. Como consequência, o estudo das patologias e imunologia dos camarões peneídeos tornou-se uma prioridade a nível mundial para o segmento de cultivo de camarões marinhos.

No Brasil, entre as patologias de origem viral que mais acometeram a produção de camarões está a o Vírus da Mionecrose Infecciosa (IMNV, em inglês *Infectious Myonecrosis Virus*). Esta enfermidade vem causando, desde o final de 2002, contínuas perdas econômicas em fazendas de engorda do camarão branco, *Litopenaeus vannamei*, localizadas na Região Nordeste do Brasil (NUNES *et al.*, 2004). Segundo Nunes *et al.* (2004) a primeira ocorrência documentada do IMNV foi registrada em uma fazenda de camarões situada no Piauí, seguida de uma rápida expansão para outros Estados adjacentes durante a estação chuvosa. As taxas de mortalidades causadas pelo vírus alcançaram de 35% a 55% em 2003 e os prejuízos diretos, advindos da perda de produção nos Estados afetados, foram estimados em US\$ 20 milhões. A confirmação da origem viral da etiologia foi feita em fevereiro de 2004 por pesquisadores da Universidade do Arizona, após bioensaios de infectividade e estudos de microscopia eletrônica e análise genômica do vírus (LIGHTNER *et al.*, 2004; POULOS &

LIGHTNER, 2006; POULOS *et al.*, 2006). Mais recentemente, em 2006, o IMNV foi detectado na Indonésia (SENAPIN *et al.*, 2007).

Ao contrário dos vertebrados, os camarões não possuem um sistema imunológico com memória adaptativa. Estes possuem, no entanto um sistema imune inato apresentando respostas de defesa menos complexas. Um componente essencial da imunidade dos camarões peneídeos inclui um mecanismo de vigilância capaz de detectar invasores ou a presença de células não-próprias. Dentre os sistemas de reconhecimento destaca-se o sistema de ativação da Pro-fenoloxidase (SRITUNYALUCKSANA & SÖDERHÄLL, 2000). Nos crustáceos, a ativação do sistema da proPO e outras moléculas associadas encontram-se compartimentalizados no interior dos grândulos dos hemócitos, de onde são liberados por uma exocitose regular, como demonstrado no lagostim *Pacifastacus leniusculus* (JOHANSSON & SÖDERHÄLL, 1985; LIANG *et al.*; 1992; SÖDERHÄLL & CERENIUS, 1998; *apud* BARRACO, 2004 ). As moléculas do sistema da proPO nos camarões peneídeos como *P. monodon* (KONDO *et al.*, 1992 *apud* BARRACO, 2004) encontram-se na fração celular da hemolinfa. A ativação desse sistema proPO libera moléculas que induzem novas degranulações dos hemócitos, acarretando uma amplificação do sistema e da resposta imune em geral. O sistema de ativação da proPO é regulada por inibidores de proteases para evitar uma super-ativação e restringir a reação somente aos locais agredidos e (ou) infectados, evitando assim danificar outros tecidos do hospedeiro (BARRACO, 2004).

As funções celulares de defesa dos camarões estão dependentes, entre outros aspectos, do seu status nutricional. A condição nutricional é considerada um dos mais importantes fatores para determinar a capacidade de resistência de qualquer animal frente a infecções. Na prática, as fazendas de engorda de camarão procuram prevenir as enfermidades tentando manter uma boa condição ambiental nos viveiros de cultivo, e em alguns casos com administração de dietas medicadas. Pelo fato de não ser possível vacinar crustáceos, torna-se de grande importância pesquisas que objetivem incrementar o status nutricional e conseqüentemente a condição imunológica do camarão cultivado *Litopenaeus vannamei* frente as doenças virais.

O uso de imunoestimulantes e diversos tipos de aditivos na ração (carotenóides, farinha de algas, vitaminas E, C, etc.) para melhorar o desempenho zootécnico de camarões cultivados são ainda pouco difundidos no Brasil, em função da falta de informações relativas à sua forma de uso e eficácia. Desta forma, o presente estudo teve

como objetivo verificar a eficácia no uso de  $\beta$ -1,3/1,6-glucano e dosagens elevadas de ácido L-ascórbico-2-monofosfato (Stay-C<sup>®</sup> 35%) sobre o desempenho do camarão *L. vannamei* infectado com o vírus da Mionecrose Infecciosa (IMNV).

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os crustáceos possuem o seu exoesqueleto como sendo o seu primeiro mecanismo de defesa, a física. O sistema imunológico do camarão é responsável pela sua integridade corpórea, sendo um sistema imune inato ou natural, que está relacionado à hemolinfa e uma outra parte que é a líquida, onde estão os plasmas e os fatores humorais nele dissolvidos. Tanto os hemócitos como os fatores humorais agem de forma conjunta (BARRACO, 2004).

Os camarões possuem três tipos de hemócitos: os hialinos, os semi-granulares e os granulares (JOHANSSON *et al.*, 2000; *apud* BARRACO, 2004). Os hemócitos hialinos para alguns autores estariam responsáveis pelos os mecanismos de coagulação (OMORI *et al.*, 1989; HOSE *et al.*, 1990; *apud* BARRACO, 2004). Já os hemócitos granulares estariam responsáveis pela fagocitose de microorganismos, na formação de nódulos e cápsulas e na produção de moléculas tóxicas e microbicidas capazes de lisar e (ou) degradar os organismos não próprios (HOSE *et al.*, 1990; GARGIONI & BARRACO, 1990; DESTOUMIEUX *et al.*, 2000; VAN DE BRAAK *et al.*, 2002; *apud* BARRACO, 2004).

Segundo Moullac & Haffner (2000), o estresse ambiental, é considerado um importante fator para o surgimento e (ou) o incremento das doenças em crustáceos. As mudanças físico-químicas da água, por exemplo, mudanças de temperatura, podem afetar o metabolismo, crescimento, muda, sobrevivência e afetar o sistema imune dos animais. No entanto, ainda são poucos os estudos que relacionam a competência do sistema imune com a susceptibilidade dos organismos a patógenos (MOULLAC & HAFFNER, 2000).

Devido às particularidades do sistema imunológico dos peneídeos, os compostos biológicos denominados de imunoestimulantes, vêm despontando como perspectiva para incrementar a resistência dos camarões frente a infecções de origem viral. Alguns compostos parecem ativar o sistema imunológico destes animais, em particular, os  $\beta$ -1,3-glucanos, os quais podem amplificar respostas contra infecções virais e bacterianas (VARGAS-ALBORES *et al.*, 1996). Os glucanos são várias moléculas de glicose interligadas entre si denominadas de polissacarídeo. Alguns glucanos têm a capacidade de ser imunoestimuladores e dependendo da sua composição química ocorrerá uma maior ou menor eficiência para estimular o sistema imunológico (NEWMAN, 2000; ENGSTADE *et al.*, 2004).

Os glucanos não podem ser submetidos à temperatura superiores a 130°C (NEWMAN, 2000), podendo ocorrer sua degradação. Os glucanos são encontrados em vários extratos de leveduras, entretanto os  $\beta$ -1,3-glucanos estão em sua grande maioria presentes em paredes de células de fermento (NEWMAN, 2000). A qualidade e efetividade dos imunoestimulantes para induzir uma resposta imune não dependem apenas da concentração dos mesmos, mas também de sua estrutura molecular, que determina o nível de reconhecimento pelo sistema imunológico da espécie cultivada, podendo variar de um indivíduo a outro (ENGSTADE *et al.*, 2004).

A vitamina C possui um papel importante na condição de saúde dos camarões atuando como um antioxidante, através da inativação de radicais livres produzidos pela atividade celular e por diversos estressores, além de ser um nutriente essencial para os camarões peneídeos (GUARY *et al.*, 1976). Em camarões, a deficiência de vitamina C causa a Síndrome da Morte Negra (LIGHTNER *et al.*, 1977, 1979), muda incompleta (CHEN & CHANG, 1994), aumento no fator de conversão alimentar (FCA) e diminuição da resistência ao estresse (MAGARELLI *et al.*, 1979). Os requerimentos de ácido L-ascórbico dos camarões peneídeos variam de 50 a 100 mg/kg de dieta (CUZON *et al.*, 2004).

Itami *et al.* (1998) relataram que a administração de um peptidoglicano aumentou a resistência do camarão *Marsupenaeus japonicus* exposto a vibriose. Sung *et al.* (1994) utilizando um  $\beta$ -1,3/1,6-glucanos demonstraram um aumento na resistência do *Penaeus monodon* frente à vibriose e a infecção do WSSV (vírus da síndrome da Mancha Branca). Os autores também reportaram que os camarões alimentados com uma ração contendo  $\beta$ -1,3/1,6-glucano exibiram um crescimento mais rápido, uma redução na mortalidade e uma melhor utilização do alimento. A atividade fagocítica dos hemócitos de pós-larvas de *P. monodon* foi incrementada quando estas foram imersas por 3 h em suspensões aeradas contendo 2 g/kg de dieta de um  $\beta$ -1,3-glucano (CHANG *et al.* 2000).

Min-Hsien & Shi-Yen (2002) relataram que o ácido ascórbico favoreceu a resposta imunológica do camarão *Penaeus monodon*. Já López *et al.* (2003) reportaram um efeito positivo no crescimento de camarões juvenis da espécie *Litopenaeus vannamei* alimentados continuamente com uma dieta contendo  $\beta$ -1,3-glucano e vitamina C. Camarões da espécie *L. vannamei* alimentados com ração e alimento fresco contendo super-dosagens de vitamina C (1.000 e 2.000 mg/kg), não apresentaram diferenças significativas na contagem total de hemócitos (MAGGIONI *et al.*, 2003).

Alguns autores relatam que a contagem total de hemócitos apresenta um decréscimo e raramente aumenta, quando os crustáceos passam por situações de estresse como, por exemplo, quadros de infecção (HENNIG *et al.*, 1998; LORENZON *et al.* 1999; CHENG & CHEN, 2001).

Camarões da espécie *Penaeus monodon* alimentados com uma dieta contendo 2 g/kg, 10 g/kg e 20 g/kg de  $\beta$ -1,3-glucano na dieta apresentaram uma diminuição imediata na contagem total de hemócito quando desafiados com o WSSV ; CHANG *et al.*, 2002). Ainda segundo Chang *et al.* (2002) o nível ótimo obtido de  $\beta$ -1,3-glucano quando administrado oralmente numa concentração de 10 g/kg de dieta durante 20 dias melhorou o sistema imunológico e a taxa de sobrevivência da espécie.

O *Litopenaeus vannamei* cultivado em condições de laboratório numa densidade de cinco PL (pós-larva) por litro foi alimentado com uma dieta contendo vitamina C em várias dosagens (0, 10, 100, 1.000 e 2.000 mg/kg de dieta). Os resultados desse estudo demonstraram que a partir de PL36 (pós-larva com 36 dias de vida), o ganho de peso dos animais estocados foi estatisticamente mais significativo quando alimentados com uma dieta contendo 1.000 mg/kg de ácido ascórbico (LAVENS *et al.*, 1999).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 *Local do Estudo*

O estudo foi realizado no Laboratório de Nutrição de Camarão Marinho do Instituto de Ciências do Mar (Labomar) da Universidade Federal do Ceará (UFC), situado no município do Eusébio, Estado do Ceará. O laboratório está localizado no entorno do Estuário do Rio Pacoti, nas coordenadas 35°00'0,25" S e 38°25'22,57" W (Figura 1, A).

#### 3.2 *Sistema de Cultivo*

Na presente pesquisa foram utilizados trintas tanques circulares de polipropileno de cor azul (Plastsan Plásticos do Nordeste Ltda., Caucaia, CE), dispostos em células, contendo cada uma cinco unidades com capacidade volumétrica individual de 500 l e área operacional de 0,57 m<sup>2</sup>. Os tanques foram unidos por meio de conexões de PVC soldável com um diâmetro de 50 mm (Figura 1, B).

A filtragem mecânica de água em cada célula ocorreu de forma independente, sem nenhuma interferência de outros tratamentos. Cada célula foi equipada com um filtro mecânico de areia de alta vazão (Dancor S.A. Indústria Mecânica, Rio de Janeiro, RJ) com área filtrante de 0,07 m<sup>2</sup>, conectado a uma eletrobomba (WEG Indústrias S.A., Guarulhos, SP) de serviço contínuo, monofásica, na potência de 1/4 cv, tensão de 220 V e vazão nominal de 3,8 m<sup>3</sup>/h.

Os tanques foram alimentados por um sistema de aeração composto por três compressores radiais (Ibram Indústria Brasileira de Máquinas e Equipamentos, São Paulo, SP), equipados com supressores de ruído e com motores trifásicos de 2,0 cv de potência. Cada tanque dispunha de dois pontos de alimentação de ar, composto de duas pedras porosas localizadas em lados opostos do tanque.

#### 3.3 *Limpeza e Desinfecção da Unidade de Cultivo*

A preparação da unidade de cultivo consistiu da lavagem com água doce corrente e desinfecção com hipoclorito de cálcio seco contendo 65% de produto ativo (cloro granulado HTH®, Nordesclor S/A, Igarassu, PE) da água de cultivo, tanques de cultivo, filtros de areia, bandejas de alimentação e linhas de filtragem e aeração mecânica.



**Figura 1.** Vista aérea do Laboratório de Nutrição de Camarão (LNC) do Labomar/UFC às margens do Rio Pacoti (A) no município do Eusébio, Ceará. Tanques de cultivo empregados no presente estudo (B).

Inicialmente, os tanques de cultivo foram lavados com água corrente e desinfetados com solução contendo 100 ppm de hipoclorito de cálcio. Os filtros de areia foram desmontados e a areia removida, lavada com água corrente e exposta ao sol durante um período de 72 h. Posteriormente, os filtros foram montados e conectados as células de cultivo, sendo os tanques encheidos com água doce contendo 200 ppm de hipoclorito de cálcio. As eletrobombas foram acionadas e mantidas em funcionamento ininterrupto durante sete dias. Após este período toda água doce foi drenada e repostada por água salgada, previamente desinfetada com hipoclorito de sódio a 20 ppm. As bandejas de alimentação e outros apetrechos de cultivo foram desinfetados antes e durante o cultivo através de imersão em água doce contendo uma solução de hipoclorito de cálcio a 30 ppm.

### 3.4 *Delineamento Experimental*

No presente estudo foram avaliados o crescimento, a sobrevivência e algumas respostas imunológicas do camarão *Litopenaeus vannamei* quando infectado com o vírus da Mionecrose Infecciosa (IMNV). O desempenho dos animais foi avaliado durante a alimentação com uma ração contendo doses elevadas de ácido L-ascórbico-2-monofosfato ( $\text{Na}_2\text{Ca}_{0,5}\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_9\text{P}$ ; Rovimix Stay-C<sup>®</sup> 95%, DSM Produtos Nutricionais Brasil Ltda., São Paulo, SP) incorporado individualmente a ração ou em combinação com  $\beta$ -1,3/1,6-glucano (MacroGard<sup>®</sup>, Immunocorp AS, Oslo, Noruega). O MacroGard<sup>®</sup> é um polissacarídeo extraído e purificado a partir da parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (RAA, 2000, 2003).

O estudo foi composto de três tratamentos e três controles (Tabela 1). Os tratamentos controle consistiram de animais infectados e não infectados com IMNV, alimentados com uma ração comercial para camarões (Camaronina 35 hp, Cargill Nutrição Animal Ltda., São Lourenço da Mata, PE) ou com uma ração fabricada em laboratório contendo níveis normais de ácido L-ascórbico-2-monofosfato e ausente de  $\beta$ -1,3/1,6-glucano. Um total de cinco réplicas (*i.e.*, cinco tanques de cultivo) foi designado de forma sistemática para cada tratamento (Figura 2).

**Tabela 1.** Detalhamento do delineamento experimental adotado durante o estudo de infectividade do camarão *Litopenaeus vannamei* com o vírus da Mionecrose Infecciosa (IMNV).

Controle/Tratamento	Abreviação	Infeção viral <sup>1</sup>	Vitamina C	Betaglucano <sup>2</sup>
Controle comercial <sup>3</sup>	<b>Ref</b>	Não	300 mg/kg <sup>4</sup>	NI <sup>5</sup>
Controle negativo	<b>Neg</b>	Não	250 mg/kg <sup>6</sup>	NI <sup>5</sup>
Controle positivo	<b>Pos</b>	Sim	250 mg/kg <sup>6</sup>	NI <sup>5</sup>
Tratamento 1	<b>VitC</b>	Sim	1.160 mg/kg <sup>6</sup>	NI <sup>5</sup>
Tratamento 2	<b>VitCBetG</b>	Sim	1.160 mg/kg <sup>6</sup>	600 mg/kg <sup>7</sup>
Tratamento 3	<b>BetG</b>	Sim	250 mg/kg <sup>5</sup>	600 mg/kg <sup>7</sup>

<sup>1</sup>Infeção *per os* com o vírus da Mionecrose Infecciosa (IMNV).

<sup>2</sup> $\beta$ -1,3/1,6-glucano (MacroGard<sup>®</sup>, Immunocorp AS, Oslo, Noruega).

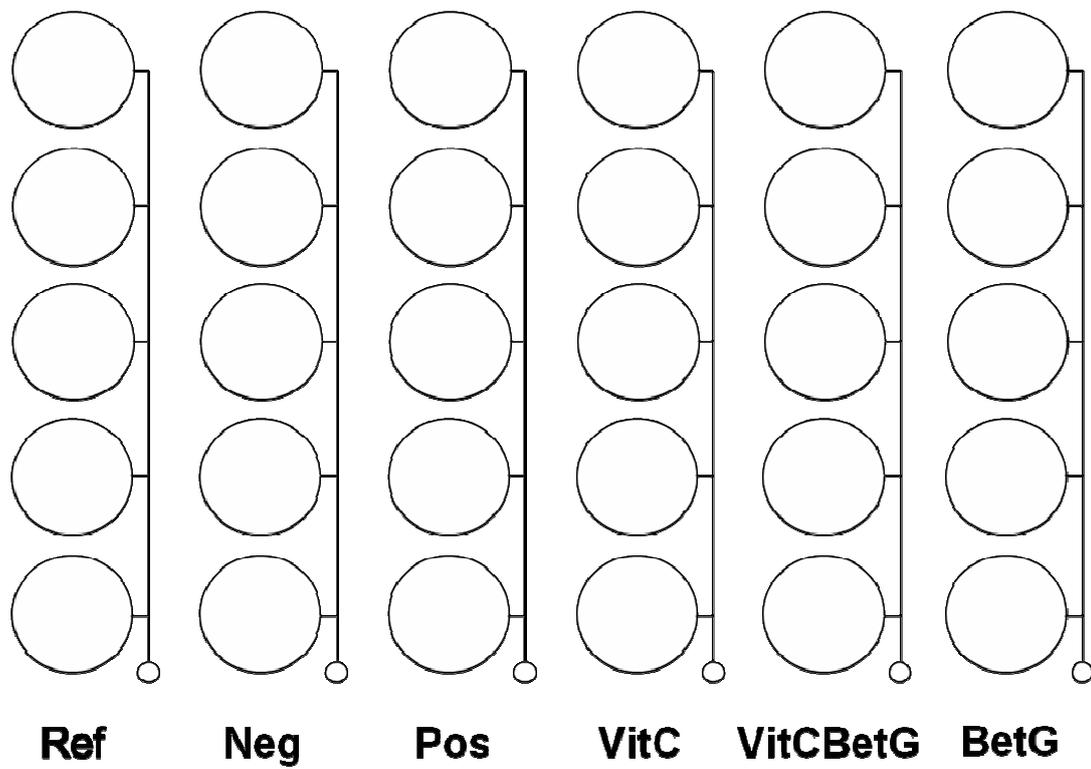
<sup>3</sup>Ração comercial contendo 35% de proteína bruta, segundo níveis de garantia do fabricante (Camaronina 35 hp, Cargill Nutrição Animal Ltda., São Lourenço da Mata, PE).

<sup>4</sup>De acordo com os níveis de garantia reportados pelo fabricante (Camaronina 35 hp, Cargill Nutrição Animal Ltda., São Lourenço da Mata, PE).

<sup>5</sup>Não ocorreu inclusão.

<sup>6</sup>Rovimix Camarões Intensivo (DSM Produtos Nutricionais Brasil Ltda., São Paulo, SP).

<sup>7</sup>Ácido L-ascórbico-2-monofosfato (Rovimix Stay-C<sup>®</sup> 35%, DSM Produtos Nutricionais Brasil Ltda., São Paulo, SP).



**Figura 2.** Distribuição dos tanques de cultivo com seus respectivos tratamentos. **Ref**, ração comercial; **Neg**, ração controle negativo; **Pos**, ração controle positivo; **VitC**, ração contendo 250 mg/kg de ácido L-ascórbico-2-monofosfato; **VitCBetG**, ração contendo 1.160 mg/kg de ácido L-ascórbico-2-monofosfato em combinação com 600 mg/kg de  $\beta$ -1,3/1,6-glucano; e **BetG**, ração contendo 600 mg/kg de  $\beta$ -1,3/1,6-glucano.

### 3.5 *Formulação e Fabricação de Ração*

As rações foram formuladas por meio da ferramenta de programação linear Solver do Microsoft® Office Excel 2003 SP2. As rações isocalóricas e isoprotéicas foram desenhadas para resultar em uma mesma composição e balanceamento nutricional, exceto no que diz respeito às inclusões de ácido L-ascórbico-2-monofosfato e  $\beta$ -1,3/1,6-glucano. As inclusões destes aditivos foram equilibradas com o aporte de betonita numa inclusão de 0,4% (Tabela 2).

O processo de fabricação das rações experimentais iniciou-se com a moagem (moinho tipo Willye, modelo MA-680, Marconi Equipamentos para Laboratório Ltda., Piracicaba, SP) do farelo de soja, quirera de arroz e farinha de peixe nacional em malha com 600  $\mu$ m. Subsequentemente, estes ingredientes juntamente com a farinha de peixe Peruana foram individualmente peneirados em malha de 250  $\mu$ m.

Após a moagem, todos os ingredientes sólidos e líquidos foram pesados em balança eletrônica de precisão (Ohaus Adventurer, Toledo do Brasil, São Paulo, SP) e misturados em uma bateadeira planetária industrial para massas (G. Paniz, modelo BP-12 super, Caxias do Sul, RS) durante 10 minutos. Após este período, água doce a uma temperatura 92°C foi adicionada a mistura de ingredientes na proporção de 2,0:1,5. Os ingredientes foram misturados por um tempo adicional de 10 minutos até a formação de um bolo. O bolo de ingredientes foi então transferido para uma cuscuzeira e mantido sob cozimento a vapor durante 40 min. O bolo cozido foi submetido à extrusão em um moedor industrial para carnes (C.A.F., modelo CAF-32, Rio Claro, SP) equipado com uma matriz de 2,0 mm. Durante a extrusão houve a formação de uma massa na forma de *spaghetti*, o qual foi distribuído em bandejas de aço inox para secagem a 65°C em uma estufa com circulação e renovação de ar (estufa de secagem especial, Modelo MA-035/3, Marconi Equipamentos para Laboratório Ltda., Piracicaba, SP) durante 5 h. A massa foi revirada a cada 2 h de secagem para alcançar uma umidade homogênea em toda ração. Findo o processo de secagem a ração foi cortada em *pellets* cônicos com 5,0 cm de comprimento em um multiprocessador, embalada em sacos plásticos, identificada e armazenada sob temperatura de -22°C. Amostras de ração foram analisadas bromatologicamente para proteína bruta, extrato etéreo, cinzas, fibra bruta e energia bruta de acordo com a metodologia proposta pela AOAC (1984).

**Tabela 2.** Composição das rações experimentais (g/kg de dieta) empregadas no estudo.

Ingredientes	Tipo de Ração <sup>1</sup> (g/kg de dieta)			
	Neg/Pos	VitC	VitCBetG	BetG
Farinha de trigo <sup>2</sup>	350,00	350,00	350,00	350,00
Farelo de soja <sup>3</sup>	220,79	220,79	220,79	220,79
Quirera de arroz <sup>4</sup>	70,00	70,00	70,00	70,00
Farinha de peixe Peruana <sup>5</sup>	167,11	167,11	167,11	167,11
Farinha de peixe nacional <sup>6</sup>	100,00	100,00	100,00	100,00
Óleo de peixe <sup>7</sup>	30,00	30,00	30,00	30,00
Lecitina de soja <sup>8</sup>	20,00	20,00	20,00	20,00
Colesterol <sup>9</sup>	1,50	1,50	1,50	1,50
Atrativo <sup>10</sup>	5,00	5,00	5,00	5,00
Sal	10,00	10,00	10,00	10,00
Premix vitamínico e mineral <sup>11</sup>	10,00	10,00	10,00	10,00
Aglutinante sintético <sup>12</sup>	5,00	5,00	5,00	5,00
Fosfato de cálcio monobásico	12,00	12,00	12,00	12,00
Betonita	3,60	1,00	0,00	2,60
Rovimix Stay-C <sup>®</sup> 35% <sup>13</sup>	0,00	2,60	2,60	0,00
Macrogard <sup>®14</sup>	0,00	0,00	1,00	1,00

<sup>1</sup>Ref, ração comercial; **Neg**, ração controle negativo; **Pos**, ração controle positivo; **VitC**, ração contendo 250 mg/kg de ácido L-ascórbico-2-monofosfato; **VitCBetG**, ração contendo 1.160 mg/kg de ácido L-ascórbico-2-monofosfato em combinação com 600 mg/kg de  $\beta$ -1,3/1,6-glucano; e **BetG**, ração contendo 600 mg/kg de  $\beta$ -1,3/1,6-glucano.<sup>2</sup>13,04% proteína bruta (PB); 1,23% extrato etéreo (EE); 0,78% cinzas; 0,06% fibra bruta (FB); 4.306 kcal/kg energia bruta (EB).

<sup>3</sup>50,00% PB; 2,10% EE; 10,12% cinzas; 7,74% FB; 4.722 kcal/kg EB

<sup>4</sup>Usina Catende, Catende, PE. 9,21% PB; 1,06% EE; 0,63% cinzas; 1,21% FB; 4.250 kcal/kg EB.

<sup>5</sup>Pesquera Capricornio S.A., Lima, Peru. 68,87% PB; 7,15% EE; 16,67% cinzas; 5,46% FB; 4.957 kcal/kg EB.

<sup>6</sup>ETNA Agro Indústria Ltda., Capela de Santana, RS. 58,22% PB; 8,18% EE; 27,96% cinzas; 0,85% FB; 4,547 kcal/kg EB.

<sup>7</sup>98,00% EE; 8.620 kcal/kg EB.

<sup>8</sup>100,00% EE; 7.590 kcal/kg EB.

<sup>9</sup>Cholesterol XG, Solvay Pharmaceuticals BV/NL. 91% de pureza.

<sup>10</sup>Aquasavor™, Bentoli Agrinutrition, Texas, EUA.

<sup>11</sup>Rovimix Camarao Intensivo. DSM Produtos Nutricionais Brasil Ltda., São Paulo, SP. Níveis de garantia por kg: vitamina A, 1.250.000 UI; vitamina D3, 350.000 UI; vitamina E, 25.000 UI; vitamina K3, 500,0 mg; vitamina B1, 5.000,0 mg; vitamina B2, 4.000,0 mg; vitamina B6; 10,0 mg; ácido nicotínico, 15.000,0 mg; ácido pantotênico, 10.000,0 mg; biotina, 150,0 mg; ácido fólico, 1.250,0 mg; vitamina C, 25.000,0 mg; colina, 50.000,0 mg; colina, 50.000,0 mg; inositol, 20.000,0 mg; ferro 2.000,0 mg; cobre, 3.500,0 mg; cobre quelado, 1.500,0 mg; zinco, 10.500,0 mg; zinco quelado, 4.500,0 mg; manganês, 4.000,0 mg; selênio, 15,0 mg; selênio quelado, 15,0 mg; iodo, 150,0 mg; cobalto, 30,0 mg; cromo 80,0 mg; veículo q.s.p., 1.000,0 g.

<sup>12</sup>Pegabind™, Bentoli Agrinutrition, Texas, EUA. Aglutinante sintético a base de uréia formaldeído.

<sup>13</sup>Ácido L-ascórbico-2-monofosfato, Na<sub>2</sub>Ca<sub>0,5</sub>C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>O<sub>9</sub>P; Rovimix Stay-C® 35%, DSM Produtos Nutricionais Brasil Ltda., São Paulo, SP.

<sup>14</sup>Macrogard®, Immunocorp AS, Oslo, Noruega. 60% de β-1,3/1,6-glucano purificado (SELJELID *et al.*, 1981).

### 3.6 Coleta, Povoamento e Status Patológico dos Camarões Cultivados

Um total de 4.068 animais da espécie *Litopenaeus vannamei* com  $2,58 \pm 0,39$  g,  $n = 11$  foi capturado através de tarrafa de um viveiro de engorda da fazenda São Francisco (Amontada, Estado do Ceará), localizado nas coordenadas  $3^{\circ}02'08,49''$ S e  $39^{\circ}40'53,77''$ W. O viveiro operava com uma densidade de 25 animais/m<sup>2</sup> e salinidade de 9‰.

Após captura, os camarões foram distribuídos em 41 sacos plásticos duplos com 30 l de capacidade. Os sacos foram cheios até cerca de 40% do seu volume total com água previamente desinfetada com hipoclorito de sódio a 20 ppm, sendo o restante preenchido com oxigênio puro. Posteriormente, os sacos foram lacrados, acomodados em caixas de isopor e acondicionados em caminhão baú para transporte até o laboratório. No laboratório os animais foram individualmente contados e estocados nos tanques de cultivo, sob densidade de 57 animais/tanque (*i.e.*, 100 animais/m<sup>2</sup>).

Para verificar o status patológico dos camarões estocados, no dia do povoamento um *pool* de 30 indivíduos foi coletado para análise histopatológica realizada no Centro de Diagnóstico de Enfermidades de Camarão Marinho do Instituto de Ciências do Mar (Labomar) da Universidade Federal do Ceará (UFC), seguindo a metodologia descrita por Lightner (1996). O terceiro par de pleópodos destes mesmos indivíduos foi removido e fixado em uma solução de etanol a 95% para análise da reação de polimerase em cadeia (PCR) realizada pelo Laboratório de Patologia em Aqüicultura da Universidade do Arizona para as seguintes enfermidades: vírus da Síndrome de Taura (TSV, em inglês *Taura Syndrome virus*), vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV, em inglês *White Spot Syndrome virus*), Infecção Viral na Hipoderme e Necrose do Tecido Hematopoético (IHHNV, em inglês *Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis virus*) e IMNV. As análises de reação de polimerase em cadeia (PCR) seguiram os seguintes protocolos: TSV por Nunan *et al.* (1998); WSSV por Lo *et al.*, 1996; IHHNV por Nunan *et al.* (2000); IMNV por Poulos & Lightner (2006).

### 3.7 Alimentação e Manejo do Sistema de Cultivo

Os camarões foram inicialmente submetidos a um período de aclimação de 10 dias com uma ração fabricada em laboratório contendo 32,78% de proteína bruta, 10,95% de extrato etéreo, 10,22% de cinzas, 8,75% de umidade, 2,30% de cálcio e 1,52% de fósforo. Após o período de aclimação, os animais passaram a ser alimentados com suas respectivas rações até o término do cultivo no 70º dia.

Durante todo cultivo, os camarões foram expostos à ração durante cinco horas ao dia, das 0730 h às 1000 h e das 1330 h às 1600 h. Toda ração não consumida após 2,5 h de exposição foi coletada, pesada e descartada. A ração foi fornecida exclusivamente em bandejas de alimentação, confeccionadas com uma tela com malha retangular com área de 141 mm (abertura da malha de 640  $\mu$ m e uma altura de 220  $\mu$ m) e envoltas por um arco de PVC de 150 mm. Durante a alimentação, a ração foi dispensada em um cano de PVC de esgoto com 50 mm de diâmetro e 1 m de altura, direcionado para o centro da bandeja repousada no fundo do tanque.

As biometrias foram conduzidas em um intervalo de 14 dias, coletando-se 14 animais por tanque, sendo estes imediatamente devolvidos para suas respectivas unidades de cultivo após determinação de peso corporal em balança de precisão. Durante a pesagem, retirou-se o excesso de umidade dos camarões com toalha de papel. Os tanques de cultivo foram diariamente inspecionados com lanterna para localização de indivíduos mortos. Quando detectados, foram removidos, contabilizados e descartados.

As refeições diárias seguiram taxas de alimentação segundo NUNES & PARSONS (2000), sofrendo ajustes individuais para cada tanque de cultivo após biometria (Tabela 3). As taxas de alimentação sofreram uma redução de 20% sempre na primeira semana após a biometria (NUNES *et al.*, 2006), retornando aos níveis normais na segunda semana. As refeições foram divididas de forma homogênea para os dois horários de arraçoamento. Aos domingos, os camarões foram alimentados às 0730 h com 50% da refeição diária e expostos a ração até o dia seguinte.

Os parâmetros de qualidade de água (temperatura, salinidade e pH) foram monitorados um vez ao dia, sempre às 1500 h, durante o decorrer de todo o estudo. A renovação de água ocorreu através da retrolavagem dos filtros de areia em um intervalo de 7 a 10 dias ao longo do ciclo de cultivo. A cada retrolavagem foi drenado cerca de 20% de água, sendo repostada com água salgada previamente desinfetada com hipoclorito de sódio a 20 ppm.

**Tabela 3.** Tabela de arraçamento adotada no cultivo do *Litopenaeus vannamei* conduzido em tanques de 500 l de volume contendo água clara, desenvolvido segundo taxas de alimentação de NUNES & PARSONS (2000).

Peso Corporal		
Inicial (g)	Final (g)	Taxa Alimentar (%) <sup>1</sup>
1,0	1,9	8,0
2,0	2,9	7,5
3,0	3,9	7,0
4,0	4,9	6,5
5,0	5,9	5,5
6,0	6,9	5,0
7,0	7,9	4,5
8,0	8,9	4,0
9,0	9,9	3,5
10,0	10,9	3,0
11,0	11,9	2,5
12,0	12,9	2,0

<sup>1</sup>refere-se ao percentual de ração a ser ofertada em relação à biomassa estocada de camarões (população estimada x peso médio populacional)

### 3.8 Preparação do Homogenado com IMNV e Desafio per os

Para a coleta do homogenado com suspeita de infecção com o vírus da Mionecrose Infecciosa, foi selecionada a área geográfica do primeiro relato de ocorrência do vírus no Brasil (Nunes *et al.*, 2004). Um total de 10 kg de camarões adultos da espécie *Litopenaeus vannamei* foi coletado durante a despesca de um viveiro de engorda da fazenda Aquinor (Aqüicultura do Nordeste Ltda.) localizado no município do Cajueiro da Praia, Piauí.

Os camarões coletados apresentavam suspeita de infecção viral devido à presença de sinais clínicos compatíveis à infecção por IMNV (NUNES *et al.*, 2004; POULOS *et al.*, 2006) e uma baixa sobrevivência alcançada ao final do ciclo de engorda (*i.e.*, 32%). Imediatamente após a captura, os camarões inteiros foram resfriados e congelados a -20°C. Após transporte ao local do estudo, o material foi mantido sob refrigeração a -22°C. Logo após a captura dos animais, o terceiro par de pleópodos de um total de 30 indivíduos foi removido e fixado em etanol 95% para análise por PCR das enfermidades indicadas na secção 3.6. Para quantificação da carga viral no tecido utilizado para o desafio *per os* foi realizada uma análise de RT-PCR pelo Laboratório de Patologia em Aqüicultura da Universidade do Arizona seguindo a metodologia descrita por Andrade *et al.* (2007). Na despesca dos camarões do presente estudo, os pleópodos de 30 animais de cada tratamento foram removidos para análise de PCR para o IMNV.

A infecção dos camarões cultivados no presente estudo se deu através da administração via oral (*i.e.*, *per os*) de tecido contaminado com IMNV oriundo de uma fazenda de engorda, durante três dias consecutivos, duas vezes ao dia. Os procedimentos do desafio *per os* com o inóculo ocorreu conforme descrito por Hasson *et al.* (1995) e Wang *et al.* (1999), com algumas modificações. O desafio teve início no 29º dia de exposição dos camarões cultivados às rações experimentais, quando os animais alcançaram entre 4,93 g e 6,92 g (mínimo e máximo) de peso corporal. O tamanho das refeições foi determinado à base seca (inóculo com umidade de  $77,3 \pm 0,74\%$ ;  $n = 5$ ), conforme a biomassa estimada de camarões, com taxas de alimentação variando de 4,0% a 5,2%. A variação das taxas de alimentação foi função do peso corporal médio dos camarões de cada tanque de cultivo, determinado um dia de antecedência ao início do desafio. Durante o desafio, a alimentação dos camarões nos tratamentos controle (**Ref** e **Neg**) procedeu de forma normal, através do fornecimento das suas respectivas rações.

### 3.9 Avaliações Imunológicas

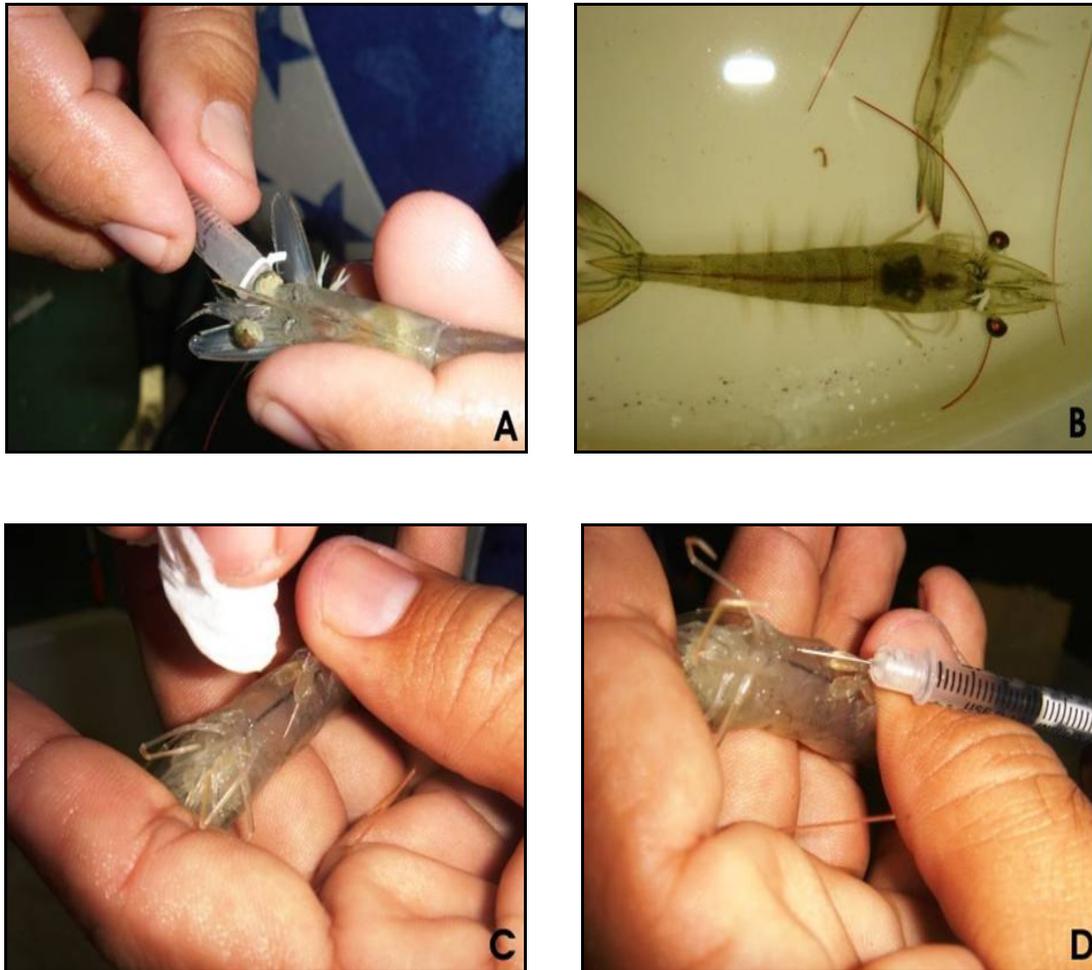
#### 3.9.1 Desenho Amostral

Alguns parâmetros imunológicos foram avaliados nos seguintes períodos de cultivo: (1) dois dias antes do início do desafio *per os* (*i.e.*, no 27<sup>o</sup> dia de exposição às rações experimentais); (2) 17 dias após o término do desafio *per os* (*i.e.*, 48<sup>o</sup> dia de exposição às rações experimentais); e, (4) no momento da despesca (70<sup>o</sup> dia de exposição às rações experimentais ou 41 dias após o dia inicial da infecção).

Para cada dia de amostragem, foi coletada a hemolinfa de 30 animais por tratamento oriundo de um total de cinco tanques de cultivo. Deste total, foram formados seis *pools*, sendo três para contagem total de hemócitos e três para preparação de soro empregado na determinação da concentração Protéica e atividade da enzima fenoloxidase (PO). Cada *pool* continha cinco animais derivado de um animal por tanque de cultivo. Após a amostragem, os camarões coletados foram devolvidos aos seus respectivos tanques de cultivo. Cada indivíduo somente foi amostrado uma única vez durante o estudo. Para evitar a recaptura, os camarões amostrados foram marcados com uma liga de borracha posicionada na base do pedúnculo ocular direito (Figura 3).

#### 3.9.2 Coleta de Hemolinfa e Preparação do Soro

A hemolinfa dos camarões foi coletada através de uma seringa (1 ml) com agulha 25X7mm 22G1, posicionada na região ventral do abdômen, entre o último esternito cefalotorácico e o primeiro abdominal. Antes da coleta, a região abdominal dos camarões foi higienizada com papel absorvente embebido em álcool 70% (Figura 3). A hemolinfa coletada foi mantida a 4°C por um período de 24 h para coagulação. Após esse período, a hemolinfa foi congelada por 10 min e descongelada, por três vezes consecutivas. Após este processo, a amostra foi centrifugada por três vezes a 16.000 g para lise celular por um período de 10 min por centrifugação, com o objetivo de remoção do coágulo e coleta do sobrenadante ou soro. O soro foi imediatamente estocado a -18°C para posterior análise.



**Figura 3.** Marcação dos camarões com liga de borracha (A e B), seguido da coleta de hemolinfa (C e D).

### 3.9.3 *Contagem Total de Hemócitos (THC)*

Para determinar os hemogramas dos diferentes grupos de camarões, a hemolinfa foi coletada diretamente em formol 5% em anticoagulante (27 mM Citrato de Sódio, 336 mM NaCl, 115 mM glicose e 9 mM EDTA, pH 7,6), sendo diluída oito vezes. A contagem de hemócitos seguiu a metodologia descrita por Moura *et al.* (2003). No presente estudo, a contagem foi realizada em uma câmara de Neubauer em microscópio com resolução de 40X16.

### 3.9.4 *Determinação da Concentração Protéica*

A concentração protéica do soro dos grupos de camarões analisados foi determinada através do método de BRADFORD (1976), utilizando soro albumina bovina (BSA) como padrão

### 3.9.5 *Determinação da Atividade da Enzima Fenoloxidase (PO)*

A atividade da PO nas amostras de soro foi verificada espectrofotometricamente (490 nm), através da formação do pigmento vermelho-coral DOPA-cromo, proveniente da oxidação do substrato enzimático L-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) pela PO do soro. Para determinar a atividade da PO, as amostras de soro foram diluídas (1:14) em TBS (TRIS 10 mM, NaCl 336 mM, CaCl<sub>2</sub> 5 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, pH 7,6) e uma alíquota de 50 µl dessa solução foi pré-incubada com um volume igual de um indutor da atividade enzimática, a serino-protease tripsina (SIGMA) (1mg/ml), durante 5 min a 20°C (MAGGIONI *et al.*, 2004). As serino-proteases têm a propriedade de clivar a forma zimogênica enzimática proPO para a forma ativa PO. Nos controles, o indutor foi substituído por um volume equivalente de TBS. Após incubação, foi adicionado um volume de 50 µl do substrato enzimático L-DOPA (3 mg/ml) procedendo-se à leitura das absorbâncias em Leitora de microplacas (490 nm) após 5, 10, 20 e 30min. A atividade enzimática específica da PO foi expressa pela variação da absorbância (490 nm) por minuto e por miligrama de proteínas totais nas amostras. Uma (1) unidade de atividade enzimática equivale ao aumento de 0,001 na absorbância, por min a 20°C e por miligrama de proteína (SÖDERHALL & HÄLL, 1984).

### 3.10 *Análises Estatísticas*

As análises estatísticas foram realizadas com o programa Statistical Package for Social Sciences, versão Windows 15.0.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, EUA). A Análise

de Variância Univariada (ANOVA) foi aplicada para determinar as diferenças estatísticas entre três ou mais tratamentos. O teste *a posteriori* de Scheffé foi utilizado para examinar as diferenças estatísticas individuais entre tratamentos, quando observadas diferenças estatísticas ao nível de significância de 0,05. O teste *t* foi aplicado para testar a igualdade entre duas variáveis. Para análise de correlação entre as variáveis, empregou-se o Coeficiente de Correlação de Pearson (*r*).

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Parâmetros de Qualidade de Água

Um total de 5.400 leituras de temperatura, pH e salinidade foram realizados ao longo de 70 dias de cultivo do camarão *Litopenaeus vannamei* em tanques de cultivo de 500 l com água clara (Tabela 4). A temperatura ( $28,4 \pm 0,62^{\circ}\text{C}$ ) não exibiu diferenças estatísticas significativas entre tratamentos ( $P > 0,05$ ; ANOVA). Apesar do pH e da salinidade da água terem exibido pouca variação entre tratamentos, diferenças estatisticamente significativas foram detectadas para estas variáveis ( $P < 0,05$ ; ANOVA). Níveis mais elevados de pH foram observados para os tratamentos **VitC**, **VitCBetG** e **BetG** quando comparados aos tratamentos controle **Ref**, **Neg** e **Pos** ( $P < 0,05$ ; ANOVA). Igualmente, o tratamento **BetG** exibiu níveis de salinidade mais baixos comparados aos tratamentos **Ref**, **Neg** e **VitCBetG** ( $P < 0,05$ ; ANOVA), contudo não se diferenciaram estatisticamente dos tratamentos **Pos** e **VitC** ( $P > 0,05$ ; ANOVA).

Os parâmetros de qualidade de água sofreram alterações ao longo do cultivo (Figura 4). O pH exibiu uma tendência de aumento até o 29º dia de cultivo, seguido de uma queda até a despesca quando alcançou uma média de 7,1. A salinidade aumentou de forma progressiva até o término do cultivo variando de um mínimo de 31‰ no 4º dia de cultivo até um máximo de 39‰ no 68º dia de cultivo. A temperatura apresentou-se de forma regular ao longo do cultivo, variando de um mínimo de  $27,1^{\circ}\text{C}$  a um máximo de  $29,7^{\circ}\text{C}$ .

### 4.2 Bromatologia das Rações Empregadas

Com exceção da ração comercial **Ref**, as demais rações fabricadas em laboratório (rações experimentais) apresentaram pouca variação em seu perfil nutricional. O teor protéico das rações variou de  $31,28 \pm 0,09\%$  (ração **BetG**) até  $36,57 \pm 0,15\%$  (**Ref**). Comparativamente, a ração **Ref** exibiu níveis estatisticamente mais elevados para a proteína bruta, cinzas e fibra bruta ( $P < 0,05$ ; ANOVA; Tabela 4). Por outro lado, o extrato etéreo da ração **Ref** foi estatisticamente inferior em relação às rações fabricadas em laboratório ( $P < 0,05$ ; ANOVA). A energia bruta alcançou uma média de  $3.733 \pm 82,5$  kcal/kg e não exibiu uma diferença estatística significativa entre rações ( $P > 0,05$ ; ANOVA; Tabela 5).

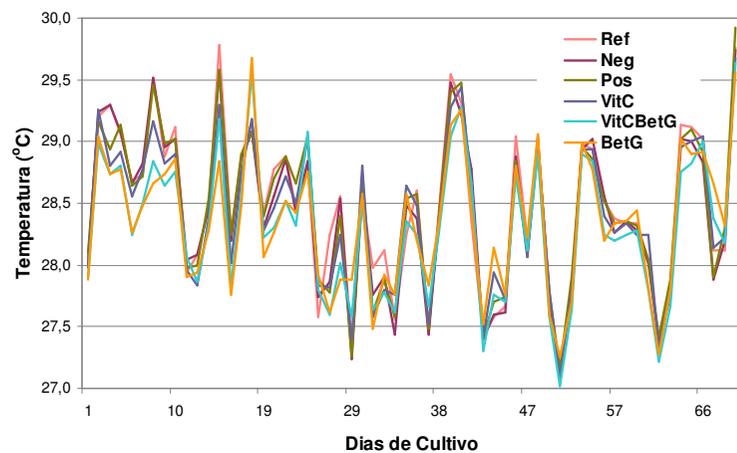
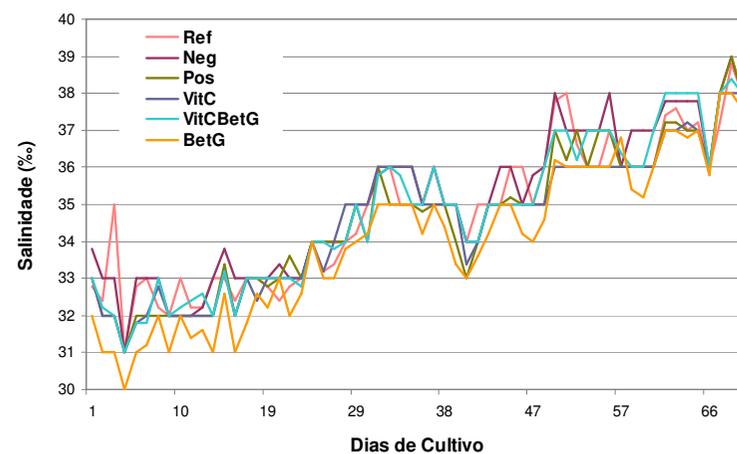
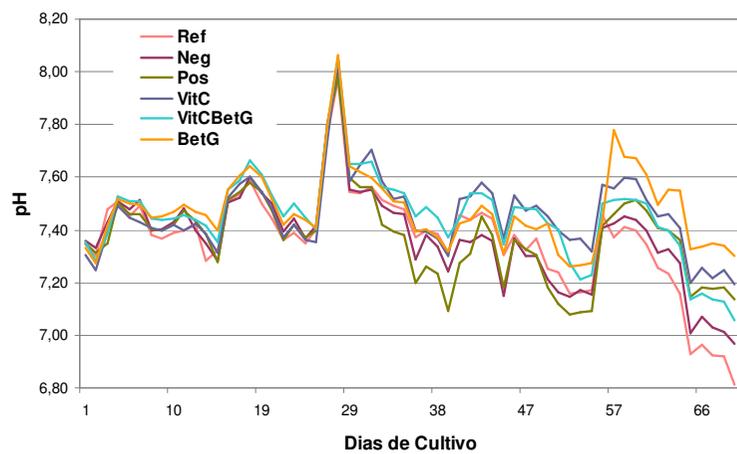
**Tabela 4.** Média de pH, salinidade (‰) e temperatura (°C) ± desvio padrão da água empregada no cultivo do camarão *Litopenaeus vannamei*. Linhas com letras iguais indicam diferença estatística não significativa entre rações ao nível de  $\alpha = 0,05$  segundo o teste *a posteriori* de Scheffé. Valores em parênteses indicam leituras mínimas e máximas.

Tipo de Ração <sup>1</sup>	Parâmetros de Qualidade de Água		
	pH	Salinidade (‰)	Temperatura (°C)
<b>Ref</b>	7,4 ± 0,19a (6,76 – 7,99)	35 ± 1,9a (31 – 39)	28,5 ± 0,66a (27,0 – 29,9)
<b>Neg</b>	7,4 ± 0,18a (6,92 – 8,04)	35 ± 2,0a (31 – 39)	28,4 ± 0,65a (27,0 – 29,9)
<b>Pos</b>	7,4 ± 0,17a (7,03 – 8,04)	35 ± 1,9ab (31 – 39)	28,5 ± 0,64a (27,0 – 30,0)
<b>VitC</b>	7,5 ± 0,14b (7,10 – 8,07)	35 ± 1,8ab (31 – 38)	28,4 ± 0,60a (26,9 – 29,9)
<b>VitCBetG</b>	7,5 ± 0,16b (7,03 – 8,08)	35 ± 2,0a (31 – 39)	28,3 ± 0,59a (26,9 – 29,8)
<b>BetG</b>	7,5 ± 0,15b (7,20 – 8,07)	34 ± 2,1b (30 – 38)	28,3 ± 0,57a (27,1 – 29,8)
<i>P</i> ANOVA	< 0,05	< 0,05	NS <sup>2</sup>
<i>n</i> <sup>3</sup>	1.800	1.800	1.800

<sup>1</sup>**Ref**, ração comercial; **Neg**, ração controle negativo; **Pos**, ração controle positivo; **VitC**, ração contendo 250 mg/kg de ácido L-ascórbico-2-monofosfato; **VitCBetG**, ração contendo 1.160 mg/kg de ácido L-ascórbico-2-monofosfato em combinação com 600 mg/kg de  $\beta$ -1,3/1,6-glucano; e **BetG**, ração contendo 600 mg/kg de  $\beta$ -1,3/1,6-glucano.

<sup>2</sup>NS, diferença estatística não significativa ao nível de  $\alpha = 0,05$  segundo a Análise de Variância Univariada (One-Way ANOVA).

<sup>3</sup>número total de leituras.



**Figura 4.** Variação diária nos parâmetros de qualidade de água ao longo do cultivo de 70 dias do *Litopenaeus vannamei*. **Ref**, ração comercial; **Neg**, ração controle negativo; **Pos**, ração controle positivo; **VitC**, ração contendo 250 mg/kg de ácido L-ascórbico-2-monofosfato; **VitCBetG**, ração contendo 1.160 mg/kg de ácido L-ascórbico-2-monofosfato em combinação com 600 mg/kg de  $\beta$ -1,3/1,6-glucano; e **BetG**, ração contendo 600 mg/kg de  $\beta$ -1,3/1,6-glucano.

**Tabela 5.** Análise bromatológica das rações empregadas no estudo de desempenho zootécnico e imunológico do camarão *Litopenaeus vannamei* após infecção com o vírus da Mionecrose Infecciosa (IMNV). Valores apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. Todos os parâmetros bromatológicos foram realizados em duplicata, exceto energia bruta (EB) que foi conduzida em triplicata. Linhas com letras iguais indicam diferença estatística não significativa entre rações ao nível de  $\alpha = 0,05$  segundo o teste *a posteriori* de Scheffé.

Tipo de Ração <sup>1</sup>	Perfil Nutricional <sup>2,3</sup>				
	PB (%)	EE (%)	Cinzas (%)	FB (%)	EB (kcal/kg)
<b>Ref</b>	36,57 $\pm$ 0,15a	8,7 $\pm$ 0,2a	10,6 $\pm$ 0,00a	7,6 $\pm$ 0,1a	3.713 $\pm$ 83,3a
<b>Pos/Neg</b>	31,37 $\pm$ 0,00b	10,1 $\pm$ 0,2b	10,0 $\pm$ 0,07b	5,1 $\pm$ 0,1b	3.706 $\pm$ 97,2a
<b>VitC</b>	31,34 $\pm$ 0,15b	9,9 $\pm$ 0,2b	10,1 $\pm$ 0,09b	4,5 $\pm$ 0,1c	3.773 $\pm$ 81,5a
<b>VitCBetG</b>	31,35 $\pm$ 0,02b	10,3 $\pm$ 0,2b	10,1 $\pm$ 0,01b	5,2 $\pm$ 0,2b	3.656 $\pm$ 61,3a
<b>BetG</b>	31,28 $\pm$ 0,09b	9,9 $\pm$ 0,2b	10,3 $\pm$ 0,01ab	4,3 $\pm$ 0,1bc	3.817 $\pm$ 25,6a
<i>P</i> ANOVA	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	NS

<sup>1</sup>**Ref**, ração comercial; **Neg**, ração controle negativo; **Pos**, ração controle positivo; **VitC**, ração contendo 250 mg/kg de ácido L-ascórbico-2-monofosfato; **VitCBetG**, ração contendo 1.160 mg/kg de ácido L-ascórbico-2-monofosfato em combinação com 600 mg/kg de  $\beta$ -1,3/1,6-glucano; e **BetG**, ração contendo 600 mg/kg de  $\beta$ -1,3/1,6-glucano.

<sup>2</sup>PB, proteína bruta; EE, extrato etéreo; FB, fibra bruta; EB, energia bruta.

<sup>3</sup>NS, diferença estatística não significativa ao nível de  $\alpha = 0,05$  segundo a Análise de Variância Univariada (One-Way ANOVA).

#### 4.3 Status Patológico dos Camarões Cultivados e do Homogenado

As análises de PCR e as avaliações histopatológicas indicaram que os camarões empregados no presente estudo estavam livres das principais enfermidades virais (*i.e.*, TSV, WSSV, IHHNV, IMNV; Tabela 6; Anexos I e II). O laudo histopatológico emitido pelo CEDECAM do Instituto de Ciências do Mar (Labomar/UFC) indicou que “não houve nenhum achado histológico compatível com enfermidades de etiologia viral ou bacteriológica e de um modo geral o material analisado apresentou características normocíticas e normocrômicas”.

Por outro lado, o homogenado empregado no desafio *per os* apresentou-se negativo para os vírus TSV, WSSV e IHHNV, mas positivo para IMNV (Tabela 6; Anexo I). Ainda segundo análise de RT-PCR em tempo real, o homogenado apresentou uma carga viral de  $1,82 \times 10^3$  cópias de IMNV/ $\mu$ l RNA (Anexo III).

Ao término do estudo, análises de PCR com camarões despescados confirmaram que todos os tratamentos, com exceção do tratamento controle **Ref**, apresentavam animais contaminados com o IMNV (Tabela 6; Anexo IV).

#### 4.4 Crescimento dos Camarões Cultivados

Os camarões cresceram em um ritmo contínuo durante todo período do estudo (Tabela 7). Na despesca, após 70 dias de cultivo, os animais alcançaram um peso corporal entre  $9,07 \pm 1,48$  g (**BetG**) e  $11,11 \pm 1,86$  g (**Pos**). Diferenças estatísticas significativas no peso corporal dos camarões apareceram 14 dias após o início do cultivo quando os animais submetidos ao tratamento **BetG** exibiram um menor peso corporal comparado aos demais (exceto ao tratamento **Pos** e a **VitCBetG**;  $P < 0,05$ ; ANOVA). Entre o 28° e o 56° dias de cultivo a tendência de menor peso corporal no tratamento **BetG** ficou estabelecida. Na despesca, os camarões dos tratamentos **Pos**, **VitC** e **VitCBetG** exibiram um maior peso corporal em relação aos animais no tratamento **BetG** ( $P < 0,05$ ; ANOVA). Os camarões alimentados com **Ref** e **BetG** não apresentaram diferenças estatísticas significativas ao término do cultivo ( $P > 0,05$ ; ANOVA).

O ganho de peso semanal dos camarões (g/semana) exibiu uma tendência de aumento com o tempo de cultivo. O crescimento semanal variou de 0,56 g no 14° dia de cultivo para 0,77 g na última semana de cultivo. Contudo, não foi observada diferença estatística significativa entre tratamentos para este parâmetro ao longo do cultivo ( $P > 0,05$ ; ANOVA; Figura 5).

**Tabela 6.** Resultado das análises de histopatológica e de PCR realizadas nos camarões povoados no início do estudo, no homogenado empregado para o desafio *per os* e nos camarões despescados oriundo dos diferentes tratamentos estudados.

Material analisado <sup>1</sup>	Análise Patológica	
	Histopatologia	PCR <sup>2</sup>
Camarões povoados	Ausente de vírus e bactérias	TSV-, WSSV-, IHHNV-, IMNV-
Homogenado	ND <sup>3</sup>	TSV-, WSSV-, IHHNV-, IMNV+
Camarões despescados		
<b>Ref</b>	ND	IMNV-
<b>Pos/Neg</b>	ND	IMNV+
<b>VitC</b>	ND	IMNV+
<b>VitCBetG</b>	ND	IMNV+
<b>BetG</b>	ND	IMNV+

<sup>1</sup>**Ref**, ração comercial; **Neg**, ração controle negativo; **Pos**, ração controle positivo; **VitC**, ração contendo 250 mg/kg de ácido L-ascórbico-2-monofosfato; **VitCBetG**, ração contendo 1.160 mg/kg de ácido L-ascórbico-2-monofosfato em combinação com 600 mg/kg de  $\beta$ -1,3/1,6-glucano; e **BetG**, ração contendo 600 mg/kg de  $\beta$ -1,3/1,6-glucano.<sup>2</sup>Cada amostra analisada foi constituída de um *pool* de pleópodos removido de um total de 30 indivíduos

<sup>3</sup>ND, não disponível

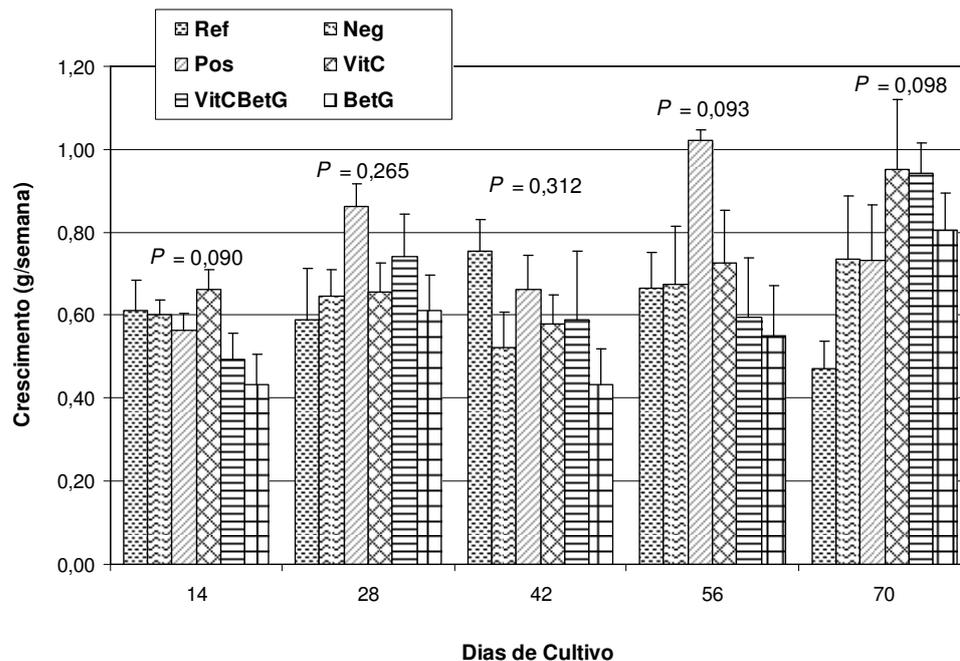
**Tabela 7.** Peso médio corporal (g)  $\pm$  desvio padrão do camarão *Litopenaeus vannamei* ao longo de 70 dias de cultivo em tanques de 500 L com água clara. Médias representam o peso corporal de um total de 70 animais oriundos de cinco tanques de cultivo. Linhas com letras iguais indicam diferença estatística não significativa entre tratamentos ao nível de  $\alpha = 0,05$  segundo o teste *a posteriori* de Scheffé. O desafio *per os* com o IMNV ocorreu entre o 30º e o 33º dia de cultivo nos tratamentos **Pos**, **VitC**, **VitBetG** e **BetG**.

Tipo de Ração <sup>1</sup>	Dias de Cultivo/Peso Corporal (g)					
	0	14	28	42	56	70 <sup>2</sup>
<b>Ref</b>	3,58 $\pm$ 0,53a	4,80 $\pm$ 0,81a	5,98 $\pm$ 0,95ab	7,49 $\pm$ 1,18 <sup>a</sup>	8,82 $\pm$ 1,68a	9,70 $\pm$ 1,71ab
<b>Neg</b>	3,52 $\pm$ 0,55a	4,72 $\pm$ 0,68a	6,02 $\pm$ 0,95ab	7,06 $\pm$ 1,40 <sup>a</sup>	8,41 $\pm$ 1,52a	9,88 $\pm$ 1,85a
<b>Pos</b>	3,51 $\pm$ 0,58a	4,64 $\pm$ 0,68ab	6,37 $\pm$ 1,06b	7,69 $\pm$ 1,08 <sup>a</sup>	9,73 $\pm$ 1,70b	11,11 $\pm$ 1,86c
<b>VitC</b>	3,51 $\pm$ 0,56a	4,84 $\pm$ 0,71a	6,15 $\pm$ 0,92b	7,31 $\pm$ 1,14 <sup>a</sup>	8,76 $\pm$ 1,39a	10,50 $\pm$ 1,80ac
<b>VitCBetG</b>	3,46 $\pm$ 0,56a	4,44 $\pm$ 0,66ab	5,93 $\pm$ 1,02ab	7,11 $\pm$ 1,26 <sup>a</sup>	8,30 $\pm$ 1,10a	10,16 $\pm$ 1,94ac
<b>BetG</b>	3,41 $\pm$ 0,55a	4,27 $\pm$ 0,65b	5,49 $\pm$ 0,81a	6,36 $\pm$ 0,94b	7,46 $\pm$ 1,25c	9,07 $\pm$ 1,48b
<i>P</i> ANOVA	NS <sup>3</sup>	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05

<sup>1</sup>**Ref**, ração comercial; **Neg**, ração controle negativo; **Pos**, ração controle positivo; **VitC**, ração contendo 250 mg/kg de ácido L-ascórbico-2-monofosfato; **VitCBetG**, ração contendo 1.160 mg/kg de ácido L-ascórbico-2-monofosfato em combinação com 600 mg/kg de  $\beta$ -1,3/1,6-glucano; e **BetG**, ração contendo 600 mg/kg de  $\beta$ -1,3/1,6-glucano.

<sup>2</sup>Representa a média de todos os animais coletados na despesca.

<sup>3</sup>NS, diferença estatística não significativa segundo o Teste de Univariância (ANOVA).



**Figura 5.** Ganho de peso semanal (g/semana)  $\pm$  erro padrão ( $n = 30$ ) do camarão *Litopenaeus vannamei* alimentado com seis rações antes e depois de desafio per os com o IMNV. Os camarões dos tratamentos **Pos**, **VitC**, **VitBetG** e **BetG** foram desafiados com o IMNV entre o 30° e o 33° dias de cultivo. **Ref**, ração comercial; **Neg**, ração controle negativo; **Pos**, ração controle positivo; **VitC**, ração contendo 250 mg/kg de ácido L-ascórbico-2-monofosfato; **VitCBetG**, ração contendo 1.160 mg/kg de ácido L-ascórbico-2-monofosfato em combinação com 600 mg/kg de  $\beta$ -1,3/1,6-glucano; e **BetG**, ração contendo 600 mg/kg de  $\beta$ -1,3/1,6-glucano.

#### 4.5 Sobrevivência dos Camarões Cultivados

A sobrevivência dos camarões decresceu de forma progressiva ao longo do cultivo, independente do tratamento adotado (Figura 6). Uma mortalidade elevada de camarões foi observada no 56º dia de cultivo, logo após a quinta biometria. Esta mortalidade ocorreu 29 dias após o primeiro dia de desafio *per os* com o IMNV.

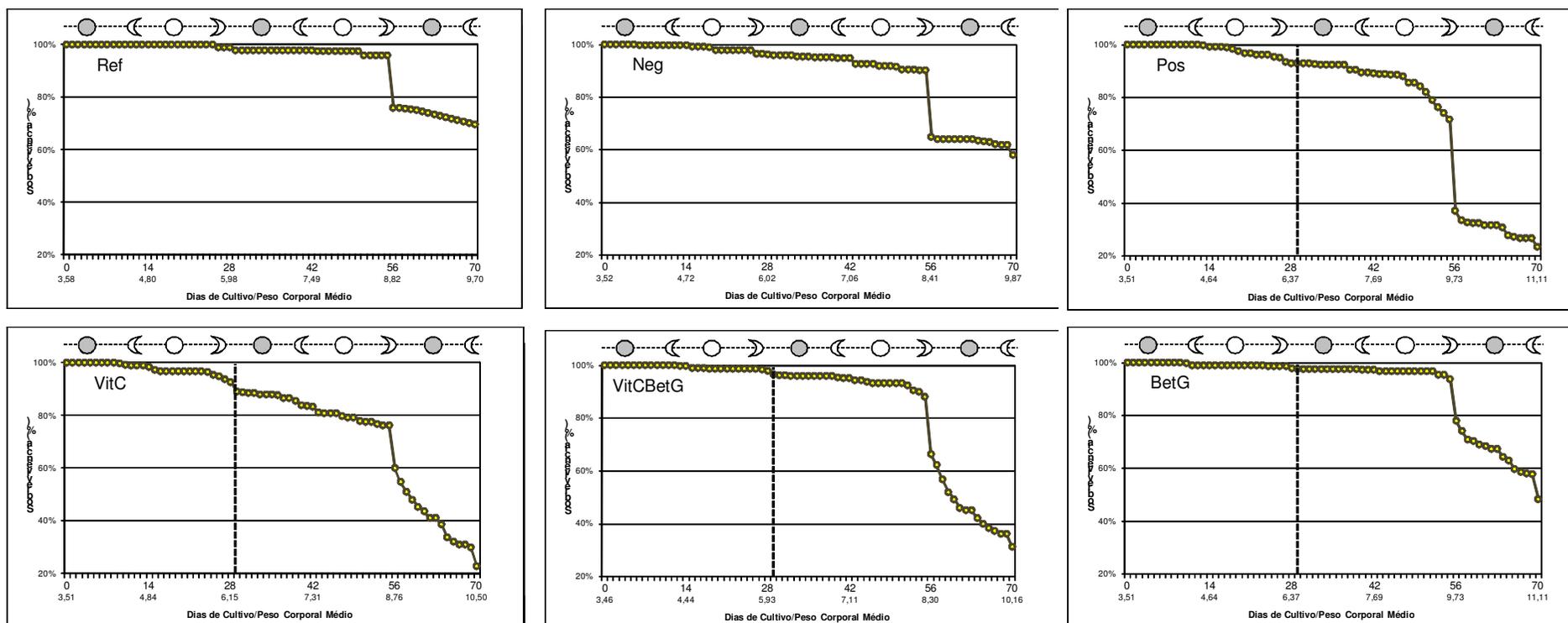
A queda na sobrevivência dos camarões foi da ordem de 26,1%, 39,0%, 94,3%, 27,0%, 32,8% e 20,3%, respectivamente, para os tratamentos **Ref**, **Neg**, **Pos**, **VitC**, **VitCBetG** e **BetG**. As menores perdas ocorrem nos tratamentos que não foram submetidos ao desafio *per os* com IMNV (**Ref** e **Neg**) e os que foram alimentados com as rações **VitC** e **BetG**.

Na despesca dos camarões, após 70 dias de cultivo, a sobrevivência final variou de um mínimo de  $22,8 \pm 4,9\%$  para o tratamento **VitC** a um máximo de  $69,5 \pm 5,7\%$  para o tratamento **Ref** (Figura 8). De acordo com o teste *a posteriori* de Scheffé a sobrevivência final dos animais nos tratamentos **Ref** ( $69,5 \pm 5,7\%$ ) e **Neg** ( $57,9 \pm 4,1\%$ ) não exibiram diferença estatística significativa ( $P > 0,05$ ), contudo diferenciaram-se estatisticamente da sobrevivência nos tratamentos **Pos** ( $23,2 \pm 2,6\%$ ), **VitC** ( $22,8 \pm 4,9\%$ ) e **VitCBetG** ( $31,2 \pm 2,0\%$ ;  $P < 0,05$ ). Não foi detectada diferença estatística significativa entre os tratamentos **Neg** e **BetG** ( $48,1 \pm 3,1\%$ ) nem entre os tratamentos **VitCBetG** e **BetG** ( $P > 0,05$ ; teste de Scheffé).

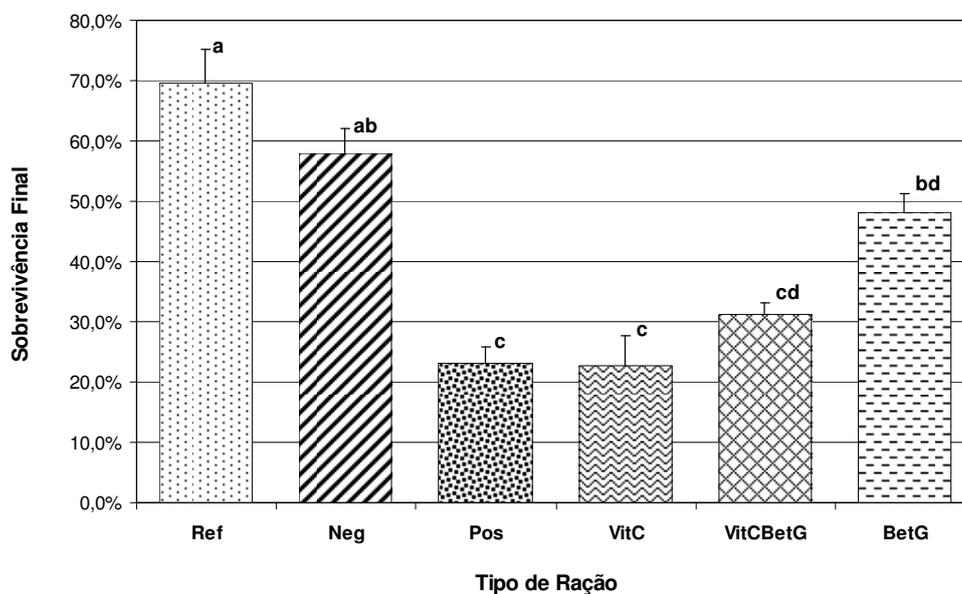
Quando se avaliamos fatores que podem ter contribuído para redução ou manutenção dos índices de sobrevivência (Figura 7), o peso corporal dos camarões foi o que exibiu uma maior correlação ( $r = - 0,892$ ). Contudo, todos os fatores analisados (ciclo lunar, tipo de ração e desafio *per os*) exibiram uma correlação linear estatisticamente significativa com a sobrevivência ( $P < 0,05$ ; Coeficiente de Pearson), porém com um baixo nível de correlação.

#### 4.6 Parâmetros Imunológicos

A contagem total de hemócitos (CTH) do camarão *Litopenaeus vannamei* não apresentou diferença estatística significativa ( $P > 0,05$ ; ANOVA; Tabela 9) entre os tratamentos avaliados com 27 (*i.e.*, dois dias antes da infecção *per os*) e 70 dias de cultivo (no momento da despesca). Entretanto, após 17 dias do desafio (48º dia de cultivo) foi constatado uma diferença estatisticamente significativa na CTH entre alguns tratamentos estudados ( $P < 0,05$ ; ANOVA).



**Figura 6.** Variação na sobrevivência do *L. vannamei* ao longo de 70 dias de cultivo em relação ao peso médio corporal e a fase lunar. Linhas pontilhadas indicam primeiro dia (40º dia) da infecção oral com o vírus da Mionecrose Infecciosa (IMNV). **Ref**, ração comercial; **Neg**, ração controle negativo; **Pos**, ração controle positivo; **VitC**, ração contendo 250 mg/kg de ácido L-ascórbico-2-monofosfato; **VitCBetG**, ração contendo 1.160 mg/kg de ácido L-ascórbico-2-monofosfato em combinação com 600 mg/kg de  $\beta$ -1,3/1,6-glucano; e **BetG**, ração contendo 600 mg/kg de  $\beta$ -1,3/1,6-glucano. ☾, lua nova; ☾, lua quarto crescente; ○, lua cheia; ☽, lua quarto minguante. Linha horizontal pontilhada indica o 1º dia do desafio *per os* (30º dia).



**Figura 7.** Sobrevivência (%) média final  $\pm$  erro padrão do camarão *Litopenaeus vannamei* após 70 dias de cultivo e infecção com o vírus da Mionecrose Infeciosa (IMNV). Os animais foram alimentados com seis diferentes tipos de ração: **Ref**, ração comercial; **Neg**, ração controle negativo; **Pos**, ração controle positivo; **VitC**, ração contendo 250 mg/kg de ácido L-ascórbico-2-monofosfato; **VitCBetG**, ração contendo 1.160 mg/kg de ácido L-ascórbico-2-monofosfato em combinação com 600 mg/kg de  $\beta$ -1,3/1,6-glucano; e **BetG**, ração contendo 600 mg/kg de  $\beta$ -1,3/1,6-glucano. Colunas com letras iguais indicam diferença estatística não significativa entre tratamentos ao nível de  $\alpha = 0,05$  segundo o teste *a posteriori* de Scheffé.

**Tabela 8.** Correlação entre sobrevivência de camarões, crescimento corporal (g), ciclo lunar e tipo de ração utilizada segundo o Coeficiente de Pearson ( $r$ ). As observações de sobrevivência empregadas nas análises de correlação representam valores diários (ciclo lunar e infecção com IMNV), semanais (crescimento) ou finais (tipo de ração). As interações significativas ao nível de  $\alpha = 0,001$  segundo o Coeficiente de Pearson ( $r$ ) são indicadas por \*\*.

	Variáveis/Correlação de Pearson			
	Ciclo Lunar <sup>1</sup>	Crescimento <sup>2</sup>	Tipo de Ração <sup>3</sup>	Desafio <i>per os</i> <sup>4</sup>
Ração	0,204**	- 0,892**	- 0,470**	- 0,149**
<i>N</i>	1.950	150	30	1.380

<sup>1</sup>Lua nova, lua quarto crescente, lua cheia, lua quarto minguante.

<sup>2</sup>Peso corporal (g) dos camarões ao longo do cultivo.

<sup>3</sup> **Ref**, ração comercial; **Neg**, ração controle negativo; **Pos**, ração controle positivo; **VitC**, ração contendo 250 mg/kg de ácido L-ascórbico-2-monofosfato; **VitCBetG**, ração contendo 1.160 mg/kg de ácido L-ascórbico-2-monofosfato em combinação com 600 mg/kg de  $\beta$ -1,3/1,6-glucano; e **BetG**, ração contendo 600 mg/kg de  $\beta$ -1,3/1,6-glucano.

<sup>4</sup>Desafio *per os* com o vírus da Mionecrose Infecciosa

\*\*A correlação é significativa ao nível de  $\alpha = 0,01$  segundo o coeficiente de Pearson.

No 48º dia de cultivo, as maiores contagens totais de hemócitos foram detectadas para os tratamentos **Ref**, **Neg**, **Pos** e **VitC** as quais apresentaram valores máximo e mínimo de  $32.185 \pm 4.502$  cels./mm<sup>3</sup> e  $23.323$  cels./mm<sup>3</sup>, para POS e VITC respectivamente. Neste dia, os camarões alimentados nos tratamentos **VitCBetG** e **BetG** exibiram os menores valores de CTH (Tabela 9). Ao longo do cultivo, ocorreu um aumento estatisticamente significativo na CTH nos tratamentos **Neg** e **VitCBetG** ( $P < 0,05$ ; ANOVA). No **Pos**, a CTH sofreu um aumento significativo após o desafio *per os*, seguido de uma queda (Tabela 9;  $P < 0,05$ ; ANOVA). Nos demais tratamentos (**Ref**, **VitC** e **BetG**) não houve diferença estatisticamente significativa ao longo do cultivo ( $P > 0,05$ ; ANOVA).

A concentração de proteínas totais no soro do camarão *L. vannamei* antes do desafio *per os* variou de um mínimo de  $101 \pm 13,2$  mg/l (**Pos**) a um máximo de  $118 \pm 7,9$  mg/L (**BetG**), contudo não apresentou diferença estatística significativa entre tratamentos ( $P > 0,05$ ; ANOVA; Tabela 10). Mesmo após 17 dias do término do desafio *per os* com IMNV (dia 48º) e na despesca (70º dia), os camarões cultivados não apresentaram diferença estatística significativa na concentração de proteína total entre tratamentos ( $P > 0,05$ ; ANOVA). Apesar de ter sido observada uma queda da concentração de proteína total após a infecção com o IMNV e uma leve recuperação na despesca, as diferenças não observadas não foram estatisticamente significativas ( $P > 0,05$ ; ANOVA).

A atividade específica da enzima fenoloxidase (PO, U/min/mg) no soro do camarão *L. vannamei* antes do desafio *per os* (27º dia) exibiu níveis estatisticamente mais elevados para os animais submetidos ao tratamento **VitC** comparado aos demais ( $P < 0,05$ ; teste de Scheffé; Tabela 11). Contudo este tratamento não se diferenciou estatisticamente dos tratamentos **VitCBetG** e **BetG** ( $P > 0,05$ ; teste de Scheffé). Estes últimos exibiram níveis de atividade da enzima PO semelhantes aos animais submetidos aos tratamentos **Ref**, **Neg** e **Pos** ( $P > 0,05$ ; ANOVA). Após o desafio *per os* (48º dia) e na despesca (70º dia), os tratamentos não se diferenciaram estatisticamente em relação à atividade da enzima PO ( $P > 0,05$ ; ANOVA).

Ao longo do cultivo, apesar de ter sido detectada uma variação na atividade PO semelhante à concentração de proteínas totais na maioria dos tratamentos (queda após infecção *per os*, seguida de leve recuperação na despesca), esta variação não foi

**Tabela 9.** Número total de hemócitos (cels./mm<sup>3</sup>) na hemolinfa do camarão *Litopenaeus vannamei* em três estágios de cultivo, antes e após um desafio *per os* com o vírus IMNV. Valores apresentados como média ± desvio padrão. Cada valor representa a média de três *pools* de um total de 15 animais por tratamento. As leituras foram realizadas em duplicata para cada *pool*. Letras em minúsculo e maiúsculo em comum indicam diferença estatística não significativa entre tratamentos (colunas) e dias de cultivo (linhas), respectivamente, ao nível de  $\alpha = 0,05$  segundo o teste *a posteriori* de Scheffé.

Tipo de Ração <sup>2</sup>	Dias de Cultivo <sup>1</sup> /No. de Células (cels./mm <sup>3</sup> )			P ANOVA
	Dia 27	Dia 48	Dia 70	
<b>Ref</b>	19.934 ± 4.137aA	27.243 ± 5.577aAC	25.667 ± 7.088aA	NS <sup>3</sup>
<b>Neg</b>	16.930 ± 2.916aA	24.290 ± 4.226bABC	29.157 ± 1.700bA	< 0,05
<b>Pos</b>	15.140 ± 2.380aA	32.185 ± 4.502bC	24.693 ± 3.048cA	< 0,05
<b>VitC</b>	22.055 ± 6.881aA	23.323 ± 4.845aABC	26.310 ± 7.538aA	NS <sup>3</sup>
<b>VitCBetG</b>	14.540 ± 1.738aA	21.090 ± 3.038bAB	29.760 ± 3.390cA	< 0,05
<b>BetG</b>	16.090 ± 4.242aA	17.783 ± 2.707aB	21.703 ± 5.671aA	NS <sup>3</sup>
P ANOVA	NS <sup>3</sup>	< 0,05	NS <sup>3</sup>	-

<sup>1</sup>Dia 27, dois dias antes do início do desafio *per os*; Dia 48, 17 dias após o término do desafio *per os*; Dia 70, no momento da despesca.

<sup>2</sup>**Ref**, ração comercial; **Neg**, ração controle negativo; **Pos**, ração controle positivo; **VitC**, ração contendo 250 mg/kg de ácido L-ascórbico-2-monofosfato; **VitCBetG**, ração contendo 1.160 mg/kg de ácido L-ascórbico-2-monofosfato em combinação com 600 mg/kg de  $\beta$ -1,3/1,6-glucano; e **BetG**, ração contendo 600 mg/kg de  $\beta$ -1,3/1,6-glucano.

<sup>3</sup>NS, diferença estatística não significativa ao nível  $\alpha = 0,05$  segundo o Teste de Univariância (One-Way ANOVA).

**Tabela 10.** Concentração de proteínas totais (mg/l) no soro do camarão *Litopenaeus vannamei* estimada pelo método de Bradford (1976) em três estágios de cultivo, antes e após um desafio *per os* com o vírus IMNV. Valores apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. Cada valor representa a média de três *pools* de um total de 30 animais por tratamento. As análises foram realizadas em duplicata para cada *pool*. Letras em minúsculo e maiúsculo em comum indicam diferença estatística não significativa entre tratamentos (colunas) e dias de cultivo (linhas), respectivamente, ao nível de  $\alpha = 0,05$  segundo o teste *a posteriori* de Scheffé.

Tipo de Ração <sup>2</sup>	Dias de Cultivo <sup>1</sup> /Concentração de Proteína (mg/l)			P ANOVA
	Dia 27	Dia 48	Dia 70	
<b>Ref</b>	114 $\pm$ 5,1aA	97 $\pm$ 8,8aA	103 $\pm$ 12,3aA	NS <sup>3</sup>
<b>Neg</b>	106 $\pm$ 15,5aA	98 $\pm$ 15,3aA	94 $\pm$ 10,7aA	NS <sup>3</sup>
<b>Pos</b>	101 $\pm$ 13,2aA	96 $\pm$ 5,0aA	101 $\pm$ 2,9aA	NS <sup>3</sup>
<b>VitC</b>	102 $\pm$ 21,1aA	97 $\pm$ 1,5aA	102 $\pm$ 9,1aA	NS <sup>3</sup>
<b>VitCBetG</b>	110 $\pm$ 7,7aA	87 $\pm$ 11,4aA	96 $\pm$ 7,2aA	NS <sup>3</sup>
<b>BetG</b>	118 $\pm$ 7,9aA	107 $\pm$ 10,9aA	94 $\pm$ 24,2aA	NS <sup>3</sup>
P ANOVA	NS <sup>3</sup>	NS <sup>3</sup>	NS <sup>3</sup>	-

<sup>1</sup>Dia 27, dois dias antes do início do desafio *per os*; Dia 48, 17 dias após o término do desafio *per os*; Dia 70, no momento da despesca.

<sup>2</sup>**Ref**, ração comercial; **Neg**, ração controle negativo; **Pos**, ração controle positivo; **VitC**, ração contendo 250 mg/kg de ácido L-ascórbico-2-monofosfato; **VitCBetG**, ração contendo 1.160 mg/kg de ácido L-ascórbico-2-monofosfato em combinação com 600 mg/kg de  $\beta$ -1,3/1,6-glucano; e **BetG**, ração contendo 600 mg/kg de  $\beta$ -1,3/1,6-glucano.

<sup>3</sup>NS, diferença estatística não significativa ao nível  $\alpha = 0,05$  segundo o Teste de Univariância (One-Way ANOVA).

**Tabela 11.** Atividade específica (em função da concentração protéica) da enzima fenoloxidase (PO, U/min/mg) no soro do camarão *Litopenaeus vannamei* em três estágios de cultivo, antes e após desafio *per os* com o vírus IMNV. Valores apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. Cada valor representa a média de três *pools* de um total de 30 animais por tratamento. As análises foram realizadas em duplicata para cada *pool*. Letras em minúsculo e maiúsculo em comum indicam diferença estatística não significativa entre tratamentos (linhas) e dias de cultivo (colunas), respectivamente, ao nível de  $\alpha = 0,05$  segundo o teste *a posteriori* de Scheffé.

Tipo de Ração <sup>2</sup>	Dias de Cultivo <sup>1</sup> /Atividade Específica de PO (U/min/mg)			P ANOVA
	Dia 27	Dia 48	Dia 70	
<b>Ref</b>	14,3 $\pm$ 1,4aA	14,6 $\pm$ 5,5aA	17,9 $\pm$ 9,5aA	NS <sup>3</sup>
<b>Neg</b>	23,8 $\pm$ 1,4abAB	16,1 $\pm$ 5,7aA	27,0 $\pm$ 4,2aB	< 0,05
<b>Pos</b>	23,0 $\pm$ 5,1abA	12,8 $\pm$ 1,3aA	17,4 $\pm$ 5,5aA	NS <sup>3</sup>
<b>VitC</b>	30,2 $\pm$ 7,9bA	21,5 $\pm$ 7,3aA	22,6 $\pm$ 12,1aA	NS <sup>3</sup>
<b>VitCBetG</b>	16,8 $\pm$ 5,7abA	23,3 $\pm$ 2,5aA	22,5 $\pm$ 4,4aA	NS <sup>3</sup>
<b>BetG</b>	18,8 $\pm$ 6,7abA	19,6 $\pm$ 6,7aA	24,8 $\pm$ 17,0aA	NS <sup>3</sup>
P ANOVA	< 0,05	NS <sup>3</sup>	NS <sup>3</sup>	-

<sup>1</sup>Dia 27, dois dias antes do início do desafio *per os*; Dia 48, 17 dias após o término do desafio *per os*; Dia 70, no momento da despesca.

<sup>2</sup>**Ref**, ração comercial; **Neg**, ração controle negativo; **Pos**, ração controle positivo; **VitC**, ração contendo 250 mg/kg de ácido L-ascórbico-2-monofosfato; **VitCBetG**, ração contendo 1.160 mg/kg de ácido L-ascórbico-2-monofosfato em combinação com 600 mg/kg de  $\beta$ -1,3/1,6-glucano; e **BetG**, ração contendo 600 mg/kg de  $\beta$ -1,3/1,6-glucano.

<sup>3</sup>NS, diferença estatística não significativa ao nível  $\alpha = 0,05$  segundo o Teste de Univariância (One-Way ANOVA).

estatisticamente significativa ( $P > 0,05$ ; ANOVA). No entanto, no tratamento **Neg** as variações ao longo do cultivo foram estatisticamente significativas ( $P < 0,05$ ; ANOVA), em particular após o desafio *per os* (48º dia) que exibiu a menor atividade PO entre todos os dias de cultivo analisados ( $P < 0,05$ ; teste de Scheffé).

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1 Qualidade e Efeito da Água sobre o Desempenho dos Camarões

Os parâmetros de qualidade de água observados no presente estudo estão dentro de níveis considerados ideais para o cultivo do camarão *Litopenaeus vannamei* (CLIFFORD, 1992; VAN WYK & SCARPA, 1999). As diferenças no pH e na salinidade detectadas entre os diferentes tratamentos, apesar de estatisticamente significativas, foram mínimas (Coeficiente de Variação, CV de 2,34% e 0,57%, respectivamente) e provavelmente não exerceram influência sobre as diferentes variáveis de desempenho zootécnico da espécie durante o estudo.

As alterações no pH da água que ocorreram durante o cultivo foram reflexo das trocas parciais de água executadas na tentativa de manter uma baixa concentração de material orgânico acumulado no sistema de cultivo. A salinidade sofreu um aumento progressivo durante o cultivo, influenciado pela água de captação utilizada para as trocas parciais de água realizadas no sistema de cultivo. Os aumentos na salinidade estão de acordo com o regime de chuvas observado no Estado do Ceará. O estudo, conduzido entre junho e setembro, coincidiu com o período de estiagem no Estado (CAMPOS *et al.*, 2003), quando se observam salinidades mais elevadas nos estuários (FONSECA, 2006).

Apesar da salinidade ter alcançado concentrações elevadas, próximo a 40‰ na despesca, os incrementos foram gradativos ao longo do período de cultivo. Observou-se que o aumento na taxa de mortalidade dos camarões iniciou-se a partir do 56º dia de cultivo quando a salinidade e o pH estavam em  $36 \pm 0,41\%$  e  $7,5 \pm 0,13$ , respectivamente. Estes níveis provavelmente não refletem condições de estresse para o *L. vannamei*, uma espécie adaptada a condições hipersalinas de cultivo (MARTÍNEZ-CORDOVA *et al.*, 1997). PONCE-PALAFOX *et al.* (1997) avaliou o crescimento e a sobrevivência do camarão branco submetido a salinidades de 20, 30, 35, 40 e 50‰ e temperaturas de 20, 25, 30 e 35°C. Os autores concluíram que um crescimento e uma sobrevivência mais elevada para a espécie ocorrem entre 28 e 30°C e entre 33 e 40‰.

### 5.2 Dinâmica da Mortalidade dos Camarões

Os camarões cultivados foram efetivamente contaminados com o IMNV através de desafio *per os*. Embora mortalidades de 100% não tenham sido observadas, os animais mostraram-se extremamente susceptíveis ao vírus e alcançando sobrevivências tão baixas quanto 22,8% (**VitC**). Enquanto com outros vírus, têm sido relatadas mortalidades de 100% dentro de 14 dias pós-infecção (WSSV; WANG *et al.*, 1997) neste trabalho com o IMNV as mortalidades mais elevadas somente foram detectadas 27 dias pós-inoculação.

Coincidentemente, a queda na sobrevivência foi observada de forma simultânea para todos os tratamentos, inclusive os não desafiados com IMNV (*i.e.*, **Ref** e **Neg**). Isto sugere que algum fator não contabilizado (*e.g.*, manuseio dos animais durante as biometrias) durante o estudo tenha contribuído para a queda na sobrevivência dos animais de forma brusca. O manuseio de camarões pode induzi-los ao estresse e diminuir suas taxas de sobrevivência. Em tanques expostos, sem cobertura, Mercler *et al.* (2005) induziram o *L. vannamei* ao estresse através de um manuseio voluntário realizado diariamente ao longo de quatro semanas. Os autores observaram alterações metabólicas e uma queda na sobrevivência dos animais submetidos ao estresse, apesar de não terem encontrado diferenças estatísticas nos parâmetros imunológicos avaliados.

Andrade *et al.* (2007) trabalhando com juvenis SPF de *L. vannamei* (Livres de Enfermidades Específicas, em inglês, *Specific Pathogen Free*) realizou injeção dos indivíduos no terceiro segmento abdominal com uma solução diluída do IMNV ( $1,0 \times 10^4$  cópias de IMNV/ $\mu\text{l}$  RNA). Segundo os autores, em grupos de camarões infectados, as primeiras mortalidades tiveram início oito dias pós-inoculação do vírus, enquanto a queda mais substancial na taxa de sobrevivência ocorreu após 40 dias.

As diferenças na virulência do IMNV do presente estudo e no trabalho desenvolvido por Andrade *et al.* (2007) pode ser atribuída à carga viral utilizada nos desafios, à procedência do inoculo, ao método de infecção, ao estágio de desenvolvimento dos camarões no momento da infecção ou mesmo na susceptibilidade dos indivíduos utilizados (WANG *et al.*, 1999). Enquanto os camarões no estudo de Andrade *et al.* (2007) foram infectados com 1,0 g de peso corporal, no presente estudo a infecção teve início com indivíduos entre 4,93 g e 6,92 g de peso corporal. O desafio tardio dos animais com o IMNV foi necessário para permitir uma ação dos componentes testados na ração.

No presente estudo, apesar dos camarões no tratamento **Neg** não terem sido intencionalmente infectados, os animais apresentaram-se positivos para IMNV segundo análise de PCR. A transmissão acidental do IMNV para os camarões no tratamento **Neg** deve ter ocorrido de forma horizontal (*e.g.*, apetrechos, água de cultivo) devido à proximidade física dos tanques com os tratamentos desafiados com o IMNV.

No presente estudo, apesar da mortalidade de camarões ter ocorrido ao longo de todo estudo, ficou claro uma maior ação do vírus em indivíduos com pesos corporais mais elevados. Esta observação corrobora com o que é relatado nas fazendas de cultivo de camarão na Região Nordeste do Brasil. Observa-se que apesar do IMNV afetar todos os estágios de desenvolvimento do *L. vannamei*, as taxas de mortalidade da espécie cultivada em viveiros tornam-se mais elevadas em estágios mais avançados de crescimento, particularmente a partir de camarões entre 6 g e 8 g de peso corporal (NUNES *et al.*, 2004).

Nunes *et al.* (2004) relataram que as mortalidades ocasionadas pelo IMNV são caracterizadas por três fases distintas. A primeira fase caracteriza-se pelo reduzido índice de mortalidade de camarões que apresentam sintomatologia leve em baixa porcentagem da população cultivada (< de 10%). Na fase subsequente, denominada de aguda, ¼ ou mais da população cultivada exibe sinais clínicos evidentes do IMNV, com nível de severidade variando de moderado a grave, resultando em elevada taxa de mortalidade. Esta fase é mais comum em indivíduos com peso a partir de 6 a 7 g, prolongando-se até sub-adultos de 9 a 10 g. Este estágio geralmente progride para uma forma crônica marcada pela baixa, mas persistente mortalidade dos indivíduos infectados. Observam-se sintomas da enfermidade em um baixo percentual da população (< 5%), sendo estes provavelmente os indivíduos que sobreviveram à fase aguda.

O ciclo lunar exibiu uma correlação significativa, porém baixa, com a mortalidade dos camarões ao longo do presente estudo. Nas fazendas de cultivo da Região Nordeste, os dias que antecedem a lua cheia e a lua nova são considerados possíveis gatilhos para a deflagração do IMNV (NUNES *et al.*, 2004). Isto aparentemente deve-se as alterações nos padrões de locomoção dos camarões nos viveiros, possivelmente favorecendo ao estresse, muda e a redução no apetite alimentar.

### 5.3 Crescimento dos Camarões

Os camarões cresceram num ritmo contínuo ao longo do estudo, tendo alcançado um crescimento semanal compatível com outros trabalhos desenvolvidos em condições controladas semelhantes (NUNES *et al.*, 2006). O efeito do tipo da ração sobre o crescimento dos animais não ficou tão evidente, devido à queda populacional observada durante o cultivo nos diferentes tratamentos.

O crescimento do *L. vannamei* foi diretamente influenciado pela sobrevivência dos animais. Camarões com menor peso corporal na despesca, abaixo de 10 g, foram encontrados nos tratamentos **Neg** e **Ref** que exibiram uma maior sobrevivência final de 57,9% e 69,5%, respectivamente. Por outro lado, nos tratamentos **Pos**, **VitC** e **VitCBetG**, que onde houve uma sobrevivência final entre 22,8% e 31,2%, os camarões atingiram pesos corporais mais elevados, acima de 10 g. A relação inversa entre densidade de estocagem de camarões e crescimento é amplamente conhecida (SANDIFER *et al.*, 1988; RAY & CHIEN, 1992). Li *et al.* (2006) trabalhando com juvenis do *Fenneropenaeus chinensis* com  $1,77 \pm 0,3$  g sob 50, 200 e 600 camarões/m<sup>3</sup>, relatou que o crescimento e os fatores de imunidade não-específicos da espécie foram afetados negativamente por densidades de estocagem mais elevadas.

No presente estudo, não houve uma diferença estatística significativa na sobrevivência final entre os tratamentos **Neg** e **BetG** (57,9% e 48,1%, respectivamente). Contudo, os animais do tratamento **BetG** alcançaram um peso corporal ( $9,07 \pm 1,48$  g) estatisticamente inferior comparado ao tratamento **Neg** ( $9,88 \pm 1,85$  g). Nesta condição era de se esperar um maior peso final dos animais alimentados com **BetG** comparado com o **Neg** devido à menor população estocada. Contudo, dado ao fato dos camarões no tratamento **BetG** terem sido intencionalmente infectados com IMNV, este fator pode ter interferido negativamente no crescimento dos animais. Camarões enfermos apresentam uma maior demanda nutricional devido a uma maior necessidade de respostas imunológicas, deprimindo o crescimento.

Os resultados relativos ao efeito de betaglucanos sobre o crescimento de camarões são contraditórios. Enquanto alguns estudos indicam não terem encontrado nenhum efeito adverso sobre o crescimento de camarões (*P. monodon*, SONG *et al.*, 1997), outros indicam um efeito promotor (*L. vannamei*; LÓPEZ *et al.*, 2003; *Marsupenaeus japonicus*,

ITAMI *et al.*, 1998). López *et al.* (2003) sugerem que o modo de ação dos betaglucanos no crescimento dos camarões é através de um maior aporte energético. De fato, no presente trabalho, observou-se que a ração **BetG** apresentou o teor mais elevado de energia bruta comparada as demais, apesar do tratamento **VitCBetG**, com a mesma inclusão de  $\beta$ -1,3/1,6-glucano, ter exibido o nível energético mais baixo entre todas as rações avaliadas.

Contudo, no presente estudo, observou-se que o perfil nutricional das rações teve pouca influência sobre ganho de peso dos camarões cultivados. No tratamento **Ref**, apesar dos animais terem sido alimentados com uma ração contendo um teor protéico 16,7% mais elevado comparado às demais, não houve uma influência positiva sobre o crescimento. Igualmente, as rações contendo doses elevadas de ácido L-ascórbico (*i.e.*, **VitC** e **VitCBetG**) não promoveram um maior crescimento nos camarões. Isto contraria o observado por outros estudos que relatam um benefício em dosagens elevadas de vitamina C sobre o crescimento de camarões peneídeos quando submetidos a uma condição adversa de cultivo (SHIAU & HSU, 1994; LAVENS *et al.*, 1999; MERCHIE *et al.*, 1998; LÓPEZ *et al.*, 2003). Contudo, em nenhum destes trabalhos, os animais foram submetidos a um desafio viral, e, portanto comparações diretas com o presente estudo não podem ser realizadas.

De forma geral, não ficou evidenciado no presente estudo, que o uso contínuo de  $\beta$ -1,3/1,6-glucano na alimentação do *L. vannamei* tenha causado um detrimento no crescimento desta espécie quando desafiado com IMNV. Da mesma forma, animais infectados intencionalmente com IMNV e alimentados de forma contínua com doses elevadas de ácido L-ascórbico, individualmente ou em combinação com  $\beta$ -1,3/1,6-glucano, não apresentaram um crescimento mais elevado compatível com as sobrevivências alcançadas.

## 5.4 Efeito do Ácido L-Ascórbico e do $\beta$ -1,3/1,6-Glucano

### 5.4.1 Sobre a Sobrevivência dos Camarões

A alimentação continuada do *L. vannamei*, desafiado com IMNV, com uma ração contendo 1.000 mg/kg de  $\beta$ -1,3/1,6-glucano (**BetG**) resultou em uma sobrevivência duas vezes mais elevada comparativamente ao grupo controle positivo (**BetG**; 48,1% *versus* **POS**; 23,2%, respectivamente). Quando comparado com o grupo controle negativo (**Neg**) a

sobrevivência do tratamento **BetG** foi inferior, embora não tenha exibido uma diferença estatisticamente significativa ( $P > 0,05$ ; 57,9% versus 48,1%, respectivamente).

Vários estudos relatam um efeito positivo da inclusão de betaglucanos sobre a sobrevivência de camarões. Chang *et al.* (2000) reportaram que reprodutores do *Penaeus monodon* alimentados com dietas contendo betaglucanos alcançaram uma maior sobrevivência quando comparados ao grupo controle. Comparativamente, a sobrevivência dos camarões do grupo controle alcançou 35,0% e 25,0% para tanques internos e externos, respectivamente. Por outro lado, nos grupos de animais alimentados com a dieta contendo betaglucano a sobrevivência elevou-se para 71,7% e 70,0%, para os respectivos sistemas de cultivo. Em *P. monodon* desafiado através de injeção subcutânea com inoculo do vírus da Mancha Branca e alimentado com ração contendo 1% de  $\beta$ -1,3-glucano, a sobrevivência aumentou em 42%.

Os requerimentos mínimos de **VitC** para uma sobrevivência normal do *L. vannamei* é de 41 mg/kg a 120 mg/kg de dieta para camarões com peso corporal entre 0,1 e 0,5 g, respectivamente (HE & LAWRENCE, 1993). No presente estudo a inclusão de doses elevadas de vitamina C não promoveu um aumento na sobrevivência do *L. vannamei* após exposição ao IMNV. A sobrevivência alcançada com os camarões alimentados com a ração contendo 1.000 mg/kg de ácido L-ascórbico (**VitC**, 22,8%) foi estatisticamente semelhante ao grupo controle positivo (**Pos**, 23,2%).

Poucos estudos relatam um aumento da sobrevivência de camarões peneídeos quando expostos a super dosagens de ácido ascórbico. López *et al.* (2003) trabalharam com dietas contendo 2.000 mg/kg de  $\beta$ -1,3-glucano e 5.000 mg/kg de vitamina C na alimentação de juvenis do *L. vannamei* durante 40 dias, sob diferentes regimes de alimentação. Os animais expostos a estas dietas de forma contínua ou pulsada não exibiram um aumento na sobrevivência ao término do cultivo. Nos grupos de camarões alimentados com dietas contendo doses elevadas de vitamina C, houve uma diminuição do número de hemócitos, 48 h após um choque osmótico (de 35‰ para 0‰). Os autores concluíram, no entanto, que a vitamina C teve um papel positivo no metabolismo do animal, pois detectaram uma rápida recuperação dos componentes do sistema imunológico da espécie após o advento de estresse.

No presente estudo, a combinação de doses elevadas de ácido ascórbico com  $\beta$ -1,3/1,6-glucano (**VitCBetG**) levou a um aumento significativo da sobrevivência dos camarões após o desafio *per os* com o IMNV. Comparado ao controle positivo (**Pos**), o tratamento **VitCBetG** resultou em um aumento de 34% na sobrevivência final dos animais. Contudo, a sobrevivência alcançada no **VitCBetG** (31,2%) não foi superior ao do tratamento **BetG** (48,1%). Isto evidencia que numa situação de exposição viral, é preferível o uso individual de betaglucanos ao invés de uma combinação com dosagens elevadas de vitamina C. Aparentemente ocorreu um antagonismo entre os dois componentes.

#### 5.4.2 Sobre os Parâmetros Imunológicos

Os parâmetros imunológicos avaliados no presente estudo não apresentaram variações tão significativas quanto àquelas observadas nas sobrevivências alcançadas. Apesar dos animais terem claramente respondido de forma diferenciada em termos de sobrevivência final as dietas ofertadas, do ponto de vista imunológico, pouca alteração estatística foi encontrada entre dietas.

Entre dietas ofertadas, a concentração de proteínas no soro do *L. vannamei* não sofreu alterações estatisticamente significativas ( $P > 0,05$ ) antes do desafio viral. Nesta fase do cultivo, somente a atividade da PO foi mais elevada para o tratamento **VitC** comparado ao **Ref**. Isto indica que o sistema profenoloxidase (proPO) foi efetivamente estimulado nos animais alimentados com a ração contendo dosagens elevadas de ácido L-ascórbico (**VitC**). Estudos realizados sobre a ação de dosagens elevadas de ácido ascórbico sobre o sistema imunológico dos camarões são contraditórios. Kontara *et al.* (1997) demonstraram que pós-larvas do *L. vannamei* quando alimentadas com uma ração contendo 2.000 mg/kg de **VitC** aumentaram sua resistência a uma infecção e a um choque osmótico. Por outro lado, Maggioni *et al.* (2004) trabalhando com reprodutores do *L. vannamei* abladados submetidos a uma dieta suplementada com 2.000 mg/kg de ácido ascórbico concluíram que não houve um aumento significativo de respostas imunológicas da espécie. Lavens *et al.* (1999) trabalhando com dosagens de ácido ascórbico 2-monofosfato de 0, 10, 100, 1.000 e 2.000 mg/kg em dietas para larvas do *L. vannamei*

também não conseguiram demonstrar um aumento na resistência da espécie quando submetida a um choque osmótico.

No presente estudo, nas avaliações posteriores, não houve diferença estatística ( $P > 0,05$ ) nos parâmetros imunológicos dos camarões alimentados com as diferentes dietas. Contudo, em termos relativos notou-se um aumento substancial na atividade de PO, 21 dias pós-inoculação viral, nos animais alimentados com **VitC**, **VitCBetG** e **BetG** (47,3%, 59,6% e 34,2% em relação à **Ref**, respectivamente). Surpreendentemente, a ação imunológica do tratamento **BetG** somente pôde ser notada após o desafio viral. Neste mesmo período, a concentração de proteínas totais no soro dos camarões alimentados com **BetG** apresentou-se 10,3% mais elevado comparado a **Ref**. Estas observações sugerem que houveram respostas imunológicas dos animais alimentados tanto com ácido L-ascórbico como com  $\beta$ -1,3/1,6-glucano e corroboram com outros estudos.

De um modo geral, a concentração protéica do soro dos camarões não se alterou ao longo do cultivo. A atividade de PO não variou estatisticamente ( $P > 0,05$ ), mesmo frente ao crescimento progressivo dos animais. Contudo, observou-se que 21 dias após o desafio viral, ocorreu uma queda na atividade de PO nos tratamentos **Neg**, **Pos** e **VitC**, alcançando uma média de 56% (47,8%, 79,7% e 40,5%, respectivamente). Somente o tratamento **Ref**, **VitCBetG** e **BetG** apresentaram valores estáveis não diminuindo pós-infecção. Novamente isto sugere fortemente uma ação do  $\beta$ -1,3/1,6-glucano sobre as respostas imunológicas do *L. vannamei* a qual continuou até o término do cultivo (dia 70).

Apesar dos animais do controle **Neg** terem sido acidentalmente infectados, a atividade de PO nestes animais variou estatisticamente ( $P < 0,05$ ) durante o cultivo. Houve uma queda na atividade de PO 21 dias pós-inoculação (dia 48), seguido de uma recuperação significativa na despesca (dia 70). Comparando estas variações com o controle positivo (**Pos**), nota-se uma maior atividade de PO nos dias 48 e 70 para o controle negativo (**Neg**), da ordem de 25,8% e 55,2%, respectivamente. Isto sugere que apesar de estar infectado, a virulência do IMNV foi mais baixa no tratamento **Neg** e, portanto os camarões puderam melhor responder imunologicamente ao desafio viral.

Apesar de alguns autores (CHANG *et al.*, 2000; LÓPEZ *et al.*, 2003) sugerirem que a exposição contínua a betaglucanos pode resultar em uma fadiga imunológica, os resultados coletados no presente trabalho não indicam que isto tenha ocorrido. Mesmo na

despesca, os camarões do tratamento **BetG** apresentaram uma atividade de PO 38,5% superior ao tratamento **Ref**, indicando que as respostas imunológicas persistiram, mesmo após um longo período de exposição ao betaglucano. Uma tendência semelhante, mas em menor grau, foi observada para os tratamentos **VitC** e **VitCBetG** (26,3% e 25,7%, respectivamente). López *et al.* (2003) relataram que mesmo após 40 dias de exposição a uma dieta contendo 2.000 mg/kg de  $\beta$ -1,3-glucano, juvenis de *L. vannamei* responderam positivamente a um choque de salinidade.

Segundo Chang *et al.* (2000) o uso continuado de betaglukanos é desnecessário, pois pode resultar em uma fadiga imunoestimulatória. Em reprodutores *Penaeus monodon* (135  $\pm$  25g), após 24 dias de alimentação com uma ração contendo 2.000 mg/kg de  $\beta$ -1,3-glucano derivado da *Schizophyllum commune*, os autores observaram uma redução na atividade fagocítica e na produção de O<sub>2</sub> na hemolinfa dos camarões. Ainda segundo os autores, a fim de otimizar a imunoestimulação, a exposição à betaglukanos deve ser restrita a um período de três semanas, ou empregando-se um esquema alimentar intermitente, com 20 dias de exposição seguido de 10 dias sem exposição.

No presente estudo a contagem do número total de hemócitos (CTH) apresentou um aumento em todos os tratamentos após o desafio *per os* com IMNV (*i.e.*, 48º dia de cultivo), não sendo significativo para os tratamentos **Ref**, **VitC** e **BetG**. Neste dia de amostragem, um maior número de células/mm<sup>3</sup> foi observado nos tratamentos voluntariamente infectados, os quais alcançaram uma menor sobrevivência final de camarões (**Pos** e **VitC**). Igualmente, o tratamento não infectado, **Ref**, também apresentou um aumento, porém não significativo na CTH no período de pós-infecção viral.

Ao contrário, nos tratamentos infectados com IMNV, **VitCBetG** e **BetG**, exibiram comparativamente uma menor CTH. No período pós-infecção, houve uma maior mobilização de hemócitos pelo *Litopenaeus vannamei* nos tratamentos contendo  $\beta$ -1,3/1,6-glucano. Isto pode ser resultado das contínuas respostas imunológicas exigidas pelo animal quando estimuladas pelo  $\beta$ -1,3/1,6-glucano. No final do estudo, esta mesma tendência não foi observada, provavelmente pelo fato do pico da ação viral já ter ocorrido, demandando uma menor resposta imunológica pelos animais estocados.

O aumento na contagem do número total de hemócitos (CTH), observado no presente estudo, pode também estar relacionado ao período de amostragem. Pelo fato da coleta de

hemolinfa ter sido realizada somente 17 dias após o término do desafio com IMNV, é possível que tenha havido tempo suficiente para permitir a recuperação do status imunológico dos animais. O mesmo padrão de comportamento no aumento no CTH foi observado em camarões da espécie *L. vannamei* 14 dias após a ablação, porém esse aumento não foi significativo (MAGGIONI *et al.*, 2004). Song *et al* (2003), relataram que em *L. vannamei* infectado com o vírus Taura, a CTH foi 79% menor em relação a camarões não infectados e apenas os camarões poucos infectados apresentaram um aumento de 35% na contagem total de hemócitos e que mesmo assim, esse incremento não foi significativo. De um modo geral, a literatura indica (HENNIG *et al*, 1998; LORENZO *et al* 1999; CHENG & CHEN, 2001) que a contagem total de hemócitos apresenta um decréscimo e raramente aumenta, quando os crustáceos passam por situações de estresses, como por exemplo, quadros de infecção.

López *et al* (2003), relataram que a contagem do número de hemócitos em *L. vannamei* foi afetada por tipos de dietas e após choques de salinidade. Segundo estes autores, antes do choque de salinidade a concentração de hemócitos foi significativamente maior nos camarões alimentados com dietas contendo doses elevadas de ácido ascórbico (1.500 mg/kg de dieta) comparativamente a camarões alimentados com uma dieta contendo  $\beta$ -1,3-glucano e uma dieta controle (*i.e.*, sem  $\beta$ -1,3-glucano e com 286 mg/kg de ácido ascórbico). Nos camarões alimentados com doses elevadas de vitamina C foi verificada uma redução no número total de hemócitos no período de 4 a 24 h após a mudança de salinidade. Ao contrário, Maggioni *et al* (2004), não encontraram diferenças significativas na contagem total de hemócitos do *L. vannamei* alimentado com ração e alimento fresco contendo super-dosagens de vitamina C. Chang *et al.* (2003) trabalhando com *Penaeus monodon* infectado com WSSV e alimentado com  $\beta$ -1,3-glucano, também não encontraram aumento significativo na contagem total de hemócitos.

Os resultados imunológicos alcançados no presente estudo confirmam que a ação positiva do  $\beta$ -1,3/1,6-glucano sobre a sobrevivência do *L. vannamei* após o desafio com IMNV foi resultado de uma maior resposta imunológica. O ácido L-ascórbico também proporcionou uma ação imunológica, contudo em menor grau comparado com o  $\beta$ -1,3/1,6-glucano.

## 6.0 CONCLUSÃO

Através do presente estudo pode-se concluir que:

1. A inclusão de 600 mg/kg de  $\beta$ -1,3/1,6-glucano em uma dieta para o camarão *Litopenaeus vannamei* proporcionou um aumento significativo na sobrevivência e nas respostas imunológicas da espécie quando exposto ao IMNV.
2. Não houve fadiga imunológica ou detrimento no crescimento da espécie quando exposta de forma contínua a uma dieta contendo 600 mg/kg de  $\beta$ -1,3/1,6-glucano.
3. A inclusão de 1.160 mg/kg de ácido L-ascórbico-2-monofosfato em dietas para o camarão *L. vannamei* infectado com IMNV não resultou em um maior crescimento ou sobrevivência da espécie.
4. Não houve benefícios no crescimento e na sobrevivência do *L. vannamei* infectado com IMNV quando da adição em uma dieta de 600 mg/kg de  $\beta$ -1,3/1,6-glucano em combinação com 1.000 mg/kg de ácido L-ascórbico-2-monofosfato.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, T. P. D.; SRISUVAN, T.; TANG, K. F. J.; LIGHTNER, D. V. 2007. Real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay using TaqMan probe for detection and quantification of *Infectious myonecrosis virus* (IMNV). **Aquaculture**. v. 264, p. 9–15.
- AOAC, 1984. Williams, S. *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*, 14<sup>a</sup> Edição. Arlington, VA, EUA, 114 p.
- BARRACO, M. A. 2004. Mecanismo de resistência a doenças em crustáceos. In: Ranzani-Paiva, M. J., Takemoto, R. M., Lizama, M. de los A. P. Sanidade de Organismos Aquáticos. Editora Varela, 2004. Cap. 2, p. 51-74.
- BRADFORD, M. M. 1976. A refined and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. v. 72, p. 248.
- CAMPOS, A. A.; MONTEIRO, A. Q.; NETO, C. M.; POLETTE, M. 2003. A Zona Costeira do Ceará: Diagnóstico para a Gestão Integrada. **Aquasis**. 293 p.
- CEDEÑO, R., MOLINA, C., OTERO, V., VALENZUELA, E., SOTOMAYOR, M. A., RODRÍGUEZ J. Inmunomodulación: aspectos nutricionales e inmunoestimulación. **V congreso equatoriano de aqüicultura**, 28-30 a outubro de 1999, Guayaquil-Ecuador.
- CHANG, C. F.; CHEN, H. Y.; SU, M. S.; LIAO, I. -C. 2000. Immunomodulation by dietary  $\beta$ -1-3 glucan in the brooders of the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. **Fish Shellfish Immunology**. v. 10: 505-514.
- CHANG, C. -F; SU, M.-S.; CHEN, H.-Y.; LIAO, I.-C. 2003. Dietary  $\beta$ -1,3-glucan effectively improves immunity and survival of *Penaeus monodon* challenged with spot syndrome virus. **Fish & Shellfish Immunology**. v. 15, p. 297-310.
- CHEN, H. Y. & CHANG, C. F. 1994. Quantification of vitamin C requirements for juvenile shrimp (*Penaeus monodon*) using polyphosphorylated L-ascorbic acid. **The Journal of Nutrition**. v. 124, p. 2033-2038.

- CHENG, W. & CHEN, J.C. 2001. Effects of intrinsic and extrinsic factors on the haemocyte profile of the prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. **Fish & Shellfish Immunology**. v. 11, p. 53-63.
- CLIFFORD, H. C. 1992. Marine shrimp pond management: a review, p. 110-137, in Chamberlain, G. W.; Villalón, J.; Wyban, J. (eds.), *Proceedings of the special session on shrimp farming*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, EUA, 301 p.
- COUCH, J. A. 1974a. An ezootic nuclear polyhedrosis virus of pink shrimp: ultrastructure, prevalence, and enhancement. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 24, p. 311-331.
- COUCH, J. A. 1974b. Free and occluded virus similar to *Baculovirus* in hepatopancreas of pink shrimp. **Nature**. v. 247, p. 229-331.
- CUZON, G.; LAWRENCE, A.; GAXIOLA, G.; ROSAS, C.; GUILLAUME, J. 2004. Nutrition of *Litopenaeus vannamei* reared in tanks or in ponds. **Aquaculture**. v. 235, p. 513-551.
- ENGSTAD, R., RODRIGUEZ, J., ECHEVERRIA, F. Evaluación de productos com Beta-glucano a través de um Estúdio in vitro y prueba de Desafioncon WSSV. Biotec Phamacon ASA, Noruega, CENAIM, Equador. 2004.
- FAO, 2007. *The state of the world fisheries and aquaculture 2006*. FAO Fisheries and Aquaculture Department, Roma, Itália, 162 p.
- FONSECA, R. S. 2006. **Dinâmica da comunidade fitoplanctônica em um viveiro de engorda de camarão marinho (*Litopenaeus vannamei*) no Estado do Ceará**. 90 p. Dissertação de Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais. Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará.
- GUARY, M.; KANAZAWA, A.; TANAKA, N.; CECCALDI, H.J. 1976. Nutritional requirements of prawn: VI. Requirement for ascorbic acid. **Memouirs of the Faculty of Fisheries from the Kagoshima University**. v. 25, p. 53-57.
- HASSON, K. W.; LIGHTNER, D. V.; POULOS, B. T.; REDMAN, R. M.; WHITE, B. L.; BROCK, J. A.; BONAMI, J. R. 1995. Taura Syndrome in *Penaeus vannamei*: demonstration of a viral etiology. **Diseases of Aquatic Organisms**. v. 23, p. 115-126.
- HE, H. & LAWRENCE, A. L. 1993. Vitamin C requirements of the shrimp *Penaeus vannamei*. **Aquaculture**. v. 114, p. 305-316.

- HENNIG, O.; ITAMI, T.; MAEDA, M.; KONDO, M.; NATUSKARI, Y.; TAKAHASHI, Y. 1998. Analyses of hemolymph immunoparameters in Kuruma shrimp infected with penaeid rod-shaped DNA vírus. **Fish Pathology**. v. 33, p. 389-393.
- ITAMI, T.; ASANO, M.; TOKUSHIGE, K.; JUBONO, K.; NAKAGAWA, A.; TAKENO, N.; NISHIMURA, H.; MAEDA, M.; KONDO, M.; TAKAHASHI, Y. 1998. Enhancement of disease resistance of Kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, after oral administration of peptidoglycan derived from *Bifidobacterium thermophilum*. **Aquaculture**. v. 164, p. 277-288.
- KONTARA, E .K.; MERCHIE, G.; LAVENS, P.; NELIS, H.; DE LEENHEER, A.; SORGELOOS, P. 1997. Improved larviculture outputs of postlarval shrimp *Penaeus vannamei* through supplementation of L-ascorbyl-2-polyphosphate in their diet. **Aquaculture International**. v. 5, p. 127-136.
- LAVENS, P.; MERCHIE, G. ; RAMOS, R. ; KUJAN, A. L.-H. ; HAUWAERT, V. A. ; PEDRAZZOLI, A. ; NELIS, H. ; LEENHEER, A. D. 1999. Suplemmentation of ascorbic acid 2-monophosphate during the early postlarval stages of the shrimp *Penaeus vannamei*. **Aquaculture Nutrition**. v. 5, p. 205-209.
- LE MOUULLAC, G. & HAFFNER, P. 2000. Environmental factors affecting immune responses in Crustacea. **Aquaculture**. v. 191, p. 121-131.
- LIGHTNER, D. V. 1996. *A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, EUA, 304 p.
- LIGHTNER, D. V. 2003. Exclusion of specific pathogens for shrimp disease prevention, p. 81-116, in LEE, C. -H. & O'BRYEN, P. J. (eds.). *Biosecurity in aquaculture production systems: exclusion of pahtogens and other undesirables*. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Lousiana, EUA, 293 p.
- LIGHTNER, D. V.; COLVIN, L. B.; BRAND, C.; DANALD, D. A. 1977. Black death, a disease syndrome of Penaeid shrimp related to a dietary deficiency of ascorbic acid. **Proceedings of the World Mariculture Society**. v. 8, p. 611-623.
- LIGHTNER, D. V.; HEDRICK, R. P.; FRYER, J. L.; CHEN, S. N.; LIAO, I. C.; KOU, G. H. 1987. A survey of cultured penaeid shrimp in Taiwan for viral and other important diseases. **Fish Pathology**. v. 22, p. 127-140.

- LIGHTNER, D. V.; HUNTER, B.; MARGARELLI, P. C. JR.; COLVIN, L. B. 1979. Ascorbic acid: nutritional requirement and role in wound repair in penaeid shrimp. **Proceedings of the World Mariculture Society**. v. 10, p. 513-528.
- LIGHTNER, D. V.; PANTOJA, C. R.; POULOS, B. T.; TANG, K. F. J.; REDMAN, R. M.; ANDREAS, T.; BONAMI, J. R. 2004. Infectious Myonecrosis (IMN): a new virus disease of *Litopenaeus vannamei*. in Book of Abstracts of Aquaculture 2004. The World Aquaculture Society, Honolulu, Hawaii, EUA.
- LIN, C.K. 1989. What went wrong? **World Aquaculture**. v. 20, p. 19-20.
- LO, C. F.; LEU, J. H.; HO, C. H.; CHEN, C. H.; PENG, S. E.; CHEN, Y. T.; CHOU, C. M.; YEH, P. Y.; HUANG, C. J.; CHOU, H. Y.; WANG, C. H. & KOU, G. H. 1996. Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSSV) in penaeid shrimps using polymerase chain reaction. **Diseases of Aquatic Organisms**. v. 25, p. 133-141.
- LÓPEZ, N.; CUZON, G.; GAXIOLA, G.; TABOADA, G.; VALENZUELA, M.; PASCUAL, C.; SÁNCHEZ, A.; ROSAS, C. 2003. Physiological, nutritional, and immunological role of dietary  $\beta$ -1,3-glucan and ascorbic acid 2-monophosphate in *Litopenaeus vannamei* juveniles. **Aquaculture**. v. 224, p. 223-243.
- LORENZON, S.; GUARRINI, S.; SMITH, V. J.; FERRERO, E. A. 1999. Effects of LPS injection on circulating hemocytes in crustaceans in vivo. **Fish & Shellfish Immunology**. v. 9, p. 31-50.
- MARGARELLI, P. C. JR.; HUNTER, B.; LIGHTNER, D. V.; COLVIN, L. B. 1979. Black death: an ascorbic acid deficiency disease in penaeid shrimp. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 63A, p. 103-108.
- MAGGIONI, E. S.; ANDREATTA, E. R.; HERMES, E. M.; BARRACCO, M. A. 2004. Evaluation of some hemato-immunological parameters in female shrimp *Litopenaeus vannamei* submitted to unilateral eyestalk ablation in association with a diet supplemented with superdoses of ascorbic acid as a form of immunostimulation. **Aquaculture**. v. 241, p. 501-515.
- MARTÍNEZ-CORDOVA, L. R.; VILLAREAL, H.; PORCHAS-CORNEJO, M.; NARANJO-PARAMO, J.; ARAGON-NORIEGA, A. 1997. Effect of aeration on

- growth, survival and yield of white shrimp *Penaeus vannamei* in low water exchange ponds. **Aquacultural Engineering**. v. 16, p. 85–90.
- MERCIER, G.; KONTARA, E. K. M.; LAVENS, P.; ROBLES, R.; KURMALY, K.; SOGeloos, P. 1998. Effect of vitamin C and astaxanthin on stress and disease resistance of postlarval tiger shrimp *Penaeus monodon* (Fabricius). **Aquaculture**. v. 29, p. 579-585.
- MERCIER, L.; PALACIOS, E.; CAMPA-CÓRDOVA, Á. I.; TOVAR-RAMÍREZ, D.; HERNÁNDEZ-HERRERA, R.; RACOTTA, I. S. 2006. Metabolic and immune responses in Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to a repeated handling stress. **Aquaculture**. v. 258, p. 633-640.
- MIN-HSIEN, L. & SHI-YEN, S. 2002. Dietary vitamin C and its derivatives affect immune responses in grass shrimp, *Penaeus monodon*. **Fish & Shellfish Immunology**. v. 12, p. 119-129.
- MOURA, R. A.; PURCHIO, A.; ALMEIDA, T. V. 2002. *Técnicas de laboratório*. 3ª Edição. Rio de Janeiro. Atheneu, 511 p.
- NEWMAN, S. 2000. Prevención de enfermedades del camarón de cultivo. **Panorama da Aqüicultura**. V.5, p.22-23.
- NUNAN, L. M.; POULOS B. T.; LIGHTNER, D. V. 1998. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) used for the detection of Taura Syndrome Virus (TSV) in experimentally infected shrimp. **Diseases of Aquatic Organisms**. v. 34, p. 87-91.
- NUNES, A. J. P. & PARSONS, G. J. 2000. Size-related feeding and gastric evacuation measurements for the Southern brown shrimp *Penaeus subtilis*. **Aquaculture**. 187: 133-151.
- NUNES, A. J. P.; MARTINS, P. C. C.; GESTERIA, T. C. V. 2004. Carcinicultura ameaçada: produtores sofrem com as mortalidades decorrentes do vírus da Mionecrose Infecciosa (IMNV). **Panorama da Aqüicultura**. v. 14, p. 37-51.
- NUNES, A. J. P.; SÁ, M. V. C.; CARVALHO, E. A.; SABRY-NETO, H. 2006. Growth performance of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* reared under time- and rate-restriction feeding regimes in a controlled culture system. **Aquaculture**. v. 253, p. 646-652.

- PONCE-PALAFIX, 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**. v. 157, p. 107-115.
- POULOS, B. T. & LIGHTNER, D. V. 2006. Detection of infectious myonecrosis virus (IMNV) of penaeid shrimp by reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). **Diseases of Aquatic Organisms**. v. 73, p. 69-72.
- POULOS, B. T., TANG, K. F. J., PANTOJA, C. R., BONAMI, J. R.; LIGHTNER, D. V. 2006. Purification and characterization of infectious myonecrosis virus of penaeid shrimp. **Journal of General Virology**. v. 87, p. 987-996.
- RAA, J. 2000. The use of immune-stimulants in fish and shellfish feeds, p. 47-56, in CRUZ -SUÁREZ, L. E.; RICQUE-MARIE, D.; TAPIA-SALAZAR, M.; OLVERA-NOVOA, M. A.; CIVERA-CERECEDO, R. (eds.). *Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. Mérida, Yucatán, México.
- RAA, J. 2003. Beta-1,3/1,6-glucanos: la ciencia moderna y la sabiduría antigua se combinan en beneficio de la acuicultura. **Panorama Acuícola**. v. 8, p. 28-29.
- RAY, W. M. & CHIEN, Y. H. 1992. Effects of stocking density and aged sediment on tiger prawn, *Penaeus monodon*, nursery systems. **Aquaculture**. v. 104, p. 231-248.
- ROSENBERRY, B. 2001. *World Shrimp Farming 2000*. Shrimp News International, No. 13. Shrimp News International, San Diego, California, EUA.
- SANDIFER, P. A.; HOPKINS, J. S.; STOKES, A. D. 1988. Intensification of shrimp culture in earthen ponds in South Carolina: progress and prospects. **Journal of the World Aquaculture Society**. v. 19, p. 218-226.
- SCHOLZ, U., GARCÍA DÍAZ, G., RICQUE, D., CRUZ SUAREZ, L.E., VARGAS ALBORES, F., LATCHFORD J. 1998. Enhancement of Vibriosis resistance in juvenile *Penaeus vannamei* by supplementation of diets with different yeast products. **Aquaculture**. v. 76, p. 271-283.
- SENA PIN, S.; PHEWSAIYA, K.; BRIGGS, M.; FLEGEL, T. W. 2007. Outbreaks of infectious myonecrosis virus (IMNV) in Indonesia confirmed by genome sequencing and use of an alternative RT-PCR detection method. **Aquaculture**. v. 266, p. 32-38.

- SHIAU, S. Y. & HSU, T. S. 1994. Vitamin C requirement of grass shrimp, *Penaeus monodon*, as determined with L-ascorbyl-2-monophosphate. **Aquaculture**. v. 122, p. 347-357.
- SÖDERHÄLL, K, & HALL, L. 1984. Lipopolysaccharide-induced activation of prophenoloxidase activating system in crayfish haemocyte lysate. **Biochemistry Biophysics Acta**. v. 797, p. 99-104.
- SONG, Y. L.; LIU, J. J.; CHAN, L. C.; SUNG, H. H. 1997. Glucan-induced disease resistance in tiger shrimp (*Penaeus monodon*). **Fish Vaccinology**. v. 90, p. 413-421.
- SONG, Y.-L.; YU, C. -I.; LIEN, T. -W.; HUANG, C. -C.; LIN, M. -N. 2003. Haemolymph parameters of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) infected with Taura syndrome virus. **Fish & Shellfish Immunology**. v. 14, p. 317-331.
- SRITUNYALUCKSANA, K. & SÖDERHÄLL, K. 2000. The proPO and clotting system in crustaceans. **Aquaculture**. v. 191, p. 53-69.
- SUNG, H. H.; KOU, G. H.; SONG, Y. L. 1994. Vibriosis resistance induced by glucan treatment in tiger shrimp (*Penaeus monodon*). **Fish Pathology**. v. 29, p. 11-17.
- VAN WYK, P. & SCARPA, J. 1999. Water quality and management, p. 141-138, in VAN WYK, P. & SCARPA, J. (eds.), *Farming marine shrimp in recirculating freshwater systems*. Florida Department of Agriculture and Consumer Services, Tallahassee, EUA.
- VARGAS-ALBORES, F. & YEPIZ-PLASCENCIA, G. 2000. Beta glucan binding protein and its role in shrimp immune response. **Aquaculture**. v. 191, p. 13-21.
- VARGAS-ALBORES, F.; JIMÉNEZ-VEJA, G.; SÖDERHÄLL, K. 1996. A plasma protein isolated from brown shrimp (*Penaeus carliforniensis*) which enhances the activation of prophenoloxidase system by  $\beta$ -1,3-glucan. **Developmental & Comparative Immunology**. v. 20, p. 299-306.
- WANG, C. S.; TANG, K. F. J.; KOU, G. H.; CHEN, S. N. 1997. Light and electron microscopic evidence of white spot disease in the giant tiger shrimp, *Penaeus monodon* (Fabricius), and the kuruma shrimp, *Penaeus japonicus* (Bate), cultured in Taiwan. **Jornal of Fish Diseases**. v. 20, p. 323-331.

WANG, Q., WHITE, B.L., REDMAN, R.M.; LIGHTNER, D.V. 1999. *Per os* challenge of *Litopenaeus vannamei* postlarvae and *Farfantepenaeus duorarum* juveniles with six geographic isolates of white spot syndrome virus. **Aquaculture**. v. 170, p. 179-194.

**ANEXO I.** Laudo de PCR emitido pelo Laboratório de Patologia em Aquicultura da Universidade do Arizona a cerca da condição patológica dos camarões empregados no estudo (Sample#1) e homogenado utilizado no desafio *per os* (Sample#2).

**AQUACULTURE PATHOLOGY  
OFFICE PHONE 1-520-621-8414  
LAB PHONE 1-520-621-4438  
FAX 1-520-621-4899**

August 25, 2006

Alberto J.P. Nunes  
Instituto de Ciencias do Mar-Labomar/UFC  
Centro de Diagnostico de Enfermidades de Camarao Mamho (CEDECAM)  
Av. da Abolicao  
3207 Meireles  
Fortaleza, Ceara  
60.165-081  
BRASIL

E-mail: [albertojpgn@uol.com.br](mailto:albertojpgn@uol.com.br)

**Case: 06-284**

Dear Dr. Nunes:

The tests you requested for the detection of WSSV, IHNV, IMNV & TSV by PCR have been completed. The 2 vials of *Litopenaeus vannamei* pleopods arrived on August 23<sup>rd</sup>, 2006 in good condition. Representative samples from each of the vials were collected for DNA and RNA extractions. WSSV, TSV and IHNV were Not Detected in any of the samples tested. IMNV was POSITIVE in one of the two samples tested. A summary of the tests and results is provided on the following page.

We hope that this information will be helpful to you. A hard copy of this report will be mailed to you. The fee for these tests is \$180.00 (4 sets of tests @ \$45.00 each). A separate invoice will be sent to you. If there are any questions regarding this case please feel free to contact us.

**UAZ Policy on certification:** This report provides our findings on the samples submitted to our laboratory for examination, health status evaluation, disease diagnosis, or pathogen detection. It is our policy and intent to perform the most appropriate assay(s) for the determination of the health/pathogen status of all specimens submitted to our laboratory. However, this report in no way constitutes a stock or facility "certification" or a "certificate" of health/pathogen status for the sample(s) tested or for the stocks, or facility, from which the sample(s) were derived.

**PCR disclaimer:** This report provides our findings on the samples submitted to our laboratory for pathogen detection. The PCR assay used by this laboratory for the detection of shrimp pathogens is a research tool. The results should be considered as experimental and tentative. Whenever possible, PCR results should be confirmed by alternative assay. This report in no way constitutes a stock or facility "certification" or a "certificate" of health/pathogen status for the sample(s) tested or for the stocks, or facility, from which the sample(s) were derived.

Sincerely yours,

Ms. Solangel Navarro  
Research Specialist

D.V. Lightner Ph.D.  
Professor

**ANEXO I. Cont.****Case: 06-284**

<u>Test(s) Requested:</u>	<u>Sample Type:</u>	<u>Species:</u>
TSV	2 vials of pleopods in 95% ethanol	<i>L. vannamei</i>
WSSV	2 vials of pleopods in 95% ethanol	<i>L. vannamei</i>
IHHNV	2 vials of pleopods in 95% ethanol	<i>L. vannamei</i>
IMNV	2 vials of pleopods in 95% ethanol	<i>L. vannamei</i>

**Protocols:**

TSV: RT-PCR described by Nunan, et al. (DAO, 1998, 34:87-91)

WSSV: Two-step nested PCR modified method from Lo, et al (DAO, 1996, 25:133-141)

IHHNV: PCR described by Nunan, et al. (Marine Biotechnology, 2000, 2: 319-328)

IMNV: PCR protocol developed in this laboratory

**Table:**

<b>UAZ #</b>	<b>Sample Ref</b>	<b>WSSV</b>	<b>IHHNV</b>	<b>TSV</b>	<b>IMNV</b>
06-284/ 1	Sample 1	Not Detected	Not Detected	Not Detected	Not Detected
06-284/ 2	Sample 2	Not Detected	Not Detected	Not Detected	POSITIVE

**Conclusion:** WSSV, TSV and IHHNV were Not Detected in any of the samples tested. IMNV was POSITIVE in one of the two samples tested.

**ANEXO II.** Laudo de histopatologia emitido pelo Centro de Diagnóstico de Enfermidades de Camarão Marinho (CEDECAM) a cerca da condição patológica dos camarões empregados no presente estudo.



**Centro de Diagnóstico de Enfermidades de Camarão Marinho - CEDECAM**

Instituto de Ciências do Mar – LABOMAR  
 Av. Abolição, 3207- Fortaleza, Ceará, 60165-081  
 Tel.: +55 85 3242-6422 - Fax: +55 85 3242-8355  
 e-mail: gecmar@labomar.ufc.br

<b>Número de Registro</b>	<b>Data de Entrada</b>	<b>Data de Liberação</b>
H220606	22/06/06	10/07/06
<b>Teste(s) Requeridos</b>	<b>Tipo de Amostra</b>	<b>Espécie</b>
Investigatório	Camarões vivos	<i>L. vannamei</i>

**Protocolo**

Os camarões chegaram vivos ao Centro de Diagnóstico de Enfermidades de Camarão Marinho – CEDECAM e foram fixados em solução de Davidson. Após 24 horas foram transferidos para álcool 70% e mantidos até o processamento. Os procedimentos histológicos foram feitos de acordo com Bell and Lightner (1988). Cortes de 4µm foram corados com H&E (Tolosa *et al.*,2003).

**Resultados**

Não houve nenhum achado histológico compatível com enfermidades de etiologia viral ou bacteriológica. De um modo geral o material analisado apresentou características normocíticas e normocrômicas.

Tereza Cristina Vasconcelos Gesteira ( PhD.)  
 CRBio. 27.830/05-D

**ANEXO III.** Laudo de RT-PCR em tempo real emitido pelo Laboratório de Patologia em Aqüicultura da Universidade do Arizona a cerca da carga viral no homogenado utilizado no desafio *per os* do presente estudo.

**AQUACULTURE PATHOLOGY  
OFFICE PHONE 1-520-621-8414  
LAB PHONE 1-520-621-4438  
FAX 1-520-621-4899**

September 20, 2006

Alberto J.P. Nunes  
Instituto de Ciencias do Mar-Labomar/UFC  
Centro de Diagnostico de Enfermidades de Camarao Marinho (CEDECAM)  
Av. da Abolicao  
3207 Meireles  
Fortaleza, Ceara  
60.165-081  
BRASIL

E-mail: [albertojpgn@uol.com.br](mailto:albertojpgn@uol.com.br)

**Case: 06-284**

Dear Dr. Nunes:

The tests you requested for quantification of *Infectious myonecrosis virus* (IMNV) by real-time RT-PCR on sample 06-284/2 have been completed. The *Litopenaeus vannamei* pleopod samples arrived on August 23<sup>rd</sup>, 2006 in good condition. Total RNA was extracted and analyzed by real-time RT-PCR to determine the copies of IMNV in µl of RNA. The results indicate approximately  $1.82 \times 10^3$  copies of IMNV present per µl of RNA in sample 06-284/2. A summary of the tests and results is provided on the following page.

We hope that this information will be helpful to you. A hard copy of this report will be mailed to you. The fee for these tests is \$100.00 (1 RNA sample @ \$ 30.00, and \$ 70.00 for preparing the quantitative standards). A separate invoice will be sent to you. If there are any questions regarding this case please feel free to contact us.

**UAZ Policy on certification:** This report provides our findings on the samples submitted to our laboratory for examination, health status evaluation, disease diagnosis, or pathogen detection. It is our policy and intent to perform the most appropriate assay(s) for the determination of the health/pathogen status of all specimens submitted to our laboratory. However, this report in no way constitutes a stock or facility "certification" or a "certificate" of health/pathogen status for the sample(s) tested or for the stocks, or facility, from which the sample(s) were derived.

**PCR: disclaimer:** This report provides our findings on the samples submitted to our laboratory for pathogen detection. The PCR assay used by this laboratory for the detection of shrimp pathogens is a research tool. The results should be considered as experimental and tentative. Whenever possible, PCR results should be confirmed by alternative assay. This report in no way constitutes a stock or facility "certification" or a "certificate" of health/pathogen status for the sample(s) tested or for the stocks, or facility, from which the sample(s) were derived.

Sincerely yours,

Thales Passos de Andrade, B.FE., M.Sc.  
Ph.D. student in Pathobiology

Carlos R. Pantoja, Ph.D.  
Associate Research Professor



**ANEXO IV.** Laudo de PCR emitido pelo Laboratório de Patologia em Aquicultura da Universidade do Arizona a cerca da presença do IMNV nos camarões despicados dos tratamentos **Ref** (T1), **Neg** (T2), **Pos** (T3), **VitC** (T4), **VitCBetG** (T5) e **BetG** (T6).

**AQUACULTURE PATHOLOGY**  
**OFFICE PHONE 1-520-621-8414**  
**LAB PHONE 1-520-621-4438**  
**FAX 1-520-621-4899**

May 7, 2007

Alberto J.P. Nunes  
Instituto de Ciencias do Mar-Labomar /UFC  
Rua Silva Paulet, 736-apt 1103  
Meireles  
60.120-20  
Fortaleza, Ceara  
BRAZIL

**Case: 07-173**

[albertoipn@uol.com.br](mailto:albertoipn@uol.com.br)

Dear Mr. Nunes:

The tests you requested for the detection of IMNV by nested RT-PCR have been completed. The 6 vials of *Litopenaeus vannamei* containing 30 pleopods each arrived on May 3<sup>rd</sup>, 2007 in good condition. Representative samples from each of the vials consisting of 6 pleopods per vial (approximately 21 mg to 30 mg) were collected for RNA extractions. IMNV was POSITIVE in five of the six samples tested. A summary of the tests and results is provided on the following page.

We hope that this information will be helpful to you. A hard copy of this report will be mailed to you. The fee for these tests is \$198.00 (6 sets of tests for IMNV @ \$33.00 each). A separate invoice will be sent to you. If there are any questions regarding this case please feel free to contact us.

**UAZ Policy on certification:** This report provides our findings on the samples submitted to our laboratory for examination, health status evaluation, disease diagnosis, or pathogen detection. It is our policy and intent to perform the most appropriate assay(s) for the determination of the health/pathogen status of all specimens submitted to our laboratory. However, this report in no way constitutes a stock or facility "certification" or a "certificate" of health/pathogen status for the sample(s) tested or for the stocks, or facility, from which the sample(s) were derived.

**PCR: disclaimer:** This report provides our findings on the samples submitted to our laboratory for pathogen detection. The PCR assay used by this laboratory for the detection of shrimp pathogens is a research tool. The results should be considered as experimental and tentative. Whenever possible, PCR results should be confirmed by alternative assay. This report in no way constitutes a stock or facility "certification" or a "certificate" of health/pathogen status for the sample(s) tested or for the stocks, or facility, from which the sample(s) were derived.

Sincerely yours,

Ms. Solangel Navarro  
Research Specialist

D.V. Lightner Ph.D.  
Professor

**ANEXO IV. Cont.****Case: 07-173****Test(s) Requested: Sample Type:**

IMNV

6 vials of pleopods in 95% ethanol

**Species:***L. vannamei***Protocols:**

IMNV: RT-PCR nested protocol described by Poulos and Lightner (DAO,2006,73:69-72)

**Table:**

<b>UAZ #</b>	<b>Sample Ref</b>	<b>IMNV</b>
07-173/ 1	T1	Not Detected
07-173/ 2	T2	POSITIVE
07-173/ 3	T3	POSITIVE
07-173/ 4	T4	POSITIVE
07-173/ 5	T5	POSITIVE
07-173/ 6	T6	POSITIVE

**Conclusion:** IMNV was POSITIVE in five of the six samples tested.