

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

Caracterização de agentes patogênicos virais e metazoários em rãs-touro, *Lithobates catesbeianus*, provenientes de ranários comerciais do Vale do Paraíba no estado de São Paulo, Brasil

Antonio Mataresio Antonucci

Orientadora: Prof^a Dra. Cláudia Maris Ferreira

Co-orientador: Prof. Dr. Ricardo Massato Takemoto

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

Setembro - 2009

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

Caracterização de agentes patogênicos virais e metazoários em rãs-touro, *Lithobates catesbeianus*, provenientes de ranários comerciais do Vale do Paraíba no estado de São Paulo, Brasil

Antonio Mataresio Antonucci

Orientadora: Prof^a Dra. Cláudia Maris Ferreira

Co-orientador: Prof. Dr. Ricardo Massato Takemoto

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

Setembro - 2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Elaborada pelo Núcleo de Informação e Documentação. Instituto de Pesca, São Paulo

A635c Antonucci, Antonio Mataresio
Caracterização de agentes patogênicos virais e metazoários em rãs-touro,
Lithobates catesbeianus, provenientes de ranários comerciais do vale do Paraíba
no Estado de São Paulo, Brasil. / Antonio Mataresio Antonucci. – São Paulo, 2009.
iii, 75f. ; 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

1. *Lithobates catesbeianus*. 2. vírus. 3. parasitos 4.patologia . I. Ferreira,
Cláudia Maris. II. Título.

CDD 597.87

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

**Caracterização de agentes patogênicos virais e metazoários em rãs-touro,
Lithobates catesbeianus, provenientes de ranários comerciais do Vale do
Paraíba no Estado de São Paulo, Brasil**

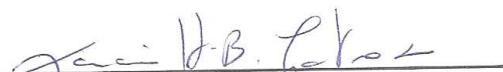
AUTOR: ANTONIO MATARESIO ANTONUCCI

ORIENTADORA: Prof^a. Dra. Cláudia Maris Ferreira Mostério

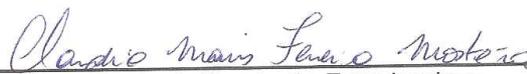
Aprovado como parte das exigências para obtenção do título de
MESTRE EM AQUICULTURA E PESCA, Área de Concentração em
Aqüicultura, pela Comissão Examinadora:


Prof^a. Dra. Cláudia Maris Ferreira Mostério


Prof^a. Dra. Maria de Los Angeles P. Lizama


Prof^a. Dra. Márcia H. B. Catroxo

Data da realização: 04 de setembro de 2009


Presidente da Comissão Examinadora
Prof^a. Dra. Cláudia Maris Ferreira Mostério

AGRADECIMENTOS

A minha mãe ,Alba, meus familiares e amigos pela compreensão, incentivo e colaboração.

A Doutora Cláudia Maris Ferreira e ao Doutor Ricardo Massato Takemoto pela orientação.

Aos pesquisadores do Instituto de Pesca e a equipe do Laboratório de Ictioparasitologia do Nupélia – UEM pela colaboração e incentivo.

Ao Doutor Marcio Hipólito, Doutora Maria José Tavares Ranzani-Paiva e Doutora Adriana Sacioto Marcantonio pela amizade e apoio.

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica e sua equipe pela colaboração nas análises.

Aos meus amigos e colegas de pós-graduação Patrícia Coelho, Fernanda França, Daniele Dias, Juliana Pezzuto, Rainer Knoop, Isabela Bordon, Silvia Napoleão, Guilherme Rocha, Fernanda Queiros pelo incentivo.

A Capes pela bolsa concedida.

SUMÁRIO

Resumo	7
Abstract	8
Introdução Geral	9
Capítulo 1 - Helmintofauna de rãs-touro <i>Lithobates catesbeianus</i> (Anura: Amphibia) provenientes de ranários do estado de São Paulo, Brasil	17
Capítulo 2 - Pesquisa de Partículas Virais em Conteúdo Intestinal de rãs- touro americana, <i>Lithobates</i> <i>catesbeianus</i> , através da Microscopia Eletrônica de Transmissão	41
Considerações Finais	59
Anexos - Orientação aos Autores – Revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz	63
Anexos - Orientação aos Autores – The Veterinary Journal	68

RESUMO

Parasitoses e viroses representam, em sua maioria, um grave problema socioeconômico, pois acometem tanto animais criados comercialmente quanto os selvagens, sendo que alguns podem ser zoonóticos. A perda de peso, crescimento tardio, predisposição a outras doenças e morte são sintomas presentes nos animais parasitados. Sabe-se, também, que as fezes são uma importante via de eliminação de agentes virais pelos animais portadores, e que por estarem na água, os agentes patogênicos podem se propagar mais rapidamente. O objetivo deste trabalho foi levantar a helmintofauna e partículas virais de rãs-touro criadas comercialmente. Trabalhou-se com 5 ranários diferentes na região do Vale do Paraíba, São Paulo, Brasil e um total de 185 animais foram analisados. Realizou-se necropsia e exames coproparasitológicos em todos os órgãos que poderiam estar parasitados por helmintos e uma amostra de conteúdo intestinal dos animais foi coletada para a realização de análises a procura de agentes virais através de Microscopia Eletrônica de Transmissão. O único nematóide encontrado no presente estudo foi identificado como *Longibucca catesbeiana*, com prevalência de 1,7%, abundância média de 14,16, intensidade média de 850 e amplitude de 729-1014. Os grupos virais Coronavírus, Paramixovírus, Parvovírus e Herpesvírus foram observados e fotografados. As alterações nos parâmetros hematológicos analisados não puderam ser evidenciadas devido à baixa prevalência do parasito. Tendo em vista que a maioria dos estudos de parasitologia em anfíbios provém de animais de natureza, deve-se realizar mais estudos nesta área a fim de conhecer melhor estes agentes patogênicos para evitar problemas futuros em criações comerciais, além de ressaltar a importância da adoção de medidas sanitárias nas criações.

Palavras-chave: Helmintos; Vírus; Microscopia Eletrônica; Sanidade; Profilaxia

ABSTRACT

In most of cases, parasitic and viral diseases represent a serious economical problem, since they affect domestic, cultivated and wild animals. Moreover, some of them may be zoonotic. The loss of weight, delayed growth, predisposition to other diseases and death are symptoms present in parasitized animals. It's also known that faeces are the major elimination route of viral agents by animal vectors and, when present in the water, these pathogens may spread more rapidly. This study aimed to evaluate the occurrence of helminthes and viral particles in bullfrogs commercially reared. A total of 185 animals were collect from five different frog farms of Paraiba Valley and were analyzed. The most suspected organs were submitted to necropsy examinations and coproparasitological assay in order to detect any helminthes species. In addition, a sample of bull-frog intestinal underwent Electronic Microscopy of Transmission to detect viral particles. The nematode *Longibucca catesbeiana* was found and identified, with a prevalence of 1.7%, a mean abundance of 14.16, a mean intensity of 850 and a range of 729-1014. Coronavirus, Paramixovirus, Parvovirus and Herpesvirus were observed and photographed. No alterations were detected in blood analysis because of the low prevalence of parasites. Considering that most of the studies of amphibian parasitology use wild animals, more efforts must be done in order to prevent future problems in commercial farms. Furthermore, this study emphasizes the importance of sanitary measures and confirms that Electronic Transmission Microscopy is an efficient tool for quicky diagnosis of viral agents.

INTRODUÇÃO GERAL

A Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) define a aquicultura como toda a criação de organismos aquáticos. Esta atividade vem se desenvolvendo a cada ano, pois é mais uma alternativa de produção de alimentos para a crescente população humana mundial. Por ser uma atividade industrial emergente requer grandes esforços científicos e desenvolvimentos tecnológicos para sua melhor viabilidade (TORANZO *et al.*, 2004).

A aquicultura pode ser classificada conforme as estratégias de desenvolvimento da atividade. Ela pode ser industrial, quando existem empresas financiando a atividade, e na maioria das vezes o produto aquícola é processado em plantas de beneficiamento e exportado, ou pode ser classificada como rural, quando envolve empreendimentos pequenos geralmente de subsistência da família do aquicultor ou comércio do produto em seu estado bruto e entre vizinhos (ARANA, 2004).

Os organismos aquáticos mais utilizados para a criação e produção de alimentos são os peixes, os moluscos, os crustáceos, os anfíbios e plantas aquáticas. Para melhor desenvolvimento dos organismos aquáticos a qualidade da água para criação e cultivos destes devem ser ótimas. Neste contexto, existe um conjunto de fatores físicos e químicos a serem observados constantemente, e respeitados para cada espécie animal ou vegetal produzida, assim sendo, o organismo cultivado não sofrerá muitos danos que são eminentes a uma criação com altas densidades (SCORVO FILHO, 2000; ARANA, 2004). Existem fatores biológicos que também podem causar danos à viabilidade econômica das atividades aquícolas, como as enfermidades infecciosas causadas por vírus, bactérias (TORANZO *et al.*, 2004) e parasitos (TAKEMOTO *et al.*, 2004). Estas patologias ocorrem majoritariamente em animais confinados, e podem desenvolver sérios processos infecciosos comprometendo o desenvolvimento dos animais e até mesmo causar a morte (TORANZO *et al.*, 2004).

Independente da criação animal, a eficácia e lucratividade da atividade dependem do bom gerenciamento da produção e da adoção de medidas sanitárias adequadas, tanto preventivas quanto curativas. As medidas

sanitárias, por sua vez, dependem de fatores como conscientização do proprietário sobre a importância da adoção de manejos sanitários e, a presença de profissionais capacitados para orientação e diagnóstico das enfermidades. Com isso alguns procedimentos preventivos podem ser adotados como quarentena, boas instalações, armazenamento adequado de ração entre outros que dependem da forma de criação e da espécie produzida (*HIPOLITO, 2004; MARTINS, 2004*).

A criação comercial de anfíbios anuros (rãs) é denominada ranicultura (*FERREIRA et al., 2002*). Sapos, pererecas e rãs são denominações populares para espécies de famílias distintas de anfíbios. Os sapos são animais de ambiente seco, pele seca e rugosa e pernas curtas. As pererecas são pequenos animais arborícolas de pernas finas e longas. Ambos não são comestíveis. Já as rãs possuem pele fina e lisa, pernas grossas e alongadas e carne bastante apreciada (*LIMA & AGOSTINHO, 1992*).

A atividade zootécnica de criação de rãs engloba a produção de girinos até a metamorfose e a engorda dos animais metamorfoseados (adultos). Esta atividade permite a comercialização de carne, animais vivos para laboratórios e pesquisa, couro e algumas vísceras e gorduras, que são utilizadas na fabricação de cosméticos (*COSTA, 1992*). Alguns estudos atuais procuram viabilizar ainda mais a produção criando produtos e subprodutos com as carnes e vísceras de rãs (*LIMA et al., 1999*). Devido à grande variação de cores de pele que existem entre as rãs-touro criadas e a incidência de animais albinos (*VIANA, 1993*), vê-se atualmente um crescente comércio destas rãs no mercado de animais de companhia, o chamado “pet”.

No Brasil, a ranicultura teve início em 1935 com a chegada de 300 casais de rãs-touro, provenientes do Canadá, e mantidos em um empreendimento denominado Ranário Aurora no estado do Rio de Janeiro. Em 1939, parte destes animais foram trazidos para o estado de São Paulo pela Secretaria de Agricultura e instalados no município de Pindamonhangaba (*VIANA, 1993; FERREIRA et al., 2002*).

A rã-touro americana *Rana catesbeiana* é atualmente classificada como *Lithobates catesbeianus* (FROST *et al.*, 2006). É um animal rústico que se adaptou muito bem as condições climáticas do Brasil melhorando bastante seus aspectos zootécnicos como precocidade, fecundidade e prolificidade. Estas melhoras são bastante evidenciadas quando se observa que nos EUA uma rã-touro esta pronta para a comercialização com 36 meses e no Brasil este período cai para 12 a 18 meses (VIANA, 1993).

Todas as grandes concentrações de animais constituem sempre um fator que favorece o aparecimento de doenças, com isto cria-se um ambiente favorável para surtos epizooticos, devido à presença de diferentes organismos patogênicos, que em condições naturais teriam expressão mínima (PAVANELLI *et al.*, 2002). Segundo HIPOLITO (2004), os parasitos, em sua maioria, não levam o animal à morte, porém podem causar sérios comprometimentos ao seu desenvolvimento. O parasitismo engloba ações em que um dos membros, o parasito, depende metabolicamente de outro, o hospedeiro, podendo ou não, na dependência de inúmeros fatores, causar danos, e estes levarem ao aparecimento da doença parasitária.

Os principais helmintos de interesse sócio-econômico, pela alta prevalência em animais domésticos e selvagens, pertencem ao Filo Nematelminte, compreendendo os nematóides, e ao Filo Platyhelminte formado pelos cestóideos, trematóideos e monogêneos (ALMEIDA & AYRES, 1996). A maioria dos nematóides produz danos que são dependentes do número de parasitos que acometem o animal (FAGONDE COSTA, 2005). Desse modo, a simples presença de alguns vermes, não indica que os hospedeiros estejam sendo prejudicados. A ação patológica dos parasitos depende do órgão afetado, das lesões perfurantes, da intensidade do parasitismo e da contaminação bacteriana secundária (HIPOLITO, 2004).

Estudos abordando parasitos que acometem rãs-touro criadas comercialmente são de extrema importância para demonstração do estado sanitário das criações, diminuindo assim as perdas econômicas que estes agentes podem acarretar (HIPOLITO, 2004; TAKEMOTO *et al.*, 2004).

Os vírus são os menores e mais simples microorganismos que existem, menores até mesmo que qualquer célula existente e com estrutura muito mais simples e estática. Como estes agentes não possuem mecanismos para a produção de energia e síntese de proteínas, necessitando assim, das funções do metabolismo celular para se multiplicar (FLORES, 2007a). Fora de uma célula viva os vírus são apenas estruturas químicas, o que os tornam parasitos intracelulares obrigatórios. O genoma viral RNA ou DNA codifica apenas as informações necessárias para assegurar sua multiplicação (MORAES & JARAMILLO, 2007). A patogenicidade dos vírus refere-se à capacidade de produção da doença no hospedeiro e é diferente em cada grupo viral associado. Contudo, as células são as unidades fundamentais, e por isso a patologia difere conforme o órgão acometido (FLORES, 2007b).

Vírus acometendo anfíbios são descritos já algum tempo, principalmente em relatos de acometimento de animais de zoológico ou de animais silvestres (HIPOLITO *et al.*, 2003). O adenocarcinoma renal conhecido como Tumor de Lucké é uma neoplasia associada ao grupo Herpesvírus e a baixas temperaturas, descrita inicialmente em *Rana pipiens* na América do Norte. Em anuros como *Xenopus laevis* e *R. pipiens* já foi descrita a ocorrência de linfossarcoma associados ao grupo dos Iridovírus. Também já se estabeleceu associação, entre anfíbios silvestres, que seriam reservatórios dos vírus causadores da encefalite eqüina oeste, e da encefalite japonesa B (HIPOLITO, 2004). As fezes são importantes vias de transmissão de agentes virais, assim como a água e alimentos contaminados e o diagnóstico laboratorial deve permitir a identificação dos agentes no próprio material fecal (GREGORI *et al.*, 2004).

A relação patológica envolvendo vírus e rãs não é bem estabelecida, e por isso todos os estudos na área tornam-se importante, pois os vírus podem permanecer latentes em animais saudáveis ou dizimar plantéis inteiros em uma criação animal, inviabilizando uma produção.

O objetivo desta dissertação foi conhecer as possíveis agentes parasitários e virais presentes em rãs-touro (*Lithobates catesbeianus*) criadas comercialmente no estado de São Paulo, e demonstrar a situação sanitária das criações.

A dissertação está dividida em capítulos que representam dois artigos científicos. O primeiro artigo intitulado “Helmintofauna de rãs-touro *Lithobates catesbeianus* (Anura: Amphibia) provenientes de ranários do Estado de São Paulo, Brasil” será enviado para o periódico Memórias do Instituto Oswaldo Cruz (Classificação A2 – CAPES), e o segundo artigo intitulado “Pesquisa de Partículas Virais em Conteúdo Intestinal de Rãs-touro *Lithobates catesbeianus* através da Microscopia Eletrônica de Transmissão”, a ser enviado para o periódico The Veterinary Journal (Classificação A2 – CAPES).

Referências Bibliográficas

ALMEIDA, M.A.; AYRES, M.C. 1996. Considerações Gerais Sobre Anti-helmínticos. In: SPINOSA H. S., GÓRNIAC S. L., BERNARDI M. M.. *Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária*. 2^o Edição, Ed. Guanabara, São Paulo.p. 437- 443.

ARANA, L.V. 2004. *Fundamentos de Aquicultura*. Editora da UFSC, Florianópolis. 348p.

COSTA, C.L.S. 1992. Desenvolvimento do Aparelho Reprodutor e Fatores Associados ao Ciclo Reprodutivo da Rã-touro no Sistema Anfígranja. Tese. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 98p.

FAGONDE COSTA, C.A. 2005. Anti-helmíntico. In: PALERMO NETO J.. *Farmacologia Aplicada à Avicultura*. Roca, São Paulo. p. 201-208

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

FLORES, E.F. 2007a. Estrutura e Composição dos Vírus:. In: FLORES E F 2007. *Virologia Veterinária*. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria. p. 19-36

FLORES, E.F. 2007b. Patogenia das Infecções Víricas:.In: FLORES E F 2007. *Virologia Veterinária*. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria. p. 189- 236

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. *Bulletim American Museum of Natural History*: 297: 1-370.

GREGORI, F.; RUIZ, V.L. de A.; BERSANO, J.G.; CENTOFANTI, T. 2004. Rotaviroses em Criações de Suínos *Biológico* 1/2: 11-12

HIPOLITO, M. 2004. Manejo Sanitário no Cultivo de Rã. In: RANZANI-PAIVA, M.J.T.; TAKEMOTO, R.M.; LIZAMA, M.L.A.P. 2004 *Sanidade de Organismos Aquáticos*. Editora Varela, São Paulo. p. 333- 353.

HIPOLITO, M.; CATROXO, M.H.B.; CURI, N.A.; FERREIRA, C.M.; BACH, E.E. 2003. Detecção ao Microscópio Eletrônico de Transmissão de Partículas semelhantes ao grupo Iridovírus em rã-touro (*Rana catesbeiana* Shaw,1802) criadas comercialmente, primeiras observações no Brasil. *Arquivos do Instituto Biológico*, 70: CD -R.

LIMA, S.L.; AGOSTINHO, C.A. 1992. A Tecnologia da Criação de Rãs. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa: 168p.

LIMA, S.L.; CRUZ, T.A.; MOURA, O.M. 1999. Ranicultura: Análise da Cadeia Produtiva. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa: 172p.

MARTINS, M.L. 2004. Manejo sanitário na Piscicultura. In. RANZANI-PAIVA, M.J.T.; TAKEMOTO, R.M.; LIZAMA, M.L.A.P. 2004 *Sanidade de Organismos Aquáticos*. Editora Varela, São Paulo. p. 323-332.

MORAES, M.P.; JARAMILLO, H.D. 2007. Genética e evolução Viral:. In: FLORES E F 2007. *Virologia Veterinária*. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria. p. 87- 106

PAVANELLI, G.C.; EIRAS, J.C.; TAKEMOTO, R.M. 2002. Doença de Peixes; Profilaxia, diagnóstico e tratamento, 2º Ed, UEM. Maringá. 305p.

SCORVO FILHO, J.D. 2000. Panorama da Aqüicultura Nacional. Acesso em 17 Ago 2009 Disponível em <http://www.pesca.sp.gov.br/textos.php>

TAKEMOTO, R.M.; LIZAMA, M.L.A.P.; GUIDELLI, G.M.; PAVANELLI, G.C. 2004. Parasitos de Peixes de Águas continentais. In. RANZANI-PAIVA, M.J.T.; TAKEMOTO, R.M.; LIZAMA, M.L.A.P. 2004 *Sanidade de Organismos Aquáticos*. Editora Varela, São Paulo. p. 179- 198.

TORANZO, A.E.; BARJA, J.L.; DOPAZO, C.P. & ROMALDE, J.L. 2004. Enfermidades Bacterianas y Víricas de Peces Marinos. In. RANZANI-PAIVA, M.J.T.; TAKEMOTO, R.M.; LIZAMA, M.L.A. 2004 . *Sanidade de Organismos Aquáticos*. Editora Varela, São Paulo.p. 3 - 49.

VIANA, M.I. 1993. Rã Touro Gigante: Características e Reprodução. 4 edição Infotec. São Paulo: 80p.

CAPITULO 1

Helmintofauna de rãs-touro

Helmintofauna de rãs-touro *Lithobates catesbeianus* (Anura: Amphibia)

provenientes de ranários do estado de São Paulo, Brasil

Antonio M. Antonucci, Ricardo M. Takemoto, Fernanda M. França, Patrícia C. Teixeira, Cláudia M. Ferreira

Instituto de Pesca do Estado de São Paulo. Av. Francisco Matarazzo, 455. São Paulo SP. Brasil

RESUMO - Parasitoses representam, em sua maioria, um grave problema socioeconômico, pois acometem tanto animais domésticos, os criados comercialmente e os selvagens, sendo que alguns podem ser zoonóticos. A perda de peso, crescimento tardio, predisposição a outras doenças e morte são sintomas presentes nos animais parasitados. O objetivo deste trabalho foi levantar a helmintofauna de rãs-touro criadas comercialmente. Trabalhou-se com 5 ranários diferentes na região do Vale do Paraíba, São Paulo, Brasil e um total de 185 animais foram analisados. Foi realizada necropsia e exames coproparasitológicos em todos os órgãos que poderiam estar parasitados. O único nematóide encontrado no presente estudo foi identificado como *Longibucca catesbeiana*, com prevalência de 1,7%, abundância média de 14,16, intensidade média de 850 e amplitude de 729-1014. Tendo em vista que a maioria dos estudos de parasitologia em anfíbios provém de animais de vida livre, deve-se realizar mais estudos nesta área a fim de conhecer melhor este parasito evitando problemas futuros em criações comerciais.

Palavras- chave: Nematóide, *Longibucca catesbeiana*, *Lithobates catesbeianus*, parasito.

ABSTRACT - In most of cases, parasites represent a serious economical problem, since they affect domestic, cultivated and wild animals. Moreover, some of them may be zoonotic. The loss of weight, delayed growth, predisposition to other diseases and death are symptoms present in parasitized animals. This study aimed to evaluate the occurrence of helminthes in bullfrogs commercially reared. A total of 185 animals were collect from five different frog farms of Paraiba Valley and were analyzed. The most suspected organs were submitted to necropsy examinations and coproparasitological assay in order to detect any helminthes species. The nematode *Longibucca catesbeiana* was found and identified, with a prevalence of 1.7%, a mean abundance of 14.16, a mean intensity of 850 and a range of 729-1014. Considering that most of the studies of amphibian parasitology use wild animals, more efforts must be made in order to prevent future problems in commercial farms.

Key Words: Nematode, *Longibucca catesbeiana*, *Lithobates catesbeianus* , parasite

Introdução: A rã-touro americana (*Rana catesbeiana*), recentemente reclassificada como *Lithobates catesbeianus* (Frost et al. 2006), foi introduzida no Brasil na década de 30, a partir de exemplares trazidos do Canadá e instalados em uma fazenda de produção conhecida como Ranário Aurora, no Estado do Rio de Janeiro (Ferreira et al. 2002). Até a década de 70 os tanques de criação e engorda de rãs eram chamados tanques múltiplos, onde se ofereciam diversos tipos de alimentos tais como sobras de abatedouros para a atração de insetos (moscas) e desenvolvimento de suas larvas. Porém o odor desagradável causou um impacto negativo sobre a produção o que culminou com o desenvolvimento de vários outros sistemas de criação e engorda. Com toda gama de estruturas de criação existentes, os produtores brasileiros geralmente acrescentam detalhes ou mesclam sistemas a fim de adequarem-se as suas realidades, dando origem aos chamados sistemas híbridos (Ferreira et al. 2002). Atualmente a ranicultura brasileira é uma alternativa de empreendimento agroindustrial, particularmente para produtores com pouca disponibilidade física por ser rentável em pequenas áreas (Dias et al. 2008).

Todas as grandes concentrações de animais constituem sempre um fator que favorece o aparecimento de doenças, com isto cria-se um ambiente favorável para surtos epizooticos, devido à presença de diferentes organismos patogênicos, que em condições naturais teriam expressão mínima (Pavanelli et al. 2002). Segundo Hipolito (2004), os parasitos, em sua maioria, não levam o animal à morte, porém, podem causar sérios comprometimentos ao seu desenvolvimento. O parasitismo engloba ações em que um dos membros, o parasito, depende metabolicamente de outro, o hospedeiro, podendo ou não,

na dependência de inúmeros fatores causar danos, e estes levarem ao aparecimento da doença parasitária.

Muitos protozoários e metazoários encontrados em anfíbios não estão associados a doenças, a não ser que o hospedeiro esteja estressado ou imunocomprometido. Os anfíbios mais suscetíveis ao parasitismo são os recém capturados, transportados e aqueles mantidos em más condições higiênicas e fora da sua zona térmica ótima de atividade (Wright & Whitaker 2008). Segundo os mesmos autores, os parasitos com ciclo de vida indireto tendem a morrer caso o anfíbio, utilizado como hospedeiro definitivo ou intermediário, não esteja no mesmo ambiente. Em casos de parasitos com ciclo de vida direto, as infecções podem ser intensificadas em ambientes fechados.

Os principais helmintos de interesse sócio-econômico, pela alta prevalência em animais domésticos e selvagens, pertencem ao Filo Nematelminte, compreendendo os nematóides, e ao Filo Platyhelminte formado pelos cestóideos, trematóideos e monogêneos (Almeida & Ayres 1996). Segundo Fagonde Costa (2005) a maioria dos nematóides produz danos que são dependentes do número de parasitos que acometem o animal. Desse modo, a simples presença de alguns vermes, não indica que os hospedeiros estejam sendo prejudicados. A ação patológica dos parasitos depende do órgão afetado, das lesões perfurantes, da intensidade do parasitismo e da contaminação bacteriana secundária (Hipolito 2004).

O conhecimento das doenças parasitárias que acometem os anfíbios de cativeiro encontra-se em fase inicial de estudos. Na literatura especializada os artigos se resumem principalmente a citações de casos e levantamentos sobre a prevalência de parasitos havendo poucos estudos sobre a relação parasito-

hospedeiro. No Brasil, foram citadas as ocorrências de infestações por crustáceos (*Lernaea cyprinacea*), insetos (miíase causada por larva de mosca *Notochaeta* sp), e infecções por acantocéfalos e nematóides como o *Longibucca catesbeiana*, relatadas por Hipolito (2004) em uma revisão sobre o assunto. Já a literatura internacional cita raros casos de infestação por nematóides, tais como o *Eustrongylides* sp, que é considerado um parasito zoonótico, encontrado encistado em músculo de rãs-touro cultivadas no lago Cuitzeo, México (Lezama & Sarabia 2001).

O objetivo do presente estudo foi conhecer as possíveis parasitoses sofridas por rãs criadas comercialmente no Estado de São Paulo, e demonstrar a situação sanitária das criações.

Material e Métodos: O levantamento da helmintofauna foi realizado em cinco ranários de municípios distintos na região do Vale do Paraíba, São Paulo, Brasil (Figura 1). Estes ranários foram denominados A, B, C, D e E; e esta região foi escolhida por apresentar o maior número de ranários ativos no Estado.



Figura 1: Mapa destacando o vale do Paraíba no Estado de São Paulo

Foram coletadas 36 rãs-touro (*Lithobates catesbeianus*) aparentemente saudáveis de cada propriedade, perfazendo um total de 180 indivíduos, entre os meses de Março e Junho de 2008. Os animais pós-metamorfoseados foram coletados de forma aleatória, e redistribuídos em 3 grupos contendo 12 animais cada, conforme sua fase de desenvolvimento dentro do setor de engorda dos ranários.

Também foram coletadas 5 rãs-touro de vida livre (invasoras), nas dependências do ranário B (açude), que permaneciam neste local sem nenhum manejo zootécnico, controle sanitário ou alimentar.

As rãs foram levadas ao Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos do Instituto de Pesca em São Paulo, onde foram acondicionadas em caixas de biotério adaptadas para rã-touro (Bueno-Guimarães 1999)

permanecendo no local por no máximo 4 dias. Diariamente foi realizada a troca de água e alimentação forçada dos animais com ração extrusada contendo 40% proteína bruta.

Antes do sacrifício, os animais foram anestesiados por hipotermia e inspecionados para detectar alguma lesão ou parasito. Posteriormente foram insensibilizados e sacrificados através de secção medular e sangria na altura do Atlas na região cervical, segundo metodologia descrita pela Cornell University (2005).

A necropsia foi realizada em animais a fresco sob microscópio estereoscópico, através de incisão com tesoura a partir da cloaca, expondo toda a cavidade celomática e suas vísceras. Todos os órgãos passíveis de serem parasitados foram retirados e observados separadamente em placas de petri. Observou-se também a cavidade oral e língua.

O conteúdo gástrico e intestinal foi separado para melhor análise e uma parcela deste, presente no terço final do intestino foi destinada ao exame coproparasitológico. Este exame seguiu o método de RITCHIE para pesquisa de ovos de helmintos e possíveis protozoários (Figueira de Mello 1973). Trata-se de um método de centrifugo-sedimentação que consiste em dissolver as fezes em 10 mL de água, filtrar em gaze dobrada em quatro, depositando o material em um tubo cônico, centrifugá-lo a 698,6 x g por 2 minutos, desprezar o sobrenadante e ressuspender novamente em 10 mL de água. Este procedimento foi repetido até que o sobrenadante se apresentasse claro. Em seguida adicionou-se 2 mL de éter e centrifugou-se por mais 2 minutos. Desprezou-se o sobrenadante e examinou-se o depósito ao microscópio de luz adicionando uma gota de solução de lugol.

Adicionalmente, utilizou-se também, outro método de pesquisa de ovos de helmintos com densidades consideradas leves, usando-se solução saturada de sacarose (densidade=1,203) ao invés de água. Neste método de centrifugo-flutuação, semelhante ao de RICHIE não se fez uso de éter (Figueira de Mello 1973).

A mucosa gástrica e a porção anterior do intestino foram raspadas com auxílio de uma espátula, e colocadas em lâmina de vidro com lamínula para detecção de parasitos sob microscopia de luz (Souza Junior et al. 1993).

Os helmintos encontrados foram coletados e fixados em formol 4% aquecido a aproximadamente 65°C segundo Eiras et al. (2006), e levados ao Laboratório de Ictioparasitologia do NUPELIA (Núcleo de Pesquisa em Limnologia, Ictiologia e Aqüicultura) na UEM (Universidade Estadual de Maringá) para identificação. Os helmintos foram desidratados em série alcoólica, clarificados com creosoto de faia e a lâmina montada com Bálsamo do Canadá. A identificação dos espécimes de parasitos foi realizada em microscópio ótico utilizando aumento de 1000x e comparação com as figuras apresentadas em bibliografia (Souza Junior et al. 1993).

A contagem dos parasitos foi realizada usando-se a câmara de McMaster utilizada em laboratórios clínicos para quantificação de ovos de helmintos (Nascimento et al. 2009). Sabendo-se que cada campo de leitura da câmara armazena o volume de 0,15mL e que a câmara possui dois campos, a contagem estimada dos helmintos encontrados pôde ser realizada. Foi feito uma homogeneização do líquido contendo os parasitos, e em seguida foram feitas três leituras diferentes do mesmo hospedeiro, somando-se os parasitos contados e o volume da câmara. O total de formol com helmintos foi

mensurado através de uma proveta. Com este total, foi feita uma regra de três simples, utilizando-se o volume total de formol onde se encontravam os helmintos fixados e assim, estimou-se o total de parasitos. Os cálculos de amplitude, incidência, prevalência e abundância parasitárias seguiram o proposto por Bush et al. (1997).

De forma a complementar as informações do presente estudo foram avaliados os empreendimentos de ranicultura por meio de visitas técnicas e entrevistas aos ranicultores para avaliação das condições higiênicas e sanitárias, manejos preventivo e curativo adotados, manejos zootécnicos, captação e origem de água, lançamento e tratamento dos efluentes, deformações observadas, mortalidade, e destino de carcaças. O objetivo principal foi identificar os fatores de risco sanitário associados à atividade de criação de rãs na região de estudo.

Resultados: Dentre os cinco ranários analisados apenas dois apresentaram animais parasitados, e mesmo assim não foram todos os indivíduos que estavam infectados (baixa prevalência). Apenas uma rã do ranário D e duas rãs do ranário E apresentaram infecção por *Longibucca catesbeiana* no estômago, indicando uma prevalência de 1,66%, abundância média de 14,16%, intensidade média de 850 parasitos e uma amplitude de 729 a 1014 parasitos, para todos os animais de cativeiro estudados (Tabela 1).

Tabela 1. Prevalência, Abundância Média, Intensidade Média e Amplitude parasitária em *Lithobates catesbeianus* provenientes de ranários do Vale do Paraíba no estado de São Paulo (n=185)

Ranário	Prevalência	Abundância média	Intensidade média	Amplitude
A	0	0	0	0
B	0	0	0	0
C	0	0	0	0
D	2,77%	20,25	729,00	729
E	5,55%	50,58	910,50	807 - 1014
Invasoras	80,00%	1015,60	1269,50	700 - 1870
Total	1,66%	14,16	850,00	729 - 1014
Cativoiro				

O animal parasitado do ranário D tinha peso de 357,1 g sendo o maior do grupo, e segundo relatos na propriedade era um animal de um lote já antigo, com idade e peso superiores aos normais para o abate. Já no ranário E as rãs parasitadas pesavam 201,4 g e 167,7 g (Tabela 2), sendo a primeira a maior do grupo e a segunda com peso intermediário, ambas dentro no peso e idade normais para o setor de engorda de um ranário comercial (Ferreira et al. 2002).

Tabela 2. Peso e número de parasitos (*Longibucca catesbeiana*) nos ranários monitorados (D e E), e nos animais invasores estimado através da câmara de McMaster

Animais - Procedência	Número estimado de parasitos
Animal 357,1g - Ranário D	729
Animal 201,4g - Ranário E	807
Animal 167,2g - Ranário E	1014
Animal 356,0g - Invasor	1398
Animal 210,1g - Invasor	700
Animal 254,9 g - Invasor	1870
Animal 315,0 g - Invasor	1110

Os 3 animais parasitados apresentavam vermes apenas no estômago aderidos à mucosa gástrica. As demais víceras e cavidades não apresentaram nenhuma lesão ou estrutura sugestiva de parasitos ou lesões ocasionadas por fixação ou migração dos mesmos, o que nos indica que os mesmos encontravam-se e dentro das condições zootécnicas consideradas apropriadas (Fontanello et al. 1993). O único helminto encontrado foi o nematóide *Longibucca catesbeiana* (Figura 2) descrito por Souza Junior et al. (1993), sendo um nematóide de dimensões reduzidas e que geralmente localiza-se na mucosa gástrica, mas podendo também ser encontrado na mucosa intestinal, medindo entre 520 a 707 μm .



Figura 2 Nematóide *Longibucca catesbeiana* encontrado em mucosa gástrica de rã-touro. Aumento 400x

A Tabela 2 representa o número estimado destes parasitas realizado através da câmara de McMaster para cada hospedeiro. Campos et al. (2007) apud Tavares-Dias et al. (2001) não encontraram diferenças significativas entre a contagem do número total de parasitos e a contagem realizada através de câmara de McMaster evidenciando a eficiência desta técnica.

Os métodos coproparasitológicos utilizados não evidenciaram ovos de helmintos ou cistos de protozoários nas fezes analisadas. Técnicas para identificação de parasitos ovos e cistos em animais vivos precisam ser padronizadas e validadas para organismos aquáticos, evitando o sacrifício de animais e facilitando a coleta de material.

Discussão: O fato de animais maiores estarem mais parasitados pode ter ocorrido devido a um efeito cumulativo, pois os estes são, teoricamente, os animais mais velhos e conseqüentemente tiveram mais oportunidades para adquirirem parasitos.

Measures (1994) diz que o gênero *Longibucca* foi descrito na década de 30 em quatro espécies de morcegos na América do Norte. O mesmo artigo propõe que duas das espécies do nematóide: *Longibucca eptesica* e *Longibucca lasiura* sejam sinônimos. O gênero *Longibucca* também já foi descrito em serpentes sul-americanas como as Muçuranas: *Pseudoboa cloelia* e *Clelia clelia*, segundo Souza Junior et al. (1993). A presença de *Longibucca catesbeiana* causa lesões gástricas e intestinais, hemorragias e apatia dos hospedeiros (Hipolito 2004), porém isto não foi observado no presente trabalho.

Os animais invasores são significativamente mais parasitados que os animais dos ranários D e E, o que pode ser explicado pela adoção de manejos alimentares, zootécnicos e sanitários adequados (Fontanello et al. 1993), ou também porque no ambiente natural há uma maior possibilidades de se fechar o ciclo do parasito.

Poucos trabalhos no Brasil descrevem parasitos de rã-touro, *Lithobates catesbeianus*, criadas comercialmente. Um destes trabalhos é a redescrição do nematóide *Gyrinicola chabaudi* coletado no trato gastrintestinal de girinos provenientes de criatório (Souza Junior & Martins 1996). Outro estudo foi realizado no México sobre lesões de músculo esquelético de rãs-touro criadas comercialmente no lago Cuitzeo, e relata a presença do nematóide zoonótico *Eustrongylides* sp, cuja larva pode além de lesionar, se encistar (Lezama & Sarabia 2001). Estes últimos autores corroboram o objetivo do presente

trabalho sobre a realização de estudos sobre parasitos de rãs de importância comercial, principalmente destinada ao consumo humano, pois estas podem abrigar parasitos zoonóticos como os acima citados.

A grande maioria dos relatos de parasitos de anfíbios são realizados com animais de vida livre, coletados em reservas ecológicas, parques e demais localidades (McAlpine & Burt 1998 e Bursey & Willian 1998). Os anfíbios invasores de ranários, sempre foram capturados e analisados junto às rãs-touro de cativeiro para observação dos parasitos existentes (Souza Junior & Martins 1996 e Souza Junior et al. 1993).

McAlpine & Burt (1998) realizando um estudo de campo em New Brunswick, Canadá, coletaram *Rana catesbeiana*, *Rana clamitans* e *Rana pipiens*, e observaram 4 espécies de cestóides, 14 de digenéticos, 5 de nematóides e 2 de acantocéfalos. Trabalho semelhante foi realizado por Brusey & Willian (1998) em Ohio, EUA, descrevendo em rãs-touro o digenético *Haematoloechus longiplexus* e o nematóide *Rabdias ranae* em pulmão, o cestóide *Opbotaenia gracilis* em intestino delgado, o nematoda *Cosmocercoides variabilis* em intestino grosso, larvas de nematóide *Physaloptera* sp no estômago e o nematoda *Gyrinicola batrachiensis* em intestino de girinos de rã-touro.

Pryor & Bjorndal (2005) eclodiram ovos de rãs-touro em laboratório para posteriores estudos dos efeitos do nematóide *Gyrinicola batrachiensis* no desenvolvimento dos girinos após infestação experimental, concluindo que a relação entre estes animais é de mutualismo já que o desenvolvimento intestinal e a fermentação são favorecidos quando existe presença de nematóides.

Em um levantamento parasitário de rãs-touro livres na natureza, Marcogliese et al. (2000) descreveram a ocorrência do digenéticos do gênero *Diplostomum* sp em girinos de rã-touro habitantes do Rio St. Lawrence, na região de Quebec, Canadá. Também foram realizados estudos sobre variação intraespecífica do digenético *Haematoloechus floedae*, coletado em pulmão de anfíbios de vida livre do gênero *Rana* nas Américas do norte e central (León-Règagnon et al. 2005). Yildirimhan et al. (2006) cita o acometimento da vesícula urinária de *Rana macrocnemis* por monogêneos *Polystoma macrocnemis*, assim como descreve a presença de digenéticos, acantocéfalos e nematóides nestas rãs. Todos estes estudos nos mostram que rãs-touro são passíveis de infestação por helmintos, mas principalmente quando em vida livre, pois pode se inferir que nestes locais ocorra o fechamento do ciclo dos parasitos.

Características biológicas e ecológicas distintas entre os hospedeiros geram diferenças na exposição e nas taxas de infecção/infestação e nos graus de compatibilidade e susceptibilidade pós-infecção (Guidelli et al. 2006). Na maioria dos casos, o hospedeiro possui mecanismos genéticos e imunológicos contra helmintos, já que grande parte dos processos imunológicos estão sob controle genético. Os anticorpos agem principalmente nos helmintos localizados na mucosa do trato digestório. Com a evolução das relações entre parasito e hospedeiro, os helmintos desenvolveram mecanismos de escape do sistema imunológico, os quais são essenciais para sua sobrevivência e multiplicação. (Araujo & Madruga 2001).

O organismo animal possui diversos mecanismos imunológicos contra os agentes patogênicos, infecciosos e parasitários. Barreiras naturais de

proteção, como a pele, as secreções e diversas substâncias biologicamente ativas devem ser superadas por estes agentes. Os helmintos podem enfrentar todas essas barreiras. Com isto, a evolução da relação parasito-hospedeiro, fez com que o primeiro desenvolvesse fenômenos de escape ao sistema imunológico (Soares 2001).

Hipolito (2004) relata que em questionário aplicado a produtores, a maioria afirma adotar medidas preventivas. No questionário feito aos produtores, estes afirmaram adotar medidas como controle de invasores e higienização diária das baias. Porém, o uso de medicamentos como medida preventiva, foi relatado e observado, como uso inadequado em 3 dos ranários visitados. Em 2 das propriedades não se observou controle da qualidade da água, já que a mesma atravessa outros locais antes de chegar à criação. Em todos os ranários, animais domésticos têm acesso ao galpão de engorda das rãs-touro e também não existe local de higienização de sapatos e roupas dos funcionários. Apenas em uma fazenda foi encontrada lagoa de decantação para a os efluentes, antes de este ser desprezado em um curso d'água.

Estudos devem ser realizados para esclarecimento do ciclo de vida do *Longibucca catesbeiana*, já que os animais invasores e sem nenhum controle sanitário e alimentar estavam muito mais parasitados. A relação parasito/hospedeiro também deve ser melhor elucidada, pois se pode supor que, as rãs-touro, por serem exóticas, são resistentes a grande parte dos parasitos existentes, como ocorre com outros animais introduzidos e criados no Brasil.

Conclusão: Mesmo que as medidas preventivas e profiláticas não tenham sido as ideais para a biossegurança nos ranários avaliados, estas se mostraram eficazes, uma vez que houve baixa incidência de infecções por helmintos e demais parasitos, pois se observou apenas uma espécie de nematóide infectando as rãs-touro, e mesmo assim, com baixa prevalência.

Agradecimentos:

Ao NUPÉLIA por proporcionar estrutura e apoio para análise do material coletado e a CAPES pela bolsa concedida..

Referências Bibliográficas:

Almeida M. A., Ayres M. C. 1996. Considerações Gerais Sobre Anti-helmínticos.

In H. S. Spinosa, S. L. Górnjak, M. M. Bernardi. *Farmacologia Aplicada à Medicina veterinária*, Ed. Guanabara, São Paulo, p. 437- 443.

Araújo F. R., Madruga C. R. 2001. Imunidade contra helmintos. In C. R. Madruga, F. R. Araújo, C. O. Soares. *Imunodiagnóstico em Medicina Veterinária*, Embrapa Gado de Corte Campo Grande, p. 97-110.

Bueno-Guimarães H. M. 1999. *Avaliação da resposta da Rana catesbeiana frente às variações ambientais: determinação das condições ideais de manutenção em biotério e da resposta aos poluentes aquáticos*. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo. 180pp.

Bush, A. O. et al. 1997. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. *Revised. Journal of parasitology* 83 (4): 575 – 583.

Burse C. R., William F. D. 1998. Helminths of the Frogs, *Rana catesbeiana*, *Rana clamitans*, and *Rana palustris*, from Coshocton Country, Ohio. *Ohio Journal of Science* 98 (2): 28- 29.

Campos C. M., Moraes F. R. & Pereira G. T. 2007. Método Estimativo para Amostragem Quantitativa de *Rondônia rondoni* (Nematoda ; Atractidae) parasito de Peixes. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 16 (3):174-176.

Cornel University 2005. Fish and Amphibian Euthanasia. Cornel Center for Animal Resources and Education.

Dias D. C., Stéfani M. V., Ferreira C. M, França F. M. 2008. Uso de Probiótico em ração de Rã-touro (*Rana catesbeiana*): Desempenho Produtivo. *Archivos de Zootecnia* 57 (220): 449-455.

Eiras J. C., Takemoto R. M. & Pavanelli G. C 2006. *Métodos de estudo e técnicas laboratoriais em parasitologia de peixes*, UEM, Maringá. 199pp.

Fagonde Costa C. A. 2005. Anti-helmintico. 201-208 In J. Palermo Neto. *Farmacologia Aplicada à Avicultura*. Roca. São Paulo, p. 192-203.

Figueira de Mello E. B. 1973. *Ensaio crítico de método de Mello e Campos para coleta de helmintos em infestações naturais de cães como critério de adequação de técnicas coproscópicas no diagnóstico dessas infestações*. Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo. 123pp.

Ferreira C. M., Pimenta A. G. C., Paiva - Neto J. S. 2002. Introdução à Ranicultura. *Boletim Técnico do Instituto de Pesca* 33 (14): 1 – 15.

Fontanello D., Wirz R. R., Arruda Soares H., Campos B. E. S., Freitas E. A. N., Ferreira C. M. 1993. Comparação de quatro sistemas de engorda de rã-touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802): Tanque-Ilha, Confinamento, Anfigranja e gaiolas. 1- Desenvolvimento ponderal; 2 – Custo operacional. *Boletim do instituto de pesca* 20: 43-58.

Frost D. R., Grant T., Faivovich J., Bain R. H., Haas A., Haddad C. F. B., De Sá R., Channing A., Wilkinson M., Donnellan 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* 297: 1-370.

Guidelli G., Taveschio W. L. G., Takemoto R. M., Pavanelli G. C. 2006. Fauna parasitária de *Leporinus lacustris* e *Leporinus friderici* (Characiformes, Anostomidae) da planície de inundação do alto rio Paraná, Brasil. *Acta Scientiarum. Biological Sciences* 28 (3): 281-290.

Hipolito M. 2004. Manejo Sanitário no Cultivo de Rã.. In M. J. T. Ranzani-paiva, R. M. Takemoto, M. A. P. Lizama . *Sanidade de Organismos Aquáticos*. Varella, São Paulo, 333- 353.

León-Règagnon V., Guillén-hernández S., Arizmendi-espínosa M. A. 2005. Intraespecific Variation of *Haematoloechus Floedae* Harwood, 1932 (Digenea: plagiorchidae), from *Rana* sp. In North and Central America. *Journal of Parasitology* 91(4): 915-921.

Lezama J. R., Sarabia D. O. 2001. Lesiones histológicas em músculo esquelético, causadas por larvas de *Eustrongylides* sp. (Nematoda: Dictophymatidae) em ranas comestibles del Lago Cuitzeo, Michoacán, México. *Veterinaria México* 33(3): 335- 341.

Marcogliese D. J., Rodrigues J., Oullet M., Champoux L. 2000. Natural Occurrence of *Diplostomum* sp. (Digenea: Diplosmatidae) in Adult mudpuppies and Bullfrog Tadpoles from the St. Lawrence River, Québec. *Comparative Parasitology* 67(1): 26- 31.

McAlpine D. F., Burt M. D. B. 1998. Helminthes of Bullfrogs, *Rana catesbeiana*, Green frogs, *Rana clamitans* and Leopard Frogs, *Rana pipiens* in New Brunswick. *The Canadian Field-Naturalist*. 112(1): 50-68.

Measures L. N. 1994. Synonymy of *Longibucca eptesica* with *Longibucca lasiura* (Nematoda: Rhabditoidea) and New host and Geographic records. *Journal of parasitology* 80(3): 486-489.

Nascimento E. M., Furlong J., Pimenta D. S., Prata, M. C. A. 2009. Efeito anti-helmintico do hidrolato de *Mentha villosa* HUBS (lamiacea) em nematóides gástricos de bovinos. *Ciência Rural* 06: 13 - 19.

Pavanelli G. C., Eiras J. C., Takemoto R. M. 2002. *Doença de Peixes; Profilaxia, diagnóstico e tratamento*, UEM. Maringá. 305pp.

Pryor G. S, Bjorndal K. A. 2005. Effects of Nematoda *Gyrinicola batrachiensis* on Development, Gut Morphology, and Fermentation in Bullfrog Tadpoles (*Rana catesbeiana*): A Novel Mutualism. *Journal of Experimental Zoology* 303(A): 704 – 712.

Soares C. O. 2001. Imunodiagnóstico em Medicina Veterinária. In C. R. Madruga, F. R. Araújo, C. O. Soares. *Imunodiagnóstico em Medicina Veterinária*. Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, p. 13-16

Souza Junior F. L., Artigas P. T. & Martins M. L. 1993. *Longibucca catesbeianae* N. SP. (NEMATODA: CYLINDROCORPORIDAE), a gastrointestinal parasite of the bullfrog *Rana catesbeiana* Shaw, 1802 in Brazil. *Research and Reviews in Parasitology*.53(3-4): 97-102.

Souza Junior F. L., Martins L. M. 1996. A Redescription of *Gyrinicola chabaudi* Araujo and Artigas, 1982 (Nematoda: Pharygodonidae), a gastrintestinal parasite of tadpoles. *Revista Brasileira de Biologia* 56(1):19 – 25.

Vazzoler, A. E. A. M. 1996. *Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática*. UEM Maringá. 169pp.

Yildirimhan H. S., Burseley C. R., Goldberg S. R. 2006. Helminthes Parasites of the Taurus Frog, *Rana holtzi*, and the Uludag Frog, *Rana macrocnemis*, with Remarks on the Helminth Community of Turkish Anurans. *Comparative Parasitology* 73(2): 237-248.

Wright K. N., Whitaker B. R. 2008. Anfíbios. In C. M. Kahn, S. Line. Roca. *Manual Merck de Veterinária*, São Paulo, p. 1237-1242.

CAPÍTULO 2

Pesquisa de Partículas Virais em Conteúdo Intestinal de rãs-touro americana, *Lithobates catesbeianus*, através da Microscopia Eletrônica de Transmissão

Antonio M. Antonucci ^{a *}, Márcia H. Catroxo ^b, Marcio Hipolito ^c, Ricardo M. Takemoto ^d, Nataly A. Melo ^e, Fernanda M. França ^f, Patrícia C. Teixeira ^g, Cláudia M. Ferreira ^h

^{a, f, g, h} Instituto de Pesca do Estado de São Paulo. Av. Francisco Matarazzo, 455. São Paulo, SP. Brasil.

* Autor Correspondente: Tel.: +551182974404. E-mail: endorana@yahoo.com.br

^{b, c, e} Instituto Biológico do estado de São Paulo. Av Conselheiro Rodrigues Alves, 1252. São Paulo, SP. Brasil.

^d Laboratório de Ictioparasitologia, Nupélia. Universidade Estadual de Maringá. Av. Colombo, 5790. Maringá. PR. Brasil.

Resumo: Sabendo-se que as fezes são uma importante via de eliminação de agentes virais pelos animais portadores e que por estarem na água, os agentes patogênicos podem se propagar mais rapidamente, objetivou-se a pesquisa de vírus em conteúdo intestinal de rãs-touro (*Lithobates catesbeianus*) de cinco ranários comerciais na região do Vale do Paraíba, no Estado de São Paulo pela técnica de Microscopia Eletrônica de Transmissão. Os grupos virais Coronavírus, Paramixovírus, Parvovírus e Herpesvírus foram observados e fotografados. Este trabalho ressalta a importância da adoção de medidas sanitárias nas criações além da confirmação de que a observação de fezes pela Microscopia Eletrônica de Transmissão é uma eficiente ferramenta de diagnóstico rápido para agentes virais.

Palavras-chave: Vírus, Anfíbios, Herpesvírus, Coronavírus, Paramixovírus, Parvovírus, Rãs-touro

Abstract : It's well-known that feces are the major elimination route of viral agents by animal vectors and, when they are thrown to the water, these pathogens may spread more rapidly. Therefore, this study aimed to search for viruses in the intestinal contents of bullfrogs *Lithobates catesbeianus* proceeding from five farms located in Vale do Paraíba region, São Paulo State, Brazil. The Electronic Transmission Microscopy technique was applied to detect the viruses. Coronavirus, Paramixovirus, Parvovirus and Herpesvirus were observed and photographed. This study emphasizes the importance of sanitary measures on farms and confirms that Electronic Transmission Microscopy is an efficient tool for rapid diagnosis of viral agents.

Key Words: Virus, Amphibian, Herpesvirus, Coronavirus, Paramixovirus, Parvovirus, Bullfrog

Introdução: Vírus acometendo anfíbios são descritos já há algum tempo, principalmente em relatos de acometimento de animais de zoológico ou de animais silvestres (Hipolito et al., 2003). O adenocarcinoma renal conhecido como Tumor de Lucké é uma neoplasia associada ao grupo Herpesvírus e a baixas temperaturas, descrita inicialmente em *Rana pipiens* na América do Norte (McKinnel, 1973 e Williams et al. 1996). Em anuros como *Xenopus laevis* e *R. pipiens* já foi descrita a ocorrência de linfossarcoma associado ao grupo dos Iridovírus. Também já se estabeleceram associações entre anfíbios silvestres, que seriam reservatórios dos vírus causadores das encefalites equina oeste e japonesa B (Hipolito, 2003).

Na ranicultura atual existe uma alta incidência de casos de mortalidade de animais sem um completo esclarecimento da causa, e entre alguns se detectou partículas virais semelhantes ao grupo dos Iridovírus em fígados destes animais provenientes de ranário no Estado de São Paulo (Hipolito et al., 2003). A edemaciação de girinos de rã-touro também já foi associada a um grupo de vírus desoxiribopoliédricos citoplasmáticos, os TEV “tadpole edema vírus” (Hipolito, 2003). Este mesmo autor descreve a presença de partículas semelhantes ao grupo herpesvírus em lesões hepáticas de rãs mortas por problemas de intoxicação, e também em nódulos na musculatura esquelética. Vírus do grupo Togavírus foi observado em líquido de rãs-touro com ascite e do grupo Paramixovírus foi descrito em fígado de girinos mortos por causa desconhecida (Hipolito, 2003).

O Ranavírus é um agente viral pertencente ao grupo dos Iridovírus e que acomete mais especificamente os anfíbios. Atualmente, a doença causada por este vírus é notificável para a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) devido a sua rápida propagação e alta letalidade. O diagnóstico destes vírus pode ser feito através de

imunodiagnósticos e outros sistemas de biologia molecular (Zupanovic et al., 1998). GALLI et al. (2006) relataram a ocorrência de Ranavírus em criações comerciais de rãs no Uruguai e Brasil.

Atualmente as pesquisas de agentes virais estão sendo realizadas não apenas por PCR, mas também por técnicas de microscopia eletrônica e por anti-corpos através do método de ELISA (Zupanovic et al., 1998)

Sabe-se que as fezes são importante via de transmissão de agentes virais, assim como a água e alimentos contaminados (Gregori et al., 2004), o diagnóstico laboratorial deve permitir a identificação dos agentes no próprio material fecal (Jerez et al., 2002). O confinamento de um grande número de animais associado ao desconhecimento e não adoção de procedimentos básicos de limpeza, podem gerar graves problemas e perda de animais, inviabilizando o empreendimento de criação (Hipolito et al., 2002).

Material e Métodos: O presente estudo foi realizado em cinco ranários de municípios distintos na região do Vale do Paraíba, São Paulo, Brasil. Estes ranários foram denominados A, B, C, D e E; e esta região foi escolhida por apresentar o maior número de ranários ativos no Estado de São Paulo, com altitude de 500 670m, latitude de 22°32' a 23°47' e longitude de 44°46' a 45°41'

Foram coletadas 09 rãs-touro (*Lithobates catesbeianus*) aparentemente saudáveis de cada propriedade perfazendo um total de 45 indivíduos, entre os meses de março e junho de 2008. Os animais pós-metamorfoseados foram coletados de forma aleatória em cada propriedade.

As rãs foram levadas ao Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos do Instituto de Pesca em São Paulo, onde foram acondicionadas em caixas de biotério adaptadas para rã-touro (Bueno-Guimarães, 1999) permanecendo no local por no máximo 4 dias. Diariamente foi realizada a troca de água e alimentação forçada dos animais com ração extrusada contendo 40% de proteína bruta.

Pela dificuldade da coleta de fezes dos animais vivos, devido a possível lixiviação das mesmas pela água, contaminação por tecidos e outras substâncias do próprio animal realizou-se a dissecação direta do intestino grosso (Mouriño e Stéfani, 2006).

Antes do sacrifício humanitário os animais foram anestesiados por hipotermia, inspecionados para detectar alguma lesão e, posteriormente insensibilizados e sacrificados através de secção medular e sangria na altura do osso atlas, na região cervical (Cornel University, 2005).

A necropsia foi realizada sob microscópio estereoscópico através de incisão com tesoura a partir da cloaca, expondo toda a cavidade celomática e suas vísceras. Os intestinos foram separados e dissecados com auxílio de tesoura. O conteúdo do intestino grosso foi retirado com espátula e colocado em microtubos de polipropileno devidamente identificados. A cada rã necropsiada foi feita a assepsia da bancada e do material utilizados com álcool 70% para minimizar o risco de contaminação entre as amostras.

Após a coleta as amostras fecais foram imediatamente resfriadas a 5°C por no máximo 24 horas, até de serem levadas ao Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto Biológico de São Paulo para serem processadas e analisadas.

Foram coletados com auxílio de tesoura, fragmentos de intestinos que apresentavam lesões semelhantes macroscopicamente a enterites para a mesma finalidade de observação de partículas virais associadas a estes órgãos.

As amostras foram processadas para observação de partículas virais através da técnica de contrastação negativa por microscopia eletrônica de transmissão. Neste tipo de procedimento as amostras são suspensas em tampão fosfato 0,1M e pH 7,0, colocadas em grades metálicas cobertas com filme de colódio e carbono, drenadas com papel filme, contrastadas negativamente com molibdato de amônio a 2%, pH 5,0 e observadas em microscópio eletrônico de transmissão Philips EM 208 (Catroxo et al., 1998).

A fim de ampliar a pesquisa de partículas virais em conteúdo intestinal de rãs-touro, foram coletadas 2 rãs invasoras que foram analisadas da mesma forma. Estes dois animais eram também rãs-touro, que fugiram do ranário e estavam vivendo livres na natureza sem nenhum tipo de manejo zootécnico, sanitário e alimentar.

Resultados: Foram positivas para presença viral 42 das 45 amostras (91,3%) sendo que duas rãs negativas para vírus pertenciam ao ranário A e uma ao ranário B. Os grupos virais encontrados nas amostras de conteúdo intestinal foram Paramixovírus em 40 dos animais, Coronavírus em 11, Herpesvírus em 7 e Parvovírus em 1. A Tabela 1 indica a prevalência dos grupos virais encontrados.

Três animais que apresentavam Paramixovírus (Figura 1) no conteúdo intestinal apresentavam também lesões intestinais semelhantes à enterite. Na análise destes fragmentos foi observada a presença de partículas virais semelhantes ao grupo Paramixovírus e ao Herpesvírus. O Ranário E apresentou 5 animais com lesões intestinais, sendo que em apenas um dos animais foi observado a presença de Herpesvírus (Figura 2) e em outro a presença de Coronavírus (Figura 3), associados à presença de Paramixovírus.

Um dos animais invasores apresentou no conteúdo intestinal apenas Paramixovírus e no fragmento de lesão intestinal os grupos Paramixovírus e Herpesvírus. O segundo animal apresentou os grupos Paramixovírus e Herpesvírus tanto no conteúdo intestinal, quanto na lesão coletada (Tabela 2).

Discussão: A sobrevivência de um vírus depende da sua capacidade de infecção de novos hospedeiros. A eliminação viral do organismo animal ocorre pela saliva, secreção nasal, urina sêmen e fezes (Kreutz, 2001). A inexistência de processos terapêuticos ou imunização para as viroses confere uma enorme importância às medidas profiláticas, fazendo dos vírus um dos agentes patogênicos mais importantes entre os organismos aquáticos (Pavanelli et al., 2002). Além de ser uma das fontes de eliminação de agentes virais pelo hospedeiro, já foi constatado que vírus entéricos são frequentemente associados à contaminação de alimentos, provavelmente devido ao erro de manipulação (Schmid et. al., 1977).

Em anfíbios, as neoplasias de pele são largamente distribuídas, e já foram descritas no Brasil, como a ocorrência de papilomas em rãs-touro criadas comercialmente, mas não foi estabelecido uma etiologia concreta, podendo ser viral (Souza et al., 1985).

Os Paramixovírus estão amplamente distribuídos entre diversas espécies animais, como bovinos, suínos, eqüinos, aves (Catroxo et al., 1998) e anfíbios (Hipolito, 2003). e por Hipolito et al. (2002) na observação do mesmo grupo viral em fezes de escargots da espécie *Helix aspersa*. São partículas pleomórficas medindo entre 150 e 200nm de diâmetro e com envelope recoberto por espículas.

Estas partículas virais foram também observadas em fígado de girinos de rã-touro mortos por causa desconhecida (Hipolito et al., 2003). Este grupo viral é muito conhecido principalmente por causar sérias doenças em diversas espécies animais, como a grave síndrome entérica e respiratória que acomete aves domésticas e selvagens chamada doença de Newcastle (Oliveira Júnior et al., 2005).

Os Coronavírus são bastante difundidos entre os mamíferos por estarem envolvidos com enterites e diarréias, que são consideradas síndromes de grande complexidade etiológica (Gregori et al., 2000), e que são uma das principais causas de morbi-mortalidade nas criações animais. Nas rãs não conseguimos definir diarréia, mas identificamos conteúdos intestinais mais aquosos. Em bovinos eles estão envolvidos na etiologia de enterites severas com presença de diarréias (Brandão et al., 2007). Através da microscopia eletrônica de transmissão, também já se detectou Coronavírus como agente de enterites e diarréias em suínos (Cappellaro et al., 1998). Os Coronavírus são RNA vírus de cadeia simples, pleomórficos, arredondados ou alongados com envoltório em forma de clava e por isso apresenta um aspecto de coroa solar, medindo, em

média, 140nm de diâmetro e tamanho do virion de 75 a 160 nm (Catroxo et al., 1998), estes vírus também são associados a diarreias em aves silvestres (Catroxo et al., 1998), síndromes respiratórias e problemas reprodutivos em aves industriais (Villarreal et al., 2007).

Alguns animais podem ser portadores assintomáticos de viroses e quando expostos a uma queda de imunidade, pode se desencadear um processo viral, mesmo que a presença viral não possa ser relacionada com a causa *mortis* do animal, não se sabe se a quantidade de partículas virais encontradas contribuem ou não para a piora do quadro (Catroxo et al., 2003).

O grupo viral Herpes é um dos mais conhecidos e estudados por estar amplamente distribuído nas populações de animais de produção e na população humana. Estudos genéticos atribuem a co-evolução deste grupo viral com seus hospedeiros onde ocorrem infecções latentes, sem serem em geral doenças graves com alta mortalidade, favorecendo assim, a disseminação dos Herpesvírus (Franco e Roehe, 2007).

Contudo, subfamílias de Herpesvírus são consideradas um dos principais patógenos em bovinos, caprinos e ovinos, por prejudicar, seriamente, a reprodução destes animais gerando prejuízos econômicos à pecuária (Dias et al., 2008). Também em bovinos os Herpesvírus estão associados a infecções neurológicas como as meningoencefalite e a problemas respiratórios graves. Assim sendo, vários trabalhos já estão sendo desenvolvidos para estudo desta patologia e possíveis tratamentos e imunização dos animais de produção para combate à este grupo viral (Flores et al., 2009).

Herpesvírus são DNA vírus encontrados em várias doenças já bastante conhecidas como Aujeszky em suínos (Pongillupi et al., 2007) e que são facilmente identificados em culturas celulares devido aos seus efeitos citopáticos (Flores et al. 2009). Estudos genéticos avançados e identificação por PRC (Pongillupi et al., 2007), além da pesquisa sorológica para os Herpesvírus também são bastante difundidos.

Em anfíbios selvagens o grupo Herpesvírus é o único, dos grupos observados, que esta associado a um processo patológico determinado, como o tumor de Lucké (Williams et al., 1996). Em rãs-touro criadas comercialmente Hipolito et al. (2003) identificaram partículas de Herpesvírus em fígados e líquido ascítico de animais mortos, provenientes de ranários de São Paulo.

Parvovírus é um grupo viral muito difundido entre animais domésticos como os cães, causando gastroenterites severas, principalmente em filhotes, com desenvolvimento de um quadro clínico bastante característico (Strottmann et al., 2008). Estes DNA vírus podem ser identificados através de sorologias que são largamente utilizadas para diagnóstico destes agentes (Dezengrini et al., 2007) A Hemaglutinação e PCR são utilizados em diagnóstico diferencial, pois esta infecção tem um caráter endêmico nas populações de possíveis hospedeiros (Strottmann et al., 2008).

Conforme Flores (2007) os grupos virais acometem muitos animais, não só domésticos como selvagens, tanto endotérmicos, quanto ectotérmicos (Franco e Roehle, 2007), por isso, o emprego dos princípios de biossegurança são a melhor solução em criação animal para se evitar problemas sanitários e graves impactos econômicos (Bordin et al., 2005). A adoção destes conceitos são indiscutivelmente indispensáveis, já que os grupos virais estão presentes na maioria dos animais. Neste sentido, a adoção da biossegurança é indiscutivelmente indispensável e alguns procedimentos envolvendo

conceitos de HACCP (Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle) e BPM (Boas Práticas de Manejo) podem ser sugeridos para melhorar o desempenho produtivo das criações comerciais de rãs.

Conclusão: A utilização da técnica de contração negativa em microscopia eletrônica de transmissão para detecção de partículas virais deve ser amplamente difundida e utilizada para diagnóstico rápido de infecções por estes agentes.

Agradecimentos:

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto Biológico pelo uso de seus serviços, a CAPES pela Bolsa concedida e ao Instituto de Pesca de São Paulo.

Referências Bibliográficas

Brandão, P. E., Gregori, F., Sforsin, A. J., Vilarreal, L. Y. B., Jerez, J. A., 2007. Winter Dysentery in cows Associated with Bovine Coronavirus (BCoV). *Arq Bras Med Vet Zootec* 59, 45-49.

Bordin, R. de A., Pereira, C. A. D., Eboli, M., Artilheiro, R., Freitas, C., 2005. Biosseguridade aplicada nas granjas de aves e de suínos. *Revista Ciências Veterinária* 3, 11-16.

Bueno-Guimarães, H. M., 1999. Avaliação da resposta da *Rana catesbeiana* frente às variações ambientais: determinação das condições ideais de manutenção em biotério e da resposta aos poluentes aquáticos. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo. pp.180

Cappellaro, C. E. M. P. D. M., Bersano, J. G., Catroxo, M. H. B., Mueller, S. B. K., 1998. Presença de Coronavírus Associado a Surtos de gastroenterite em Suínos no Município de Mairinque, SP no ano de 1988. *Arq Inst Biológico* 65, 111-116

Catroxo, M. H. B., Silva, J. C. R., Menezes, A. C. de, Curi, N. A., Schmich, H., 2000. Presença de Partículas Semelhantes a Corona e Paramixovírus em Fezes de Aves Silvestres (Passeriformes e Psittaciformes) In: M. A. dos S. Alves, A ornitologia no Brasil: Pesquisa atual e Perspectivas. Rio de Janeiro. PP. 161-169.

Catroxo, M. H. B., Godoy, S. N., Milanelo, L., Curi, N. A., 2003. Detecção de Partículas Semelhantes ao Coronavírus em Intestino Delgado de Quati (*Nosua nosua*) por Microscopia Eletrônica de Transmissão. *Arq Inst Biológico* 70 Suplemento 3.

Cornell University 2005. Fish and Amphibian Euthanasia. Cornell Center for Animal Resources and Education

Dias, J. A., Alferi, A. A., Medici, K. C., Freitas, J. C., Ferreira Neto, J. S., Müller, E. E., 2008. Fatores de Risco Associados à Infecção pelo Herpesvírus Bovino 1 em Rebanhos bovinos da Região Oeste do estado do Paraná. *Pesq Vet Bras* 28

Dezengrini, R., Weiblen, R., Flores, E. F., 2007. Soroprevalência das Infecções por Parvovírus, Adenovírus, Coronavírus canino e pelo Vírus da Cinomose em Cães de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciência Rural* 37

Franco, A. C., Roeche, P. M., 2007. Herpesviridae. In: Flores E. F., *Virologia Veterinária*. UFMS. Santa Maria, pp. 433- 488.

Flores, E. F., Weiblen, R., Vogel, F. S. F., Desengrini, R., Almeida, S. R. de, Spilki, F. R., Roeche, R. M., 2009 Neuropatogênese experimental da Infecção pelo Herpesvírus Bovino tipo 3 em Coelhos. *Pesq Vet Bras* 29

Gregori, F., Brandão, P. E., Rosales, C. A. R., Cortez, A., Heinemann, M. B., Richtzhein, L. J., Jerez, J. A., 2000. Desenvolvimento de um Método de ELISA para a Detecção de Rotavírus a partir de Material Fecal. *Arq Inst Biológico* 67, 191-194.

Gregori, F., Ruiz, V. L. de A., Bersano, J. G., Centofanti, T., 2004. Rotavírus em Criações de Suínos. *Biológico* 66, 11-12

Hipolito, M., Catroxo, M. H. B., Curi, N. A., Schmich, H., 2002. Detecção ao Microscópio Eletrônico de Transmissão de partículas virais do grupo Toga e Paramixovírus em Mollusca Gastropoda Pulmonata *Helix aspersa* (escargot) Helicidae e grupo Paramixovírus em lesma *Aginulus sp.* Veronicelidae. *Arq Inst Biológico* 69, 113-115.

Hipolito, M., Catroxo, M. H. B., Curi, N. A., Ferreira, C. M., Bach, E. E., 2003. Detecção ao Microscópio Eletrônico de Transmissão de Partículas semelhantes ao grupo Iridovírus em rã-touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802) criadas comercialmente, primeiras observações no Brasil. Arq Inst Biológico 70 Suplemento 3.

Hipolito, M., Catroxo, M. H. B., Curi, N. A., Bach, E. E., 2003. Detecção ao Microscópio Eletrônico de Transmissão de partículas virais Semelhantes aos Grupos Herpes, Toga e Paramixovírus em Rãs-touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802) Criadas Comercialmente. Primeiras Observações no Brasil. Arq Inst Biológico 70, 107-111.

Jerez, A. A., Brandão, P. E., Buzinaro, M. G., Gregori, F., Rosales, C. A. R., Ito, F. H., Sakai, T., 2002. Detecção de Rotavírus e Coronavírus em Fezes de bezerros neonatos com Diarréia Criados em Vários Municípios de Estado de São Paulo. Arq Inst Biológico 69,19-23.

Kreutz, L. C., 2001. Imunidade Contra Vírus. In: Madruga, C. R., Araújo, F. R. de, Soares, C. O. Imunodiagnóstico em Medicina Veterinária, Campo Grande pp. 19-33.

McKinnel, R. G., 1973. The Lucké Frog Kidney Tumor and Herpesvírus. American Zoologist 13, 97-114.

Mouriño, J. L. P., Stéfani, M. V., 2006. Avaliação de métodos de coleta de fezes para determinação de digestibilidade protéica em Rã-touro (*Rana catesbeiana*). Ciência Rural 36,1-7

[Oie.int](http://www.oie.int). [homepage on the Internet] Paris: Organização Internacional de Epizootias. (cited 2009 Aug 05) Available from: <http://www.oie.int>

Oliveira Junior, J. G. de, Schiavo, P. A., Doretto Junior, L., Orsi, M. A., Mazur, C., Andrade, C. de M., 2005. Isolamento e Caracterização biológica da Amostra JAP99 do Vírus da Doença de Newcastle Isolada em Patos Domésticos (*Neta sp.*) no Rio de Janeiro. Ciência Rural 35.

Pavanelli, G. C., Eiras, J. C., Takemoto, R. M., 2002. Doenças de Peixes. Universidade Estadual de Maringá, Maringá, pp. 305.

Pongiluppi, T., Bersano, J. G., Moreno, A. M., Borges, S. R. T., Petrella, S., Ogata, R. A., Gregori, F., Ruiz, V. L. A., Catroxo, M. H. B., 2007. Pesquisa de Agentes Virais em Semen de Suínos pelas Técnicas de Microscopia Eletrônica de Transmissão e PCR (Reação em cadeia pela Polimerase). Laes & Haes 166, 108- 127.

Pongiluppi, T., Bersano, J. G., Borges, S. R. T., Petrella, S., Vieira, J. C. F., Catroxo, M. H. B., 2008. Padronização da Técnica de Contrastação Negativa para a Identificação de paramixovírus em Sêmen de Suíno. Laes & Haes 172,126-140.

Schimid, A. W., Stewien, K. E., Candeias, J. A. N., 1977. Evidenciação de Vírus patogênico Humano em Filés de Peixe. Rev saúde Pública 11, 405-409.

Souza, C. W. O. de, Arantes, G. J., Coelho, H. E., Lúcio, N. F., Silva, N. R. da, Lúcio, W. F., 1985. Papiloma em Rãs-touro (*Rana catesbeiana*, Shaw, 1802). Rev C Ciênc Biom Univ Fed Uberlândia, 1, 63-65.

Strottmann, D. M., Scortegagna, G., Kreutz, L. C., Barcellos, L. J. G., Frandoloso, R., Anzillero, D., 2008. Diagnóstico e estudo Sorológico da Infecção pelo Parvovírus canino em Cães de Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brasil. Ciência Rural 38.

Villareal, L. Y. B., Brandão, P. E., Chacón, J. L., Assayag, M. S., Maiorka, P. C., Raffi, P., Saidenberg, A. B. S., Jones, R. C., Ferreira, A. J. P., 2007. Orchitis in Roosters with Fertility Associed with Avian Infectious Bronchitis Vírus and Avian. Avian Disease 51, 970-974.

Williams, J. W., Tweedell, K. S., Sterling, D., Marshall, N., Christ, C. G., Carlson, D. L., McKinnel, R. G., 1996. Oncogenic herpesvírus DNA absence in Kidney cell lines established from the northern leopard frog *Rana pipiens*. Dis Aquatic Organ 27, 1-4.

Zupanovic, Z., Lopez, G., Hyatt, A. D., Green, B., Bartran, G., Parkes, H., Whittington R J, Speare R 1998. Giant toads *Bufo marinus* in Australia and Venezuela hava antibodies against ‘ranaviruses’.. Disf Aquatic Organ 32, 1-8.

Tabelas:

Tabela 1: Número de animais (*Lithobates catesbeianus*) e prevalência de cada grupo viral encontrado

Grupo Viral	Número de animais	Prevalência (%)
Paramixovírus	40	87
Coronavírus	11	24
Herpesvírus	7	15
Parvovírus	1	2

Tabela 2: Grupos virais presentes nos fragmentos de lesão intestinal semelhantes macroscopicamente a enterites, em cada animal analisado contendo estas lesões

Grupo Animal	Animal	Grupo Viral
Ranário B	1	Paramixovírus e Herpesvírus
Ranário B	5	Paramixovírus e Herpesvírus
Ranário B	6	Paramixovírus e Herpesvírus
Ranário E	2	Paramixovírus e Coronavírus
Ranário E	3	Paramixovírus
Ranário E	4	Paramixovírus e Herpesvírus
Ranário E	5	Paramixovírus
Ranário E	8	Paramixovírus
Invasor	1	Paramixovírus e Herpesvírus
Invasor	2	Paramixovírus e Herpesvírus

Legenda das Figuras:

Figura 1 – Fotomicrografia obtida através de Microscopia Eletrônica de Transmissão de Paramixovírus em conteúdo intestinal de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*). Barra representa 180 nm.

Figura 2 - Fotomicrografia obtida através de Microscopia Eletrônica de Transmissão de Herpervírus em conteúdo intestinal de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*). Barra representa 150 nm.

Figura 3 - Fotomicrografia obtida através de Microscopia Eletrônica de Transmissão de Coronavírus em conteúdo intestinal de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*). Barra representa 130 nm.

Figuras:

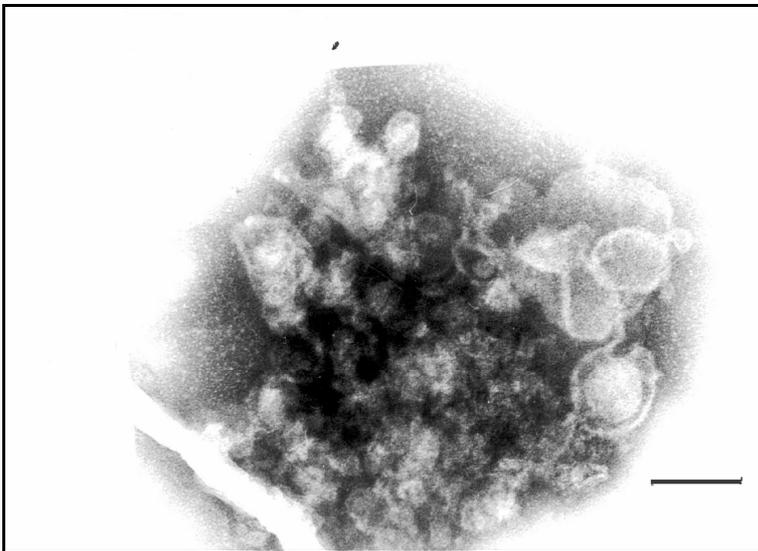


Figura 1

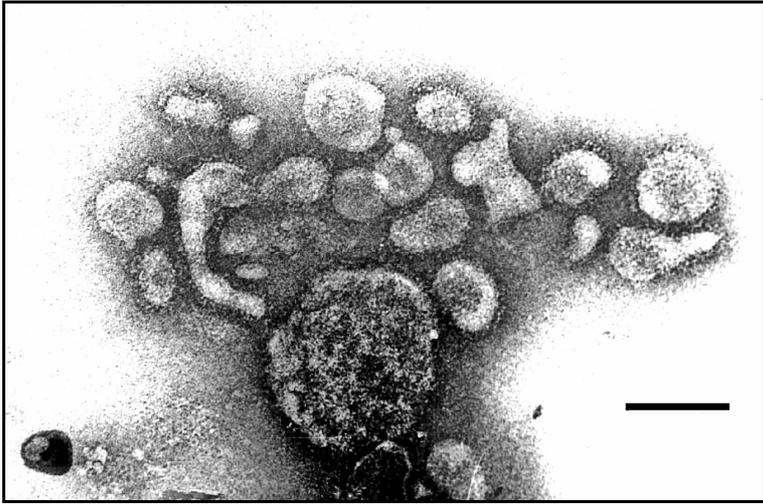


Figura 2

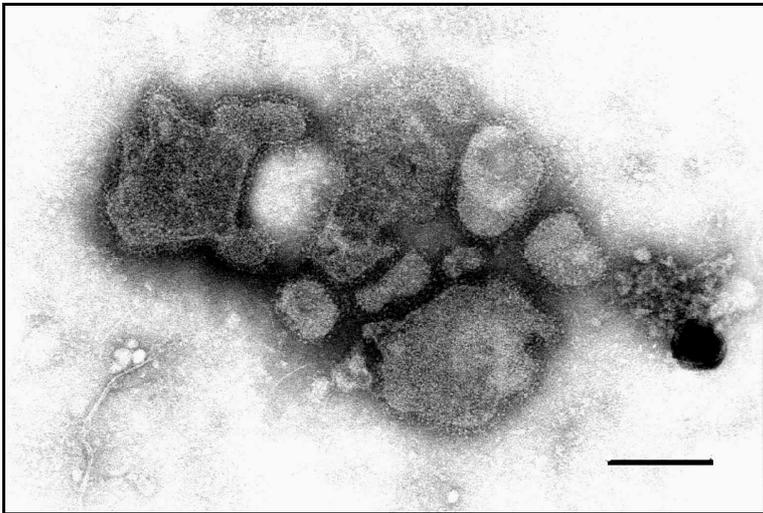


Figura 3

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através da pesquisa da hemintofauna de rãs-touro foi encontrada apenas uma espécie de nematóide, o *Longibucca catesbeiana* e mesmo não tendo medidas preventivas e profiláticas ideais em biossegurança nos ranários avaliados, houve baixa prevalência deste parasito entre os animais de cativeiro. Algumas hipóteses podem ser levantadas para explicar esta situação:

- o fato da rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) ser um animal exótico, e que apesar de introduzido no Brasil na década de 30, apresentar resistência aos parasitos endêmicos de nossa região. Esta situação ocorre com outras espécies de organismos aquáticos introduzidos em nosso país como a tilápia, por exemplo.
- a possibilidade dos parasitos não conseguirem realizar o fechamento de seu ciclo biológico nas instalações de cativeiro das rãs.

Com relação aos grupos virais encontrados pode-se concluir que a utilização da técnica de contrastação negativa em Microscopia Eletrônica de Transmissão para detecção de partículas virais, deve ser amplamente difundida e utilizada para diagnóstico rápido de infecções por estes agentes. Contudo, os estudos sobre a relação vírus/célula/hospedeiro e sua sorologia devem ser aprofundados já que ainda não se pode definir se as rãs-touro são prejudicadas ou agem apenas como reservatórios destes grupos virais. Ainda, deve-se pesquisar se estes vírus são os mesmos que ocorrem em outros organismos da mesma propriedade, já que todos os grupos virais encontrados tiveram descrição nos animais de criação e que muitos deles geram graves problemas sanitários e econômicos.

Estudos e padronização de técnicas de identificação de agentes parasitários e virais em animais vivos devem ser realizados para que os trabalhos de coleta de material e diagnóstico de doenças sejam facilitados e ocorram com maior rapidez.

A adoção da biossegurança é indiscutivelmente indispensável e alguns procedimentos envolvendo conceitos de HACCP (APPCC - Análise de Perigos

e Pontos Críticos de Controle) e GMP (BPM - Boas Práticas de Manejo) podem ser sugeridos para melhorar o desempenho produtivo das criações comerciais de rãs. Estes programas de biossegurança podem ser adotados para qualquer etapa de criação das rãs-touro, bem como no combate de quaisquer agentes patogênicos. A adoção de medidas preventivas, e de bons manejos zootécnicos, sanitários e alimentares são as melhores alternativas para se obter uma produção rentável de rãs.

ANEXOS

**Orientação aos Autores – Revista:
Memórias do Instituto Oswaldo
Cruz**

O manuscrito (incluindo tabelas e referências) deve ser preparado em um software para edição de textos, em espaço duplo, fonte 12, paginado. As margens devem ser de pelo menos 3 cm. As figuras deverão vir na extensão tiff, com resolução mínima de 300 dpi. Tabelas e figuras deverão vir em documentos separados.

Deve ser organizado de acordo com a seguinte ordem:

Título resumido: com até 40 caracteres (letras e espaços)

Título: com até 250 caracteres

Autores: sem títulos ou graduações

Afiliação institucional: endereço completo somente do autor correspondente

Resumo: com até 200 palavras (100 palavras no caso de comunicações breves). Deve enfatizar novos e importantes aspectos do estudo ou observações.

Palavras-chave: devem ser fornecidos de 3 a 6 termos, de acordo com a lista Medical Subject Headings (Mesh) do Index Medicus.

Notas de rodapé: indicando a fonte de financiamento e mudança de endereço

Introdução: deve determinar o propósito do estudo, oferecer um breve resumo (e não uma revisão de literatura) dos trabalhos anteriores relevantes, e especificar quais novos avanços foram alcançados através da pesquisa. A introdução não deve incluir dados ou conclusões do trabalho em referência.

Materiais e Métodos: deve oferecer, de forma breve e clara, informações suficientes para permitir que o estudo seja repetido por outros pesquisadores. Técnicas padronizadas bastam ser referenciadas.

Ética: ao descrever experimentos relacionados a temas humanos, indicar se os procedimentos seguidos estiveram de acordo com os padrões éticos do comitê responsável por experimentos humanos (institucional ou regional) e de acordo com a Declaração de Helsinki de 1975, revisada em 1983. Ao relatar experimentos em animais, indicar se diretrizes de conselhos de pesquisa institucionais ou nacionais, ou qualquer lei nacional relativa aos cuidados e ao uso de animais de laboratório foram seguidas.

Resultados: devem oferecer uma descrição concisa das novas informações descobertas, com o mínimo julgamento pessoal. Não repetir no texto todos os dados contidos em tabelas e ilustrações.

Discussão: deve limitar-se ao significado de novas informações e relacionar as novas descobertas ao conhecimento existente. Somente as citações indispensáveis devem ser incluídas.

Agradecimentos: devem ser breves e concisos e se restringir ao absolutamente necessário.

Referências: devem ser precisas. Somente as citações que aparecem no texto devem ser referenciadas. Trabalhos não publicados, a não ser os já aceitos para publicação, não devem ser citados. Trabalhos aceitos para publicação devem ser citados como " in press "; nesse caso, uma carta de aceitação da revista deverá ser fornecida. Dados não publicados devem ser citados somente no texto como " unpublished observations "; nesse caso, uma carta com a permissão do autor deve ser fornecida. As referências ao final do manuscrito devem ser organizadas em ordem alfabética de acordo com o sobrenome do primeiro autor.

Os títulos de revistas devem ser abreviados de acordo com o estilo usado no Index Medicus.

Consultar: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=journals&TabCmd=Limits>.

• **No texto, usar o sobrenome do autor e a data:**
Lutz (1910) ou (Lutz 1910).

Com dois autores, a forma é:
(Lutz & Neiva 1912) ou Lutz and Neiva (1912).

Quando há mais que dois autores, somente o primeiro é mencionado:
Lutz et al. (1910) ou (Lutz et al. 1910).

• **Nas referências, usar os seguintes estilos:**
Artigo de revista

Chagas C, Villela E 1922. Forma cardíaca da tripanosomiase americana. Mem Inst Oswaldo Cruz 14: 15-61.

Livro ou Tese
Forattini OP 1973. Entomologia Médica. Psychodidae, Phlebotominae, Leishmaniose, Bartonelose, Vol. IV, Edgard Blucher, São Paulo, 658 pp.

Morel CM 1983. Genes and Antigens of Parasites. A Laboratory Manual, 2nd ed., Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, xxii + 580 pp.

Mello-Silva CC 2005. Controle alternativo e alterações fisiológicas em *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), hospedeiro intermediário de *Schistosoma mansoni* Sambom, 1907 pela ação do látex de *Euphorbia splendens* var. *hislopii* N.E.B (Euphorbiaceae), PhD Thesis, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 85 pp.

Capítulo de livro
Cruz OG 1911. The prophylaxis of malaria in central and southern Brasil. In R Ross, The Prevention of Malaria, John Murray, London, p. 390-398.

Artigo de revista na Internet
Aboud S. Quality improvement initiative in nursing homes: the ANA acts in an advisory role. Am J Nurs [serial on the Internet]. 2002 Jun [cited 2002 Aug 12];102(6):[about 3 p.]. Available from:
<http://www.nursingworld.org/AJN/2002/june/Wawatch.htm>

Monografia na Internet
Foley KM, Gelband H, editors. Improving palliative care for cancer [monograph on the Internet]. Washington: National Academy Press; 2001 [cited 2002 Jul 9]. Available from: <http://www.nap.edu/books/0309074029/html/>.

Homepage/Web site
Cancer-Pain.org [homepage on the Internet]. New York: Association of Cancer Online Resources, Inc.; c2000-01 [updated 2002 May 16; cited 2002 Jul 9]. Available from: <http://www.cancer-pain.org/>.

Parte de uma homepage/Web site
American Medical Association [homepage on the Internet]. Chicago: The Association; c1995-2002 [updated 2001 Aug 23; cited 2002 Aug 12]. AMA Office of Group Practice Liaison; [about 2 screens]. Available from: <http://www.ama-assn.org/ama/pub/category/1736.html>

BASE DE DADOS NA INTERNET

Acesso aberto:
Who's Certified [database on the Internet]. Evanston (IL): The American Board of Medical Specialists. c2000 - [cited 2001 Mar 8]. Available from: <http://www.abms.org/newsearch.asp>

Acesso fechado:
Jablonski S. Online Multiple Congenital Anomaly/Mental Retardation (MCA/MR) Syndromes [database on the Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). c1999 [updated 2001 Nov 20; cited 2002 Aug 12]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/mesh/jablonski/syndrome_title.html

Parte de uma base de dados na Internet
MeSH Browser [database on the Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US); 2002 - [cited 2003 Jun 10]. Meta-analysis; unique ID: D015201; [about 3 p.]. Available from: <http://www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html> Files updated weekly. Updated June 15, 2005

• **Ilustrações:** figuras e tabelas devem ser compreensíveis sem a necessidade de referência ao texto.

- Figuras: as fotografias devem ser bem nítidas, com alto contraste, ampliadas em preto e branco em papel brilhante, se apresentadas lâminas, as figuras devem ser numeradas consecutivamente em algarismos arábicos. As escalas devem ser indicadas por uma linha ou barra na figura, e referenciadas, se necessário, na legenda (por exemplo, bar = 1 mm etc.). Lâminas e gráficos devem ajustar-se tanto em uma coluna (8 cm) ou na largura completa (16.5 cm) da página, e devem ser menores que a página para permitir a inclusão da legenda. As letras e números nas figuras devem ter tamanho legível após a redução ou a impressão. Ilustrações coloridas somente podem ser aceitas se os autores assumirem os custos. Por outro lado, uma fotografia colorida ilustra a capa de cada fascículo de Memórias, e os autores são convidados a submeter para consideração da revista ilustrações com legendas de seus manuscritos que poderão vir a ilustrar a capa.

- Tabelas: devem complementar, e não duplicar, o texto. Elas devem ser numeradas em algarismos romanos. Um título breve e descritivo deve constar no alto de cada tabela, com quaisquer explicações ou notas de rodapé (identificadas com letras a, b, c etc.) colocadas abaixo.

• **Comunicações breves:** devem ser breves e diretas. Seu objetivo é comunicar com rapidez resultados ou técnicas particulares. As comunicações não devem ocupar mais do que três páginas impressas, incluindo figuras e/ou tabelas. Não devem conter referências em excesso. As referências devem ser citadas no final do

texto, usando o mesmo formato para artigos originais. Um resumo breve e três palavras-chave devem ser apresentados.

- **Formato alternativo:** Os manuscritos podem ser submetidos seguindo os "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" produzidos pelo International Committee of Medical Journal Editors, também conhecidos como Vancouver Style. Nesse caso, os autores devem seguir as diretrizes da quinta edição (Annals of Internal Medicine 1997; 126: 36-47, ou no website <http://www.acponline.org/journals/resource/unifreqr/htm>), sendo responsáveis por modificar o manuscrito onde diferir das instruções aqui apresentadas, se o manuscrito for aceito para publicação. Os autores também deverão seguir os Uniform Requirements para quaisquer outras diretrizes omitidas nestas instruções.

Uma vez que um trabalho seja aceito para publicação, os autores devem enviar:

- uma declaração de **affidavit** fornecida pela produção editorial da revista, assinada por todos os autores. Autores de diferentes países ou instituições podem assinar em diferentes folhas que contenham a mesma declaração.
- uma declaração de **copyright** fornecida pela produção editorial da revista, assinada pelo autor responsável pela correspondência.
- **Taxas:** a revista não cobra taxas para publicação.
- **Provas:** serão enviadas provas tipográficas aos autores para a correção de erros de impressão. As provas devem retornar para a Produção Editorial na data estipulada. Outras mudanças no manuscrito original não serão aceitas nesta fase.

**Orientação aos Autores –
Periódico: The Veterinary Journal**

Guia para Autores

O Jornal Veterinário é uma revista internacional de investigação veterinária, que publica trabalhos originais e opiniões sobre todos os aspectos da ciência veterinária. Contribuições relatórios trabalho de investigação nas áreas científicas que envolvem espécies veterinários são particularmente bem-vinda. Os editores terão prazer em considerar as sugestões para Assuntos Especiais sobre temas de importância tópica. A revista também publica resenhas de livros.

Manuscritos

Os artigos podem descrever trabalhos originais em um Full Paper (Artigo original) ou uma comunicação de curta ou podem constituir uma revisão do estado actual do conhecimento sobre um aspecto particular da ciência veterinária. As análises devem, em geral, ser escrito em suporte de investigações originais. Relatos de Casos não são publicados.

Quando os animais têm sido utilizados em um estudo, o bem-estar institucional ética animal ou autoridade sob a qual o trabalho foi realizado deve ser indicado, juntamente com o número específico de autorização de referência. Circunstâncias relativas à experimentação animal devem satisfazer as *Princípios Orientadores Internacional para a Pesquisa Biomédica Envolvendo Animais*, Emitido pelo Conselho de Organizações Internacionais de Ciências Médicas. Estas diretrizes são obtidas a partir de: Secretário Executivo CIOMS, c / WHO, Appia, CH-1211 Genebra 27, Suíça, ou no seguinte URL: http://www.cioms.ch/frame_1985_texts_of_guidelines.htm.

O Jornal irá rejeitar qualquer papel em que haja razões para crer que os animais tenham sido submetidos a sofrimento desnecessário ou evitável ou sofrimento. Para mais orientações, autores são referidos *O Jornal Veterinário* (2008) 175, 1-2. (["Artigo de opinião"](#))

Apresentação dos manuscritos

Submissão de manuscritos para *O Jornal Veterinário* é online, através da Editorial Elsevier System - ver <http://ees.elsevier.com/ytvjl>. Os autores serão guiados passo a passo o que lhes permite fazer upload de arquivos diretamente de seu computador. As opções serão dadas para que os autores selecionar um conjunto de classificações de seus trabalhos, bem como a designação da categoria (artigo original, revisão, Short comunicação etc), a partir de uma determinada lista. formato de documento eletrônico portátil (pdf) provas será gerada automaticamente a partir de upload de arquivos e estes são utilizados para a revisão subsequente. Os autores devem enviar os artigos em formato Word e *não* como arquivos PDF. Consultas sobre o processo de submissão ou revista procedimentos devem ser enviadas por e-mail para: AuthorSupport@elsevier.com.

O autor correspondente será solicitado para confirmar que o artigo é original e não está sendo considerado para publicação em outro lugar. Apresentação também implica que todos os autores aprovaram o documento para a liberação e estão de acordo com seu conteúdo. Após a aceitação do artigo por *O Jornal Veterinário* Autor (s) será convidado a transferir os direitos autorais do artigo para o Publisher. Esta transferência irá garantir a mais ampla divulgação possível das informações.

Todos os autores deveriam ter feito contribuições substanciais para todas as seguintes características: (1) a concepção e desenho do estudo, ou a aquisição de dados, ou análise e interpretação dos dados, (2) redação do artigo ou revisão crítica relevante do conteúdo intelectual e (3) aprovação final da versão a ser apresentada.

Todos os contribuintes que não cumprem os critérios de autoria definidos acima devem ser listadas em uma seção de Agradecimentos. Exemplos daqueles que podem ser reconhecidas incluem uma pessoa que prestaram apoio puramente técnico, auxílio na redação ou chefes de departamento que tenham dado apenas apoio geral.

Conflito de interesses

No final do texto, sob um subtítulo "Conflito de declaração de interesse" de todos os autores devem revelar todas as relações pessoais e financeiros com outras pessoas ou organizações que poderiam influenciar inapropriadamente (bias) o seu trabalho. Exemplos de potenciais conflitos de interesse incluem o emprego, consultorias, participação acionária, honorários pagos prova pericial, os pedidos de patentes / registros, e de subvenções ou outros financiamentos. Se não existir conflitos de interesse, isto deve ser declarado como "Nenhum dos autores deste trabalho tem relações financeiras ou pessoais com outras pessoas ou organizações que poderiam influenciar

inapropriadamente ou viés do conteúdo do papel".

Papel da fonte de financiamento

Todas as fontes de financiamento devem ser declarados em uma seção de agradecimentos no final do texto. Os autores devem declarar o papel dos patrocinadores do estudo, se for o caso, no desenho do estudo, na recolha, análise e interpretação dos dados, na redação do manuscrito e na decisão de submeter o manuscrito para publicação.

Formato e layout

Autores que apresentam trabalhos que são adequados para análise, mas que não cumprir integralmente este guia será convidado a alterar o texto e voltar a apresentar. Modelo em formato WORD artigo estão disponíveis:

- [Artigo](#) [Original](#)
- [Curta](#) [Comunicação](#)
- [Revisão](#)
- [Resenha](#)
- [Guest](#) [Editorial](#)

Os artigos devem ser escritos no idioma Inglês. Reino Unido ou E.U. Inglês é o preferido. Autores cuja primeira língua não é Inglês são aconselhados a consultar um falante nativo Inglês familiarizado com seu campo *antes da apresentação*. Os Editores vão decidir se o uso do Inglês é de um nível satisfatório. Se não, a proposta será rejeitada ou devolvidos aos autores para revisão. Por favor, note que há um número de organizações comerciais que irão auxiliar os autores não falam Inglês na preparação de seus manuscritos para a publicação internacional em revistas. Mais conselhos está disponível em Elsevier <http://www.elsevier.com/locate/languagepolishing>

Artigos originais não devem ser maiores do que 3.000 palavras de comprimento excluindo tabelas, figuras e referências. Comentários devem ser cerca de 4.000 palavras e Comunicações Breves não mais do que mil palavras.

números das linhas contínuas são necessárias ao longo do texto.

Use espaçamento duplo, exceto para a página de título, legendas e referências, que devem estar em espaçamento simples. Times New Roman, tamanho 12 pt, é o preferido. A menor tamanho da fonte pode ser utilizada nos quadros se o espaço é limitante. A formatação não deve ser personalizadas como esta edição impede.

Todos os contributos são sujeitos a revisão editorial. A decisão do editor será final.

seqüências de nucleotídeos. Submissão de um manuscrito implica que os dados de seqüência de nucleotídeos primário será depositado com depositário disponíveis internacionalmente. números de seqüência deve ser fornecida no manuscrito.

Página de Título

A página de título deve ser incluído no início do artigo. Isto deve dar o título do trabalho, os nomes dos autor (s), nome (s) e endereço (s) instituição (ões) onde o trabalho foi feito e endereços de outros autores que diferem. Se o artigo é uma revisão a curto ou comunicação, esta deve ser claramente indicado no centro da parte superior da página de título.

Exceto onde todos os autores vêm do mesmo departamento, cada autor deve ser identificado através de um sobrescrito carta (^a, ^b, ^c etc), e autor correspondente designado por um asterisco (*) como segue:

A prevalência de úlceras gástricas em cavalos de endurance: Um relatório preliminar.

Jorge E. Nieto ^{a, *}, Jack R. Snyder ^{um}, Pablo Beldomenico ^{um}, Aleman Monica ^b, James W. Kerr ^c, Sharon J. Spier ^b

^{um} *Laboratório de Gastroenterologia Comparada, Departamento de Ciências Veterinárias Cirúrgica e Radiológica, University of California, Davis, CA95616, E.U.A.*

^b *Departamento de Medicina e Epidemiologia na Universidade da Califórnia, Davis, CA95616, E.U.A.*

^c *Equine Veterinary Service Napa, Napa, CA94558, E.U.A.*

Os detalhes de contato completo do autor correspondente deve então ser dada usando o seguinte formato:

* Autor para correspondência. Tel.: +1 530 752 0290 +1 530 752 0290 fax;: +1 530 752 6042.+1 530 752 0290 +1 530 752 0290 ; Fax: +1 530 752 6042.
Endereço e-mail: jeniето@ucdavis.edu (J. E. Nieto).

Artigos

Artigos Originais devem ser dispostas da seguinte forma: (1) Página título, (2) um resumo de no máximo 200 palavras (sem subtítulos), que deverá enfatizar os objetivos, o procedimento experimental, resultados e conclusões, até cinco palavras-chave devem ser fornecidas abaixo do resumo, (3) texto principal sub-dividido em Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão, Conclusões, (4) declaração de eventuais conflitos; (5) Agradecimentos, (6) Apêndice A. material complementar (se esta é prestado; veja abaixo); (7) Referências, (8) Quadros (9); Figura lendas, (10) Figuras. As seções não devem ser numeradas. Resultados e Discussão devem ser distintos e não são contabilizados. Sempre que possível, os quadros devem ser incluídas no artigo (seqüencialmente após as referências com uma tabela por página), mas os números devem ser enviados em arquivos separados (Figura 1, Figura 2 etc.) A primeira pessoa (eu, nós, nosso etc) não devem ser utilizados no abstrato, mas é aceitável no corpo principal do texto.

Short Communications deve seguir os requisitos para manuscritos cheio, mas o texto não deve exceder 1000 palavras e que o papel não deve ser dividida em secções convencionais. A declaração de conflito de interesse é necessária antes de qualquer Agradecimentos. Não deve haver mais de 10 referências na comunicação Short. Um resumo de no máximo 125 palavras é necessário e até cinco *Palavras-chave* deve ser fornecido abaixo.

Artigos de revisão podem ser encomendados ou proposta. Os autores que desejem apresentar um artigo de revisão são aconselhados a contactar o Editor de tvj@aht.org.uk. Críticas podem abranger todos os aspectos relevantes da ciência veterinária ou medicina comparativa. As análises devem seguir o layout dos artigos originais, mas com o texto principal sub-dividido conforme apropriado para o assunto começando com um resumo e Introdução e Conclusões incorporando e declaração de eventuais conflitos. As seções não devem ser numeradas.

Unidades. unidades métricas devem ser utilizadas. Se as outras unidades devem ser dadas, eles devem ser colocados entre parênteses após o equivalente métrico. Unidades, símbolos e abreviaturas das unidades devem estar em conformidade com o Sistema Internacional de Unidades, tal como definido no Baron, DN, McKenzie-Clarke, H., 2008, *Unidades, símbolos e abreviaturas: Um Guia para Autores e Editores em Medicina e Ciências Correlatas*, 6ª ed., The Royal Society of Medicine, em Londres. Todas as outras abreviaturas deve ser inequívoca e *devem ser claramente explicados, onde são mencionadas no resumo e texto*. Note que o litro é abreviado para 'L', o mililitro 'mL', (também uL, mmol / L, etc); probabilidade é dada como *P* (Grifo letra maiúscula), como no $P < 0,05$; também nota Student's *t* teste "e Mann-Whitney *U* ensaio, coeficiente de correlação *r* como em $r = 0,92$, coeficiente de determinação, r^2 como em $r^2 = 0,72$, hora, minuto e segundo são abreviados de h, min e s, dia, semana e ano são apresentados na íntegra. Para a frequência do consumo de drogas por exemplo, a dose «Três vezes ao dia 'ou '8-horária" em vez de termos em latim, como "tid ou q 8 h. Sempre que ocorre a centrifugação, uso *g* valores não rpm. Outras abreviações comuns incluem "IV" para administração intravenosa ou por via intravenosa, "IM" para intramuscular ou por via intramuscular e "contra" para 'versus'. Use a abreviatura de G calibre da agulha.

terminologia anatômica. Terminologia deverá cumprir com a Associação Mundial de Veterinária Anatomistas *Nomina Anatomica Veterinaria* (2005) e os termos devem ser dadas em Inglês, sempre que possível (ver: http://www.wava-amav.org/Downloads/nav_2005.pdf).

Uma nota deve ser inserida na primeira utilização se uma moeda é dada no texto, como em 'UK £ 500¹E as taxas de conversão fornecido utilizando os seguintes três moedas E.U. \$, UK £ e Euros (€). A nota de rodapé deve ler-se conforme o caso, por exemplo: "1 £ = aprox. E.U. \$ 1,65, € 1,11 em 29 de novembro de 2009. Tarifas podem ser atualizados pelo autor na fase de prova, se necessário. Um fácil de usar conversor de moeda está disponível em <http://uk.reuters.com/business/currencies>.

Fabricantes. Os fabricantes e fornecedores devem ser fornecidos no texto após o nome do produto. Por exemplo: "diazepam (Valium, Roche)" ou "usando uma bomba de infusão (Medfusion 2010, Medex). Endereços e locais dos fabricantes não deve ser administrado e à utilização de ® ou ™ devem ser evitados. Quando um site é apropriado no texto, a nota deve ser inserida como: ¹ Veja também: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>. Observação: os nomes de propriedade não deve aparecer no título ou resumo.

Referências. Somente referências essenciais devem ser incluídos. As citações no texto pode ser de duas maneiras: (a) com a data entre parênteses, por exemplo, como demonstrado por Mills (2009), ou (b) com os nomes e as datas entre parênteses, por exemplo, de acordo com resultados recentes (Mills, 2009). Se a citação tem mais de dois autores, o primeiro autor deve ser seguido de et al., Por exemplo, Jones et al. (2007) ou (Jones et al., 2007). Quando lista de referências são citadas no texto devem ser colocados *primeiro em ordem cronológica e, em seguida, em ordem alfabética*, Por exemplo, (Philbey, 2003; Cassidy e Mills, 2005; Higgins, 2005). Se duas ou mais referências do mesmo autor (s) publicada no mesmo ano, são citados, devem ser separados uns dos outros, colocando a, b, etc após o ano, por exemplo, (Laven, 2001a, b; Laven e Smith, 2000a, b). As comunicações pessoais devem ser designados como "(EA Blomme, comunicação pessoal).

Documentos que estão na imprensa podem ser citados com o ano de aceitação. Na lista de referência, citar o identificador do objeto digital, ou o número do doi, se possível, onde os detalhes do volume diário e causa ainda não conhecida. Os trabalhos apresentados não devem ser citados, mas referidos no texto como, por exemplo, 'JP Cassidy et al., Dados não publicados. Isso pode ser atualizado na fase prova se for caso disso. Sempre que um papel de imprensa é citado no manuscrito, os autores podem ser convidados a fazer uma cópia das provas disponíveis para os editores e revisores.

A lista de referências no final do trabalho devem ser organizadas em ordem alfabética e cronológica, se necessário. Inserir uma quebra de linha entre cada referência. *Todos os autores devem ser incluídos e os títulos Jornal deve ser dada na íntegra.* As referências devem ser estabelecidos como segue:

Jornal de referência - Mischke, R., Busse, L., Bartels, D., Glaser, S., Kreienbrock, L., 2002. Quantificação da atividade thrombopoietic em aspirados de medula óssea de cães. O Veterinary Journal 164, 269-274.

Livro de referência - Hotzel, H. Frey, J., Bashiruddin, J., Sachse, K., 2002. Detecção e diferenciação de micoplasmas ruminantes. In: Sachse, K., Frey, J. (Eds.), Métodos em Biologia Molecular, vol. 216: Detecção de PCR de patógenos microbianos. Humana Press, NJ Totowa, E.U.A., pp. 231-246.

Procedimento - Higgins, A.J., 1996. Está correndo eticamente justificados? Saúde, bem-estar ea corrida: um desafio ético. In: Atas da 11ª Conferência Internacional de Corridas de Analistas e Veterinários, Queensland, Austrália, pp. 310-315.

Os endereços da Web - Devem ser apresentadas no seguinte formato, com a data de acesso, desde que: Cleaveland, S., Kusiluka, L., Kuwai ole, J., Bell, C., Kazwala, R., 2001. Avaliar o impacto da febre catarral maligna em Ngorongoro distrito, na Tanzânia. Nairobi: Comunitárias de Saúde Animal e Epidemiologia Participativa Unit (CAPE), Organização de Unidade Africano, http://www.eldis.org/fulltext/cape_new/MCF_Maasai_Tanzania.pdf. Acessado em 29 de novembro de 2008.

Tabelas. Cada tabela deve ser digitada em uma página separada, numeradas (1, 2 etc) e um breve título dado diretamente em cima de cada mesa. *As tabelas devem ser em formato retrato.* Notas de rodapé de tabelas devem ser indicados pelo ^{a, b} etc e digitado na parte inferior da tabela em questão. Informações em tabelas não deve ser repetido em números e vice-versa. As tabelas devem ser colocados *no final do texto principal, após as referências.*

Números. A qualidade de todos os valores apresentados devem ser elevados. Os editores irão rejeitar os valores de um padrão aceitável ou solicitar aos autores para substituí-los. As figuras devem ser referidas de forma seqüencial no texto como Figura. 1, fig. 2 etc A legenda deve ser fornecida para cada figura e colocada após todas as tabelas no arquivo do manuscrito principal. barras de escala deve ser fornecida em todas as fotomicrografias e eletromicrografias. Ao preparar dados, os autores devem observar o seguinte:

- Certifique-se de usar letras uniformes e dimensionamento de sua obra original.
- Salvar texto em figuras como gráficos""ou coloque a fonte.
- Apenas use as seguintes fontes de seus dados: Times New Roman, Arial, Courier, Helvetica, Symbol.
- O número de figuras de acordo com sua seqüência no texto.
- Use uma convenção de nomenclatura para arquivos lógico o seu trabalho artístico.
- Fornecer todos os dados em arquivos separados.
- Produzir imagens perto do tamanho desejado da versão impressa.

- Certifique-se de todas as unidades e redacção dos números em conformidade com *TVJ* estilo (ver *Unidades* acima).

Observe que cada figura deve ser carregado para o site da revista separadamente e não incluídas no texto principal.

Autores são incentivados a ler o guia detalhado sobre arte eletrônica que está disponível em nosso website: <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

Obra

Formatos

Independentemente do aplicativo usado, quando sua obra de arte eletrônica é finalizado, por favor 'salvar como' ou converter as imagens para um dos seguintes formatos (Nota: os requisitos de resolução para desenhos de linha, meio-tons e combinações de linha / meio-tons abaixo indicados .):

EPS: desenhos vetoriais. Incorporar a fonte ou salvar o texto como "gráficos".

TIFF: Cor ou fotografias em tons de cinza (meia-tons): Sempre use um mínimo de 300 dpi.

TIFF: desenhos Bitmapped: Use um mínimo de 1000 dpi.

TIFF: Combinações de bitmap de linha / meio-tons (cor ou escala de cinzentos): um mínimo de 500 dpi é necessária. DOC, XLS e PPT - Se a sua obra de arte eletrônica é criada em qualquer uma destas aplicações Microsoft Office favor da oferta "como está".

Por favor, não:

- Fornecimento gráficos incorporados no seu processador de texto (planilha, apresentação) do documento.
- arquivos da fonte que são otimizados para uso em tela (por exemplo, GIF, BMP, PICT, WPG), a resolução é muito baixa.
- arquivos da fonte que são demasiado baixos em resolução.
- Enviar gráficos que são desproporcionalmente grande para o conteúdo.

Todos os valores serão publicados em cores em linha, mas a cor será usada apenas na versão impressa do *Revista* quando consideradas essenciais para a apresentação do trabalho (taxa de reprodução de cores podem ser aplicadas).

Ao elaborar um manuscrito para a submissão, os autores devem observar as diretrizes a seguir:

- Assegurar que todos os arquivos não são salvos como "read-only".
- Use dois retornos de carro para terminar títulos e parágrafos.
- Digite o texto final da linha, sem hifenização, exceto para palavras compostas.
- Não use l minúsculas (el minúsculas) para um ou O (maiúsculas oh) para 0 (zero), porque têm valores diferentes de composição.
- Seja consistente com a pontuação e inserir apenas um único espaço entre as palavras e depois de pontuação.

Preparação dos dados complementares

Elsevier aceita material complementar eletrônico para apoiar e melhorar a sua investigação científica. arquivos Complementar oferecer o Autor possibilidades adicionais de apoio para publicar aplicativos, filmes, animações, imagens de alta resolução, conjuntos de dados de fundo, clips de som e muito mais. Complementar arquivos fornecidos será publicado online junto com a versão eletrônica do artigo em produtos web Elsevier, incluindo ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. A fim de garantir que o material apresentado está diretamente

utilizáveis, certifique-se que os dados são fornecidos em um dos nossos formatos de arquivo recomendado. Os autores devem enviar o material juntamente com o artigo, e fornecer uma legenda concisa e descritiva para cada arquivo.

Provas

O autor correspondente será informado pelo editor quando o papel foi aceito para publicação e pode então ser citados como "in press".

Um conjunto de provas de página em formato PDF será enviado por e-mail para o autor correspondente (se não tiver um endereço de e-mail, em seguida, as provas de papel serão enviados pelo correio). Elsevier agora envia provas pdf que podem ser anotados, para isso você precisará baixar o Adobe Reader versão 7 disponível gratuitamente a partir de <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>. Instruções sobre como anotar arquivos pdf vão acompanhar as provas. Os requisitos do sistema exato é dado no site da Adobe: http://www.adobe.com/products/acrobat/acrrsystemreqs.html#_70win. Se você não quiser usar as anotações pdf função, você pode listar as correções (incluindo as respostas ao formulário de consulta) e voltar a Elsevier em um e-mail. Por favor, liste suas correções citando o número da linha. Se, por qualquer motivo, não for possível, marcar as correções e quaisquer outras observações (incluindo as respostas ao formulário de consulta) em uma cópia impressa de sua prova e retornar por fax ou digitalizar as páginas e e-mail, ou enviar por post. Por favor, utilize esta prova apenas para verificar a composição, edição, integralidade e exactidão do texto, tabelas e figuras. mudanças significativas para o artigo como aceito para publicação somente serão considerados, nesta fase, com a permissão do Editor. Faremos todo o possível para ter seu artigo publicado com rapidez e precisão. Portanto, é importante garantir que todas as suas correções são enviados de volta para nós em uma comunicação: por favor, verifique cuidadosamente antes de responder, como a inclusão de quaisquer correções posteriores não podem ser garantidos. A leitura de prova é de sua inteira responsabilidade.

Uma vez que a correção final tenha sido feita, o objectivo Elsevier para publicar o documento eletronicamente dentro de 6-8 semanas. O documento será então atribuído um identificador de objeto digital, ou o número doi, e *uma vez na linha, o papel pode ser citado como publicado utilizando o número único doi*. O autor correspondente será notificado pelo editor quando o documento está disponível on-line e pode verificar seu status e doi número usando *O Jornal Veterinário* site <http://www.elsevier.com/locate/tvjl> (Clique em **Volume / Questões** e, em seguida, **Artigos na imprensa**). A versão impressa do *O Jornal Veterinário* contendo o documento seguirá mais tarde, normalmente no prazo de 12 meses após a aceitação.

Direitos

autorais

Se excertos de outras obras cujos Direitos autorais São Incluídos, o autor (s) devem obter permissão Por Escrito dos Proprietários de Direitos autorais e de crédito a Fonte (s) no Artigo. Formulários de Elsevier pré-Impressos n UTILIZAÇÃO Pelos autores Nestes casos: o Contato do Departamento de Direitos Elsevier, Oxford, UK: Telefone (+1) 215 239 3804 (+1) 215 239 3804 ou +44 (0) 1865 843830 +44 (0) 1865 843830 , Fax +44 (0) 1865 853333, e-mail (+1) 215 239 3804 (+1) 215 239 3804 ou +44 (0) 1865 843830 +44 (0) 1865 843830 , Fax +44 (0) 1865 853333, e-mail healthpermissions@elsevier.com. Os pedidos também podem ser preenchidos on-line através da homepage Elsevier <http://www.elsevier.com/permissions>.

Material de cartas e manuscritos inéditos também é protegido e não pode ser publicado sem a autorização foi obtida.

Os

direitos

dos

autores

Como um autor que você (ou seu empregador ou instituição) pode fazer o seguinte:

- Faça cópias (impressas ou eletrônicas) do artigo para seu uso pessoal, inclusive para seu próprio uso em sala de aula de ensino.
- Fazer cópias e distribuir essas cópias (incluindo através de e-mail) do artigo aos colegas de pesquisa, para o uso pessoal como por colegas (mas não comercialmente ou sistematicamente, por exemplo, através de uma lista de e-mail ou lista de servidores).
- Escreva uma versão de pré-impressão do artigo em sites na Internet, incluindo servidores eletrônico pré-impressão, e para manter indefinidamente essa versão em servidores ou sites.
- Escreva uma versão revista pessoal do texto final do artigo (para refletir as mudanças feitas na revisão por pares e processo de edição), em seu site pessoal ou institucional ou servidor, com um link para a página do jornal (em <http://www.elsevier.com>).
- Apresentar o artigo em uma reunião ou conferência e distribuir cópias do artigo para os delegados presentes nessa reunião.

- Para o seu empregador, se o artigo é uma "obra de aluguel", efectuada no âmbito do seu emprego, o empregador pode utilizar a totalidade ou parte das informações no artigo para uso intra-empresa (eg, formação).
- Manter patentes e direitos de marca e direitos de qualquer processo ou procedimento descrito no artigo.
- Incluir o artigo na íntegra ou em parte, uma tese ou dissertação (desde que isto não é para ser publicado comercialmente).
- Use o artigo ou parte dele em uma compilação de suas obras impressas, como recolhidas escritos ou notas de aula (após a publicação de seu artigo na revista).
- Prepare outros trabalhos derivados, para estender o artigo em forma de livro, ou outra forma de reutilização partes ou excertos de outras obras, com o pleno reconhecimento de sua publicação original na revista.

órgão de financiamento, acordos e políticas

Elsevier estabeleceu acordos e políticas desenvolvidas para permitir que os autores que publicam em periódicos Elsevier cumprir manuscrito potencial arquivamento exigências especificadas as condições da concessão sua concessão. Para saber mais sobre acordos e políticas existentes, visite <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Book

Reviews

Editores ou autores que desejam ter um livro considerado para a revisão em *TVJ* deve primeiro contato com o Editor de Livros tvj@ahj.org.uk.

Consultas

Autor

Para esclarecer dúvidas relativas à apresentação de artigos (incluindo a apresentação electrónicos, quando disponíveis), por favor visite a página do jornal em <http://www.elsevier.com/locate/tvj>. Isso também proporciona a facilidade de controlar artigos aceites e configurar alertas de email para informá-lo de status quando um artigo foi alterado.

Detalhes do contato para questões levantadas após a aceitação de um artigo, especialmente aquelas relativas às provas, são fornecidos após o registro de um artigo para publicação.

Separatas

O autor será, sem qualquer custo, ser dotado de um arquivo PDF do artigo via e-mail. O arquivo PDF é uma versão filigrana do artigo publicado e inclui uma folha de rosto com a imagem da capa do jornal e uma declaração que define os termos e condições de utilização.

O *Jornal Veterinário* não tem encargos página