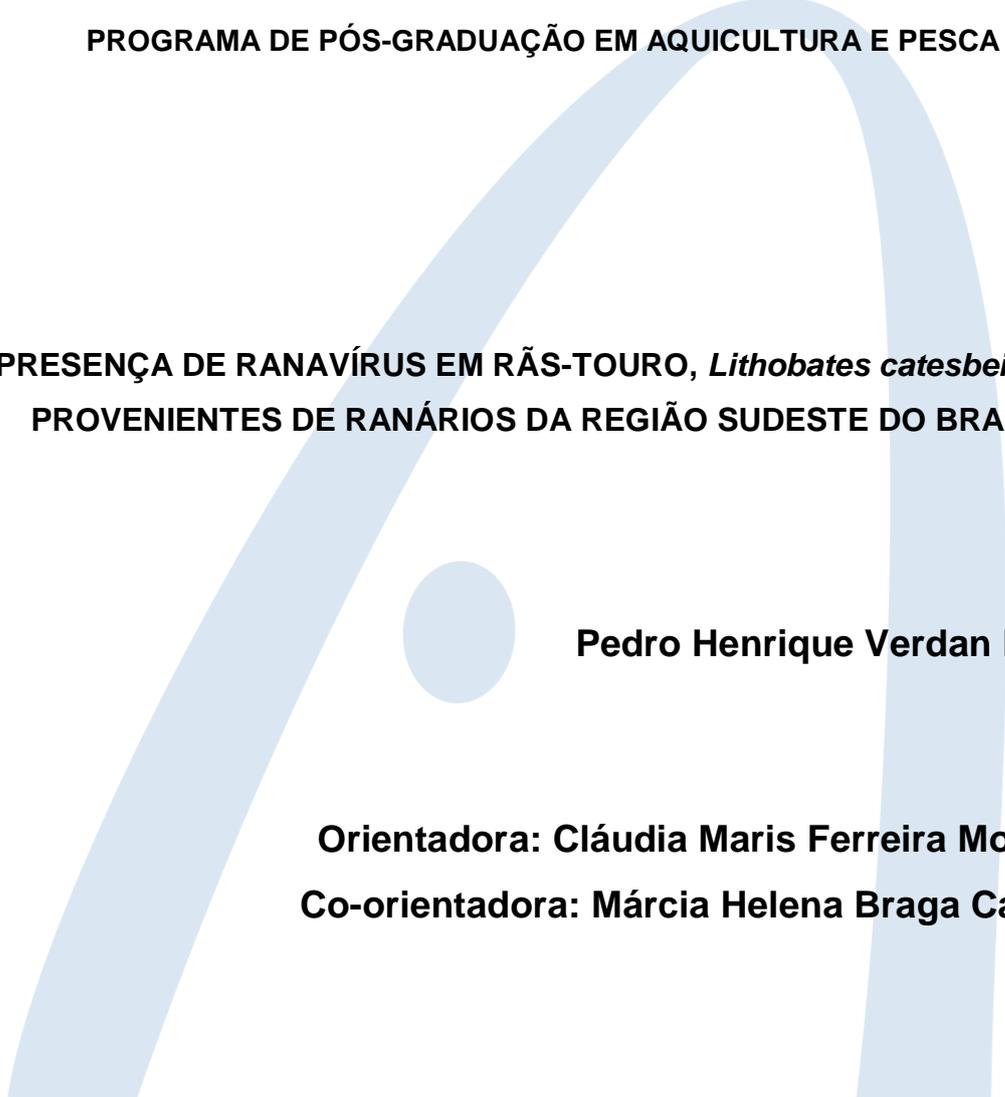


GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DA AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS

INSTITUTO DE PESCA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA E PESCA

**PRESENÇA DE RANAVÍRUS EM RÃS-TOURO, *Lithobates catesbeianus*,
PROVENIENTES DE RANÁRIOS DA REGIÃO SUDESTE DO BRASIL**



Pedro Henrique Verdan Neves

Orientadora: Cláudia Maris Ferreira Mostério

Co-orientadora: Márcia Helena Braga Catroxo

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura e Pesca do Instituto de Pesca – APTA - SAA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Aquicultura e Pesca.

São Paulo
Outubro – 2012

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DA AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA E PESCA

**PRESENÇA DE RANAVÍRUS EM RÃS-TOURO, *Lithobates catesbeianus*,
PROVENIENTES DE RANÁRIOS DA REGIÃO SUDESTE DO BRASIL**

Pedro Henrique Verdan Neves

**Orientadora: Cláudia Maris Ferreira Mostério
Co-orientadora: Márcia Helena Braga Catroxo**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura e Pesca do Instituto de Pesca – APTA - SAA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Aquicultura e Pesca.

São Paulo
Outubro – 2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Elaborada pelo Núcleo de Informação e Documentação. Instituto de Pesca, São Paulo

N518p

Neves, Pedro Henrique Verdan

Presença de ranavírus em rãs-touro, *Lithobates catesbeianus*, provenientes de ranários da região Sudeste do Brasil / Pedro Henrique Verdan Neves.

-- São Paulo, 2012.

vi, 58f. ; il. ; tab.

Dissertação (mestrado) apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura e Pesca do Instituto de Pesca – APTA - Secretaria de Agricultura e Abastecimento.

Orientadora: Cláudia Maris Ferreira Mostério.

1. *Rana catesbeiana*. 2. FV3. 3. Iridovírus. 4. Imunomicroscopia eletrônica.
5. Doenças emergentes. 6. Manejo sanitário. I. Mostério, Cláudia Maris Ferreira.
- II. Título.

CDD 639.34

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA E PESCA

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

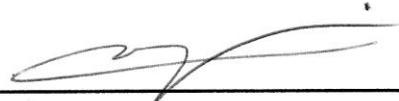
“Presença do ranavírus em rãs-touro, *Lithobates catesbeianus*, provenientes de ranários da região sudeste do Brasil”

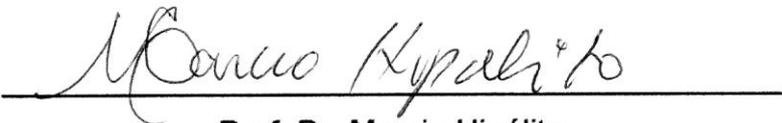
AUTOR: Pedro Henrique Verdan Neves

ORIENTADOR: Prof^ª. Dr^ª. Claudia Maris Ferreira Mostério

Aprovado como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM AQUICULTURA E PESCA, Área de Concentração em Aquicultura, pela Comissão Examinadora:


Prof^ª. Dr^ª. Claudia Maris Ferreira Mostério


Prof. Dr. Rolando Alfredo Mazzoni Romero


Prof. Dr. Marcio Hipólito

Data da realização: 31 de outubro de 2012


Presidente da Comissão Examinadora
Prof^ª. Dr^ª. Claudia Maris Ferreira Mostério

*Grandes coisas não se fazem por impulso,
mas pela junção de uma série de pequenas coisas.*

Vincent van Gogh

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos

Ao Instituto de Pesca APTA/SAA-SP, pela viabilização deste trabalho junto ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura e Pesca.

À CAPES, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela bolsa de mestrado concedida ao longo do meu mestrado.

Ao CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelo auxílio financeiro para compra de material e execução do projeto.

À Prof.^a Dr.^a Cláudia Maris Ferreira Mostério, pela orientação, amizade, acolhimento e respeito. Parabéns por ter sido capaz de extrair ao máximo minhas potencialidades como “cientista”. Muito obrigado por ter me acolhido como orientado e contribuído para mudar a minha. Obrigado também por nunca ter desistido. Talvez eu nunca encontre as palavras certas para expressar esse enorme sentimento de gratidão e admiração.

À Dr.^a Marcia Catroxo pela orientação e leitura das amostras e à Fabíola Souza pelo preparo das amostras. Aproveito também para agradecer ao Instituto Biológico por me permitir usufruir de seus laboratórios.

Aos membros da banca examinadora, Dr. Marcio Hipolito e Dr. Rolando Mazzoni, por compartilharem comigo suas colossais experiências e pelas valiosas observações durante a defesa.

Ao professor Dr. Adalberto José Monteiro Júnior, por ter me apresentado à Dr.^a Suzana Sendacz para que eu fizesse o meu último estágio durante a minha graduação em Ciências Biológicas. Esse gesto me colocou muito próximo de excelentes pesquisadores, e me mostrou que era possível ir muito mais além.

Ao Colégio Júlio Mesquita e toda a sua equipe e alunos. Serei eternamente grato por toda a ajuda, incentivo e todos os desdobramentos para que eu pudesse comparecer às atividades propostas pelo programa de pós-graduação.

Aos meus amigos que tive o prazer de fazer ao longo do meu mestrado, Renan Okawara, Ludmila Baldi (Gudymila), Fernanda Bastos, Juliana Gradisse, Juliana Macedo, Leina Carvalho, Katerine Carvalho, Bernardo Caramel, Joaquim Manoel (Camp), Sonia Doi, Guilherme Silveira, Fábio Onodera, Fernando Gonçalves e Vagner Leonardo (Macaé). Muito obrigado pelos diálogos, pela companhia durante as refeições, pela grande motivação disseminada e por todos os momentos de muita alegria.

Aos meus primos, Marcio e Marquinho, por me incentivarem me chamando de “mestre” desde os primeiros momentos. Agradeço também aos meus pais e meus irmãos pelo amor e carinho.

À minha família, minha esposa Luciana e minha filha Beatriz, por me confortarem em todos os momentos de saudade, por iluminarem meu caminho com muito amor, por nunca permitirem que eu caminhasse para trás por sempre me incentivarem muito. Obrigado por todos os seus sorrisos, beijos e abraços que me fizeram recobrar os sentidos e retomar o meu fôlego para que eu pudesse prosseguir nessa jornada rumo à nossa vitória.

Meus sinceros agradecimentos a todos que de uma forma ou de outra tornaram possível a realização deste sonho.

SUMÁRIO

Sumário

Resumo	vi
Abstract.....	vii
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	3
CAPÍTULO 1	7
CAPÍTULO 2	22
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	40
ANEXOS	42

Resumo

Pesquisas atuais apontam a ocorrência do declínio mundial da biodiversidade de anfíbios. As espécies do gênero *Ranavirus* (família *Iridoviridae*) são consideradas uma ameaça emergente, pois estão relacionadas a eventos de mortalidade em todo o mundo. O início de estudos com o ranavírus remonta os anos 1960, sendo relacionados às extinções e surtos no início dos anos 1990. A ranicultura brasileira utiliza a espécie *Lithobates catesbeianus*, popularmente conhecida como rã-touro, desde a década de 1930. A partir da década de 1980, pesquisadores se aprofundaram no estudo das patologias que ocorrem em anfíbios silvestres e também em animais de cativeiro. A ocorrência do ranavírus já havia sido registrada na região centro-oeste por meio de técnicas biomoleculares e na região sudeste partículas semelhantes ao ranavírus já haviam sido anteriormente detectadas por microscopia eletrônica de transmissão utilizando a técnica de contrastação negativa. Para nosso estudo, utilizamos contrastação negativa, imunomicroscopia eletrônica e imunocitoquímica com marcação com ouro coloidal, técnicas aplicadas à microscopia eletrônica de transmissão, realizadas a partir de fígados de 60 rãs adultas e 60 girinos, provenientes de 3 ranários comerciais da região sudeste do Brasil. As técnicas empregadas se mostraram eficientes para a detecção do ranavírus. Até o momento não existem registros de eventos de mortalidade em populações de anfíbios silvestres no Brasil. Como não existem maneiras rápidas e baratas para a detecção do ranavírus, recomenda-se que medidas preventivas devam ser tomadas para assegurar a boa qualidade da água que abastece as raniculturas, a fim de evitar a proliferação destes patógenos.

Palavras-chave: *Rana catesbeiana*; FV3; iridovírus; imunomicroscopia eletrônica; doenças emergentes; manejo sanitário.

Abstract

Recent researches point to the decline of the amphibians worldwide biodiversity. The species from the gender *Ranavirus* (family *Iridoviridae*) are considered an emerging threat, for they are related to mortality events all over the world. The beginning of studies involving the ranavirus dates back to the 60's, being related to extinctions and outbreaks during the early 90's. Brazilian frog culture uses the *Lithobates catesbeianus* specie, popularly known as bull-frog, since the 1930's . From the 1980's on, researchers deepened the pathology studies that occur in wild amphibians and also in captive animals. The occurrence of the ranavirus had already been registered in the Mid-West region through biomolecular techniques and in the Southeast region, particles similar to the ranavirus, had already been detected through electronic transmission microscopy, using the negative staining technique. For our study we've used negative staining, electronic immune microscopy and immunocytochemistry with colloidal gold mark, techniques applied to the electronic transmission microscopy, made from the liver of 60 adult frogs and 60 tadpoles, from 3 commercial frog farms from Brazil's Southeast region. The used techniques showed themselves efficient to detecting ranaviruses. So far there hasn't been records of mortality events involving wild amphibian population in Brazil. As there are no fast and cheap ways to detect ranavirus, it's recommended that preventive measures are taken to assure the good quality of the water that fuels the ranicultures, in intention to avoid the spreading of these pathogens.

Key-words: *Rana catesbeiana*; FV3; iridovirus; electronic immunomicroscopy; emerging diseases; sanitary handling.

INTRODUÇÃO GERAL

INTRODUÇÃO GERAL

O início da ranicultura, no Brasil, ocorreu na década de 1930 com a importação de matrizes de rã-touro, *Rana catesbeiana*, atualmente reclassificada como *Lithobates catesbeianus* (FROST *et al.*, 2006) provenientes da América do Norte, mas somente a partir da década de 1970 essa atividade aquícola se tornou mais popular.

Com a diminuição do empirismo relacionado ao manejo, foram desenvolvidos novos e mais eficientes sistemas de engorda para a intensificação dessa atividade (FERREIRA *et al.*, 2002).

Na região sudeste do Brasil, a produção de rãs-touro ocorre geralmente utilizando sistemas conhecidos como semi-seco e inundado (FAO 2012), climatizados por meio de estufas agrícolas, melhorando o conforto térmico dos animais. No ano de 2006, o Brasil produziu 639 toneladas de carne de rã, demonstrando a importância da ranicultura brasileira (DIAS *et al.*, 2010). Devido ao aumento na produção de carne de rã, ocorrido durante as décadas de 1980 e 1990, muitos dados relacionados ao manejo zootécnico e a sanidade vêm sendo descritos, resultando no aumento de informações sobre as principais patologias que ocorrem nos anfíbios destinados à produção comercial (HIPOLITO e BACH 2002).

Eventos relacionados à mortalidade em massa e à morbidade de espécies de anfíbios, tanto em animais silvestres quanto em fazendas de criação, reportados nas Américas, Europa, Ásia e Austrália, sendo principalmente atribuídos ao fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* e aos vírus pertencentes à família *Iridoviridae*, que são considerados uma crescente ameaça à biodiversidade global desses animais (DASZAK *et al.*, 1999; SCHLOEGEL *et al.*, 2009). Segundo a OIE (2011), essas são importantes doenças emergentes atuais de notificação obrigatória.

A família *Iridoviridae* atualmente compreende cinco gêneros: *Iridovirus*, *Chloriridovirus*, *Lymphocystivirus*, *Megalocytivirus* e *Ranavirus*, sendo apenas o gênero *Ranavirus* capaz de infectar vertebrados ectotérmicos como anfíbios, répteis e peixes. Morfológicamente, os iridovirídeos são grandes vírus icosaédricos (120-300 nm de diâmetro) que possuem membrana lipídica interna localizada entre o núcleo viral e o capsídeo exterior. No capsídeo é encontrada a Major Capside Protein (MCP) uma proteína estrutural comum e altamente conservada em todos os iridovirídeos. Os membros dessa família possuem genomas lineares com cadeia dupla de DNA. O FROG

VÍRUS 3 (FV3) é a espécie tipo do gênero *Ranavirus* (CHINCHAR *et al.*, 2009; ICTV 2011).

Os ranavírus são altamente virulentos, com incidência de alta mortalidade na maioria dos casos. A forma larval dos anfíbios é a mais vulnerável, mas em algumas espécies, os indivíduos adultos podem também ser susceptíveis às infecções (GALLI *et al.*, 2006). De acordo com estudos realizados por ROBERT *et al.* (2011), utilizando *Xenopus laevis* em ensaios laboratoriais, constatou-se que a transmissão pode ocorrer pela água, por contato, mordidas e também por canibalismo, sendo esta, a via mais eficaz de transmissão das ranavirose. Os sinais clínicos do ranavírus nem sempre são aparentes, geralmente os animais imunocomprometidos desenvolvem infecções sistêmicas, apresentando ulcerações nas porções distais dos membros, aumento do volume ventral ou emagrecimento, hemorragias, letargia e morte, além de severas lesões internas encontradas nos rins, fígado, baço e revestimento gastrointestinal (HOVERMAN *et al.*, 2010).

O estudo aprofundado sobre os vírus que parasitam anfíbios remontam os meados dos anos 1960, diversos pesquisadores buscaram a compreensão de patologias que acometiam os anfíbios. GRANOFF *et al.* (1965) associaram a presença de partículas virais ao surgimento de neoplasia de tecidos renais em rãs-leopardo, *Lithobates pipiens*. CLARK *et al.* (1968) isolaram o vírus FV3 a partir de amostras de rins com adenocarcinoma em *L. pipiens*. Desde a década de 1990, pesquisas ao redor do mundo apontaram o ranavírus como um dos agentes etiológicos do declínio de diversas populações de anfíbios. Anfíbios selvagens capturados na Austrália, Canadá, Estados Unidos, Venezuela, apresentaram ranavírus, sendo os últimos não relacionados à mortandade em massa.

No Brasil, MAZZONI *et al.* (2009), detectaram partículas do ranavírus por meio da técnica de PCR e por microscopia eletrônica de transmissão (MET), em girinos de rãs-touro doentes e o associaram como agente causador de mortalidade em massa em três raniculturas da região centro-oeste. Na região sudeste, foi registrado a ocorrência de partículas virais semelhantes ao ranavírus, utilizando MET através da técnica de contração negativa (HIPOLITO *et al.*, 2003). Aparentemente esta doença emergente está estabelecida no país causando mortalidades esporádicas, porém sem definição de sua etiologia. Acredita-se que cepas do ranavírus estejam estabelecidas no Brasil,

porém a ausência de estudos em populações de anfíbios silvestres ainda é um fator limitante que impede a compreensão da dinâmica de disseminação da doença.

O presente trabalho encontra-se dividido em dois capítulos, na forma de artigos científicos. No capítulo 1, “O Ranavírus e a Ranicultura Brasileira” a ser submetido à revista Boletim do Instituto de Pesca, objetivamos por meio de revisão da bibliografia, copilar as informações dos principais artigos científicos sobre ranavírus e destacar os primeiros registros do ranavírus nas raniculturas brasileiras. No capítulo 2, “Presença de Ranavírus em Rãs-Touro Americana, *Lithobates catesbeianus*, provenientes de ranários da região Sudeste do Brasil”, a ser submetido à revista Aquaculture Research, objetivamos detectar, por meio de técnicas de microscopia eletrônica de transmissão, a presença de partículas virais pertencentes ao gênero *Ranavirus* (família *Iridoviridae*) em adultos e girinos, provenientes de ranários comerciais da região Sudeste do Brasil.

REFERÊNCIAS

CHINCHAR, V.G.; HYATT A.; MIYAZAKI, T.; WILLIAMS, T. 2009 Family *Iridoviridae*: Poor viral relations no longer. *Current Topics in Microbiology & Immunology*, Berlim, 328: 123-170.

CLARK, H. F.; BRENNAN, J. C.; ZEIGEL, R. F.; KARZON, D. T. 1968 Isolation and characterization of viruses from the kidneys of *Rana pipiens* with renal adenocarcinoma before and after passage in the red eft (*Triturus viridescens*). *Journal of Virology*, Washington: 629-640.

DASZAK P.; BERGER L.; CUNNINGHAM A.A.; HYATT A.D.; GREEN D.E.; SPEARE R. 1999 Emerging infectious diseases and amphibian population declines. *Emerging Infectious Diseases*, Atlanta, 5: 735-748.

DIAS, D.C.; DE STÉFANI, M.V.; FERREIRA, C.M.; FRANÇA, F.M.; RANZANI-PAIVA, M.J.T.; SANTOS, A.A. 2010 Haematologic and immunologic parameters of bullfrogs, *Lithobates catesbeianus*, fed probiotics. *Aquaculture Research*, Malden, 40: 1-8.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em:<
http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Rana_catesbeiana/en> Acesso em
agosto de 2012

FERREIRA, C.M; PIMENTA, A.G.C.; PAIVA-NETO, J.S 2002 Introdução à Ranicultura.
Boletim Técnico do Instituto de Pesca, São Paulo, 33: 1-15.

FERREIRA, C. M.; CATROXO, M.H.B.; MELO, N.A.; MARTINS, A.M.C.P.F.; BALDI,
L.C.; MOREIRA, C.A.; HIPOLITO, M. 2010 Mortalidade de rã-touro, *Lithobates*
catesbeianus, associada a presença de ranavírus. XI Enbrapoa Abrapoa Campinas
UniCamp: 19-22

FROST, D.R.; GRANT, T.; FAIVOVICH, J.; BAIN, R.H.; HAAS, A.; HADDAD, C.F.B.;
DESA, R.; CHANNING, A.; WILKINSON, M.; DONNELAN, S.C.; RAXWORTHY, C.J.;
CAMPBELL, J.A.; BLOTTO, B.L.; MOLER, P.; DREWES, R.C.; NUSSBAUM, R.A.;
LYNCH, J.D.; GREEN, D.M.; WHEELER, W.C. 2006. *The Amphibian tree of Life. Bulletin*
American Museum of Natural History, New York, 297:1-370.

GALLI, L.; PEREIRA, A.; MARQUEZ, A.; MAZZONI, R. 2006 Ranavirus detection by
PCR in cultured tadpoles (*Rana catesbeiana*, Shaw 1802) from South America.
Aquaculture, Amsterdam, 257(1-4): 78-82.

GRANOFF, A.; CAME, P. E.; RAFFERTY, K. 1965 The Isolation and properties of
viruses from *Rana pipiens*: their possible relationship the renal adenocarcinoma of
leopard frog. *Annals of the New York Academy of Science, New York, 126: 555-565.*

HIPOLITO, M.; BACH, E.E. 2002 Patologias em rã touro (*Rana catesbeiana* Shaw 1802).
Primeira revisão da bibliografia brasileira. *Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo.*
São Paulo, 69, (2), p. 113-120.

HIPOLITO, M.; CATROXO, M.H.B.; CURI, N.A.; FERREIRA, C.M.F.; & BACH, E.E.
2003 Detecção ao microscópio eletrônico de transmissão de partículas virais
semelhantes ao grupo iridovírus em rãs-touro (*Rana catesbeiana* SHAW, 1802) criadas
comercialmente. Primeira observação no Brasil. *Arquivos do Instituto Biológico, 70: CD-R.*

HOVERMAN, J.T.; GRAY, M.J.; MILLER, D. L. 2010 Anuran susceptibilities to ranaviruses: role of species identity, exposure route, and a novel virus isolate. *Diseases of Aquatic Organisms*, Oldendorf/Luhe, 89: 97-107.

ICTV International Committee on Taxonomy of Viruses Virus Taxonomy: 2011 Release (current). Disponível em: < <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2011> > Acesso em julho de 2012

MAZZONI, R.; MESQUITA, A.J; FLEURY, L.F.F.; BRITO, W.M.E.D.; NUNES, I.A.; ROBERT, J.; MORALES, H.; COELHO, A.S.G.; BARTHASSON, DL ; GALLI, L ; CATROXO, M.H.B. 2009 Mass mortality associated with a frog virus 3- like Ranavirus infection in farmed tadpoles *Rana catesbeiana* from Brazil. *Diseases of Aquatic Organisms*, Oldendorf/Luhe, 86:181-191.

OIE The World Organisation for Animal Health 2011 *Infection with ranavirus*. Disponível em: <http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahc/2010/en_chapitre_1.8.2.pdf> Acesso em julho de 2012

ROBERT, J.; GEORGE, E.; ANDINO, F.J.; CHEN, G. 2001 Waterborne infectivity of the Ranavirus frog virus 3 in *Xenopus laevis*, *Virology*, New York, 417 (2): 410-417

SCHLOEGEL, L.M.; FERREIRA, C.M.; JAMES, T.; HIPOLITO, M.; LONGCORE, J.; HYATT, A.; YABSLEY; MARTINS, A.M.C.R.; MAZZONI, R.; DAVIES, A.J.; DASZAK, P. 2009 The North American Bullfrog (*Rana catesbeiana*) as a reservoir for the spread of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Brazil. *Animal Conservation*, London, 13 (51): 53-61.

CAPÍTULO 1

O RANAVÍRUS E A RANICULTURA BRASILEIRA

Resumo

Pesquisas atuais apontam a ocorrência do declínio mundial da biodiversidade de anfíbios. As espécies do gênero *Ranavirus* (família *Iridoviridae*) são consideradas uma ameaça emergente, pois estão relacionados a eventos de mortalidade e morbidade em todo o mundo. O início de estudos com o ranavírus datam dos anos 1960 e relacionam-se às extinções no início dos anos 1990. A ranicultura brasileira utiliza a espécie *Lithobates catesbeianus* desde a década de 1930. No decorrer dos anos, ocorreu o aumento de estudos com o objetivo de melhorar as condições zootécnicas, nutricionais e sanitárias. A partir da década de 1980, pesquisadores se aprofundaram no estudo das patologias que ocorrem nas criações comerciais de rãs. Em raniculturas do Brasil, a ocorrência do ranavírus já foi registrada por meio de técnicas biomoleculares e por microscopia eletrônica de transmissão nas regiões Centro-Oeste e Sudeste. Até o momento, não existem registros de eventos de mortalidade em populações de anfíbios silvestres. Recomenda-se que medidas preventivas devam ser tomadas para assegurar a boa qualidade da água que abastece as raniculturas, a fim de evitar a proliferação de patógenos.

Palavras-chave: *Rana catesbeiana*; FV3; iridovírus; declínio de anfíbios; doenças emergentes; manejo sanitário.

THE RANAVIRUS AND BRAZILIAN RANICULTURE

Abstract

Recent researches point to the decline of the amphibians worldwide biodiversity. The species from the gender *Ranavirus* (family *Iridoviridae*) are considered an emerging threat, for they are related to mortality events all over the world. The beginning of studies involving the ranavirus dates back to the 60's, being related to extinctions early 90's. Brazilian frog culture uses the *Lithobates catesbeianus* specie since the 1930's, and throughout the years there's been an increase of studies that have as goal improve zootechnical, nutritional and sanitary conditions. From the 1980's on, researchers deepened the pathology studies that occur in commercial frog breeding's. The occurrence of the ranavirus has already been registered through biomolecular techniques and electronic transmission microscopy, in the Mid-West and Southeast regions. So far there hasn't been records of mortality events involving wild amphibian population in Brazil. As there are no fast and cheap ways to detect ranavirus, it's recommended that preventive measures are taken to assure the good quality of the water that fuels the ranicultures, in intention to avoid the spreading of these pathogens.

Key-words: *Rana catesbeiana*; FV3; iridovirus; decline of amphibians; emerging diseases; sanitary handling.

Introdução

Registra-se o declínio mundial da população de anfíbios desde a década de 1990 e alguns autores acreditam que esse processo venha ocorrendo desde a década de 1950 (HARP e PETRANKA, 2006). A diversidade existente de anfíbios compreende mais de 4600 espécies conhecidas em três subordens *Urodela*, *Anura* e *Gymnophiona*. Os anfíbios adultos podem ser encontrados em ambientes aquáticos, terrestres e até fossoriais. Para tanto, são dotados de grande diversidade em suas características morfológicas e fisiológicas (ALLENDER e FRY, 2008).

Pesquisas recentes apontam 2 doenças responsáveis pelo declínio populacional dos anfíbios, o fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* e ao *Ranavirus* (família *Iridoviridae*), ambos são considerados uma crescente ameaça à biodiversidade global desses animais (DASZAK *et al.*, 1999; SCHLOEGEL *et al.*, 2010). Segundo a OIE (2011), essas são importantes doenças emergentes atuais de notificação obrigatória.

A família *Iridoviridae* atualmente compreende cinco gêneros: *Iridovirus*, *Chloriridovirus*, *Lymphocystivirus*, *Megalocytivirus* e *Ranavirus*, sendo apenas o gênero *Ranavirus* capaz de infectar vertebrados ectotérmicos como anfíbios, répteis e peixes. Morfológicamente, os iridovirídeos são grandes vírus icosaédricos (120-300 nm de diâmetro) que possuem membrana lipídica interna localizada entre o núcleo viral e o capsídeo exterior. No capsídeo é encontrada a Major Capside Protein (MCP), uma proteína estrutural comum e altamente conservada em todos os iridovirídeos. Os membros dessa família possuem genomas lineares com cadeia dupla de DNA. O FROG VÍRUS 3 (FV3) é a espécie tipo do gênero *Ranavirus* (CHINCHAR *et al.*, 2009; ICTV 2011).

Os ranavírus são altamente virulentos, com grande incidência de mortalidade na maioria dos casos. A forma larval dos anfíbios é a mais vulnerável, mas em algumas espécies, os indivíduos adultos podem também ser susceptíveis às infecções (GALLI *et al.*, 2006). De acordo com estudos realizados por ROBERT, *et al.* (2011), utilizando *Xenopus laevis*, em ensaios laboratoriais, constatou-se que a transmissão pode ocorrer pela água, por contato, mordidas e também por canibalismo, sendo esta, a via mais eficaz de transmissão das ranaviroses. Os sinais clínicos do ranavírus nem sempre são aparentes, geralmente os animais imunocomprometidos desenvolvem infecções sistêmicas, apresentando ulcerações nas porções distais dos membros, aumento do volume ventral ou emagrecimento, hemorragias, letargia e morte, além de severas

lesões internas encontradas nos rins, fígado, baço e revestimento gastrointestinal (HOVERMAN *et al.*, 2010).

Diversos fatores antropogênicos corroboram com esse processo a introdução de espécies exóticas; o aumento dos raios ultravioletas, provocado pela redução da camada de ozônio; a degradação de áreas naturais; a liberação de contaminantes químicos em corpos d'água e a potencialização da propagação de doenças emergentes devido ao tráfego de animais entre os países. (SCHLOEGEL *et al.*, 2009).

Esta revisão bibliográfica teve como objetivo evidenciar a importância do ranavírus como uma doença emergente com potencial negativo tanto para anfíbios silvestres como para os de cativeiro.

Histórico do ranavírus

O aprofundamento no conhecimento sobre os vírus que parasitam anfíbios acontecem desde meados dos anos 1960, quando diversos pesquisadores buscaram a compreensão de patologias que acometiam os anfíbios. GRANOFF *et al.* (1965) associaram a presença de partículas virais ao surgimento de neoplasia de tecidos renais em rãs-leopardo, *Lithobates pipiens*. CLARK *et al.* (1968) isolaram o vírus FV3 a partir de amostras de rins com adenocarcinoma em *L. pipiens*. Ao longo dos anos 1970, diversos trabalhos objetivaram o entendimento do mecanismo enzimático do FV3. Em 1979, CUILLEL *et al.* descreveram a arquitetura geral do FV3, destacando suas camadas lipídicas, ao utilizarem a microscopia eletrônica.

Com o decorrer dos anos 1980, muitos avanços biomoleculares foram importantes, AUBERTIN *et al.* (1981) descreveram o polipeptídeo estrutural encontrado no capsídeo, atualmente conhecido como MCP (Major Capside Protein). Esse foi um ponto muito importante, pois atualmente podemos utilizar anticorpos policlonais para a detecção das partículas virais semelhantes ao FV3 em tecidos renais e hepáticos, por meio de reações imunológicas. Em 1983, LEE e WILLIS utilizaram endonucleases para mapear o genoma do FV3, atualmente a confirmação da presença do ranavírus pode ser feita por PCR (Polymerase Chain Reaction).

Ranavírus, uma ameaça emergente

Desde a década de 1990, pesquisas ao redor do mundo apontaram o ranavírus como um dos agentes etiológicos do declínio de diversas populações de anfíbios. Anfíbios selvagens capturados na Austrália, Canadá, Estados Unidos, Venezuela

apresentaram ranavírus, sendo os últimos não relacionados à mortandade em massa. Em estudos na América do Sul utilizando microscopia eletrônica e enzimas de restrição, registraram pela primeira vez o ranavírus em *Rhinella marina* silvestres saudáveis coletados em diversos locais da Venezuela no início dos anos 1990, (ZUPANOVIC *et al.*, 1998).

O declínio populacional do anuro *Atelognathus patagonicus* foi relacionado ao ranavírus associado a alterações ecológicas em seu hábitat, esse registro feito por FOX *et al.* (2006) ao estudarem as flutuações populacionais em lagoas ao redor de Laguna Blanca National Park, na província de Neuquén, Patagônia, Argentina. Esse o registro de ranavírus em populações de anfíbios silvestres ocorreu mais ao sul de nosso continente.

BRUNNER *et al.* (2004) demonstraram como a salamandra *Ambystoma tigrinum* pode atuar como reservatório do ranavírus após a contaminação das larvas pelos adultos contaminados pelo vírus durante a estação de reprodução. Acredita-se que o mesmo deva acontecer às demais espécies que partilham das mesmas estratégias reprodutivas. Esse fato deve contribuir para que ocorram manifestações das ranavirose nos ambientes naturais, tendo como propensão disseminar-se nos meses quentes.

No complexo ciclo de vida dos anfíbios, os animais relacionam-se com o ambiente aquático e terrestre, portanto, atuam como dispersores de patógenos encontrados nesses dois ambientes. A maioria dos anfíbios está exposta aos patógenos aquáticos e terrestres em seus diferentes estágios de seu ciclo de vida, sua pele, altamente permeável, é muito sensível às toxinas ambientais ou a mudanças dos padrões de temperatura e chuvas que os demais grupos de vertebrados terrestres (ALFORD e RICHARDS, 1999). Durante a metamorfose ocorrem drásticas alterações fisiológicas, metabólicas e imunológicas (DUELLMAN e TRUEB, 1986).

Além disso, sabe-se que o ranavírus pode ser disseminado por meio da comercialização de diversos produtos, como a carne de rã, comércio de animais de estimação e utilização de anfíbios para o preparo de iscas de pesca. Em 2008, PASMANS *et al.* reportaram a presença do ranavírus em urodelos *Tylotriton kweichowensis*, capturados no período de reprodução na China e importados para a Bélgica para serem vendidos como animais de estimação. Os animais apresentavam sinais clínicos como ulcerações cutâneas, edemas e anorexia. O ranavírus foi

confirmado por PCR a partir de amostras de tecidos dos rins e fígado dos animais necropsiados (DASZAK *et al.*, 1999, SCHLOEGEL *et al.*, 2010).

Ranavírus na ranicultura brasileira

A *Lithobates catesbeianus*, também conhecida como rã-touro gigante ou rã-touro americana, é uma espécie nativa da América do Norte, com populações selvagens distribuídas na região nordeste dos Estados Unidos e sudeste do Canadá.

A rã-touro americana apresenta excelente resposta fisiológica aos fatores ambientais brasileiros, o que possibilita a aceleração do seu tempo de desenvolvimento, crescimento e engorda. Além disso, *L. catesbeianus* exibe rusticidade e sua prolificidade, muito superiores se comparadas às espécies brasileiras da família *Leptodactylidae*. Esse conjunto de características foi importante para a escolha da espécie *L. catesbeianus* para a produção nos ranários brasileiros. Geralmente encontramos animais sendo produzidos até 250 gramas em média para abate. Sua carne é o principal produto em comercialização (FERREIRA *et al.*, 2002).

O início da ranicultura no Brasil ocorreu na década de 1930 com a importação de matrizes de rã-touro, *L. catesbeianus*, provenientes da América do Norte, mas somente a partir da década de 1970 essa atividade aquícola se tornou mais popular. Com a diminuição do empirismo relacionado ao manejo foram desenvolvidos novos e mais eficientes sistemas de engorda para a intensificação dessa atividade (FERREIRA *et al.*, 2002).

Na região sudeste do Brasil, a produção de rãs-touro ocorre geralmente utilizando sistemas conhecidos como semi-seco e inundado (FAO, 2012), climatizados por meio de estufas agrícolas, melhorando o conforto térmico dos animais.

Os primeiros estudos sobre as patologias na ranicultura brasileira destacavam as bacterioses como principais causadoras de perdas na produção. A patologia mais comum estudada, a síndrome da perna vermelha, popularmente conhecida por *red leg*, uma bacteriose atribuída à *Aeromonas hydrophila*. Por serem oportunistas, tais procariontes manifestam-se na queda da resistência orgânica do animal, sendo muitas vezes responsáveis pela sua morte. Outros agentes bacterianos oportunistas que também estão envolvidos são *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Proteus sp.*, *Citrobacter sp.*, *Streptococcus sp.*, *Clostridium sp.*, *Staphylococcus sp.* e as micobactérias (HIPOLITO e BACH, 2002).

Protozoários e metazoários parasitos também podem ser encontrados na ranicultura, ANTONUCCI *et al.* (2012) relataram a presença do nematoide *Longibucca catesbeiana* associado às mucosas oral e gástrica de rãs-touro provenientes de ranários do Estado de São Paulo. Porém a baixa incidência desta espécie de nematoide encontrado nos ranários estudados, não foi capaz de causar efeitos negativos nos animais como os descritos em trabalhos anteriores.

Atualmente se faz necessário conhecer as causas predisponentes à invasão parasitária tais como, erros tanto no manejo alimentar quanto sanitário. Devido a essa nova postura, a presença bacteriana atualmente é pouco relatada, sendo os artigos voltados mais para os fatores desencadeantes (HIPOLITO e BACH, 2002).

Número excessivo de animais causa estresse e facilita a ação de agentes patogênicos, enquanto a densidade muito baixa pode gerar prejuízo econômico. Nos sistemas inundados a densidade pode ser maior, e os cuidados com a higienização, a troca e a circulação de água devem ser também aumentados (HIPOLITO, 2004).

GALLI *et al.* (2006) detectaram também, por meio de técnicas moleculares, o ranavírus em girinos provenientes de raniculturas da região centro-oeste do Brasil e Uruguai. No Brasil, MAZZONI *et al.* (2009) detectaram o ranavírus por meio da técnica de PCR, em girinos de rãs-touro doentes e o associaram como agente causador de mortalidade em massa em três raniculturas da região centro-oeste. Na região sudeste, a ocorrência de partículas virais semelhantes ao ranavírus já foi registrada por microscopia eletrônica de transmissão (MET), utilizando a técnica de contrastação negativa (HIPOLITO *et al.*, 2003, FERREIRA *et al.*, 2010). NEVES *et al.* (dados não publicados) confirmaram a presença do ranavírus, por MET utilizando as técnicas de contrastação negativa, imunomicroscopia eletrônica e imunocitoquímica em rãs adultas e girinos também provenientes de ranários da região sudeste.

Já foi constatado que alguns poucos indivíduos de *L. catesbeianus* escapem de recintos de cativeiro invadindo ambientes naturais no Brasil estabelecendo-se próximos às propriedades rurais. Por outro lado, também existem relatos de anuros silvestres que adentram ranários de maneira acidental. Nesse fluxo bidirecional, com indivíduos entrando ou saindo de ranários, pode ocorrer o intercâmbio de patógenos entre as populações de rãs-touro cultivadas e as demais populações de anfíbios selvagens (C.M. Ferreira, comunicação pessoal).

Cepas do ranavírus podem persistir no ambiente, em fundos de corpos d'água e também associados à herpetofauna e a ictiofauna, seus reservatórios naturais. GENG *et*

al. (2011) relataram manifestações de ranavirose após a entrada de animais de vida livre em uma fazenda, como salamandras gigantes da espécie *Andrias davidianus*, cultivadas na China. Os animais contaminados pelo ranavírus apresentavam lesões características no fígado e rins, sinais clínicos muito semelhantes aos relatados em estudos anteriores. Devido à grande biodiversidade, acredita-se que eventos semelhantes possam ocorrer no Brasil.

MAJJI *et al.* (2006) identificaram variados graus de patogenicidade em duas diferentes espécies de *Ranavirus*, FV3 e RCV-Z. A rã-touro apresentou maior resistência ao FV3, pois o animal é capaz de hospedar o vírus sem manifestar sinais clínicos. Para ROBERT *et al.* (2011) a patogenicidade do *Ranavirus* em *Xenopus laevis* está relacionada com comprometimento do sistema imune.

MAO *et al.* (1999) demonstraram que a similaridade genética existente entre as espécies dentro do gênero *Ranavirus* pode ser o fator determinante que possibilita a transmissão do vírus dentro de classes taxonômicas distintas de vertebrados ectotérmicos. É provável que a água que abastece as raniculturas transporte partículas virais provenientes de populações naturais em equilíbrio com as espécies silvestres.

Atualmente acredita-se que a ranicultura brasileira também seja alvo de manifestações de ranavirose, porém sem as notificações realizadas pelos ranicultores e o trabalho científico investigativo, nada pode ser confirmado.

MANEJO SANITÁRIO - MEDIDAS PREVENTIVAS

As perdas na ranicultura geralmente estão relacionadas à falta de mão-de-obra qualificada para o manejo diário nos ranários, interferindo nos manejos nutricional e sanitário. Além disso, ainda são poucos os produtores que contratam a mão-de-obra técnica como medida profilática para manter a sanidade dos animais. Os sinais que precedem os eventos de mortalidade podem ser notados quando ocorre aglomeração dos animais, inapetência, desaceleração do desenvolvimento e mudanças no padrão comportamental (HIPOLITO, 2004).

A boa qualidade de água é fundamental para a sanidade dos animais na ranicultura. No entanto, atualmente existem métodos de detecção do ranavírus na água de abastecimento das raniculturas, no entanto, estes métodos ainda são pouco acessíveis à realidade de muitos produtores. Diante disso, tornam-se necessários alguns cuidados especiais para assegurar o equilíbrio dos parâmetros físico, químicos e biológicos do corpo d'água utilizado nas propriedades rurais.

O reservatório que abastece os tanques de criação deve ser protegido, fechado, não receber poluentes, principalmente matéria orgânica oriunda de esgoto, e ser limpo periodicamente. A água deve ser analisada antes da instalação do ranário e depois, frequentemente, em relação aos seus principais parâmetros, como cor, turbidez, odor, condutividade elétrica, pH, alcalinidade, dureza, oxigênio dissolvido, nitrito/nitrato, amônia e sais minerais dissolvidos, assim como a natureza do solo, pois esta também interfere na qualidade de água (SOUZA JÚNIOR *et al.*, 1996).

A água antes de ser usada deve passar por filtro biológico, para redução do teor de matéria orgânica, de detritos e até para eliminação de predadores e seus ovos. Após a saída de cada lote, o tanque deve ser totalmente seco e limpo com todo o rigor, retirando todos os apetrechos internos, como cochos vibratórios e abrigos, e usando-se desinfetantes mais fortes. As medidas descritas visam minimizar a entrada de possíveis carreadores de patógenos, pois segundo a OIE (2011), os objetos utilizados em recintos podem abrigar partículas do ranavírus.

De acordo com BRYAN *et al.* (2009) o desinfetante à base de monopersulfato de potássio (Virkon S®) mostrou-se muito eficaz para eliminar o ranavírus de objetos que entram diretamente em contato com anfíbios, ao ser comparado com outros desinfetantes largamente utilizados em campo, reduzindo a concentração de partículas virais um curto período de tempo mesmo sob baixas concentrações (de 0,2 a 1,0%).

Quando possível, os objetos pertencentes ao tanque devem ficar expostos diretamente à luz solar. Se o tipo de construção permitir, recomenda-se a aplicação da “vassoura de fogo” – maçarico em todo o piso, paredes e cobertura. Depois de limpo, o tanque deve ficar vazio por um intervalo sanitário mínimo de 10 dias antes da colocação de outros animais (HIPOLITO, 2004). Além de todos os cuidados citados anteriormente, se faz importante o uso de telas de proteção contra aves piscívoras e outros sistemas para barrar a entrada de animais aquáticos carreadores de patógenos (OIE, 2011).

AGRADECIMENTOS

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior (CAPES/Brasil) pela bolsa de mestrado concedida e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/Brasil), pelo financiamento do material utilizado no projeto.

REFERÊNCIAS

ALFORD, R.A.; RICHARDS, S.J. 1999 Global Amphibian Declines: A problem in Applied Ecology. *Annual Review Of Ecology And Systematics*, Palo Alto, 30: 133-65.

ALLENDER, M.,C.; FRY, M.M. 2008 Amphibian virology. *Veterinary clinics of North America: exotic animal practice*, Philadelphia, 11: 463-480.

ANTONUCCI, A.M.; TAKEMOTO, R.M.; FRANÇA, F.M.; TEIXEIRA, P.C.; FERREIRA, C.M. 2012 *Longibucca catesbeiana* (Nematoda: Cyliindrocorporidae) of the bullfrog, *Lithobates catesbeianus* (Anura: Amphibia) from frog farms in the state of São Paulo, Brazil. *Neotropical Helminthology*, Lima, 6(1): 75:83.

AUBERTIN, A.M.; TONDRE, L.; DESCAMPS, P. 1981 Capping of frog virus 3 antigen on the plasma membrane of infected cells. *Les Annales de Virologie de l'Institut Pasteur*, Paris, 132 E: 195-205.

BRUNNER, J.L.; SCHOCK, D.M.; DAVIDSON, E.W.; COLLINS, J.P. 2004 Intraspecific reservoirs: complex life history and the persistence of lethal ranavirus. *Ecology*, Washington, 85: 560-566.

BRYAN, L.K.; BALDWIN, C.A; MATTHEW J. GRAY, M.J.; MILLER, D,L. 2009 Efficacy of select disinfectants at inactivating *Ranavirus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, Oldendorf/Luhe, 84: 89-94.

CHINCHAR, V.G.; HYATT, A.; MIYAZAKI, T.; WILLIAMS, T. 2009 Family *Iridoviridae*: Poor viral relations no longer. *Current Topics in Microbiology & Immunology*, Berlin, 328: 123-170.

CLARK, H.F.; BRENNAN, J. C.; ZEIGEL, R.F.; KARZON, D.T. 1968 Isolation and characterization of viruses from the kidneys of *Rana pipiens* with renal adenocarcinoma before and after passage in the red eft (*Triturus viridescens*). *Journal of Virology*, Washington, 629-640.

CUILLEL, M.; TRIPIER, F.; BRAUNWALD, J.; JACROT, B. 1979 A low resolution structure of frog virus 3. *Virology*, New York, 99: 277-285.

DASZAK, P.; BERGER, L.; CUNNINGHAM, A.A.; HYATT, A.D.; GREEN D.E.; SPEARE R. 1999 Emerging infectious diseases and amphibian population declines. *Emerging Infections Diseases*, Atlanta, 5: 735-748.

DUELLMAN, W.E. & TRUEB, L. 1986. Biology of amphibians. *McGraw-Hill*, New York, USA.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em:<
http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Rana_catesbeiana/en> Acesso em agosto de 2012

FERREIRA, C.M; PIMENTA, A.G.C.; PAIVA-NETO, J.S 2002 Introdução à Ranicultura. *Boletim Técnico do Instituto de Pesca*, São Paulo, 33: 1-15.

FOX, S.F.; GREER, A.L.; TORRES-CERVANTES, R.; COLLINS, J.P. 2006 First case of ranavirus-associated morbidity and mortality in natural populations of the South American frog *Atelognathus patagonicus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, Oldendorf/Luhe, 72: 87-92.

GALLI, L.; PEREIRA, A.; MARQUEZ, A.; MAZZONI, R. 2006 Ranavirus detection by PCR in cultured tadpoles (*Rana catesbeiana* Shaw 1802) from South America. *Aquaculture*, Amsterdam, 257(1-4): 78-82.

GENG, Y.; WANG, K.Y.; ZHOU, Z.Y; LI, C.W.; WANG, M.H.; YIN, Z.Q.; LAI, W.M. 2011 First Report of a Ranavirus Associated with Morbidity and Mortality in Farmed Chinese Giant Salamanders (*Andrias davidianus*). *Journal of Comparative Pathology*, Liverpool, 145: 95-102.

GRANOFF, A.; CAME, P.E.; RAFFERTY, K. 1965 The Isolation and properties of viruses from *Rana pipiens*: their possible relationship the renal adenocarcinoma of leopard frog. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 126: 555-565.

HARP, E.M.; J.W. PETRANKA. 2006 *Ranavirus* in wood frogs (*Rana sylvatica*): Potential sources of transmission within and between ponds. *Journal of Wildlife Diseases*, Ames, 42: 307-318.

HIPOLITO, M.; BACH, E.E. 2002 Patologias em rã touro (*Rana catesbeiana* Shaw 1802). Primeira revisão da bibliografia brasileira. *Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo*. São Paulo, v. 69, n. 2, p. 113-120.

HIPOLITO, M. 2004 Manejo sanitário no cultivo de rã. *In*: RANZANI-PAIVA, M.J.T.; TAKEMOTO, R.M.; LIZAMA, M. de los A.P. (eds.) Sanidade de organismos aquáticos, *Ed. Varela*. 333-353.

HOVERMAN, J.T.; GRAY, M.J.; MILLER, D.L. 2010 Anuran susceptibilities to ranaviruses: role of species identity, exposure route, and a novel virus isolate. *Diseases of Aquatic Organisms*, Oldendorf/Luhe, 89: 97-107.

ICTV International Committee on Taxonomy of Viruses Virus Taxonomy: 2011 Release (current). Disponível em:< <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2011>> Acesso em julho de 2012

LEE, M. H.; WILLIS, D. B. 1983 Restriction endonuclease mapping of the frog virus 3 genome. *Virology*, New York, 126: 317-327.

MAJJI, S.; LAPATRA, S.; LONG, S.M.; SAMPLE, R. BRYAN, L.; SINNING, A.; CHINCHAR, G. 2006 *Rana catesbeiana* virus Z (RCV-Z): a novel pathogenic ranavirus. *Diseases of Aquatic Organisms*, Oldendorf/Luhe, 73: 1-11.

MAO, J.; GREEN, D.E.; FELLERS, G.; CHINCHAR, V.G. 1999 Molecular characterization of iridoviruses isolated from sympatric amphibians and fish. *Virus Research*, Amsterdam, 63: 45-52.

MAZZONI, R.; MESQUITA, A.J; FLEURY, L.F.F.; BRITO, W.M.E.D.; NUNES, I.A.; ROBERT, J.; MORALES, H.; COELHO, A.S.G.; BARTHASSON, D.L.; GALLI, L.; CATROXO, M.H.B. 2009 Mass mortality associated with a frog virus 3- like Ranavirus

infection in farmed tadpoles *Rana catesbeiana* from Brazil. *Diseases of Aquatic Organisms*, Oldendorf/Luhe, 86:181-191.

OIE The World Organisation for Animal Health 2011 *Infection with ranavirus*. Disponível em: <http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahc/2010/en_chapitre_1.8.2.pdf> Acesso em julho de 2012.

PASMANS, F.; BLAHAK, S.; MARTEL, A.; PANTCHEV, N.; ZWART, PEER. 2008 Ranavirus-associated mass mortality in imported red tailed knobby newts (*Tylototriton kweichowensis*): A case report. *The Veterinary Journal*, London, 176: 257-259.

ROBERT, J.; GEORGE, E.; ANDINO, F.J.; CHEN, G. 2001 Waterborne infectivity of the Ranavirus frog virus 3 in *Xenopus laevis*, *Virology*, New York, doi:10.1016/j.virol.2011.06.026.

SOUZA JÚNIOR, F.L.; MARTINS, M.L.; HIPOLITO, M. 1996 Anfíbios. In: DE LUCCA, R.R.; ALEXANDRE, S.R.; MARQUES, T; SOUZA, N.L.; MERUSSE, J.B.L.; NEVES, S.P. (eds.) *Manual para técnicos em bioterismo*. São Paulo: COBEA, p: 239-259.

SCHLOEGEL, L.M.; FERREIRA, C.M.; JAMES, T.; HIPOLITO, M.; LONGCORE, J.; HYATT, A.; YABSLEY; MARTINS, A.M.C.R.; MAZZONI, R.; DAVIES, A.J.; DASZAK, P. 2009 The North American Bullfrog (*Rana catesbeiana*) as a reservoir for the spread of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Brazil. *Animal Conservation*, London, DOI: 10.1111/j.1469-1795.2009.00307.x.

SCHLOEGEL, L.M.; DASZAK, P.; CUNNINGHAM, A. A.; SPEARE, R.; HILL, B. 2010. Two amphibian diseases, chytridiomycosis and ranaviral disease, are now globally notifiable to the World Organization for Animal Health (OIE): an assessment. *Diseases of Aquatic Organisms*, Oldendorf/Luhe 92: 101-108.

ZUPANOVIC, Z.; MUSSO, C.; LOPEZ, G.; LOURIERO, C.-L.; HYATT, A.D.; HENGSTBERGER, S.; ROBINSON, A.J. 1998 Isolation and characterization of iridoviruses from the giant toad *Bufo marinus* in Venezuela. *Diseases of Aquatic Organisms*, Oldendorf/Luhe, 33:1-9.

CAPÍTULO 2

PRESENÇA DE RANAVÍRUS EM RÃS-TOURO AMERICANAS, *Lithobates catesbeianus*, PROVENIENTES DE RANÁRIOS DA REGIÃO SUDESTE DO BRASIL

Resumo

Os iridovírus do gênero *Ranavirus* são indicados como um dos responsáveis pelo declínio dos anfíbios em todo o mundo, podendo afetar animais de vida livre ou cativos. Este estudo teve o objetivo de identificar, por meio de técnicas de microscopia eletrônica de transmissão (MET), partículas de ranavírus e a presença de lesões, através de técnicas histopatológicas, em rãs-touro provenientes de três ranários da região sudeste do Brasil, sendo amostrados 60 animais adultos e 60 girinos. Os rins e fígado foram colhidos para análise histológica e microscópica eletrônica de transmissão. A análise histológica por microscopia óptica revelou lesões severas em fígados como hemorragias e corpúsculos de inclusão basofílicos. Nos rins apresentaram degeneração glomerular, tubular e necrose. A MET revelou pela técnica de contrastação negativa a presença de partículas semelhantes ao ranavírus, na suspensão feita a partir dos fígados. A presença de aglutinações caracterizou o resultado positivo obtido na técnica de imunomicroscopia eletrônica. Na técnica de imunocitoquímica, a reação antígeno-anticorpo foi fortemente realçada pelas partículas de ouro coloidal. Os métodos empregados neste estudo mostraram-se muito eficazes para detectar o ranavírus.

Palavras-chave: *Rana catesbeiana*; FV3; contrastação negativa; imunomicroscopia eletrônica; MET; iridovírus.

PRESENCE OF RANAVIRUS IN AMERICAN BULL-FROGS, *Lithobates catesbeianus*, PROVENIENT FROM BRAZIL'S SOUTHEAST FROG FARMS

Summary

The iridoviruses from the *Ranavirus* gender are pointed as one of the responsible for amphibians population decline all over the world, being able to affect either wild or captive animals. This study has had the objective of identifying, through electronic transmission microscopy, ranaviruses particles and the presence of lesions, using histopathological techniques in 60 adult frogs and 60 tadpoles, from 3 commercial frog farms from Brazil's Southeast region. The kidneys and the liver were collected for histological analysis and for electronic transmission microscopy. The histological analysis by optical microscopy revealed severe lesions on the livers such as bleedings and basophilic inclusion bodies. The kidneys presented glomerular and tubular degeneration, necrosis. The ETM revealed through negative staining the presence of particles similar to the ranavirus, in the suspension made from the livers. The presence of agglutinations characterized the positive result obtained by the electronic immuno microscopy. As for the immunocytochemical technique, the antigen-antibody was strongly highlighted by the colloidal gold particles. The methods used during this study showed themselves very effective to detect ranavirus.

Key-words: *Rana catesbeiana*; FV3; negative staining; electronic immunomicroscopy; ETM; iridovirus.

INTRODUÇÃO

O início da ranicultura, no Brasil, ocorreu na década de 1930 com a importação de matrizes de rã-touro, *Lithobates catesbeianus*, provenientes da América do Norte, mas somente a partir da década de 1970, essa atividade aquícola se tornou mais popular. Com a diminuição do empirismo relacionado ao manejo, foram desenvolvidos novos e mais eficientes sistemas de engorda para a intensificação dessa atividade (Ferreira, Pimenta & Paiva-Neto 2002).

Na região sudeste do Brasil, a produção de rãs-touro ocorre geralmente utilizando sistemas conhecidos como semi-seco e inundado (FAO 2012), climatizados por meio de estufas agrícolas, melhorando o conforto térmico dos animais. No ano de 2006, o Brasil produziu 639 toneladas de carne de rã, demonstrando a importância da ranicultura brasileira (Dias, De Stéfani, Ferreira, França, Ranzani-Paiva & Santos 2010). Devido ao aumento na produção de carne de rã ocorrido durante as décadas de 1980 e 1990, muitos dados relacionados ao manejo zootécnico e a sanidade vêm sendo descritos, resultando no aumento de informações sobre as principais patologias que ocorrem nos anfíbios destinados à produção comercial (Hipolito & Bach 2002).

Eventos relacionados à mortalidade em massa e à morbidade de espécies de anfíbios, tanto em animais silvestres quanto em fazendas de criação, reportados nas Américas, Europa, Ásia e Austrália, vem sendo principalmente atribuídos ao fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* e aos vírus pertencentes à família *Iridoviridae*, considerados uma crescente ameaça à biodiversidade global desses animais (Daszak, Berger, Cunningham, Hyatt, Green & Speare 1999; Schloegel, Ferreira, James, Hipolito, Longcore, Hyatt, Yabsley; Martins, Mazzoni, Davies & Daszak 2009). Segundo a OIE (2011), essas são importantes doenças emergentes de notificação obrigatória. A família *Iridoviridae* atualmente compreende cinco gêneros: *Iridovirus*, *Chloriridovirus*, *Lymphocystivirus*, *Megalocytivirus* e *Ranavirus*, sendo apenas o gênero *Ranavirus* capaz de infectar vertebrados ectotérmicos como anfíbios, répteis e peixes. Morfologicamente, os iridovirídeos são grandes vírus icosaédricos (120-300 nm de diâmetro) que possuem membrana lipídica interna localizada entre o núcleo viral e o capsídeo exterior. No capsídeo é encontrada a Major Capside Protein (MCP) uma proteína estrutural comum e altamente conservada em todos os iridovirídeos. Os membros dessa família possuem genomas lineares com cadeia dupla de DNA (Chinchar, Hyatt, Miyazaki & Willians 2009; ICTV 2011).

Os ranavírus são altamente virulentos, com incidência de alta mortalidade na maioria dos casos. A forma larval dos anfíbios é a mais vulnerável, mas em algumas espécies, os indivíduos adultos podem também ser susceptíveis às infecções (Galli, Pereira, Marquez & Mazzoni 2006). De acordo com estudos realizados por Robert, George, Andino & Chen (2011), utilizando *Xenopus laevis* em ensaios laboratoriais, constatou-se que a transmissão pode ocorrer pela água, por contato, mordidas e também por canibalismo, sendo esta, a via mais eficaz de transmissão das ranavirose. Os sinais clínicos do ranavírus nem sempre são aparentes, geralmente os animais imunocomprometidos desenvolvem infecções sistêmicas, apresentando ulcerações nas porções distais dos membros, aumento do volume ventral ou emagrecimento, hemorragias, letargia e morte, além de severas lesões internas encontradas nos rins, fígado, baço e revestimento gastrointestinal (Hoverman, Gray & Miller 2010).

Na região Sudeste do Brasil, Hipolito, Catroxo, Curi, Ferreira & Bach (2003) detectaram partículas virais semelhantes ao ranavírus por microscopia eletrônica de transmissão (MET) utilizando a técnica de contrastação negativa. Mazzoni, Mesquita, Fleury, Brito, Nunes, Robert, Morales, Coelho, Barthasson, Galli & Catroxo (2009) detectaram o ranavírus por meio da técnica de PCR e por microscopia eletrônica de transmissão, em girinos de rãs-touro doentes e o associaram como agente causador de mortalidade em massa em três raniculturas da região Centro-Oeste.

Diante do exposto, o nosso estudo teve como objetivo testar as técnicas de microscopia eletrônica de transmissão (contrastação negativa, imunomicroscopia eletrônica e imunocitoquímica) para detecção de partículas virais da família *Iridoviridae*, em amostras de tecido hepático de rãs-touro na fase larval e adulta, provenientes de criações comerciais na região Sudeste do Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta de amostras

Os animais foram amostrados da população de três (3) diferentes ranários, de forma aleatória, tendo como único critério o peso médio dos indivíduos. De cada ranário foram coletados 20 animais adultos com peso médio de 150 g e 20 girinos com peso médio de 7 g, totalizando 120 indivíduos para o presente estudo.

A primeira coleta foi realizada em setembro de 2011, no município de São Roque (SR) (23° 31' S e 47° 08' W), a segunda coleta foi em fevereiro de 2012, no

município de Jaboticabal (JAB) (21° 15' S e 48° 19' W) e a terceira, em março de 2012, no município de Santa Bárbara d'Oeste (SBO) (22° 45' S e 47° 24' W), primavera-verão no Hemisfério Sul.

Os animais foram transportados vivos em caixas isotérmicas. Para os adultos foram utilizadas caixas de poliestireno expandido com uma camada de espuma umedecida no fundo. Os girinos foram mantidos vivos por um sistema portátil de aeração acoplado a uma caixa de 16 L.

Após a recepção, no Laboratório Interinstitucional de Sanidade em Aquicultura (LISA), do Instituto de Pesca e Instituto Biológico/SP/ Brasil, os animais adultos foram acondicionados durante 24h em recipientes de 100 L, caixa d'água de polietileno, com aproximadamente 5 cm de coluna d'água de clorada. Sequencialmente foram anestesiados (gelo e cloridrato de benzocaína 4:1) e eutanasiados (girinos e adultos) por meio de secção da coluna cervical logo abaixo na cabeça e em seguida pesados.

Colheu-se o lóbulo médio do fígado e um dos rins. O material extraído de cada animal foi fragmentado em porções de 0,1 g e colocados em microtubos de 1,5 mL, sendo congelados até o momento do preparo das amostras para a MET. O restante do material colhido foi preservado em coletores universais de 80 mL parcialmente preenchidos com formalina 10% tamponada pH 7.4, e os cortes histológicos foram feitos a partir destes tecidos fixados.

Processamento de amostras para Microscopia Eletrônica de Transmissão

Foram realizadas três (3) técnicas para MET, a de contração negativa (preparo rápido), para identificação das partículas virais e as de imunomicroscopia eletrônica e imunocitoquímica (imunomarcagem com partículas de ouro coloidal), para confirmação da presença do iridovírus.

Para a contração negativa, foram realizadas suspensões do material em PBS 0.1M pH 7.0 e com a pipeta automática foi colhida uma gota de 40 µL da suspensão e colocada sobre um pedaço de parafilme aderido a uma lâmina de vidro. Sobre cada gota foi depositada uma tela de cobre, previamente coberta com filme de colódio e estabilizada com carbono, deixando-se incubar por 10 minutos. Sequencialmente, as telas foram drenadas com papel de filtro e contrastadas negativamente com molibdato de amônio a 2%, pH 5.0 (Brenner & Horne, 1959).

Para a técnica de imunomicroscopia eletrônica, as telas de cobre foram sensibilizadas com anticorpo policlonal primário (Abcam®), obtido a partir da Major

Capside Protein (MCP) do iridovírus, diluído a 1:200, lavadas com 40 gotas de tampão PBS, incubadas durante 10 minutos com a suspensão viral, lavadas sucessivamente com água destilada e contrastadas negativamente com molibdato de amônio a 2% e pH 5.0. Para controle da técnica, a cada 10 amostras incubadas, uma foi tratada como anteriormente descrito, substituindo o anticorpo por água destilada (Hayat & Miller, 1990).

Em amostras preliminarmente positivas por imunomicroscopia eletrônica, foi aplicada a técnica de imunomarcagem com ouro coloidal. As telas de cobre, também previamente preparadas, foram incubadas por 15 minutos em gotas de 40 µL de suspensão viral, sensibilizadas com o mesmo anticorpo diluído a 1:80 durante 30 minutos e lavadas com tampão PBS. A seguir foram incubadas novamente por 30 minutos com anticorpo secundário (proteína A conjugada com partículas de ouro coloidal de 10nm de diâmetro - Electron Microscopy Sciences®) diluído a 1:20 em PBS a 0.5% e contrastadas negativamente também pelo molibdato de amônio (Knutton, 1995).

Todas as amostras foram examinadas em Microscópio Eletrônico Philips EM 208 do Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto Biológico de São Paulo, Brasil.

Preparo das amostras histológicas

As amostras foram desidratadas em álcool 70°, 80°, 95° e absoluto, diafanizadas em xilol, incluídas em blocos de parafina para corte em micrótomo com 5 µm de espessura e coradas por meio da técnica de rotina, Hematoxilina-Eosina. As observações foram realizadas com microscópio óptico de transmissão de luz direta. Os resultados foram quantificados em porcentagem de ocorrências de cada tipo de lesão observada.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através da necropsia realizada nos animais, constatamos que os provenientes do ranário SR apresentavam maior quantidade de sinais clínicos externos indicativos de lesões epidérmicas (40%). Estas lesões, ulcerações, caracterizavam-se como lesões cutâneas profundas na região da cabeça e extremidades dos membros. Estruturalmente, o ranário SR utiliza o sistema inundado para produção e engorda dos animais. Esse sistema é muito utilizado no sudeste asiático, e também foi adotado por

uma parcela de ranicultores latino-americanos. É caracterizado por ser totalmente preenchido por água, com uma pequena coluna de água com cerca de 5 cm, eliminando a presença de abrigos e cochos, que são utilizados em outros sistemas de criação para evitar o estresse dos animais e facilitar seu acesso ao alimento (FAO, 2012). A ração é ofertada a lanço e permanece flutuante sobre a água do tanque, pois é extrusada. A densidade utilizada pelos ranicultores no Brasil é de 100 rãs por metro quadrado (Ferreira *et al.*, 2002).

Tem sido constatado que o ranavírus é mais frequente nas famílias *Bufo*nidae, *Dendrobatidae* e *Leptodactylidae* do que em Ranídeos, especialmente em espécies semi-aquáticas como as rãs-touro (Green & Converse 2005) e como esse sistema de criação preconiza que todos os indivíduos fiquem em contato direto com a água, desde sua metamorfose até o ponto de abate, tal aspecto, aliado à alta densidade, ao contato excessivo entre os animais e ao canibalismo natural da espécie é fator que possibilita maior propagação do ranavírus, segundo foi demonstrado por Robert *et al.* (2011).

Os demais animais amostrados, tanto no ranário Jaboticabal (JAB), quanto no ranário Santa Bárbara d'Oeste (SBO), não apresentaram lesões ou outros sinais clínicos externos de patologias. Estes ranários utilizam o sistema semi-seco de produção (FAO 2012).

As alterações internas encontradas, com maior frequência, nos animais amostrados, foram perda de consistência e mudança de coloração do fígado, variando de marrom a amarelado opaco, aumento de volume do baço e presença de nódulos escuros na região externa dos rins.

A microscopia eletrônica de transmissão possibilitou visualizar partículas semelhantes ao ranavírus, icosaédricas envelopadas medindo entre 120 a 300nm de diâmetro, contrastadas negativamente com molibdato de amônio, por meio da técnica de contrastação negativa (fig.1). As características morfológicas encontradas por nós foram similares àquelas descritas por outros autores, em rãs-touro do Brasil (Hipolito *et al.*, 2003; Mazzoni *et al.*, 2009). A técnica de imunomicroscopia eletrônica confirmou a presença de aglutinações promovidas por meio de reações antígeno-anticorpo (fig.2) (tab.1). A mesma técnica foi empregada por Hipolito, Catroxo, Martins, Melo, Pituco, Galleti, Ranzani-Paiva, Mouriño & Ferreira (2012) em *Litopenaeus vannamei* com suspeita de contaminação por partículas virais do gênero *Whispovirus* (família *Nimaviridae*), o causador da doença da mancha branca em camarões.

Na técnica de imunocitoquímica (imunomarcção com ouro coloidal) a reação antígeno-anticorpo foi fortemente realçada pelas partículas de ouro coloidal (fig.3).

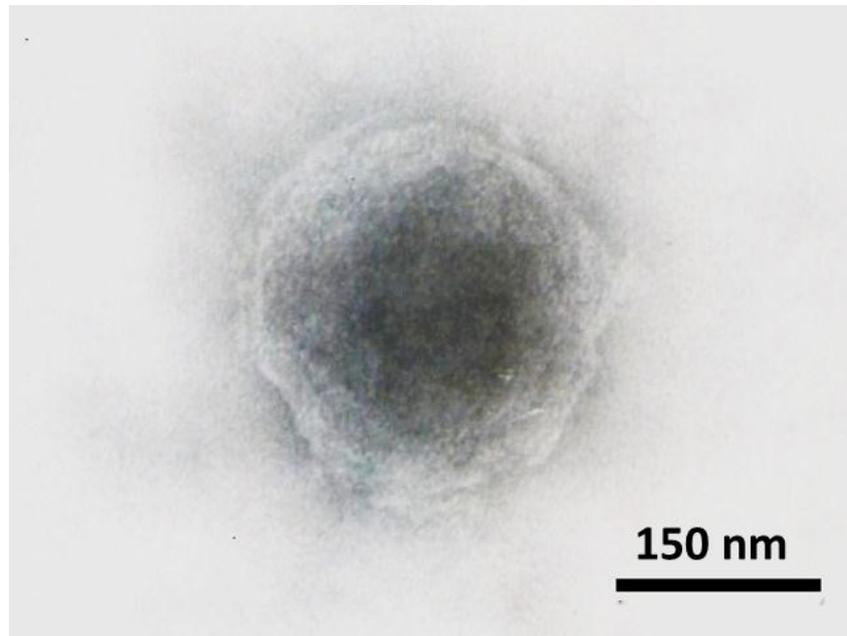


Figura 1. Fotoeletromicrografia a partir da suspensão viral de fígado de *Lithobates catesbeianus* exibindo partícula viral icosaédrica, contrastada negativamente. Aumento: 120.000x

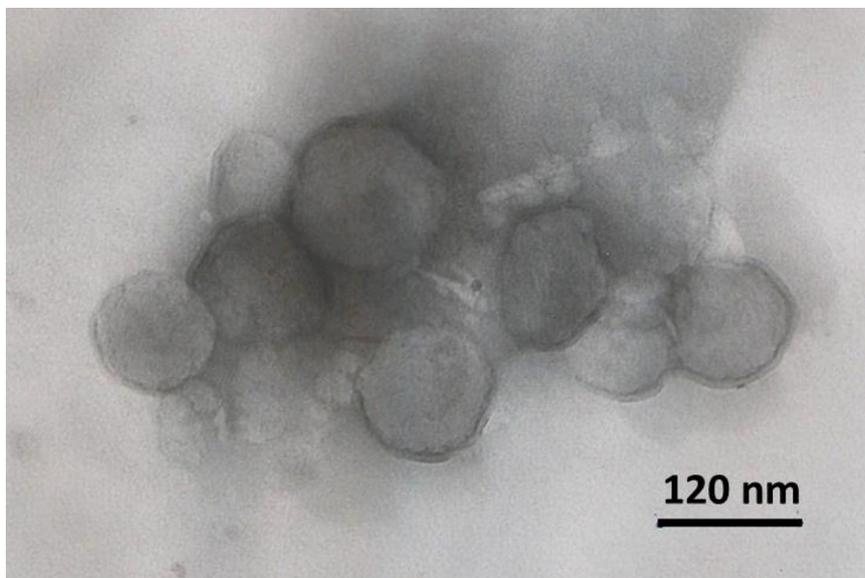


Figura 2. Fotoeletromicrografia a partir da suspensão viral de fígado de *Lithobates catesbeianus* contendo partículas de iridovírus aglutinadas pela interação antígeno anticorpo na técnica de imunomicroscopia eletrônica. Aumento: 100.000x

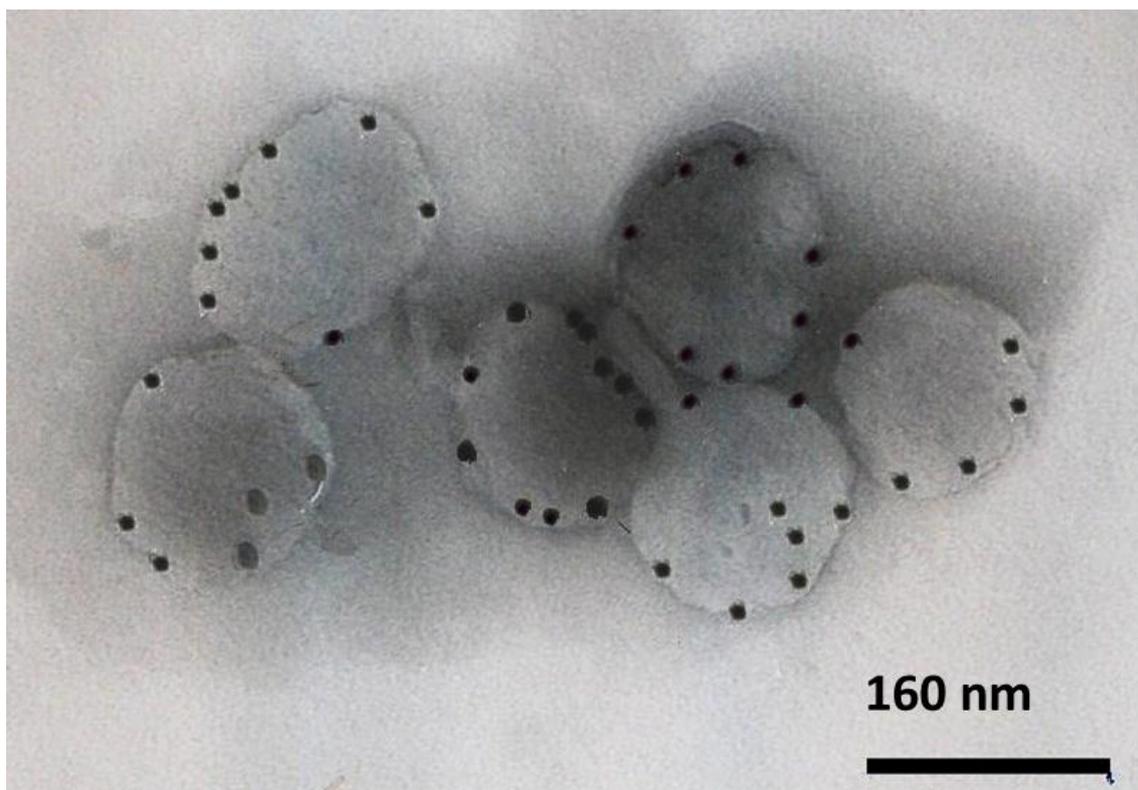


Figura 3. Fotoeletromicrografia a partir da suspensão viral de fígado de *Lithobates catesbeianus* evidenciando partículas de iridovírus aglutinadas pela interação antígeno anticorpo na técnica de imunomicroscopia eletrônica e realçadas pelas partículas de ouro coloidal. Aumento: 100.000x.

A técnica de contrastação negativa pelo MET apresentou resultados sugestivos para a presença de partículas virais do ranavírus, confirmada através das técnicas de imunomicroscopia eletrônica e de imunocitoquímica. Sua aplicação é importante em casos de suspeita de infecções virais emergentes, quando um diagnóstico rápido se faz necessário ou quando os métodos padrões alternativos não produzem resultados satisfatórios.

No presente estudo, 43,33% do total de animais amostrados apresentaram contaminação por ranavírus. Os animais adultos dos ranários SR, JAB e SOB, o ranavírus esteve presente em 90%, 65% e 15% das amostras respectivamente (tabela 1). Apenas os girinos do ranário SR apresentaram o ranavírus em 90% dos animais amostrados. Os girinos dos demais ranários não apresentaram o ranavírus. De acordo com as nossas observações em campo, os animais contaminados apresentaram comportamento similar aos animais não contaminados e estão sendo produzidos, até o momento, sem prejuízo ao aquicultor.

Tabela 1. Resultados de imunomicroscopia eletrônica de amostras de fígados de rãs-touro da região Sudeste do Brasil. Ranários São Roque (SR), Jaboticabal (JAB) e Santa Bárbara d'Oeste (SBO) (n=120).

Amostras	SR	JAB	SBO
Rãs adultas	90%	65%	15%
Girinos	90%	0%	0%

A análise por microscopia óptica relevou variados graus de lesões nos rins e fígados, podendo estar relacionadas às deficiências nutricionais, qualidade de água e agentes biológicos patogênicos secundários à infecção viral (fig. 4).

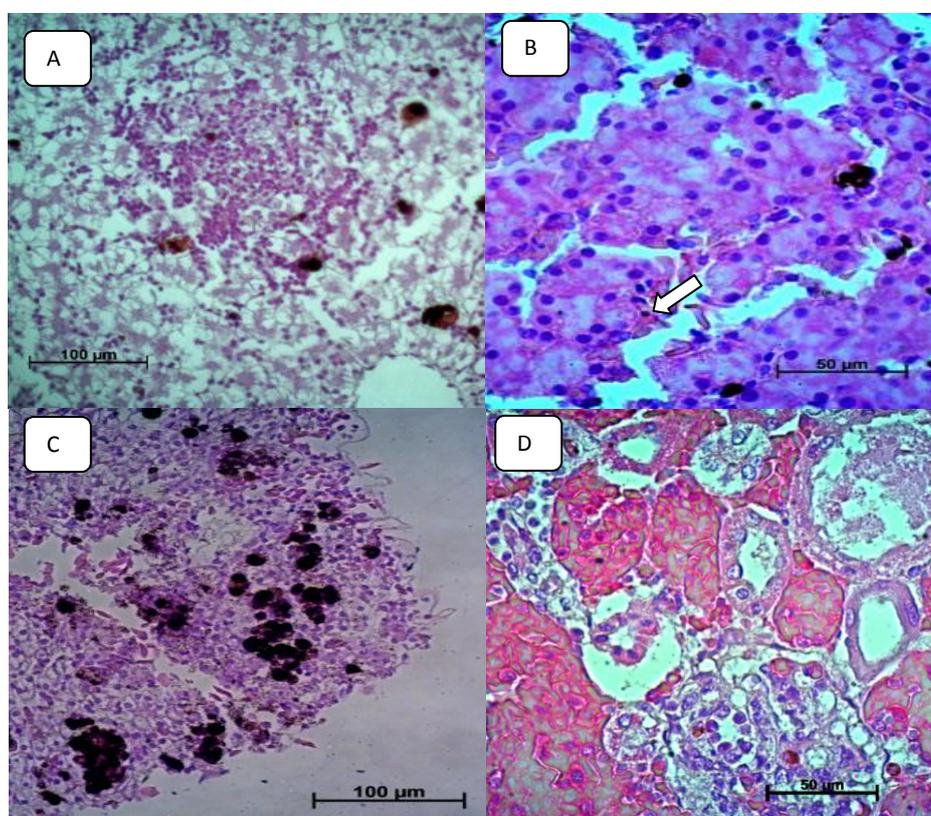


Figura 4. Alterações histológicas encontradas em tecido hepático e renal rãs-touro. (A) Rarefação acentuada do citoplasma dos hepatócitos, foco de hepatite monolinfocitária. HE. 200x. (B) Inúmeros hepatócitos em necrose e presença de inclusões citoplasmáticas basofílicas (seta). HE. 400x. (C) Grande quantidade de melanomacrófagos em fígado de girino. HE. 200x. (D) Acentuada hemorragia no parênquima renal e túbulo nefrose. HE. 400x

O tecido hepático, em geral, apresentou rarefação citoplasmática (deficiência proteico mineral), inúmeros melanomacrófagos, focos de hepatite monolinfocitária com diferentes graus de lesão (fig.4A). Alguns corpúsculos de inclusão basofílicos estavam presentes em locais com grandes focos de necrose, hemorragias (fig.4B) e melanomacrófagos (fig.4C). Nos rins foram observados focos com acentuada hemorragia e à luz de muitos túbulos foi visto material fibrinoide e, também, túbulos vacuolizados ou em necrose, e túbulo nefrose. Observou-se principalmente acentuada glomerulonefrite monolinfocitária e eosinofílica bem como lesões granulomatosas e calcificação distrófica (fig.4D).

As lesões internas observadas nos indivíduos amostrados em nosso estudo sugerem, além da constatação do agente viral, a presença de agentes patogênicos diversos. Geng, Wang, Zhou, Li, Wang, Yin & Lai (2011) descreveram sinais clínicos semelhantes, nos mesmos órgãos colhidos, ao estudarem salamandras da espécie *Andrias davidianus*, cultivadas em fazendas da China, sendo tais lesões associadas ao ranavírus.

Mesmo não apresentando sinais clínicos externos, muitos indivíduos estavam com as funções hepáticas e renais comprometidas decorrentes do alto grau de degeneração tecidual. Provavelmente o curto período de vida desses anfíbios na ranicultura (cativeiro), geralmente de apenas 4 meses, período pós metamorfose até o abate em regiões tropicais e subtropicais, não possibilite manifestações mais severas do ranavírus.

Atualmente, diversos estudos apontam maior incidência de mortalidade e morbidade de animais em locais de clima subtropical, com temperaturas mais amenas em relação ao clima tropical. No Canadá, os trabalhos de Greer, Berrill & Wilson (2005) descrevem eventos de mortalidade em animais de vida livre infectados por ranavírus no centro-sul de Ontário. Duffus, Pauli, Wozney, Brunetti & Berril (2008) coletaram, em pequenos lagos a sudeste de Ontário, anuros e salamandras de populações naturais infectados por Frog Virus-3 (FV3), a espécie-tipo do gênero *Ranavirus*.

Em estudos na América do Sul, Zupanovic, Musso, Lopez, Louriero, Hyatt, Hengstberger & Robinson (1998), utilizando microscopia eletrônica e enzimas de restrição, registraram pela primeira vez o ranavírus em *Rhinella marina* silvestres saudáveis coletados em diversos locais da Venezuela, no início dos anos 1990. Galli *et al.* (2006) detectaram, também por meio de técnicas moleculares, o ranavírus em girinos provenientes de raniculturas da região Centro-Oeste do Brasil e Uruguai.

O declínio populacional do anuro *Atelognathus patagonicus* foi relacionado ao ranavírus e associado a alterações ecológicas em seu hábitat. Esse registro, feito por Fox, Greer, Torres-Cervantes & Collins (2006), ao estudarem as flutuações populacionais em lagoas ao redor de Laguna Blanca National Park, na província de Neuquén, Patagônia Argentina comprovam que o ranavírus ocorre em pontos específicos nas Américas, porém ainda não existem informações sobre surtos em populações naturais no Brasil e outros vizinhos.

Majji, Lapatra, Long, Sample, Bryan, Sinning & Chinchar (2006) identificaram variados graus de patogenicidade em duas diferentes espécies de *Ranavirus*, FV3 e RCV-Z, registrada na rã-touro maior resistência ao FV3, pois o animal é capaz de hospedar o vírus sem manifestar sinais clínicos. Para Robert *et al.* (2011), a patogenicidade do *Ranavirus* em *Xenopus laevis* está relacionada ao comprometimento do sistema imune.

Já foi constatado que alguns poucos indivíduos de *L. catesbeianus* escapam de recintos de cativeiro invadindo ambientes naturais no Brasil, próximos às propriedades rurais. Por outro lado, também existem relatos de anuros silvestres que adentram ranários de maneira acidental. Nesse fluxo bidirecional, com indivíduos entrando ou saindo de ranários, pode ocorrer o intercâmbio de patógenos entre as populações de rãs-touro cultivadas e as demais populações de anfíbios selvagens (C.M. Ferreira, comunicação pessoal). A investigação, mesmo que exploratória, da presença de partículas virais indicativas de ranavírus é essencial para os processos de rastreabilidade e de erradicação deste patógeno em anfíbios silvestres e de criação comercial.

CONCLUSÃO

As técnicas de microscopia eletrônica de transmissão utilizadas neste estudo mostraram-se eficazes para detecção de partículas virais da família *Iridoviridae* no diagnóstico de ranavirose em tecido hepático de rãs-touro.

AGRADECIMENTOS

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior (CAPES/Brasil) pela bolsa de mestrado concedida e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/Brasil) pelo financiamento do material utilizado no projeto.

BIBLIOGRAFIA

BRENNER, S. & HORNE, R. W. A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. *Biochimica et Biophysica Acta*, Amsterdam, 34: 103, 1959.

CHINCHAR, V.G.; HYATT A.; MIYAZAKI, T.; WILLIAMS, T. 2009 Family *Iridoviridae*: Poor viral relations no longer. *Current Topics in Microbiology & Immunology*, Berlin, 328: 123-170.

DASZAK P.; BERGER L.; CUNNINGHAM A.A.; HYATT A.D.; GREEN D.E.; SPEARE R. 1999 Emerging infectious diseases and amphibian population declines. *Emerging Infections Diseases*, Atlanta, 5: 735-748.

DIAS, D.C.; DE STÉFANI, M.V.; FERREIRA, C.M.; FRANÇA, F.M.; RANZANI-PAIVA, M.J.T.; SANTOS, A.A. 2010 Haematologic and immunologic parameters of bullfrogs, *Lithobates catesbeianus*, fed probiotics. *Aquaculture Research*, Malden, 40: 1-8.

DUFFUS, A.L.J.; PAULI, B.D.; WOZNEY, K.; BRUNETTI, C.R.; BERRIL, M. 2008 Frog virus 3-like infections in aquatic amphibian communities. *Journal of wildlife diseases*, Ames, 44: 109-120.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: <http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Rana_catesbeiana/en> Acesso em agosto de 2012

FERREIRA, C.M; PIMENTA, A.G.C.; PAIVA-NETO, J.S 2002 Introdução à Ranicultura. *Boletim Técnico do Instituto de Pesca*, São Paulo, 33: 1-15.

FOX, S.F.; GREER, A.L.; TORRES-CERVANTES, R.; COLLINS, J.P. 2006 First case of ranavirus-associated morbidity and mortality in natural populations of the South American frog *Atelognathus patagonicus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, Oldendorf/Luhe, 72: 87-92.

GALLI, L.; PEREIRA, A.; MARQUEZ, A.; MAZZONI, R. 2006 Ranavirus detection by PCR in cultured tadpoles (*Rana catesbeiana*, Shaw 1802) from South America. *Aquaculture*, Amsterdam, 257(1-4): 78-82.

GENG, Y.; WANG, K.Y.; ZHOU, Z.Y.; LI, C. W.; WANG, M. H.; YIN, Z.Q.; LAI, W. M. 2011 First Report of a Ranavirus Associated with Morbidity and Mortality in Farmed Chinese Giant Salamanders (*Andrias davidianus*). *Journal of Comparative Pathology*, Liverpool, 145: 95-102.

GREEN, D.M., CONVERSE, K.A. 2005 Diseases of amphibian eggs and embryos. In: Majumdar SK, Huffman JE, Brenner FJ, Panah AI (eds) *Wildlife diseases: landscape epidemiology, spatial distribution, and utilization of remote sensing technology*. Pennsylvania Academy of Science, p 118-130

GREER, A.M.; BERRILL, M.; WILSON, P.J. 2005 Five amphibian mortality events associated with ranavirus infection in south central Ontario, Canada. *Diseases of Aquatic Organisms*, Oldendorf/Luhe, 67: 9-14.

HAYAT, M. A. & MILLER, S. E. 1990 *Negative Staining*. Mc. Graw-Hill Publ. Company, 235p.

HIPOLITO, M.; BACH, E.E. 2002 Patologias em rã touro (*Rana catesbeiana* Shaw 1802). Primeira revisão da bibliografia brasileira. *Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo*. São Paulo, v. 69, n. 2, p. 113-120.

HIPOLITO, M.; CATROXO, M.H.B.; CURI, N.A.; FERREIRA, C.M.F.; & BACH, E.E. 2003 Detecção ao microscópio eletrônico de transmissão de partículas virais semelhantes ao grupo iridovírus em rãs-touro (*Rana catesbeiana* SHAW, 1802) criadas comercialmente. Primeira observação no Brasil. *Arquivos do Instituto Biológico*, 70: CD-R.

HIPOLITO, M.; CATROXO, M.H.B.; MARTINS, A. M. C. R. P. F.; MELO, N.A.; PITUCO, E.M.; GALLETI, N.T.C. RANZANI-PAIVA, M. J. T.; MOURIÑO J.L.P.; FERREIRA, C.M. 2012 Detection of White Spot Syndrome Virus in Brazil using

Negative Staining, Immunoelectron Microscopy and Immunocytochemistry Techniques. *International Journal of Morphology*, Temuco, 30(2):761-768.

HOVERMAN, J.T.; GRAY, M.J.; MILLER, D. L. 2010 Anuran susceptibilities to ranaviruses: role of species identity, exposure route, and a novel virus isolate. *Diseases of Aquatic Organisms*, Oldendorf/Luhe, 89: 97-107.

KNUTTON, S. 1995 Electron microscopical methods in adhesion. *Methods in Enzymology*, New York, 253:145-58.

MAJJI, S.; LAPATRA, S.; LONG, S.M.; SAMPLE, R. BRYAN, L.; SINNING, A.; CHINCHAR, G. 2006 *Rana catesbeiana* virus Z (RCV-Z): a novel pathogenic ranavirus. *Diseases of Aquatic Organisms*, Oldendorf/Luhe, 73: 1-11.

MAZZONI, R.; MESQUITA, A.J; FLEURY, L.F.F.; BRITO, W.M.E.D.; NUNES, I.A.; ROBERT, J.; MORALES, H.; COELHO, A.S.G.; BARTHASSON, DL ; GALLI, L ; CATROXO, M.H.B. 2009 Mass mortality associated with a frog virus 3- like Ranavirus infection in farmed tadpoles *Rana catesbeiana* from Brazil. *Diseases of Aquatic Organisms*, Oldendorf/Luhe, 86:181-191.

ICTV International Committee on Taxonomy of Viruses Virus Taxonomy: 2011 Release (current). Disponível em:< <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2011>> Acesso em julho de 2012

OIE The World Organisation for Animal Health 2011 *Infection with ranavirus*. Disponível em: <http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahc/2010/en_chapitre_1.8.2.pdf> Acesso em julho de 2012

ROBERT, J.; GEORGE, E.; ANDINO, F.J.; CHEN, G. 2011 Waterborne infectivity of the Ranavirus frog virus 3 in *Xenopus laevis*, *Virology*, New York, doi:10.1016/j.virol.2011.06.026

SCHLOEGEL, L.M.; FERREIRA, C.M.; JAMES, T.; HIPOLITO, M.; LONGCORE, J.; HYATT, A.; YABSLEY; MARTINS, A.M.C.R.; MAZZONI, R.; DAVIES, A.J.; DASZAK,

P. 2009 The North American Bullfrog (*Rana catesbeiana*) as a reservoir for the spread of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Brazil. *Animal Conservation*, London, DOI: 10.1111/j.1469-1795.2009.00307.x

ZUPANOVIC, Z.; MUSSO, C.; LOPEZ, G.; LOURIERO, C.-L.; HYATT, A.D.; HENGSTBERGER, S.; ROBINSON, A.J. 1998 Isolation and characterization of iridoviruses from the giant toad *Bufo marinus* in Venezuela. *Diseases of Aquatic Organisms*, Oldendorf/Luhe, 33:1-9.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerações finais

A detecção de possíveis focos de ranavírus, tanto em anfíbios silvestres quanto naqueles presentes na ranicultura, tem sido de grande importância para elucidar todos os mecanismos que interagem promovendo a redução da densidade populacional de determinadas espécies de anfíbios ao redor do mundo. Ao decorrer das últimas décadas, muitas evidências apontam para o ranavírus como um dos principais fatores que ameaçam a biodiversidade.

O objetivo da maioria dos estudos atuais tem se voltado para a interação das espécies constituintes do gênero *Ranavirus* junto às populações de anfíbios silvestres que ocorrem no hemisfério norte, fato corroborado pela quantidade de pesquisadores em conjunto com o número maior de ocorrências das ranavirose. Provavelmente pode existir alguma relação entre o clima temperado e a potencialização da virulência das ranavirose. Desconfia-se de que as ranavirose também ocorram nas populações de anfíbios silvestres da América do Sul, porém a carência de dados não nos permite afirmar se outras cepas ou espécies de ranavirose parasitam as espécies que ocorrem nessa parte do continente.

A ranicultura brasileira encontra-se atualmente em fase de latência, sem crescimento significativo da produção de carne, resultando em restrições no mercado. Um fato agravante para esse quadro é a inexistência de rações específicas adequadamente balanceadas para as necessidades fisiológicas dos animais, resultando em animais aparentemente saudáveis, porém com diversos graus de lesões em órgãos internos como o fígado e rins, conseqüentemente podendo diminuir sua imunidade.

Durante a fase de engorda das rãs em sistemas inundados, os animais são obrigatoriamente mantidos em tempo integral em um ambiente aquático, de maior densidade de animais por m², com a ração flutuante permanentemente sofrendo deterioração na água. Esses fatores em conjunto podem atuar como potencializadores do estresse nos animais e também para a proliferação e disseminação de patógenos entre as rãs.

ANEXOS

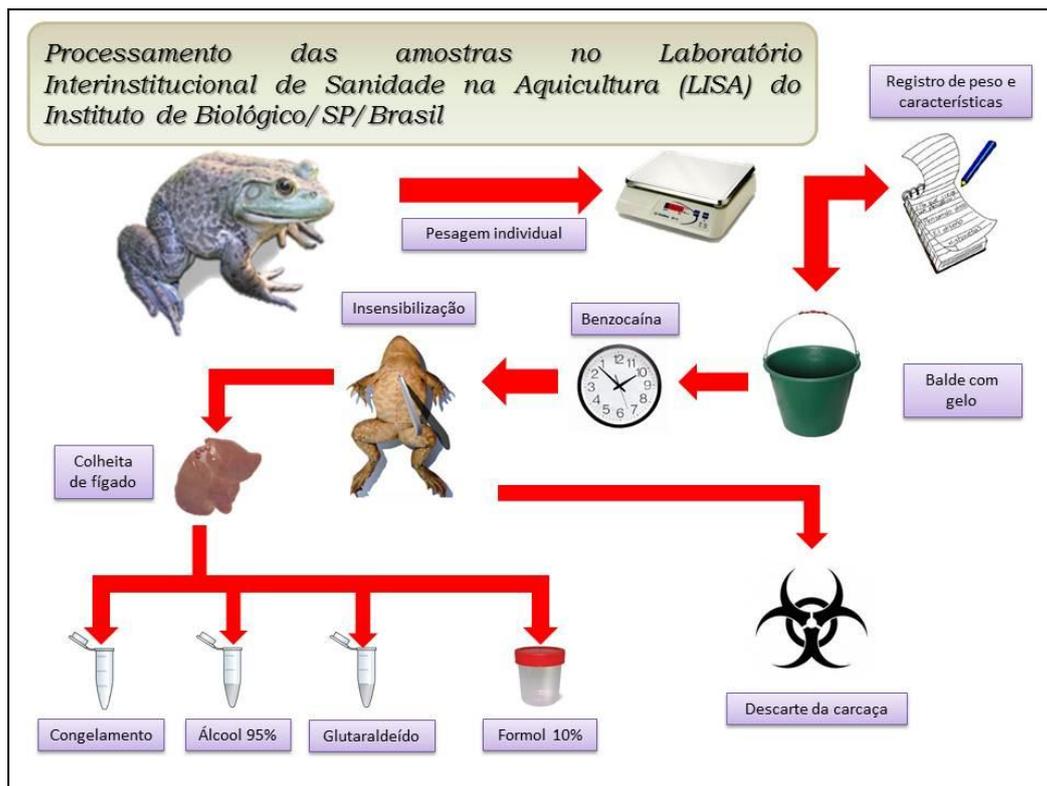


Figura 5: Fluxograma utilizado para o processamento das amostras no Laboratório Interinstitucional de Sanidade na Aquicultura (LISA). Procedimentos de pesagem, anestesia, eutanásia, colheita de fígado e destinação dos materiais fracionados e carcaças.



Figura 6: Coleta de fígado de um exemplar de *Lithobates catesbeianus* adulto. LISA SP.



Figura 7: Lóbulo intermédio do fígado de um exemplar adulto de *Lithobates catesbeianus*, colhido para análises. LISA - SP.



Figura 8: Preparo de telas metálicas utilizadas nas técnicas de microscopia eletrônica de transmissão (MET). Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto Biológico - SP.

ORIENTAÇÃO AOS AUTORES

INSTRUÇÕES AOS AUTORES Janeiro 2012

O *BOLETIM DO INSTITUTO DE PESCA*, ISSN 0046-9939 (impresso) e ISSN 1678-2305 (*online*) têm por objetivo a divulgação de trabalhos científicos inéditos, relacionados a Pesca, Aquicultura e Limnologia.

Artigo de Revisão

Estudo aprofundado sobre tema específico ou questão que requer amplo debate interdisciplinar. Não deve consistir apenas de um resumo de dados, mas conter uma avaliação crítica e objetiva dos dados, o estado da arte e a investigação necessária para o avanço do conhecimento sobre o tema.

ESTRUTURAÇÃO DO TRABALHO - Formatação

Instruções gerais

O trabalho deve ser digitado no editor de texto Microsoft Word (arquivo “doc”), de acordo com a seguinte formatação:

- fonte Book Antiqua, tamanho 11;
- espaçamento entre linhas: 1,5;
- tamanho da página: A4;
- margens esquerda e direita: 2,5 cm;
- margens superior e inferior: 3,0 cm;
- número máximo de páginas, incluindo Figura(s) e/ou Tabela(s) e Referências:
 - . Artigo Científico e Artigo de Revisão: 25 páginas;
 - . Nota Científica: 15 páginas;
 - . Relato de Caso: 15 páginas.
- as linhas devem ser numeradas sequencialmente, da primeira à última página. As páginas também devem ser numeradas.

Estrutura de Artigo de Revisão

Por se tratar de um artigo diferenciado, não é obrigatório seguir a mesma ordenação aplicada aos demais tipos de artigos. Entretanto, deve conter: Título, Autor(s), Endereço(s) Institucional(s) e eletrônico(s), Resumo, Palavras-chave, Título em inglês, Abstract, Key words, Introdução, Discussão, Agradecimentos (opcional) e Referências.

REFERÊNCIAS (normas para TODOS os tipos de publicação)

São apresentadas em ordem alfabética do sobrenome dos autores, sem numeração. Devem conter os nomes de todos os autores da obra, a data de publicação, o título do artigo e do periódico, por extenso, local da publicação (sempre que possível), volume e/ou edição e número/intervalo de páginas.

A exatidão e adequação das referências a trabalhos que tenham sido consultados e citados no texto são de responsabilidade do autor.

Recomenda-se que, no mínimo, 70% das citações seja referente a artigos científicos, de preferência publicados nos últimos cinco anos. Trabalhos de graduação não serão aceitos. Dissertações e teses devem ser evitadas como referências; porém, se estritamente necessárias, devem estar disponíveis on-line. Livros e Resumos também devem ser evitados.

Exemplos:

Citações no texto

- Usar o sistema Autor/Data, ou seja, o sobrenome do(s) autor(s) (em letras maiúsculas) e do ano em que a obra foi publicada.

Exemplos:- para um autor: "MIGHELL (1975) observou..."; "Segundo AZEVEDO (1965), a piracema..."; "Estas afirmações foram confirmadas em trabalhos posteriores (WAKAMATSU, 1973)". - para dois autores: "RICHTER e EFANOV (1976), pesquisando..." Se o artigo que está sendo submetido estiver redigido em português usar "e" ligando os sobrenomes dos autores. Se estiver redigido em inglês ou espanhol usar "and" (RICHTER and EFANOV, 1976) ou "y" (RICHTER y EFANOV, 1976), respectivamente. - para três ou mais autores: o sobrenome do primeiro autor deve ser seguido da expressão "*et al.*" (redigido em itálico).

Exemplo: "SOARES *et al.* (1978) constataram..." ou "Tal fato foi constatado na África (SOARES *et al.*, 1978)." - para o mesmo autor, em anos diferentes, respeitar a ordem cronológica, separando os anos por vírgula.

Exemplo: "De acordo com SILVA (1980, 1985)..." - para citação de vários autores sequencialmente, respeitar a ordem cronológica do ano de publicação e separá-los por ponto e vírgula.

Exemplo: "...nos viveiros comerciais (SILVA, 1980; FERREIRA, 1999; GIAMAS e BARBIERI, 2002)..." - Ainda, quando for ABSOLUTAMENTE necessário referenciar um autor citado em trabalho consultado, o nome desse autor será citado apenas no

texto (em letras minúsculas), indicando-se, entre vírgulas e precedido da palavra latina *apud*, o nome do autor do trabalho consultado, o qual irá figurar na listagem de referências. Ex.: “Segundo Gulland, *apud* SANTOS (1978), os coeficientes...”.

Citações na listagem de REFERÊNCIAS

1. *Documentos impressos* – Para dois autores, relacionar os artigos referidos no texto, com o sobrenome dos autores (em letras maiúsculas), das iniciais dos prenomes (separadas por ponto, sem espaço), separados por “e”, “and” ou “y”, se o texto submetido for redigido em português, inglês ou espanhol, respectivamente.

Se mais de dois autores, separá-los por ponto e vírgula. As referências devem ser ordenadas alfabeticamente pelo sobrenome do autor. Havendo mais de uma obra com a mesma entrada (mesmo sobrenome), considera-se a ordem cronológica e, em seguida, a alfabética do terceiro elemento da referência.

Exemplos:

a) Artigo de periódico

BARBIERI, G. e SANTOS, E.P. dos 1980 Dinâmica da nutrição de *Geophagus brasiliensis* (Quoy e Gaimard, 1824), na represa do Lobo, Estado de São Paulo, Brasil. *Ciência e Cultura*, São Paulo, 32(1): 87-89.

WOHLFARTH, G.W.; MOAY, R.; HULATA, G. 1983 A genotype-environment interaction for growth rate in the common carp, growing in intensively manured ponds. *Aquaculture*, Amsterdam, 33: 187-195.

b) Dissertação e tese (utilizar apenas quando ABSOLUTAMENTE necessário)

SOUZA, K.M. 2008 *Avaliação da política pública do defeso e análise socioeconômica dos pescadores de camarão-setebarbas (Xiphopenaeus kroyeri) do Perequê – Guarujá, São Paulo, Brasil*. Santos. 113p. (Dissertação de Mestrado. Instituto de Pesca, APTA). Disponível em: <http://www.pesca.sp.gov.br/dissertacoes_pg.php> Acesso em: 22 ago. 2009.

c) Livro (utilizar apenas quando ABSOLUTAMENTE necessário) GOMES, F.P. 1978 *Curso de estatística experimental*. 8ª ed. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. 430p. ENGLE, R.F. e GRANGER, C.W.J. 1991 *Long-run economic relationship: readings in co-integration*. New York: Oxford University Press. 301p.

d) Capítulo de livro e publicação em obras coletivas

MACKINNON, J.G. 1991 Critical values for cointegration tests. In: ENGLE, R.F. e GRANGER, C.W.J. *Long-run economic relationship: readings in cointegration*. New York: Oxford University Press. p.267-276.

e) Publicação em anais e congêneres de congresso, reunião, seminário (utilizar RESUMOS como referência apenas quando ABSOLUTAMENTE necessário)

AMORIM, A.F. e ARFELLI, C.A. 1977 Contribuição ao conhecimento da biologia e pesca do espadarte e agulhões no litoral Sul-Sudeste do Brasil. In: CONGRESSO PAULISTA DE AGRONOMIA, 1., São Paulo, 5-9/set./1977. *Anais...* São Paulo: Associação de Engenheiros Agrônomos. p.197-199.

ÁVILA-DA-SILVA, A.O.; CARNEIRO, M.H.; FAGUNDES, L. 1999 Gerenciador de banco de dados de controle estatístico de produção pesqueira marítima - ProPesq@. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA DE PESCA, 11.; CONGRESSO LATINO AMERICANO DE ENGENHARIA DE PESCA, 1., Recife, 17-21/out./1999. *Anais...* v.2, p.824-832.

2. Meios eletrônicos (Documentos consultados *online* e em CD-ROM)

- Utilizar as normas de referência de *documentos impressos*, acrescentando o endereço eletrônico em que o documento foi consultado e a data do acesso.

Exemplos:

CASTRO, P.M.G. (sem data, *on line*) *A pesca de recursos demersais e suas transformações temporais*. Disponível em: <<http://www.pesca.sp.gov.br/textos.php>> Acesso em: 3 set. 2004. SILVA, R.N. e OLIVEIRA, R. 1996 Os limites pedagógicos do paradigma da qualidade total na educação. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFPE, 4., Recife, 1996. *Anais eletrônicos...* Disponível em: <<http://www.propesq.ufpe.br/anais/anais.htm>> Acesso em: 21 jan. 1997.

TOLEDO PIZA, A.R.; LOBÃO, V.L.; FAHL, W.O. 2003 Crescimento de *Achatina fulica* (gigante africano) (Mollusca: Gastropoda) em função da densidade de estocagem. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA, 55., Recife, 14-18 jul./2003. *Anais...* Recife: Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência. 1 CD-ROM.

OBSERVAÇÕES:

1. Fórmulas, expressões e equações matemáticas

Podem ser escritas inseridas no texto, se não apresentarem caracteres especiais; caso contrário, devem ser apresentadas isoladamente na linha. Exemplo: Ganho de peso = peso final - peso inicial.

2. Unidades de medida

Devem ser apresentadas segundo o Sistema Internacional de Unidades (SI). Exemplo: 10 m²; 100 peixes m⁻¹; 20 t ha⁻¹.

3. Casas decimais

Devem ser padronizadas, de acordo com o parâmetro avaliado, ou seja, se foi determinado o comprimento dos animais, com uma casa decimal, indicar, em todo o texto, os valores com uma casa decimal.

4. Anexos e apêndices

Devem ser incluídos apenas quando imprescindíveis à compreensão do trabalho. Caberá aos Revisores e Editores julgar a necessidade de sua publicação.

LISTA DE CHECAGEM

1. Preparar Ofício de encaminhamento (modelo no link Documentos - download), devidamente assinados pelos autores (preferencialmente) ou pelo autor responsável.

Author Guidelines

1. GENERAL

Aquaculture Research publishes papers on applied or scientific research relevant to freshwater, brackish, and marine aquaculture. The Journal also includes review articles and short communications. Please read the instructions below carefully for details on

the submission of manuscripts, the Journal's requirements and standards as well as information concerning the procedure after a manuscript has been accepted for publication in *Aquaculture Research*. Authors are encouraged to visit Wiley-Blackwell's Author Services for further information on the preparation and submission of articles and figures.

2. ETHICAL GUIDELINES

Aquaculture Research adheres to the below ethical guidelines for publication and research.

3. SUBMISSION OF MANUSCRIPTS

Manuscripts must be prepared to conform to the Journal's style and format. Please consult the section Manuscript Format and Structure below for details. Substantial deviation from the Journal's format will result in return of manuscripts without review. Manuscripts should be submitted electronically via the online submission site <http://mc.manuscriptcentral.com/are>. The use of an online submission and peer review site enables immediate distribution of manuscripts and consequentially speeds up the review process. It also allows authors to track the status of their own manuscripts. Complete instructions for submitting a paper are available online and below. Further assistance can be obtained from the Editorial Office at areedoffice@wiley.com.

4. MANUSCRIPT TYPES ACCEPTED

Original Articles: Generally original articles are based upon hypothesis-driven research describing a single study or several related studies constituting a single project. Descriptive studies are allowed providing that they include novel information and/or scholarly insight that contributes to advancement of the state of information on a given scientific topic.

Review Articles: Review articles are welcome and should contain not only an up-to-date review of scientific literature but also substantial scholarly interpretation of extant published literature. Compilations of scientific literature without interpretation leading to new insights or recommendations for new research directions will be returned to the author without review.

Short Communications: These should differ from full papers on the basis of scope or completeness, rather than quality of research. They may report significant new data arising from problems with narrow, well defined limits, or important findings that warrant rapid publication before broader studies are complete. Their text should neither exceed 1500 words (approximately six pages of typescript) nor be divided up into conventional sections. When submitting Short Communications, authors should make it clear that their work is to be treated as such.

5. MANUSCRIPT FORMAT AND STRUCTURE

5.1. Format

All sections of the typescript should be on one side of A4 paper, doublespaced and with 30mm margins. A font size of 12pt should be used. Line numbering should be included, with numbering to continue from the first line to the end of the text (reference list). Line numbers should be continuous throughout the manuscript and NOT start over on each page.

Articles are accepted for publication only at the discretion of the Editors. Authors will be notified when a decision on their paper is reached. Language: The language of publication is English. Authors for whom English is a second language must have their manuscript professionally edited by an English speaking person before submission to make sure the English is of high quality. It is preferred that manuscripts are professionally edited. A list of independent suppliers of editing services can be found at http://authorservices.wiley.com/bauthor/english_language.asp. Japanese authors can also find a list of local English improvement services at <http://www.wiley.co.jp/journals/editcontribute.html>. All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication. Manuscripts in which poor English makes it difficult or impossible to review will be returned to authors without review.

Units and spelling: Systeme International (SI) units should be used. The salinity of sea water should be given as gL⁻¹. Use the form gmL⁻¹ not g/ml. Avoid the use of g per 100 g, for example in food composition, use g kg⁻¹. If other units are used, these should be defined on first appearance in terms of SI units, e.g. mmHg. Spelling should conform to that used in the *Concise Oxford Dictionary* published by Oxford

University Press. Abbreviations of chemical and other names should be defined when first mentioned in the text unless they are commonly used and internationally known and accepted. Scientific Names and Statistics: Complete scientific names, including the authority with correct taxonomic disposition, should be given when organisms are first mentioned in the text and in tables, figures and key words together with authorities in brackets, e.g. 'rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum)' but 'Atlantic salmon *Salmo salar* L.' without brackets. For further information see American Fisheries Society Special Publication No. 20, *A List of Common and Scientific Names of Fishes from the United States and Canada*. Carry out and describe all appropriate statistical analyses.

5.2. Structure

A manuscript (original article) should consist of the following sections:

Title page:

This should include:

- the full title of the paper
- the full names of all the authors
- the name(s) and address(es) of the institution(s) at which the work was carried out (the present address of the authors, if different from the above, should appear in a footnote)
- the name, address, telephone and fax numbers, and e-mail address of the author to whom all correspondence and proofs should be sent
- a suggested running title of not more than 50 characters, including spaces
- four to six keywords for indexing purposes

Main text:

Generally, all papers should be divided into the following sections and appear in the order: (1) Abstract or Summary, not exceeding 150-200 words, (2) Introduction, (3) Materials and Methods, (4) Results, (5) Discussion, (6) Acknowledgments, (7) References, (8) Figure legends, (9) Tables, (10) Figures. The Results and Discussion sections may be combined and may contain subheadings. The Materials and Methods section should be sufficiently detailed to enable the experiments to be reproduced. Trade names should be capitalized and the manufacturer's name and location (town, state/county, country) included. All pages must be numbered consecutively from the

title page, and include the acknowledgments, references and figure legends, which should be submitted on separate sheets following the main text. The preferred position of tables and figures in the text should be indicated in the left-hand margin. Optimizing Your Abstract for Search Engines Many students and researchers looking for information online will use search engines such as Google, Yahoo or similar. By optimizing your article for search engines, you will increase the chance of someone finding it. This in turn will make it more likely to be viewed and/or cited in another work. We have compiled these guidelines to enable you to maximize the web-friendliness of the most public part of your article.

5.3. References (Harvard style)

References should be cited in the text by author and date, e.g. Lie & Hire (1990). Joint authors should be referred to in full at the first mention and thereafter by *et al.* if there are more than two, e.g. Lie *et al.* (1990). More than one paper from the same author(s) in the same year must be identified by the letters a, b, c, etc. placed after the year of publication. Listings of references in the text should be chronological. At the end of the paper, references should be listed alphabetically according to the first named author. The full titles of papers, chapters and books should be given, with the first and last page numbers. For example:

Chapman D.W. (1971) Production. In: *Methods of the Assessment of Fish Production in Freshwater* (ed. by W.S. Ricker), pp. 199-214.

Blackwell Scientific Publications Ltd, Oxford. Utting, S.D. (1986) A preliminary study on growth of *Crassostrea gigas* larvae and spat in relation to dietary protein. *Aquaculture* **56**, 123-128.

Authors are responsible for the accuracy of their references. References should only be cited as 'in press' if they have been accepted for publication. Manuscripts in preparation, unpublished reports and reports not readily available should not be cited. Personal communications should be cited as such in the text. It is the authors' responsibility to obtain permission from colleagues to include their work as a personal communication. A letter of permission should accompany the manuscript. The Editor and Publisher recommend that citation of online published papers and other material should be done via a DOI (digital object identifier), which all reputable online

published material should have – see www.doi.org/ for more information. If an author cites anything which does not have a DOI they run the risk of the cited material not being traceable. We recommend the use of a tool such as EndNote or Reference Manager for reference management and formatting.

EndNote reference styles can be searched for here:

www.endnote.com/support/enstyles.asp

Reference Manager reference styles can be searched for here:

www.refman.com/support/rmstyles.asp

5.4. Tables, Figures and Figure Legends

Tables: Tables should be self-explanatory and include only essential data. Each table must be typewritten on a separate sheet and should be numbered consecutively with Arabic numerals, e.g. Table 1, and given a short caption. No vertical rules should be used. Units should appear in parentheses in the column headings and not in the body of the table. All abbreviations should be defined in a footnote.

Figures: Illustrations should be referred to in the text as figures using Arabic numbers, e.g. Fig.1, Fig.2 etc. in order of appearance. Photographs and photomicrographs should be unmounted glossy prints and should not be retouched. Labelling, including scale bars if necessary, should be clearly indicated. Magnifications should be included in the legend. Line drawings should be on separate sheets of paper; lettering should be on an overlay or photocopy and should be no less than 4 mm high for a 50% reduction. Please note, each figure should have a separate legend; these should be grouped on a separate page at the end of the manuscript.

All symbols and abbreviations should be clearly explained.

Avoid using tints if possible; if they are essential to the understanding of the figure, try to make them coarse.

Preparation of Electronic Figures for Publication: Although low quality images are adequate for review purposes, print publication requires high quality images to prevent the final product being blurred or fuzzy. Submit EPS (line art) or TIFF (halftone/photographs) files only. MS PowerPoint and Word Graphics are unsuitable for printed pictures. Do not use pixel-oriented programmes. Scans (TIFF only) should have a resolution of at least 300 dpi (halftone) or 600 to 1200 dpi (linedrawings) in relation to the reproduction size (see below). Please submit the data for figures in black

and white or submit a Colour Work Agreement Form (see Colour Charges below). EPS files should be saved with fonts embedded (and with a TIFF preview if possible).

For scanned images, the scanning resolution (at final image size) should be as follows to ensure good reproduction: line art: >600 dpi; halftones (including gel photographs): >300 dpi; figures containing both halftone and line images: >600 dpi. Further information can be obtained at Wiley-Blackwell's guidelines for figures:

<http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp>

Check your electronic artwork before submitting it:

<http://authorservices.wiley.com/bauthor/eachecklist.asp>

Permissions: If all or parts of previously published tables and figures are used, permission must be obtained from the copyright holder concerned. It is the author's responsibility to obtain these in writing and provide copies to the Publisher.

Colour Charges: It is the policy of *Aquaculture Research* for authors to pay the full cost for the reproduction of their colour artwork. Therefore, please note that if there is colour artwork in your manuscript when it is accepted for publication, Wiley-Blackwell require you to complete and return a Colour Work Agreement Form before your paper can be published. **Any article received by Wiley-Blackwell with colour work will not be published until the form has been returned.** If you are unable to access the internet, or are unable to download the form, please contact the Production Editor are@wiley.com.

In the event that an author is not able to cover the costs of reproducing colour figures in colour in the printed version of the journal, *Aquaculture Research* offers authors the opportunity to reproduce colour figures in colour for free in the online version of the article (but they will still appear in black and white in the print version). If an author wishes to take advantage of this free colour-on-the-web service, they should liaise with the Editorial Office to ensure that the appropriate documentation is completed for the Publisher.

Figure Legends: In the full-text online edition of the Journal, figure legends may be truncated in abbreviated links to the full-screen version.

Therefore, the first 100 characters of any legend should inform the reader of key aspects of the figure.

6. AFTER ACCEPTANCE

Upon acceptance of a paper for publication, the manuscript will be forwarded to the Production Editor who is responsible for the production of the journal.