



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

JONAS CUNHA ESPÍNDOLA

**IDENTIFICAÇÃO DO VÍRUS DA MIONECROSE
INFECCIOSA (IMNV) E OTIMIZAÇÃO DA TÉCNICA RT-
PCR PARA O DIAGNÓSTICO DO VÍRUS DA SÍNDROME DE
TAURA (TSV) EM CAMARÕES (*Litopenaeus vannamei*)**

Londrina
2011

JONAS CUNHA ESPÍNDOLA

**IDENTIFICAÇÃO DO VÍRUS DA MIONECROSE
INFECCIOSA (IMNV) E OTIMIZAÇÃO DA TÉCNICA RT-
PCR PARA O DIAGNÓSTICO DO VÍRUS DA SÍNDROME DE
TAURA (TSV) EM CAMARÕES (*Litopenaeus vannamei*)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciência Animal (Área de Concentração: Sanidade Animal).

Orientadora: Profa. Dra. Alice Fernandes Alfieri
Co-orientador: Prof. Dr. Amauri A. Alfieri

Londrina
2011

Catálogo na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

E77i Espíndola, Jonas Cunha.

Identificação do vírus da mionecrose infecciosa (IMNV) e otimização da técnica RT-PCR para o diagnóstico do vírus da síndrome de Taura (TSV) em camarão (*Litopenaeus vannamei*) / Jonas Cunha Espíndola. – Londrina, 2011.

84f. : il.

Orientador: Alice Fernandes Alfieri

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2011.

Inclui bibliografia.

1. Carnicicultura – Teses. 2. IMNV – Teses. 3. TSV – Teses. 4. RT-PCR – Teses. I. Alfieri, Alice Fernandes. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

CDU 639.512

JONAS CUNHA ESPÍNDOLA

**IDENTIFICAÇÃO DO VÍRUS DA MIONECROSE INFECCIOSA
(IMNV) E OTIMIZAÇÃO DA TÉCNICA RT-PCR PARA O
DIAGNÓSTICO DO VÍRUS DA SÍNDROME DE TAURA (TSV) EM
CAMARÕES (*Litopenaeus vannamei*)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciência Animal (Área de Concentração: Sanidade Animal).

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Alice Fernandes Alfieri
UEL – Londrina – PR

Prof. Dr. Eduardo Luís Cupertino Ballester
UFPR – Palotina – PR

Prof. Dr. Marco Antônio B. Barreiros
UFPR – Palotina – PR

Prof. Dra. Marlise Pompeo Claus
Instituto Federal Catarinense – SC

Prof. Dr. Ricardo Castelo Branco Albinati
UFBA – BA

Londrina, 08 de fevereiro de 2011.

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Virologia Animal, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP), Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Londrina (UEL) e no Laboratório de Biologia Molecular do Instituto Federal Catarinense, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciência Animal (Área de Concentração: Sanidade Animal) pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal/UEL, sob orientação da Profa. Dra. Alice Fernandes Alfieri.

Os recursos financeiros para o desenvolvimento do projeto foram obtidos junto às agências de fomento à pesquisa:

1. **CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico / MCT.**
2. **FINEP: Financiadora de Estudos e Projetos Ministério de Ciência e Tecnologia.**
3. **Fundação Araucária.**

DEDICATÓRIA

Dedico com todo carinho

A minha querida mulher, amor verdadeiro e eterno

À minha família, pelo amor, incentivo e orações

AGRADECIMENTOS

À Deus, Pai de bondade, pelo dom da vida e pela proteção durante a minha caminhada. Sem Ti nada seria possível.

À Profa. Dra. Alice Fernandes Alfieri e ao Prof. Dr. Amauri A. Alfieri pela coragem de me aceitar como orientando, pelo respeito e pela sabedoria.

Ao professor Marco Antônio B. Barreiros pela amizade e confiança no meu trabalho durante todo esse tempo.

À Kerlei Cristina Médici por todos os seus ensinamentos e pela dedicação incondicional e determinante.

À Dalíria do Prado pela grande amizade e pelo exemplo de força e perseverança.

A todos os colegas e amigos do Laboratório de Virologia Animal/UEL Marlise, Michele, Aline, Alexandre, Danilo e Otonel, pelo excelente convívio científico e pessoal.

A todos os estagiários e bolsistas de iniciação científica do Laboratório de Virologia Animal/UEL.

À secretária da Pós-Graduação, Helenice Kieski, por toda a dedicação e carinho.

A todos os professores e funcionários da UEL, que de alguma forma, colaboraram na realização desse trabalho.

Ao amigo Robert pelo apoio e companheirismo desde o mestrado, nossa amizade será para sempre.

Aos colegas de trabalho do IFC – *Campus* Araquari que muito contribuíram na realização dessa etapa profissional.

ESPÍNDOLA, J.C. **Identificação do vírus da mionecrose infecciosa (IMNV) e otimização da técnica rt-pcr para o diagnóstico do vírus da síndrome de Taura (TSV) em camarões (*Litopenaeus vannamei*)**. 2011. 84 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal, Área de Concentração: Sanidade Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

RESUMO

As doenças que comprometem a carcinicultura mundial destacam-se como um dos principais fatores de declínio da produtividade. As infecções de etiologia viral ocasionam prejuízos econômicos devidos às altas taxas de morbidade, mortalidade e transmissibilidade. O vírus da mionecrose infecciosa (IMNV) e o vírus da síndrome de Taura (TSV) são duas das principais doenças que acometem camarões de cultivo em todo o mundo. O objetivo deste trabalho foi investigar a ocorrência do IMNV e o do TSV em 76 amostras de camarão *Litopenaeus vannamei*, provenientes do estado de Santa Catarina, por meio da técnica RT-PCR. Para a identificação do TSV foi necessário otimizar a técnica RT-PCR utilizando como controle positivo um DNA plasmidial. A técnica de *nested*-PCR proporcionou a amplificação de um produto com 255 pb do IMNV em 10% (1/10) das amostras provenientes de camarão adulto e em 21,2% (14/66) das amostras de pós-larvas (PLs). A especificidade do sistema comercial de *nested*-PCR para a identificação do IMNV foi avaliada por meio da amplificação por RT-PCR de uma amostra positiva seguida do sequenciamento do produto amplificado. A RT-PCR otimizada nesse estudo mostrou-se altamente específica e proporcionou a amplificação de um produto com 231 pb do TSV clonado em DNA plasmidial. Entretanto, apesar de alta sensibilidade obtida nos testes de otimização, nenhuma das 76 amostras biológicas incluídas nesse estudo apresentou resultado positivo para o TSV. Os resultados do presente estudo demonstram que o IMNV está presente tanto em animais adultos quanto em PLs provenientes de laboratórios de reprodução do estado de Santa Catarina e que medidas de controle e profilaxia dessa virose devem ser implantadas e monitoradas. Apesar dos resultados negativos para o TSV na amostragem avaliada, devido ao seu impacto econômico, a monitoria sanitária com relação a essa importante virose em camarões marinhos cultivados deve ser constante.

Palavras-chave: Carcinicultura. IMNV. TSV. RT-PCR.

ESPÍNDOLA, J.C. **Identification of myonecrosis infectious virus (IMNV) and optimization of RT-PCR assay for diagnosis of Taura syndrome virus (TSV) in shrimp (*Litopenaeus vannamei*)**. 2011. 84 f. Thesis (Doctorate in Animal Science, Concentration Area: Animal Health) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

ABSTRACT

The diseases that compromise the world's shrimp stand out as a major factor in declining productivity. Viral infections cause economic losses due to high rates of morbidity, mortality and transmissibility. Infectious myonecrosis virus (IMNV) and Taura syndrome virus (TSV) are two major diseases that affect shrimp farming worldwide. The aim of this study was to investigate the occurrence of TSV and IMNV in 76 samples of shrimp *Litopenaeus vannamei* from the state of Santa Catarina by RT-PCR assay. For the identification of TSV was necessary to optimize the RT-PCR technique using plasmid DNA with positive control. The technique of nested-PCR amplification gave a product with 255 bp of IMNV in 10% (1/10) samples from adult shrimp and 21.2% (14/66) of samples of post-larvae (PLs). The specificity of the commercial system of nested-PCR for identification of IMNV was assessed by RT-PCR amplification of positive samples followed by sequencing the amplified product. The optimized RT-PCR assay in this study was highly specific and provided the amplification of a 231 bp product TSV cloned into plasmid DNA. However, despite high sensitivity obtained in the optimization tests, none of the 76 biological samples included in this study had tested positive for TSV. The results of this study demonstrate that IMNV is present in adult animals as in PLs from breeding laboratories of the state of Santa Catarina and that control measures and prophylaxis of viral infection should be implemented and monitored. Despite the negative results for TSV in the sampling evaluated, due to its economic impact monitoring with respect to this important viral disease in cultured marine shrimps must be constant.

Keywords: Shrimp. IMNV. TSV. RT-PCR.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- Figura 1** – Evolução da relação captura/cultivo de camarões na China, maior produtor da Ásia, no período de 1997 a 2007 14
- Figura 2** – Produção de camarão de cultivo nos principais países produtores da Ásia em 2007 14
- Figura 3** – Evolução da relação captura/cultivo de camarões no Equador, maior produtor da América, no período de 1997 a 2007 15
- Figura 4** – Produção de camarão de cultivo nos principais países produtores das Américas em 2007 15
- Figura 5** – Estrutura tridimensional deduzida da superfície do vírus da mionecrose infecciosa de camarões. A direita observa-se o detalhamento da estrutura da protrusão do capsídeo viral 19
- Figura 6** – Evolução do desempenho da carcinicultura brasileira e as perdas decorrentes das viroses 21
- Figura 7** – Lesões compatíveis com IMN em camarões *Litopenaeus vannamei* 25
- Figura 8** – Necrose do músculo esquelético com infiltração de hemócitos e fibrose (A); Corpúsculos de inclusão observados em grupos nas células do músculo esquelético (B); Hibridização *in situ* do tecido muscular esquelético, as precipitações negras indicam a presença do vírus (C) 26
- Figura 9** – Lesão de melanização da carapaça de camarão *L. vannamei* (A). Camarão com o urópodo vermelho indicando a expansão dos cromatóforos (AB). Em lesões comuns na TS 34
- Figura 10** – Lesão histopatológica de TSV em camarão *L. vannamei*. Corpúsculos de inclusão viral (C); destruição das células hematopoiéticas dos órgãos linfóides (D) 35

ARTIGO

- Figura 1 – Painel A.** Infiltração de hemócitos no tecido muscular (*seta*). Alteração nos feixes de fibras musculares (*círculos*). **Painel B.** A seta indica um infiltrado de polimorfonucleares de intensidade leve com necrose de grupos de fibras musculares..... 51

ANEXO A – DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA

- Figura 1 –** Eletroforese em gel de agarose 2% com brometo de etídio dos produtos (510 e 255 pb) amplificados pela PCR e *nested* PCR no diagnóstico da IMNV. Canaletas: 1 (Padrão de tamanho molecular 848, 630 e 333 pb); 2 (controle positivo); 3 (controle negativo); 4 a 9 (amostras positivas para o IMNV) 78
- Figura 2 –** Eletroforese em gel de agarose 2% com brometo de etídio dos produtos (328 pb) amplificados pela PCR para sequenciamento no diagnóstico da IMNV. Canaletas: 1 (Padrão de tamanho molecular 100 pb); 7, 8 e 9 (amostras positivas para o IMNV); 12 (controle negativo) 78
- Figura 3 –** Eletroforese em gel de agarose 2% com brometo de etídio dos produtos (231pb) amplificados pela PCR na otimização da técnica para o diagnóstico do TSV. Teste de sensibilidade. **Superior** – Canaletas: 1 (Padrão de tamanho molecular 100 pb); 2 a 9 Diluições 10^{-1} (15,7 ng/ μ L); 10^{-2} (1,57 ng/ μ L); 10^{-3} (160 pg/ μ L); 10^{-4} (16 pg/ μ L); 10^{-5} (1,6 pg/ μ L); 10^{-6} (160 fg/ μ L); 10^{-7} (16 fg/ μ L); 10^{-8} (1,6 fg/ μ L); 10 (Controle negativo). **Inferior** – Canaletas: 1 (Padrão de tamanho molecular 100pb); 2 a 7 Diluições 10^{-8} (1,6 fg/ μ L); 10^{-9} (160 atograma/ μ L); 10^{-10} (16 ag/ μ L); 10^{-11} (1,6 ag/ μ L); 10^{-12} (160 zeptograma/ μ L); 0^{-13} (16 zg/ μ L); 10^{-14} (1,6 zg/ μ L); 8 (Controle negativo) 79
- Figura 4 –** Eletroforese em gel de agarose 2% com brometo de etídio dos produtos (231pb) amplificados pela PCR na otimização da técnica para o diagnóstico do TSV. Gradiente de temperatura. Canaletas: 1 (Padrão de tamanho molecular 100 pb); 2 a 7 (gradiente de temperaturas: 51, 53, 55, 57, 59 e 61°C) 79
- Figura 5 –** Eletroforese em gel de agarose 2% com brometo de etídio dos

	produtos (231pb) amplificados pela PCR na otimização da técnica para o diagnóstico do TSV. Concentrações de dNTP. Canaletas: 1 (Padrão de tamanho molecular 100 pb); 2 à 4 (concentrações de 100 μ M, 200 μ M e 300 μ M, respectivamente)	80
Figura 6 –	Eletoforese em gel de agarose 2% com brometo de etídio dos produtos (231pb) amplificados pela PCR na otimização da técnica para o diagnóstico do TSV. Concentrações de cloreto de magnésio. Canaletas: 1 (Padrão de tamanho molecular 100 pb); 2 à 6 (1,0, 1,5, 2,0, 2,5 e 3,0 mM MgCl ₂ , respectivamente)	80
Figura 7 –	Eletoforese em gel de agarose 2% com brometo de etídio, dos produtos (231pb) amplificados pela PCR na otimização da técnica para o diagnóstico do TSV utilizando tecido de camarão com o plasmídeo diluído. Canaletas: 1 a 10 (diluições 10^{-1} a 10^{-10}); 11 (controle negativo)	81
Figura 8 –	Eletoforese em gel de agarose 2% com brometo de etídio referente ao teste de sensibilidade da técnica de RT-PCR para o diagnóstico do TSV. Canaletas: 1 (Padrão de tamanho molecular 100 pb); 2 (TSV - controle positivo com 231 pb); 3 (controle negativo); 4 e 5 (<i>white spot syndrome virus</i> -WSSV); 6 e 7 (<i>infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus</i> -IHHNV); 8 e 9 (<i>infectious myonecrosis virus</i> -IMNV)	81

SUMÁRIO

1 REVISÃO DE LITERATURA	13
Introdução	13
Mionecrose Infecciosa	18
<i>Etiologia</i>	18
<i>Epidemiologia</i>	19
<i>Sinais clínicos de importância diagnóstica</i>	23
<i>Alterações Macroscópicas</i>	24
<i>Alterações Microscópicas</i>	25
<i>Diagnóstico</i>	27
<i>Diagnóstico Diferencial</i>	28
<i>Controle e profilaxia</i>	28
<i>Perspectivas</i>	29
Síndrome de Taura	30
<i>Etiologia</i>	30
<i>Epidemiologia</i>	30
<i>Clínicos</i>	33
<i>Lesões Macroscópicas</i>	33
<i>Alterações Microscópicas</i>	34
<i>Diagnóstico</i>	35
<i>Controle e Profilaxia</i>	36
<i>Perspectivas</i>	37
Referências	38
2 OBJETIVOS	43
2.1 OBJETIVO GERAL	43
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
3 ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO	44
3.1 IDENTIFICAÇÃO POR RT-PCR DO VÍRUS DA MIONECROSE INFECCIOSA (IMNV) EM CAMARÕES CULTIVADOS NO ESTADO DE SANTA CATARINA.....	44
INTRODUÇÃO.....	46

MATERIAL E MÉTODOS	47
RESULTADOS	50
DISCUSSÃO	51
REFERÊNCIAS	54
3.2 OTIMIZAÇÃO DA RT-PCR PARA A IDENTIFICAÇÃO DO VÍRUS DA SÍNDROME DE TAURA EM CAMARÕES	56
INTRODUÇÃO	58
MATERIAL E MÉTODOS	59
RESULTADOS	63
DISCUSSÃO	64
REFERÊNCIAS	66
4 CONCLUSÕES	68
APÊNDICES	69
APÊNDICE A – Lista de Reagentes	70
APÊNDICE B – Soluções e Tampões	72
APÊNDICE C – Protocolo de Técnicas	74
ANEXOS	77
ANEXO A – Documentação Fotográfica	78

1 REVISÃO DE LITERATURA

Introdução

A carcinicultura tem grande importância no contexto econômico e social de muitos países, não somente por fazer parte de uma perspectiva de subsistência e comércio local, mas também destacando-se pela exportação dos produtos cultivados. A geração de empregos e de renda produzidos por essa atividade apresenta reflexos nas comunidades locais, colaborando com o desenvolvimento do setor como alternativa viável na substituição da pesca extrativista, principalmente por conta da crescente estabilização dos estoques pesqueiros naturais (JIMENEZ, 1992).

Das espécies de camarão cultivadas no mundo destacam-se a do *Litopenaeus vannamei* (*L. vannamei*) (80,7%) e a do *Penaeus monodon* (26%), sendo a maioria dos cultivos proveniente da Ásia, principalmente da China, Tailândia, Vietnã e Indonésia (FAO, 2010; SUBASINGHE et al., 2008). A figura 1 apresenta a expansão da produção de camarão cultivado na China, maior produtor mundial, em relação à pesca extrativista (FAO, 2009).

A China é o maior produtor mundial de camarão cultivado. Na Ásia, a carcinicultura também é uma importante atividade aquícola para a Tailândia, seguida pelo Vietnã (Figura 2). Nas Américas, Equador, México e Brasil são os principais produtores de camarões marinhos (Figuras 3 e 4) (FAO, 2009).

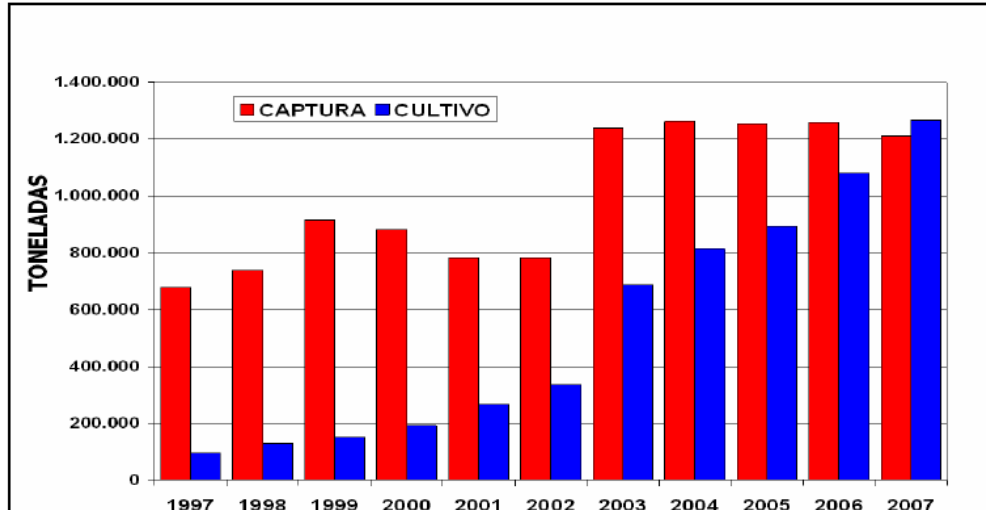


Figura 1 – Evolução da relação captura/cultivo de camarões na China, maior produtor da Ásia, no período de 1997 a 2007

Fonte: FAO (2009).

Apesar dos aspectos sócio-econômicos positivos do desenvolvimento da carcinicultura, a intensificação da produção de camarões e o crescimento do número de fazendas, tanto no Brasil quanto no mundo, tem sido responsável pela crescente degradação do meio ambiente. Esse processo de produção favoreceu ainda o surgimento de inúmeras doenças infecciosas, principalmente aquelas de etiologia viral, que apresentam-se como fatores limitantes do desenvolvimento do setor (KAUTSKY, et. al., 2000; GESTEIRA, 2004).

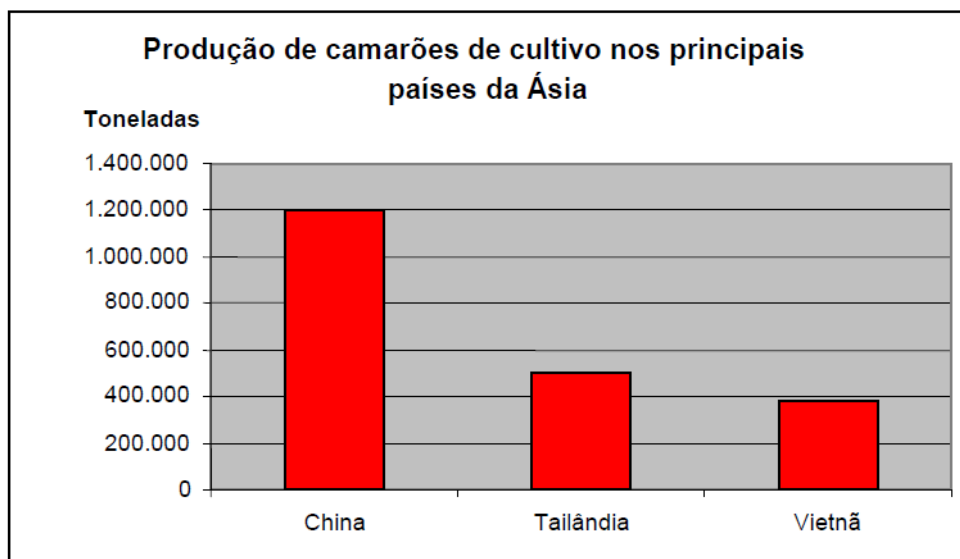


Figura 2 – Produção de camarão de cultivo nos principais países produtores da Ásia em 2007.

Fonte: FAO (2009)

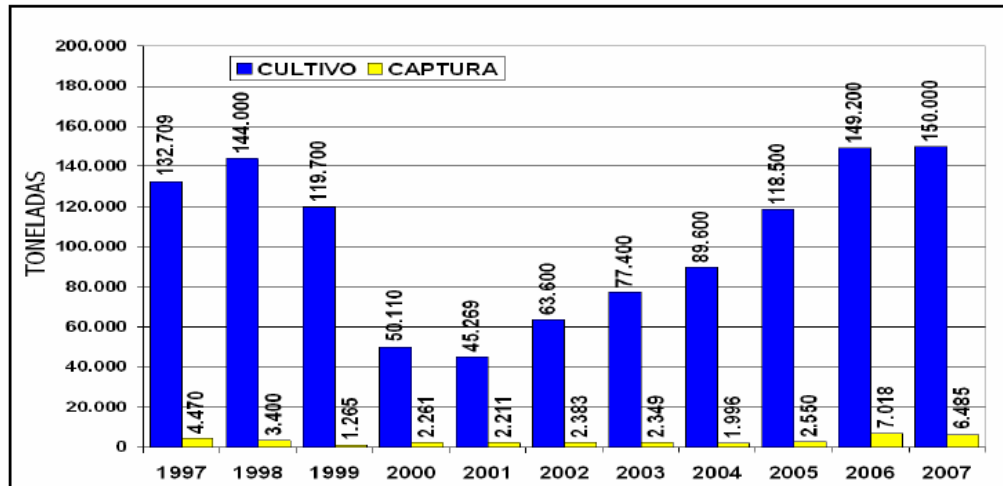


Figura 3 – Evolução da relação captura/cultivo de camarões no Equador, maior produtor da América, no período de 1997 a 2007

Fonte: FAO (2009).

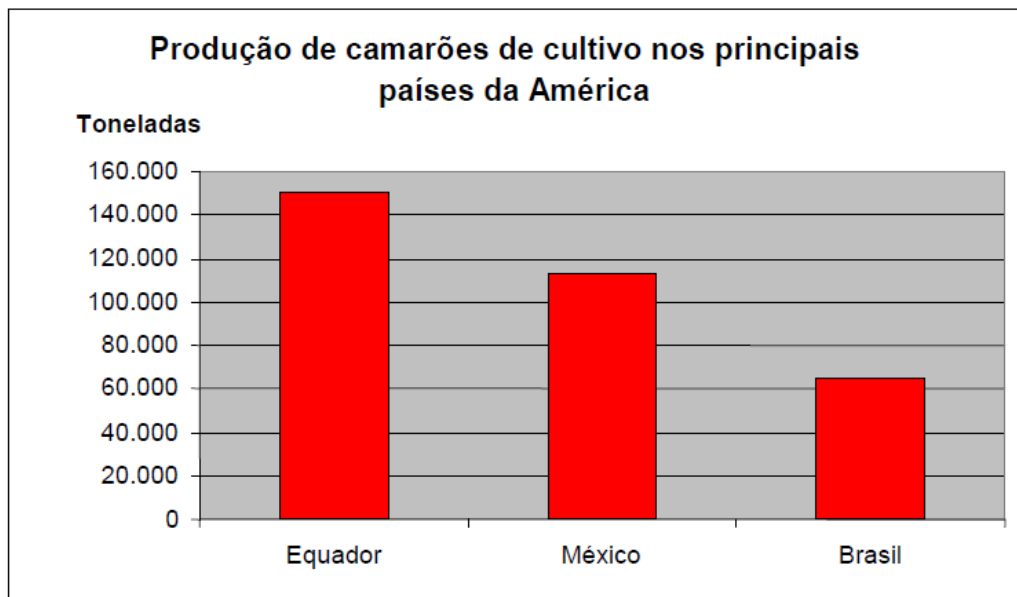


Figura 4 – Produção de camarão de cultivo nos principais países produtores das Américas em 2007

Fonte: FAO (2009).

O Brasil detém um dos maiores potenciais para a exploração da carcinicultura em todo o mundo que incluem as próprias condições naturais favoráveis, infraestrutura básica e a sua privilegiada posição geográfica em relação aos principais mercados consumidores. Porém, a comparação da evolução do cultivo de camarão no Brasil, em relação aos países mais produtores citados anteriormente, evidencia a falta de apoio e de incentivo governamental para o desenvolvimento e estruturação da atividade (PINHEIRO, 2007).

Considerando a atual globalização de oportunidades é difícil justificar a diferença em produção observada nos países asiáticos e no Brasil. Sem dúvidas, todo esse diferencial produtivo é fruto de políticas públicas diferenciadas que, em última instância, conferem maiores oportunidades e competitividade aos produtores da China, Tailândia, Vietnã, Equador e México, em relação aos produtores brasileiros (ROCHA, 2008).

Em Santa Catarina, a carcinicultura marinha é a atividade de maricultura de destaque mais recente, principalmente após 1998, apesar de que os primeiros trabalhos iniciaram no final da década de 70. Para o desenvolvimento da carcinicultura regional várias entidades contribuíram, entre elas podemos citar: Empresa de Pesquisa Agropecuária de Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI), Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Associação Catarinense de Criadores de Camarões (ACCC) e, mais recentemente, o Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas (SEBRAE). Entre 1998 e 2004, a produção de camarão marinho cultivado em Santa Catarina cresceu mais de 50 vezes, atingindo 4.200 toneladas na safra de 2004 (Quadro 1). A criação de camarões em cultivo está distribuída no estado em três núcleos de produção: Laguna, Grande Florianópolis e Baía da Babitonga (São Francisco do Sul), com destaque para o núcleo de Laguna que concentra o maior número de produtores e volume de produção. Esta região, mesmo antes do camarão de cultivo, já era tradicional na produção de camarão de extrativismo e, a partir de 1998, passou a ser a principal produtora do camarão de cultivo. Essa atividade no estado contribuiu com a redução da pressão da pesca sobre o ambiente natural (NETO, 2007).

Período (anos)	1999	2000	2001	2002	2003	2004
Nº de fazendas	4	9	23	45	63	107
Área (ha)	36	104	273	575	870	1.563
Produtividade (t)	70	190	607	1.900	3.500	4.200
Produtividade (t/ha)	1,94	1,83	2,22	3,3	4,02	2,68

Quadro 1 – Evolução da carcinicultura catarinense no período de 1999 a 2004
Fonte: Neto (2007).

Nas Américas, incluindo também o Brasil, as doenças virais que mais afetaram a carcinicultura foram as causadas pelo vírus da infecção hipodermal e necrose hematopoiética (IHHNV – *infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus*); o vírus da síndrome de Taura (TSV – *Taura syndrome virus*) e, mais recentemente, pelo vírus da mancha branca (WSSV – *white spot syndrome virus*). No Brasil, destaca-se ainda a presença do vírus da mionecrose infecciosa (IMNV – *infectious myonecrosis virus*), identificado em 2004 (LIGHTNER et al., 2004).

De 1970 a 1990, a indústria mundial foi dependente da captura de pós-larvas (PL) silvestres, ou produzidas a partir de reprodutores capturados no oceano. Estes animais eram capturados próximo da região de cultivo, em sistemas relativamente simples com medidas mínimas de biossegurança ou inexistentes e com alta taxa de renovação de água. Pouco se conhecia sobre as doenças de camarão e muito menos sobre os mecanismos de defesa humoral e celular destes crustáceos, principalmente aos agentes virais. Havia ainda poucos especialistas em patologia de camarão e o suporte diagnóstico era ínfimo na maioria das regiões. O uso de antibióticos e produtos químicos era prática comum, tanto em laboratórios quanto na produção de PL em fazendas (PINHEIRO, 2007).

Em 1987, o crescimento explosivo da indústria camaroneira foi acompanhado por epidemias de etiologia viral que, rapidamente, evidenciaram que as viroses podem representar uma das maiores ameaças para a carcinicultura e que a disseminação foi o resultado do transporte descontrolado tanto de PL quanto de reprodutores (MADRI, 2005).

Nesse período, a carcinicultura foi transformada pela necessidade de melhor controle das enfermidades. Como resultado das rápidas mudanças que iniciaram-se na década de 90, a dependência da indústria do fornecimento de PL selvagens ou de descendentes de reprodutores selvagens tem reduzido (TANG et. al. 2005a).

Neste período, várias doenças virais foram descritas, a exemplo como a mionecrose infecciosa e a síndrome de Taura. Foram desenvolvidos diferentes métodos de diagnóstico, introduzidas medidas de biossegurança em sistemas de cultivo intensivo assim como a utilização de probióticos, tanto em laboratórios de produção de PL quanto em fazendas de cultivo. Como resultado, o uso de antibióticos tem diminuído e se tornado mais responsável (PANTOJA e LIGHTNER, 2008).

Destaca-se, que as pesquisas no âmbito da biologia molecular estão sendo importantes na compreensão da relação entre o camarão e os patógenos que o acometem. No conjunto, esses avanços tecnológicos tem proporcionado o aumento constante na produção mundial de camarão cultivado (PANTOJA; LIGHTNER, 2008).

Mionecrose Infecciosa

O vírus da mionecrose infecciosa (*infectious myonecrosis virus* -IMNV) afeta camarões peneídeos da família *Penaeidae* observados unicamente em *L. vannamei* e nas espécies *L. stylirostris* e *Penaeus monodon* somente foi observado em infecções experimentais. O IMNV determina a mionecrose infecciosa (*infectious myonecrosis* -IMN) em animais adultos e nas fases juvenil e pós-larval (PEREIRA et al., 2008).

Etiologia

Os bioensaios conduzidos em condições laboratoriais por Graf et al. (2006), expondo indivíduos aparentemente saudáveis a tecidos de camarões com sinais clínicos de mionecrose, mostraram que a principal via de transmissão é a horizontal pela ingestão direta de tecidos contaminados.

Após a confirmação da natureza infecciosa, por meio de desafios por inoculação e preparação de tecido infectado em indivíduos livres de patógenos específicos (*specific pathogen free* -SPF), o agente etiológico da IMN foi identificado como um vírus pertencente à família *Totiviridae* (LIGHTNER; PANTOJA, 2004). A purificação e a caracterização do IMNV foram realizadas por Poulos et al. (2006).

O IMNV apresenta forma icosaédrica, diâmetro de 40 nm e densidade em gradiente de cloreto de cério de 1.366 g/mL. O genoma viral é constituído por uma molécula única de RNA (ácido ribonucléico) de fita dupla (dsRNA) que contém 7.560 pares de bases (pb) (TANG et al., 2005a; MORALES; CUÉLLAR-ANJEL, 2008). O vírus foi caracterizado parcialmente e porções do seu genoma foram clonadas e sequenciadas (LIGHTNER et al., 2005).

O RNA viral possui duas janelas de leitura, ou ORF (*open reading frames*), que codificam duas proteínas. A ORF1 codifica a proteína estrutural do capsídeo viral e encontra-se na fase 1 de leitura (nt.136–4953). A ORF2 localiza-se na fase 3 e codifica a enzima RNA polimerase dependente de RNA ou RdRp (*RNA-dependent RNA polymerase*) (nt.5241-7451). Estas janelas de leitura não se sobrepõem, existindo um espaço de 287 nucleotídeos entre elas (POULOS et al., 2006; KUNANOPPARAT et al. 2011).

Porém, existem controvérsias quanto ao início da janela de leitura da ORF2 que codifica a RdRp. Nibert (2007) reportou que esta região se inicia no nt.4749, o que tornaria as duas janelas de leitura sobrepostas. Assim, a tradução das duas ORF poderia ser resultado da mudança da fase de leitura que ocorreria no próprio ribossomo.

Recentemente, a estrutura tridimensional do IMNV foi elucidada (Figura 5). O capsídeo do vírus apresenta-se como uma estrutura dobrada em forma pentamérica, formada por duas subunidades distintas. Por outro lado, o dsRNA parece estar organizado no interior do capsídeo de forma helicoidal e de maneira bastante simétrica. Foram também identificadas protruções ao longo de todo o capsídeo. Essa característica estrutural é inédita no grupo dos totivírus. Essas protruções são de natureza protéica e podem ser importantes para o aumento da virulência do IMNV, por meio da ligação aos receptores presentes nas células alvo e pelo processo de internalização celular. Essa característica poderia explicar a característica singular do IMNV de, diferentemente dos outros membros da família, poder ser transmitido extracelularmente entre os organismos hospedeiros (TANG et al., 2008).

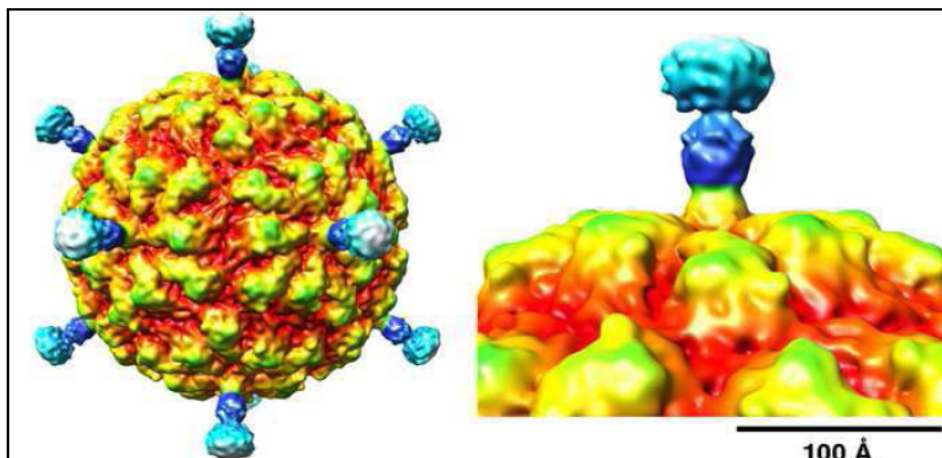


Figura 5 – Estrutura tridimensional deduzida da superfície do vírus da mionecrose infecciosa de camarões. A direita observa-se o detalhamento da estrutura da protrusão do capsídeo viral

Fonte: Adaptado de Tang et al. (2008).

Epidemiologia

A doença em *L. vannamei* foi diagnosticada em todas as fases de cultivo (PL, juvenil e adulto) e em indivíduos das espécies *L. nortenho* e *Penaeus monodon* que se

mostraram suscetíveis ao IMNV apresentando sinais clínicos e alterações características nos tecidos (TANG et al., 2005a).

O primeiro relato do IMNV no Brasil foi realizado em setembro de 2002, em uma fazenda produtora de camarão do estado do Piauí, com registros de mortalidade diária de animais com mais de 7 g de peso vivo apresentando como principal sinal clínico a opacidade no músculo abdominal (NUNES et al., 2004). Acredita-se que, após a primeira descrição da IMN no nordeste brasileiro a enfermidade tenha se disseminado ao sudeste asiático (Indonésia) e Ilha de Java, possivelmente introduzida pela importação de camarões *L. vannamei* infectados pelo agente viral (SENAPIN et al., 2007; PEREIRA et al., 2008).

A primeira descrição do IMNV tem sido amplamente discutida devido aos relatos, nos últimos 35 anos, de animais com sinais clínicos semelhantes de necrose muscular relacionada a fatores climáticos ou a situações de estresse extremo tais como fortes chuvas; elevação súbita de temperatura e salinidade da água; nível de oxigênio reduzido; alta densidade populacional; e a presença de poluentes químicos na água (LAKSHMI et al., 1978; SINDERMANN; LIGHTNER, 1988). Essas alterações, diagnosticadas em *Penaeus aztecus* nos Estados Unidos da América em 1970 (RIGDON; BAXTER, 1970) e no México em 1978, receberam a denominação de Necrose Idiopática Muscular (NIM) e foram relacionadas a mudanças na temperatura e salinidade da água (LAKSHMI et al., 1978) mostrando similaridade entre NIM e IMN.

Lesões semelhantes também foram relatadas em *Farfantepenaeus subtilis* (espécie nativa) no estado do Piauí na década de 1980 (LIGHTNER, 2004). Porém, nenhum dos relatos anteriores mostrou mortalidade de 70% e a ocorrência desses surtos foi relacionada ao manejo inadequado que poderia ser solucionado com a melhora nas condições ambientais e com a correção de falhas técnicas.

Assim como outras doenças, essa também pareceu ser multifatorial havendo ainda o IMNV como agente principal. Algumas hipóteses foram levantadas sobre a causa da mionecrose, como por exemplo, a ocorrência da doença do algodão, causada por um microsporídeo que determina a perda da transparência do músculo abdominal e a síndrome do músculo grampeado (*cramped muscle syndrome* -CMS), ocasionada por desequilíbrio nutricional com a relação aos minerais presentes na alimentação. Devido à falta de precisão para identificar a etiologia, a doença foi denominada de NIM, ou seja, de causa desconhecida.

Nos primeiros meses de 2003, e também durante o inverno, os estados do Ceará e Piauí foram afetados por alta pluviosidade e consequente quedas bruscas de salinidade (de 50 para 10 ppt); por temperaturas elevadas; e pelo aumento de cianobactérias

nos tanques de cultivo. Essas condições ambientais exacerbaram o aparecimento dos sinais clínicos observados anteriormente em camarões cultivados no Piauí e foi o primeiro registro da enfermidade no estado do Ceará. Algumas mudanças foram implementadas nos métodos de cultivo e tratamentos para a mionecrose, incluindo aumento na renovação diária do volume de água (> 20%), aplicação de cal nos tanques (150-300 kg/ha) e redução na densidade de povoamento. Entretanto, apesar do uso destas medidas e do aumento da salinidade por redução da pluviosidade não foi possível eliminar a mionecrose do país. Segundo a Associação Brasileira de Criadores de Camarão -ABCC as perdas, ocasionadas pelo IMNV apenas no ano de 2004, foram estimadas em US\$ 20 milhões (PEREIRA et al., 2008).

O IMNV foi apontado como uma das principais causas de redução da produção nacional de camarões em 2004 (Figura 6). Na ocasião, as criações comprometidas apresentaram alta mortalidade. Como medida de prevenção a densidade de povoamento foi diminuída com o objetivo de reduzir o estresse, que é considerado um dos fatores de intensificação da doença (MADRID, 2005).

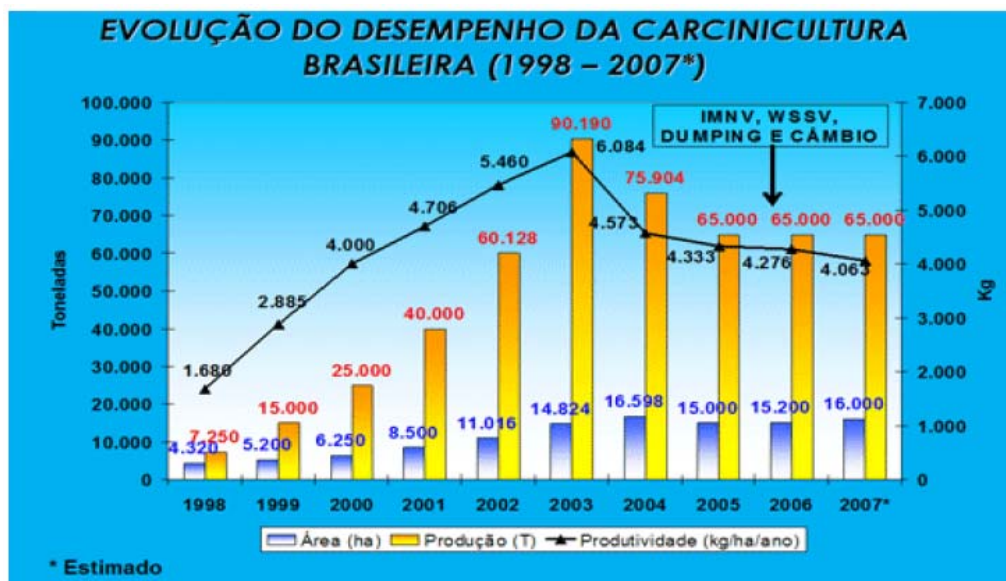


Figura 6 – Evolução do desempenho da carcinicultura brasileira e as perdas decorrentes das viroses

Fonte: Madri (2005).

Por se tratar de uma doença considerada nova, inicialmente, a sua caracterização foi extremamente difícil. Vários profissionais e produtores do nordeste brasileiro registraram as alterações mais comuns nos ambientes de cultivo e sua relação com a

evolução da doença. Sem o conhecimento e o dimensionamento do problema, a falta de barreiras sanitárias nas atividades aquícolas agravou a situação, pois permitiu a rápida disseminação da doença entre fazendas de camarão na região nordeste do Brasil (PEREIRA et al., 2008).

Anteriormente não havia o registro do vírus em nenhum outro país. Em 2002, após ser registrada no Piauí, a IMN foi identificada em outros estados como Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba e Pernambuco. Com a disseminação da doença por vários ambientes o número de surtos foi aumentando até comprometer os sistemas de produção com as seguintes condições:

- Fase de pré-cria com densidades de 35 a 120 pós-larvas/litro;
- Fase de engorda com camarões de 3 g de peso médio;
- Em densidades de 15 a 80 camarões/m² ;
- Em camarões procedentes de diferentes laboratórios de produção de PL;
- Em cultivos que utilizam vários tipos de alimentos comerciais;
- Em cultivos com variáveis físicas e químicas aceitáveis para a espécie;

Alguns produtores cultivaram *L. vannamei* em água doce durante o período de alta incidência de mionecrose infecciosa e não relataram problemas com a doença. Entretanto, o vírus pode ocorrer também em animais cultivados em água doce e pode afetar todos os estádios de desenvolvimento do crustáceo (PEREIRA et al., 2008).

A IMN pode apresentar-se de forma aguda com mortalidade elevada, contudo, a doença pode progredir para a forma crônica que é caracterizada por baixa mortalidade. A enfermidade parece estar limitada ao nordeste brasileiro, mas camarões com sinais clínicos semelhantes também foram encontrados em outros países onde o *L. vannamei* é cultivado (NUNES et al., 2004).

As espécies de camarões peneídeos *L. vannamei*, *L. stylirostris* e *P. monodon* são susceptíveis à infecção pelo IMNV e dentre estas espécies o *L. vannamei* é o mais susceptível (TANG et al., 2005b).

O IMNV causa mortalidade significativa de 40 a 60% em animais juvenis e sub-adultos de *L. vannamei* cultivados em cativeiro e as perdas econômicas no Brasil em decorrência da doença foram estimadas em milhões de dólares durante no ano de 2003 (NUNES et al., 2004).

Os surtos da doença parecem estar associados às condições ambientais e a tensões físicas como, por exemplo, extremos de salinidade e temperatura, manuseio na

despesca e, possivelmente, com o uso de alimentos de baixa qualidade nutricional (LIGHTNER et al., 2005).

A transmissão do vírus pode ocorrer de forma horizontal, por meio da água ou pelo canibalismo. Há sugestões também da transmissão vertical, porém ainda não comprovada experimentalmente. A IMN é confundida com a “doença da cauda branca”, ambas apresentam necrose do músculo esquelético e, aparentemente, os sinais são muito similares, porém são causadas por vírus distintos (GESTEIRA, 2006).

Este autor classifica a infecção de três formas:

- branda a moderada – resulta em baixa mortalidade e menos de 10% dos camarões cultivados com sinais clínicos.
- aguda – resulta em mortalidade elevada e mais de 10% da população cultivada com sinais clínicos de intensidade média a alta.
- crônica – resulta em baixa mortalidade, porém persistente e com sinais clínicos visíveis em menos 5% dos indivíduos. Nessa forma de apresentação podem ainda ser observados sinais agudos, particularmente em situações de falhas de manejo ou em qualquer outro evento que ocasione condição de imunossupressão nos camarões.

Aparentemente, a mionecrose é uma doença que surge como consequência de falhas de manejo ou em cultivos sobrecarregados por matéria orgânica. Todos os surtos têm em comum o desequilíbrio nas condições de cultivo, chamados de "gatilhos" por muitos autores, os quais desencadeiam a enfermidade. Entre os fatores predisponentes da infecção incluem-se chuvas excessivas, presença elevada de plâncton, alta infestação por parasitas como as gregarinas ou ação de bactérias oportunistas como os *Vibrium* sp (GESTEIRA, 2006).

Sinais clínicos de importância diagnóstica

No início de surtos de IMN os camarões apresentam opacidade focal ou multifocal do músculo abdominal e, em casos mais graves, as lesões se tornam avermelhadas, principalmente no último segmento abdominal. Em indivíduos infectados podem ser observados: letargia, abdômen enrijecido, aumento do tempo de coagulação da hemolinfa, aumento da conversão alimentar e taxa de crescimento reduzida (PEREIRA et al., 2008).

Alterações Macroscópicas

Os camarões infectados apresentam áreas de necrose nos músculos esqueléticos estriados do abdômen (cauda). As áreas de necrose apresentam-se, inicialmente, de maneira multifocal evoluindo até tornarem-se mais difusas e expandindo-se por quase toda a cauda.

Nas formas mais graves da doença, as áreas de necrose adquirem coloração vermelho-alaranjada e os camarões não deixam de ingerir alimentos apesar de gravemente infectados. Camarões submetidos a fatores que lhes causem estresse (captura, mudanças drásticas de salinidade ou temperatura, entre outras) poderão apresentar-se moribundos e a mortalidade persistir por vários dias. O órgão linfóide pode apresentar ambos os lobos hipertrofiados, com dimensão de três a quatro vezes superiores ao normal (PANTOJA; LIGHTNER, 2008).

Em alguns casos, os camarões infectados apresentam extensas áreas de necroses esbranquiçadas no músculo estriado, especialmente nos segmentos abdominais e na cauda (telso) (figura 7). Alguns camarões apresentam coloração avermelhada nas áreas necrosadas (LIGHTNER et al., 2005).

O tecido mais comprometido é o músculo esquelético e com menor frequência, o músculo cardíaco; o tecido conjuntivo; os hemócitos e as células parenquimatosas do órgão linfóide (PANTOJA; LIGHTNER, 2008).



Figura 7 – Lesões compatíveis com IMNV em camarões *Litopenaeus vannamei*, **Painel A:** Padrão de opacidade multifocal, **Painel B:** opacidade no último segmento abdominal.

Fonte: Poulos et al. (2006).

Alterações Microscópicas

Na dependência da gravidade da infecção com o IMNV a histopatologia pode revelar alterações em vários órgãos e tecidos. Preparações de músculo fresco, corado ou não, mostram a presença de anomalias como ausência de estrias e fibras deformadas ou fragmentadas. Preparações do órgão linfóide fresco podem revelar a presença de massa esférica (esferóides) entre os túbulos normais (PANTOJA; LIGHTNER, 2008).

O aumento no tamanho do órgão linfóide é comum e, frequentemente, está associado à presença de esferóides (*lymphoid organ spheroids* -LOS). LOS ectópicos são frequentemente encontrados no órgão linfóide, no tecido conectivo esponjoso, especialmente no lúmen do coração e túbulos adjacentes da glândula antenal em camarões que estão se recuperando da fase aguda ou que estão na fase crônica da doença (LIGHTNER et al., 2005). O aparecimento de esferóides no órgão linfóide é um dos sinais característicos da presença do IMNV (TANG et al., 2005b).

As lesões musculares dependem do grau de gravidade da infecção podendo apresentar, na fase inicial, um infiltrado hemocítico. A fase aguda da infecção é caracterizada por necrose de coagulação com edema e danos elevados nas fibras musculares, frequentemente substituídas por tecido conjuntivo. Nesta fase podem ser observados corpúsculos de inclusão viral característicos da enfermidade, que são encontrados em células musculares, tecido conjuntivo e nos hemócitos. A necrose de liquefação, com infiltração de hemócitos no músculo comprometido (inflamação) e fibrose, ocorre em camarões na fase crônica da doença quando os LOS ectópicos são mais comumente observados (LIGHTNER; PANTOJA, 2004; LIGHTNER, 2004; GESTEIRA, 2006; KUNANOPPARAT et. al. 2011).

Em alguns tecidos é possível visualizar uma combinação de lesões agudas e crônicas. As lesões parecem evoluir de níveis agudos nos quais predomina a necrose de coagulação até níveis crônicos nos quais se observa, inicialmente, infiltração hemocítica com a posterior formação de uma matriz frouxa de fibrócitos e fibras de tecido conjuntivo entremeadas nas fibras musculares recentemente regeneradas. A análise histológica também pode revelar hipertrofia do órgão linfóide causada pelo acúmulo de esferóides. Esta lesão é muito consistente em camarões durante as fases aguda e crônica da enfermidade. Frequentemente, esses esferóides também podem ser observados em outros tecidos do camarão como o coração, brânquias, glândulas antenais, cordão nervoso ventral e tecido conjuntivo. Corpúsculo de inclusão intracitoplasmático pode ser observado em células do músculo esquelético, do órgão linfóide e/ou do tecido conjuntivo (PANTOJA; LIGHTNER, 2008).

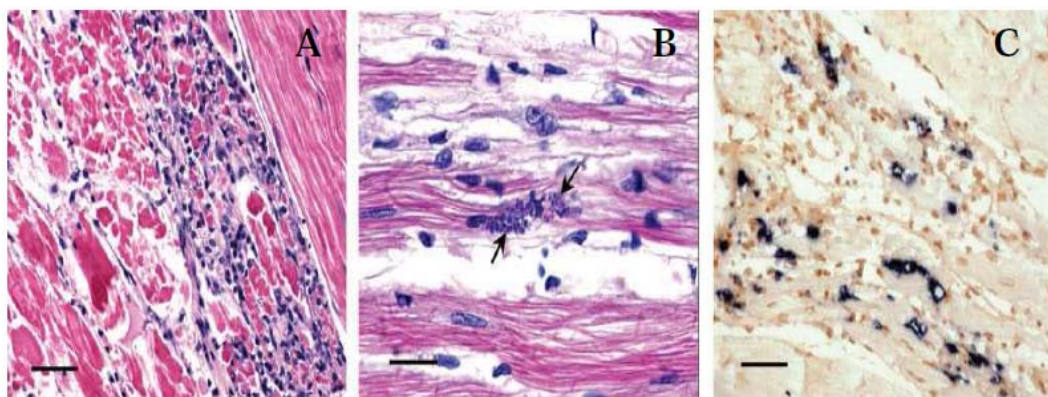


Figura 8 – Necrose do músculo esquelético com infiltração de hemócitos e fibrose (A); Corpúsculos de inclusão observados em grupos nas células do músculo esquelético (B); Hibridização *in situ* do tecido muscular esquelético, as precipitações negras indicam a presença do vírus (C)

Fonte: Poulos et al. (2006).

Diagnóstico

Os métodos de diagnóstico disponíveis para a detecção de doenças infecciosas que comprometem os camarões peneídeos incluem métodos tradicionais de patologia morfológica (microscopia direta, histopatologia e microscopia eletrônica), bioensaios e métodos moleculares (OIE, 2003).

O diagnóstico presuntivo da infecção baseia-se na anamnese e nos sinais clínicos. A histopatologia e técnicas de biologia molecular podem ser utilizadas para a confirmação do diagnóstico clínico. Na histopatologia emprega-se como coloração de rotina a hematoxilina-eosina (H.E.) para evidenciar a necrose do tipo coagulativa, frequentemente acompanhada por edema entre as fibras musculares.

A aplicação de tecnologias moleculares em sistemas de diagnóstico na aquicultura evoluiu rapidamente. Essas técnicas apresentam a vantagem de fornecer resultados rápidos e de apresentarem alta sensibilidade e especificidade. São, ainda, particularmente recomendadas para o diagnóstico de infecções nas quais a histopatologia convencional não é conclusiva (BONDAD-REANTASO et al., 2005).

A RT-PCR, descrita por Poulos e Lightner (2006), pode ser utilizada para a detecção do genoma viral. Atualmente, estão disponíveis *kits* comerciais, como o (IQ2000, Farming IntelliGene Thecnology Corporation, TaiwanTM), que são utilizados para a detecção do IMNV pela RT-PCR.

Devido à grande similaridade entre as lesões produzidas pelo PvNV *Penaeus vannamei nodavirus* e o IMNV é aconselhável associar a análise histológica com a RT-PCR ou com evidências de hibridização *in situ* e/ou por meio de marcadores (sondas) específicos para obter maior precisão no diagnóstico (PANTOJA; LIGHTNER, 2008). A hibridização *in situ* foi desenvolvida e otimizada como instrumento de diagnóstico por Tang et al. (2005b) e Andrade et al. (2007). Mais recentemente, a PCR em tempo real com a sonda TaqMan tem-se revelado um método de diagnóstico com alta sensibilidade (PANTOJA; LIGHTNER, 2008).

Além disso, métodos de diagnóstico utilizando anticorpos monoclonais estão sendo utilizados para detecção de várias enfermidades em camarões (KUNANOPPARAT et. al. 2011).

Diagnóstico Diferencial

A necrose muscular no abdômen de camarão é uma lesão que pode ocorrer como resultado de condições inadequadas de manejo ou de ambiente tais como estresse, baixa concentração de oxigênio, alta densidade populacional, mudança brusca de temperatura ou salinidade (LAKSHMI et al., 1978; RIGDOM; BAXTER, 1970). Porém, também pode ser resultado da ação de um agente infeccioso como o IMNV. Lesões semelhantes são observadas na enfermidade da cauda-branca causada por *Nodavirus*.

Apesar da importância da análise histopatológica como ferramenta de diagnóstico para a confirmação da doença, o uso de métodos moleculares como a hibridização *in situ* ou RT-PCR confere maior sensibilidade e especificidade ao diagnóstico. Um exemplo é a necrose detectada no músculo de camarões *L. vannamei* procedentes de Belize. De acordo com Tang et al. (2007), os indivíduos apresentavam a mesma opacidade no músculo abdominal, com características histopatológicas semelhantes às observadas em portadores de IMNV. Após a análise, utilizando técnicas de hibridização *in situ* e RT-PCR, os resultados foram negativos para o IMNV, sugerindo que a doença foi provavelmente causada por outro vírus RNA. Os autores encontraram 69% de similaridade entre o vírus de Belize e o *Nodavirus* do *Macrobrachium rosenbergii* que passou a ser designado PvNV.

Além de agentes virais, bactérias como vibriões e pseudomonas também podem causar opacidade muscular semelhante à observada na infecção pelo IMNV. Entretanto, nas infecções bacterianas não são observados os corpúsculos de inclusão (LIGHTNER, 1996).

Controle e profilaxia

Considerando as características do sistema imunológico do camarão, não há formas para o tratamento específico nos casos de IMN. Como para qualquer doença que compromete a carcinicultura, e mesmo outras criações comerciais intensivas, as medidas preventivas são mais econômicas e eficazes. Boas práticas de cultivo que incluem a adoção de manejo sanitário, nutricional e zootécnico adequados, aliadas às rígidas normas de biossegurança devem ser adotadas com o objetivo de impedir a entrada e estabelecimento de

novos patógenos, bem como de possibilitar a maior sobrevivência de indivíduos mesmo na presença de microorganismos potencialmente patogênicos (PANTOJA; LIGHTNER, 2008).

Perspectivas

Atualmente, em muitas fazendas de camarão algumas práticas de manejo foram alteradas como a redução na densidade de estocagem (10 a 40 camarões/m²), tratamentos de solo entre os cultivos, preparo e adubação dos tanques de cultivo e adoção de vazio sanitário entre os ciclos produtivos. Em alguns laboratórios produtores de PL foram implementados programas de melhoramento genético com importação de reprodutores SPF e SPR (*Specific Pathogen Resistant*) que poderiam proporcionar PL de boa qualidade e mais resistentes ao IMNV. Medidas de biossegurança, associadas ao manejo adequado, contribuíram para a redução da incidência de IMN. Atualmente, embora sejam identificadas lesões sugestivas de mionecrose durante todo o ciclo produtivo em criações brasileiras, a taxa média de sobrevivência dos lotes está ao redor de 70% (PEREIRA et al., 2008).

A perspectiva é que, no futuro, a indústria global de camarão possa ter acesso a maior variedade de espécies domesticadas de camarão geneticamente melhoradas e resistentes aos mais importantes micro-organismos patogênicos. Também é de grande importância o desenvolvimento de métodos de diagnóstico rápidos, de fácil execução, de grande repetibilidade e que tenham alta sensibilidade e especificidade. A adoção e o monitoramento de normas rígidas de biossegurança em todos os tipos de sistemas de cultivo é uma urgência inquestionável.

Por fim, a eficiência dos sistemas de produção intensiva de camarão somente será obtida por meio de estudos interdisciplinares que envolvam o conhecimento da biologia do camarão; o desenvolvimento de técnicas de criação e de nutrição; bem como o conhecimento da biologia e das características antigênicas e moleculares dos potenciais patógenos que comprometem a carcinicultura (PANTOJA; LIGHTNER, 2008).

Síndrome de Taura

Inicialmente, a causa da Síndrome de Taura (*Taura Syndrome* - TS), também conhecida como doença de Taura ou doença de cauda vermelha dos camarões, foi atribuída a exposição dos camarões aos fungicidas BenlateTM (benomyl; DuPont), TiltTM (propiconazole; Ciba-Geigy) e CalixinTM (tridemorph; BASF). Contudo, em 1994 foi identificado um novo vírus como agente etiológico da TS (BROCK et al., 1995).

Etiologia

Com base apenas nas características físicas e químicas, o vírus da síndrome de Taura (Taura syndrome virus -TSV) foi classificado na família Picornaviridae (BONAMI et al., 1997). Entretanto, Mari et al. (2002) sugeriram que a sequência de nucleotídeos identificada pertencia a um membro ainda não classificado do gênero *Cricket Paralysis Virus*. Atualmente, este vírus é classificado como membro da família Dicistroviridae pertencente a um gênero ainda não definido (ICTV, 2009; DHAR et. al., 2010).

O TSV apresenta morfologia icosaédrica, diâmetro de 31 a 32 nm, densidade de 1,338g/mL (CsCl) e não possui envelope. O genoma viral consiste de uma fita única de RNA (ssRNA) linear, com 10.205 nucleotídeos que contém duas grandes ORFs. A ORF 1 codifica proteínas não-estruturais como a helicase, protease e RNA polimerase e a ORF 2 as proteínas estruturais (VP1, VP2 e VP3) presentes no capsídeo viral (HASSON et al., 1995). Com relação à diversidade antigênica são descritos três sorotipos de TSV identificados como TSV-A, TSV-B e TSV-C (ERICKSON et al., 2002; DHAR et. al., 2010).

Epidemiologia

O TSV é considerado uma das principais ameaças ao cultivo de camarão nas Américas. O vírus disseminou-se rapidamente por diversos países da América Latina, ocasionando mortalidades cumulativas entre 60 e 90% (LIGHTNER, 1999). Estima-se que,

nas Américas, as infecções pelo TSV tenham ocasionado perdas econômicas diretas entre US\$ 1 a 1,3 bilhão (LIGHTNER, 2003).

Inicialmente, a distribuição do TSV estava restrita às Américas. Posteriormente, o vírus foi também detectado em explorações camaroneiras de Taiwan, ocasionando alta mortalidade em *L. vannamei*, provenientes das Américas (TU et al., 1999; YU; SONG, 2000). A presença do TSV também foi confirmada na Tailândia (NIELSEN et al., 2005; PANTOJA; LIGHTNER, 2008).

A TS foi reconhecida pela primeira vez como doença de camarão em fazendas localizadas nas proximidades da foz do rio Taura em Guayaquil, Equador, em junho de 1992 (JIMENEZ, 1992). No entanto, análises retrospectivas (setembro de 1991), realizadas em amostras de camarão obtidas na região de Taura, mostraram que a doença já estava presente na região antes de sua descrição em 1992. Relatos descrevem perdas inexplicáveis durante a reprodução de *L. vannamei* em meados de 1990 que obrigaram os produtores a abandonar o uso de tanques de cultivo e a adotar prática de povoamento com PLs em densidades relativamente baixas nos tanques de engorda (PANTOJA; LIGHTNER, 2008). Análises retrospectivas, realizadas em amostras de *L. vannamei* obtidas na Colômbia em fevereiro de 1990 também revelaram a presença de lesões semelhantes às observadas nos casos de TS (LARAMORE, 1997). Desde 1992, a TS tem se disseminado para muitas regiões do continente Americano comprometendo tanto camarões selvagens quanto em cultivo. O (quadro 2) apresenta a distribuição da TS nas Américas.

Distribuição Geográfica	Ano
Equador	1991
Peru (Tumbes)	1993
Caribe e Colômbia (costa do Pacífico)	1993/94
Honduras e El Salvador	1994
Guatemala	1994
Brasil (região Nordeste)	1994
EUA (Texas, Havaí e Flórida)	1994
Nicarágua	1995
México (Sonora, Sinaloa, Chipas e Guerrero)	1995

Quadro 2 – Casos da síndrome de Taura registrados em países do continente Americano.

Três aspectos podem justificar a distribuição da TS nas Américas, bem como a sua provável expansão: i) dependência da indústria aquícola das populações selvagens de náuplios, PLs e reprodutores que são transportados para diferentes regiões geográficas e até mesmo para outros países; ii) comercialização de camarões congelados infectados; iii) transmissão entre curtas distâncias, que é normalmente ocasionada por insetos e aves (LIGHTNER, et. al. 1995; PANTOJA; LIGHTNER, 2008).

As várias espécies de camarões diferem na susceptibilidade ao TSV (BROCK et al., 1995). Em *L. vannamei*, o TSV não causa impacto à sanidade de náuplios e larvas até o estágio de misis. Entretanto, PLs e adultos são altamente susceptíveis ao vírus. PLs de *L. vannamei* silvestres são menos resistentes ao vírus que PLs provenientes de laboratório (STERN, 1995). *Penaeus setiferus*, *P. stylirostris* são menos sensíveis à doença e *P. monodom*, *P. japonicus*, *P. duorarum* e *P. aztecus* são altamente resistentes (BROCK, 1997). Infecções experimentais foram demonstradas em PLs de *P. aztecus*, em camarões juvenis e PLs da espécie *P. setiferus* e em juvenis de *P. chinensis*. Infecções por TSV foram descritas em populações selvagens de *L. vannamei*, *P. nortenho* e *P. setiferus*.

Nos períodos superiores ao estágio de PL-12 (PL com 12 dias de idade) e juvenil de *L. vannamei*, o TSV causa infecções graves e taxa de mortalidade elevada nas populações de camarão cultivadas. Em contraste, mesmo que o TSV possa causar infecção em juvenis do *P. stylirostris*, esta espécie parece ser menos suscetível ao vírus. Camarões das espécies *P. aztecus* e *P. duorarum*, nos estádios de PLs e juvenis, parecem ser resistentes à esta doença (PANTOJA; LIGHTNER, 2008).

Na fase aguda, as mortalidades geralmente ocorrem entre 15 a 45 dias após a estocagem das PL no viveiro. A taxa diária de mortalidade pode alcançar 25%, restando ao final entre 5 a 25% de sobreviventes. Na fase crônica da doença os camarões conseguem sobreviver à muda, podendo apresentar comportamento ativo e alimentar-se normalmente. Neste estágio, os indivíduos infectados apresentam lesões e melanizações na cutícula, podendo morrer nos ciclos de mudas subsequentes. Em algumas situações, os animais podem apresentar cutícula mole e expansão avermelhada dos cromatóforos. A transmissão pode ser vertical, durante o desenvolvimento embrionário, ou horizontal, por meio da ingestão de tecido contaminado com o vírus e contato com água ou equipamentos contaminados (OIE, 2003).

Sinais clínicos

A TS é conhecida como uma enfermidade que ocorre no período de 14 a 40 dias após o povoamento dos tanques com PL de *L. vannamei*. Com isso, os camarões comprometidos geralmente são jovens com 0,05g a 5g de peso vivo. Camarões maiores também podem ser infectados, especialmente se não foram expostos ao vírus anteriormente. A TS apresenta uma fase aguda e uma fase crônica (de recuperação) que podem ser facilmente distinguidas (PANTOJA; LIGHTNER, 2008).

Lesões Macroscópicas

Em camarões moribundos, durante a fase aguda/superaguda da enfermidade, os sinais são facilmente visualizados na inspeção e inclui a expansão dos cromatóforos vermelhos da cauda conferindo, a essa estrutura, a coloração rosada ou avermelhada e aos urópodos a coloração vermelha. Essas lesões deram origem à denominação de doença da cauda vermelha. Animais na fase superaguda da infecção tendem a morrer durante a ecdise (processo de muda). Nesses animais, quando o epitélio cuticular de um apêndice é examinado minuciosamente (na ponta do urópodo ou pleópodos, por exemplo), pode-se observar a evidência de necrose epitelial multifocal. Os animais podem ainda apresentar cutícula mole, intestino vazio e estarem na fase de muda (ecdise). Essa maior incidência de mortalidade durante a ecdise sugere que a muda é uma fase de grande importância na patogênese da TS (OIE, 2003).

Durante a fase crônica os camarões, em densidade de povoamento de baixa a moderada, apresentam lesões melanizadas multifocais, cutícula mole e expansão de cromatóforos vermelhos, porém, sem qualquer alteração no comportamento e na ingestão de ração. Esses camarões são sobreviventes da fase superaguda ou aguda da doença e obtiveram êxito na muda com melanização das lesões em fase de regeneração (figura 9) (PANTOJA; LIGHTNER, 2008).

Os camarões moribundos não conseguem completar o processo de muda, morrendo com o exoesqueleto ainda mole. Quando capturados vivos, os animais apresentam comportamento letárgico, não se alimentam e estão próximos da morte (OIE, 2003).

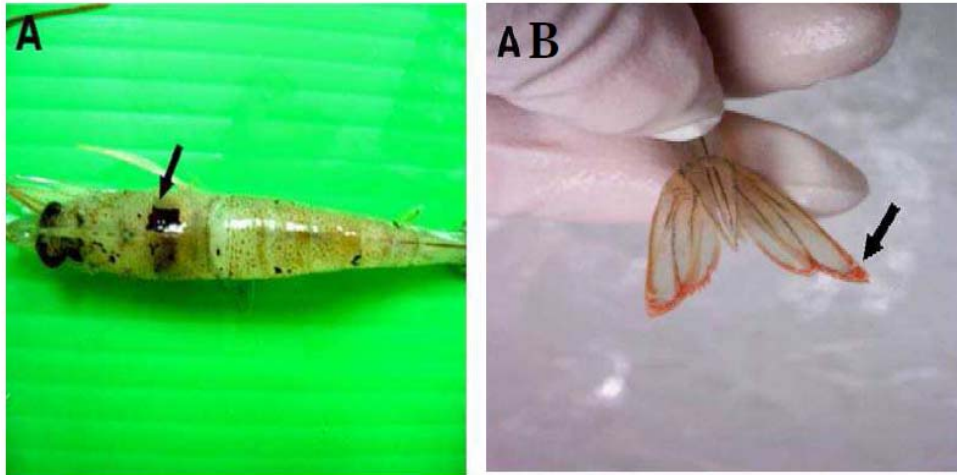


Figura 9 – Lesão de melanização da carapaça de camarão *L. vannamei* (A). Camarão com o urópodo vermelho indicando a expansão dos cromatóforos (AB). Em lesões comuns na TS

Fonte: Phalitakul et al. (2006).

Alterações Microscópicas

Camarões com a forma aguda da TS apresentam áreas de necroses multifocais no epitélio cuticular e sub-cuticular e, frequentemente, no tecido conjuntivo sub-cuticular. Na fase crônica pode não ser observadas lesões macro e mesmo microscópicas. Suspeita-se que os indivíduos sobreviventes de TS possam ser portadores do vírus (LIGHTNER et al., 1995; BROCK, 1997).

Na TS as lesões multifocais cuticulares são visíveis macroscopicamente. Microscopicamente o citoplasma das células infectadas mostra-se eosinofílico, sendo ainda observada picnose nuclear e cariorrexe. Em algumas situações, é possível observar a presença de inclusões citoplasmáticas caracterizadas como corpos esféricos com a 1-20 μm de diâmetro variando de eosinofílicos a basofílicos pálidos.

A ausência de infiltração hemocítica, ou de outro tipo de resposta inflamatória, distingue a fase superaguda da fase crônica da enfermidade. A presença de núcleos picnóticos e cariorréticos assim como das inclusões citoplasmáticas, conferem às lesões da fase aguda/superaguda o aspecto “apimentado”, que é considerada uma característica patognomônica da doença.

Durante a fase crônica da TS as lesões cuticulares assemelham-se às aquelas ocasionadas por infecção bacteriana da concha (*shell disease*). Estas lesões podem causar a

erosão da cutícula, a colonização bacteriana na superfície e a invasão da cutícula por diferentes espécies de vibrio. Frequentemente, em posição basal com relação à lesão cuticular melanizada, pode ser observada infiltração de hemócitos, que pode ou não estar melanizada. Durante a fase crônica é comum observar a presença de estruturas, denominadas esferóides, dentro do órgão linfóide. Ainda durante a fase crônica os esferóides podem mostrar reação positiva ao teste de sonda genética, o que sugere uma relação estreita com o processo da doença (PANTOJA; LIGHTNER, 2008).

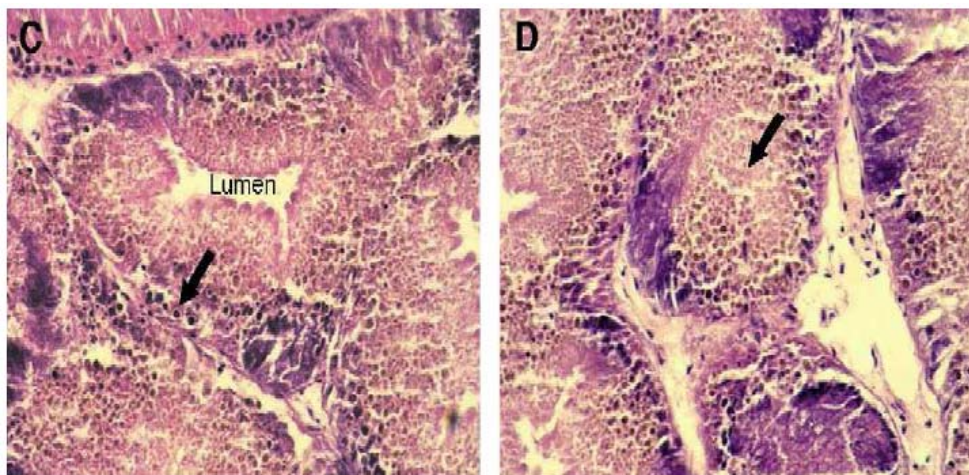


Figura 10 – Lesão histopatológica de TSV em camarão *L. vannamei*. Corpúsculos de inclusão viral (C); destruição das células hematopoiéticas dos órgãos linfóides (D)

Fonte: Phalitakul et al. (2006).

Diagnóstico

Para o diagnóstico presuntivo da TS são necessários alguns indicadores destacando-se entre eles: i) a presença de sinais clínicos da enfermidade; ii) o histórico da atividade desde as condições das instalações de cultivo, a espécie cultivada ou mesmo a região geográfica que indique a possibilidade de infecção pelo agente viral, como exemplo, a importação de *L. vannamei* proveniente do Equador ou de outras regiões com relatos do TSV; iii) preparações úmidas de apêndices (urópodos, escamas antenais, pleópodos) que apresentem necrose multifocal do epitélio cuticular em animais juvenis durante a fase superaguda ou aguda da doença (PANTOJA; LIGHTNER, 2008).

Atualmente, os métodos laboratoriais mais utilizados para o diagnóstico de TS são a histologia de rotina (H.E); a hibridização *in situ* com sondas genéticas específicas para o TSV; os bioensaios associados à histologia empregando camarão SPF juvenil da espécie *L. vannamei* como indicadores da presença do TSV; a identificação do RNA viral por meio da RT-PCR.

O diagnóstico histopatológico (H.E.) durante a fase aguda/superaguda da infecção baseia-se na demonstração de áreas multifocais de necrose presentes no epitélio cuticular da carapaça, apêndices, brânquias, esôfago, estômago e intestino posterior. Raramente o epitélio dos túbulos da glândula antenal é comprometido. O tecido conjuntivo sub-cuticular e as fibras adjacentes dos músculos estriados também podem estar comprometidos (PANTOJA; LIGHTNER, 2008).

Os testes de diagnóstico utilizando sondas genéticas de DNA complementar (cDNA) apresentam excelente sensibilidade em casos de infecção pelo TSV. Nas lesões ocasionadas pelo TSV a marcação é muita intensa com a formação de um precipitado de coloração variando do azul ao preto, localizado no citoplasma de células infectadas. Os fragmentos nucleares cariorréticos e picnóticos, que contribuem para o surgimento da aparência “apimentada” das lesões patognômicas, não reagem com a sonda genética (PANTOJA; LIGHTNER, 2008).

Controle e Profilaxia

Na produção de camarões os componentes básicos de um programa de biosseguridade devem incluir: o conhecimento das doenças existentes; a disponibilidade de métodos apropriados de diagnóstico; o controle dos vetores no ambiente; boas práticas de manejo; planos de desinfecção, contenção e erradicação das doenças nas fazendas; e controle nos laboratórios de produção de PLs (PRUDER, 2004).

Contudo, várias estratégias são empregadas para minimizar o risco da entrada de doenças nas unidades de produção da aquicultura de camarões. Entre elas destacam-se: o uso de animais SPF; sistemas com troca zero de água; utilização de probióticos e monitoramento dos efluentes; quarentena; controle do tráfego de pessoas, veículos e equipamentos; sistemas de diagnóstico rápidos, sensíveis e específicos (PRUDER, 2004).

Na aquicultura deve-se ainda considerar que a aplicação e o monitoramento de sistemas de vigilância de doenças infecciosas e de informação da saúde animal são difíceis de ser realizado por vários fatores, destacando-se entre eles o alto custo; a falta de desenvolvimento sócio-econômico e tecnológico em muitos países produtores; a diversidade das espécies cultivadas; a grande complexidade dos ambientes; e a variedade dos sistemas de cultivo e dos tipos de manejo (REANTASO et al., 2000).

Perspectivas

Considerando a importância das infecções virais nos sistemas intensivos de criação de camarões marinhos em todo o mundo, somente a adoção de práticas de manejo como o monitoramento constante do perfil sanitário e o desenvolvimento e avaliação de métodos de diagnósticos sensíveis e específicos poderá assegurar o sucesso da atividade produtiva. Além disso, é importante investir em formação dos produtores e funcionários das fazendas, a exemplo os cursos de formação continuada.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, T.P.D.; SRISUVAN, T.; TANG, K.F.J.; LIGHTNER, D.V. Real-time reverse transcription chain reaction using TaqMan probe for detection and quantification of infectious myonecrosis virus (IMNV). **Aquaculture**, v.264. p.9-15, 2007.
- BONDAD-REANTASO, M.G.; SUBASINGHE, R.P.; ARTHUR, J.R.; OGAWA, K.; CHINABUT, S.; ADLARD R.; TAN, Z.; SHARIFF, M. Disease and health management in Asian aquaculture. **Veterinary Parasitology**, v.132, p.249–272, 2005.
- BONAMI, J.R.; HASSON, K.W.; MARI, J.; POULOS, B.T.; LIGHTNER, D.V. Taura Syndrome of marine penaeid shrimp: characterization of viral agent. **Journal of General Virology**, v.78, p.313-319, 1997.
- BROCK, J.A. Special topic review: Taura syndrome, a disease important to shrimp farms in the Americas. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v.13, p.415-418, 1997.
- BROCK, J. A.; GOSE, R.; LIGHTNER, D.V.; HASSON, K.W. An overview on Taura syndrome, an important disease of farmed *Penaeus vannamei*. **Aquaculture**, p.84-94, 1995.
- DHAR, A.K.; LAKSHMAN, D.K.; AMUNDSEN, K.; ROBLES-SIKISAKA, R.; KAIZER, K.N.; ROY, S.; HASSON, K.W.; ALLNUTT, F.C.T. Characterization of a Taura syndrome virus isolate originating from the 2004 Texas epizootic in cultured shrimp. **Archives Virology**. v.155, p.315-327, 2010.
- ERICKSON, H.S.; ZARAIN-HERZBERG, M.; LIGHTNER, D.V. Detection of Taura syndrome virus (TSV) strain differences using selected diagnostics implications in penaeid shrimp. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.52, p.1-10, 2002.
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **The State of World Aquaculture**. 1. ed. Rome: FAO Fisheries Technical Paper, 2006.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). **The State of World Aquaculture**. 1. ed. Rome: FAO Fisheries Technical Paper, 2009.
- GESTEIRA, T.C.V. Enfermidades infecciosas registradas na carcinicultura brasileira. In.: SILVA-SOUZA, A. T. **Sanidade de Organismos Aquáticos**. 1. ed. Maringá: ABRAPOA, 2006. p.137-158.
- GRAF, C.; GERVAIS, N.; FERNANDES, M.P.C.; AYALA, J.C. Transmissão da síndrome da necrose idiopática muscular (NIM) em *Litopenaeus vannamei*. **Revista da ABCC**, v.4, n.5, p.45-47, 2006.
- HASSON, K.W.; LIGHTNER, D.V.; POULOS, B.T.; REDMAN, R.M.; WHITE, B.L.; BROCK, J.A.; BONAMI, J.R. Taura syndrome in *Penaeus vannamei*: Demonstration of viral etiology. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.23, p.115-126, 1995.

ICTV. Internacional Comité on Taxonomy of viruses. **ICTVdB – Index of viruses**. Disponível em: <<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2009>> Acesso em: 19 set. 2010.

JIMENEZ, R. Síndrome de Taura (Resumen). In: **Acuicultura del Ecuador. Cámara Nacional de Acuicultura**, Guayaquil, Ecuador, 1992. p.1-16.

KUNANOPPARAT, A.; CHAVISUTHANGKURA, P.; SENAPIN, S.; LONGYANT, S.; RUKPRATANPORN, S.; FLEGEL, T.W.; SITHIGORNGUL, P. Detection of infectious myonecrosis virus using monoclonal antibody specific to N and C fragments of the capsid protein expressed heterologously. **Journal of Virological Methods**. v.171, p.141-148, 2011.

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

LAKSHMI, G.J.; VENKATARAMIAH, A.; HOWSE, H.D. Effect of salinity and temperature changes on spontaneous muscle necrosis in *Penaeus aztecus* Ives. **Aquaculture**, v.13, p.35-43, 1978.

LARAMORE, C.R. Shrimp culture in Honduras following the Taura syndrome virus. In: **Proceeding of the 4th Symposium on Aquaculture in Central America: Focusing on Shrimp and Tilapia**, Tegucigalpa, Honduras, World Aquaculture Soc., Baton Rouge, Louisiana, USA, 1997, p.1-7.

LIGHTNER, D.V **A handbook of pathology and diagnostic procedures for diseases of penaeid shrimp**, Baton Rouge, Louisiana: World Aquaculture Society, 1996. CD-ROM.

LIGHTNER, D.V. The Penaeid Shrimp Viruses TSV, IHNV, WSSV, and YHV: Currents Status in the Americas, Available Diagnostics Methods, and Management Strategies. **Journal of Applied Aquaculture**, v.9, n. 2, p.27-52, 1999.

LIGHTNER, D.V. Exclusion of specific pathogens for diseases control in penaeid shrimp biosecurity program. In: LEE, C.S., O'BRYEN, P. J. **Biosecurity in aquaculture production systems: Exclusion of pathogens and other undesirables**. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA. 2003. p. 81-116.

LIGHTNER, D.V. Infectious Myonecrosis (IMN): a new virus disease of *Litopenaeus vannamei*. In: AQUACULTURE 2004 books of abstract. Baton Rouge, LA: World Aquaculture Society, 2004. p.353.

LIGHTNER, D.V.; PANTOJA, C.R. Infectious Myonecrosis (IMV): current status report on the biology of etiological agente and development of diagnostic methods. In: FEIRA NACIONAL DO CAMARÃO, Rio Grande do Norte. 2004. **Anais...** p.22.

LIGHTNER, D.V.; REDMAN, R.M.; HASSON, K.W.; PANTOJA, C.R. Taura syndrome in *Penaeus vannamei*: histopatology and ultrastructure. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.21, p.53-59, 1995.

LIGHTNER, D.V., PANTOJA, C.R., POULOS, B.T., TANG, K.F.J., REDMAN, R.M., ANDREAS, T., BONAMI, J.R. **Infectious Myonecrosis (IMN):** a new virus disease of *Litopenaeus vannamei*, Farming IntelliGene Technology Corporation. 2005. Disponível em: <http://www.iq2000kit.com/news_017.htm>. Acesso: 13 ago. 2005.

MADRID, R.M. Análise das exportações da carcinicultura brasileira de 1999 a 2003: cinco anos de sucesso e 2004, o início de uma nova fase. **Revista da ABCC**, v.1, p.76-84, 2005.

MARI, J.; POULOS, B.T.; LIGHTNER, D.V.; BONAMI, J.R. Shrimp Taura syndrome virus: genomic characterization and similarity with members of the genus Cricket paralysis-like viruses. **Journal of General Virology**, v.83, p.915-926, 2002.

MORALES, V.; CUÉLLAR-ANJEL, J. **Guía Técnica -Patología e Inmunología de Camarones Penaeidos**, Programa CYTED Red II-D Vannamei, Panamá, c.2, 2008, p.8.

NETO, F.G. **A Inflexão Da Trajetória Evolutiva Do Cluster Da Carcinicultura De Laguna: Conseqüências Nas Interações Dos Agentes E Instituições**, Tese de doutorado da Universidade Federal de Santa Catarina, 2007.

NIELSEN, L.; SANG-OUM, W.; CHEEVADHANARAK, S.; FLEGEL, T.W. Taura syndrome virus (TSV) in Thailand and its relationship to TSV in China and the Americas. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.63, p.101-106, 2005.

NIBERT, M.L. '2A-like' and 'shifty heptamer' motifs in penaeid shrimp infectious myonecrosis virus, a monosegmented double-stranded RNA virus. **Journal General Virology**, v.88, p.1315-1318, 2007.

NUNES, A.J.P.; MARTINS, P.C.C.; GESTEIRA, T.C.V. Carcinicultura ameaçada. Produtores sofrem com mortalidades decorrentes do vírus da mionecrose infecciosa (IMNV). **Panorama da Aqüicultura**, v.83, p.37-51, 2004.

OIE Office International Epizootics. **Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals**. 2003. Disponível em:<<http://www.oie.int/eng/normes/fmanuel/A.htm>>. Acesso: 12 jul. 2010.

PANTOJA, C.R.; NAVARRO, S.A.; NARANJO, J.; LIGHTNER, D.V.; GERBA, C.P. Nonsusceptibility of Primate Cells to Taura Syndrome Virus. **Emerging Infectious Diseases**, v.10, n.12, p.2106-2112, 2004.

PANTOJA, C.R.; LIGHTNER, D.V. Enfermedades Virales. In: MORALES, V.; CUÉLLAR-ANJEL, J. **Guía Técnica -Patología e Inmunología de Camarones Penaeidos**, Programa CYTED Red II-D Vannamei, Panamá, c.2. 2008, p. 8.

PHALITAKUL, S.; WONGTAWATCHAI, J.; SARIKAPUTI, M.; VISESHAKUL, N. The molecular detection of Taura syndrome virus emerging with White spot syndrome virus in penaeid shrimps of Thailand. **Aquaculture**, v.260, p.77-85, 2006.

PINHEIRO, A.C.A.S.; LIMA A.P.S.; SOUZA M.E.; NETO, E.C.L.; ADRIÃO M.; GONÇALVES, V.S.P.; COIMBRA, M.R.M. Epidemiological status of Taura syndrome and Infectious myonecrosis viruses in *Penaeus vannamei* reared in Pernambuco (Brazil). **Aquaculture**. v.262, p. 1722, 2007.

- PEREIRA, A.M.L.; MENDES, E.S.; GESTEIRA, T.C.V. Mionecrosis infecciosa viral (IMNV) y sus implicaciones en los cultivos de camarones brasileños. In: MORALES, V.; CUÉLLAR-ANJEL, J. **Guía Técnica -Patología e Inmunología de Camarones Penaeidos**, Programa CYTED Red II-D Vannamei, Panamá, c.2, 2008, p. 8.
- POULOS, B.T.; TANG, K.F.J.; PANTOJA, C.R.; BONAMI, J.R.; LIGHTNER, D.V. Purification and characterization of infectious myonecrosis virus of penaeid shrimp. **Journal of General Virology**, v.87, p.987-996, 2006.
- PRUDER G.D. Biosecurity: application in aquaculture. **Aquaculture Engineering**, v.32, p.3-10, 2004.
- REANTASO, M.B.; PHILLIPS, M.J.; SUBASINGHE, R.P. Developing surveillance program for aquatic animal diseases in Asia-Pacific: progress and constraints. In: SALMAN, M.D., MORLEY, P.S., RUCH-GALLIE, R., **Ninth Symposium of the International Society for Veterinary Epidemiology and Economics (ISVEE)**, Breckenridge, Colorado, 2000, p.672–674.
- RIGDON, R.H.; BAXTER, K.N. Spontaneous necrosis in muscle of brown shrimp *Penaeus aztecus* Ives. **Transaction American Fisheries Society**, v.99, p.583-587, 1970.
- ROCHA, I.P. Desempenho da Carcinicultura Brasileira em 2007: Desafios e Oportunidades para 2008, **Revista da ABCC**, v. 10, n.1, 2008.
- SENAPIN, S.; PHEWSAIYA, K.; GRIGGS, M.; FLEGEL, T.W. Outbreaks of infectious myonecrosis virus (IMNV) in Indonesia confirmed by genome sequencing and use of an alternative RT-PCR detection method. **Aquaculture**, v.266, p.32-38, 2007.
- SINDERMANN, C. J.; LIGHTNER, D.V. **Disease Diagnosis and Control in North American Marine Aquaculture**. 2. ed. Elsevier, 1988. p.432.
- STERN, S. Swimming through troubled waters in shrimp farming: Ecuador Country Review. In: BROWDY, C.L.; HOPKINS, J.S. **Swimming Through Troubled Water, Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming**, Aquaculture, Baton Rouge, LA, World Aquaculture Society, 1995, p.35-39.
- SUBASINGHE, R.P.; BARTLEY, D.M.; MCGLADDERY, S.; BARG, U. Sustainable shrimp development: biotechnological issues and challenges. In: FLEGEL, T. W. **Advanced shrimp technology**. Bangkok: **BIOTEC**, 2008, p.13-18.
- TANG, K.F.J., PANTOJA, C.R., LIGHTNER, D.V. Infectious Myonecrosis Virus Infection In *Litopenaeus vannamei*, *Litopenaeus stylirostris*, and *Penaeus monodon*. **Aquaculture America**, WAS meeting abstract, 2005a.
- TANG, K.F.J.; PANTOJA, C.R.; POULOS, B.T.; REDMAN, M.R.; LIGHTNER, D.V. *In situ* hybridization demonstrates that *Litopenaeus vannamei*, *L. stylirostris* and *Penaeus monodon* are susceptible to experimental infection with infectious myonecrosis virus (IMNV). **Diseases of Aquatic Organisms**, v.63, p.261-265, 2005b.

TANG, K.F.J.; PANTOJA, C.R.; REDMAN, R.M.; LIGHTNER, D.V. Development *in situ* hybridization and RT-PCR assay for the detection of a nodavirus (PvNV) that causes muscle necrosis in *Penaeus vannamei*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.75, p.183-190, 2007.

TANG, K.F.J.; OCHOA, W.F.; SINKOVITS, R.S.; POULOS, B.T.; GHABRIAL, S.A.; LIGHTNER, D.V.; BAKER, T.S.; NIBERT, M.L. Infectious myonecrosis virus has a totivirus-like, 120-subunit capsid, but with fiber complexes at the fivefold axes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.105, p.17526-17531, 2008.

TU, C.; HUANG, H.T.; CHUANG, S.H.; HSU, J.P. Taura Syndrome in Pacific White shrimp *Penaeus vannamei* in Taiwan. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.38, p.159-161, 1999.

YU, C.I.; SONG, Y.L. Outbreaks of Taura Syndrome in Pacific white shrimp *Penaeus vannamei* cultured in Taiwan. **Fish Pathology**, n.35, p.21-24, 2000.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Investigar a presença do vírus da mionecrose infecciosa (IMNV) e do vírus da síndrome de Taura (TSV) em camarões *L. vannamei* na carcinicultura do estado de Santa Catarina.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar o IMNV e o TSV em amostras de camarões *L. vannamei* adultos e PLs, provenientes do estado de Santa Catarina, por RT-PCR.
- Otimizar a RT-PCR para a identificação do TSV;

3 ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO

3.1 ARTIGO A: IDENTIFICAÇÃO POR RT-PCR DO VÍRUS DA MIONECROSE INFECCIOSA (IMNV) EM CAMARÕES CULTIVADOS NO ESTADO DE SANTA CATARINA.

RESUMO

Dentre as doenças infecciosas presentes em camarões cultivados no nordeste do Brasil, a Mionecrose Infecciosa Viral (IMN) é a que tem causado maior impacto econômico na carcinicultura brasileira desde 2003. Este estudo teve como objetivo a identificação do vírus da mionecrose infecciosa (IMNV) em amostras de camarões marinhos (*Litopenaus vannamei*) cultivados no litoral de Santa Catarina por meio das técnicas de RT-PCR, sequenciamento e histopatologia. A RT-PCR e *nested*-PCR utilizando o kit comercial (IQ2000, Farming IntelliGene Thecnology Corporation, Taiwan™) proporcionou a amplificação de produtos com 510 pb e 255 pb do IMNV em 10% (1/10) das amostras provenientes de camarões adultos e em 21,2% (14/66) das amostras de pós-larvas avaliadas. A análise da sequência de nucleotídeos obtida demonstrou a especificidade do produto amplificado que apresentou 99% de similaridade com o IMNV. No exame histopatológico foram identificadas lesões compatíveis com as ocasionadas pela infecção com o IMNV destacando-se necrose de grupos de fibras musculares e infiltrado de células polimorfonucleares. Os resultados do presente estudo possibilitaram identificar pela primeira vez a infecção pelo IMNV em camarões marinhos cultivados no estado da Santa Catarina.

Palavras-chave: Carcinicultura, *Litopenaus vannamei*, IMNV, RT-PCR.

INFECTIOUS MYONECROSIS VIRUS (IMNV) DETECTION BY RT-PCR ASSAY IN SHRIMP IN THE STATE OF SANTA CATARINA, BRAZIL.

ABSTRACT

Among the infectious diseases in shrimp farming in northeastern Brazil, Myonecrosis Infectious (IMN) is what has caused the greatest impact on shrimp farming in Brazil since 2003. This study aims to identify the IMNV in shrimp (*Litopenaeus vannamei*) samples from Santa Catarina State, Brazilian South region using the RT-PCR assay, sequencing, and histopathology. The RT-PCR and nested-PCR using a commercial kit (IQ2000, Farming IntelliGene Technology Corporation, Taiwan™) provide the amplification of a product with 510 bp and 255 bp, respectively of IMNV 10% (1/10) of the adult shrimp samples and in 21.2% (14/66) of the postlarva evaluated. Analysis of nucleotide sequence demonstrated the specificity of the amplified product that showed 99% of similarity with the IMNV. The histopathological lesions such as muscular necrosis and infiltration of polymorphonuclear cells were consistent with IMNV infection. The results of this study allowed to identify for the first time the IMNV infection in cultured marine shrimp in the state of Santa Catarina, Brazil.

Keywords: Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, IMNV, RT-PCR.

INTRODUÇÃO

A carcinicultura marinha brasileira fundamentou-se na introdução do camarão *Litopenaeus vannamei* devido ao completo domínio do ciclo reprodutivo, ao aperfeiçoamento da tecnologia de manejo operacional, à disponibilidade de alimentos balanceados e à crescente demanda dos mercados interno e externo por camarão cultivado (ROCHA, 1999).

De 1970 a 1990 a indústria foi completamente dependente da captura de pós-larvas silvestres ou produzidas a partir de reprodutores capturados no oceano. Com frequência, estes animais eram capturados próximo às regiões de cultivo, realizado em sistemas relativamente simples, com medidas mínimas de biossegurança ou inexistentes e com alta taxa de renovação de água. No início, havia pouco conhecimento sobre as doenças de camarão e sobre os mecanismos de defesa humoral e celular destes crustáceos, especialmente frente aos agentes virais. O número de especialistas em patologia de camarão e o suporte diagnóstico eram ínfimos na maioria das regiões. O uso de antibióticos e produtos químicos eram práticas comuns, tanto em laboratórios quanto na produção de pós-larvas em fazendas (PANTOJA e LIGHTNER, 2008).

Dentre as doenças presentes em camarões cultivados no nordeste do Brasil, a Mionecrose Infecciosa (*infectious myonecrosis* -IMN) é a que tem causado maior impacto na carcinicultura desde 2003. Essa doença altera o comportamento dos camarões frente às condições de desequilíbrio ambiental e/ou práticas inadequadas de manejo sanitário, situação em que a doença apresenta as maiores consequências à carcinicultura (LIGHTNER, 2004).

A IMN foi descrita pela primeira vez a partir de casos clínicos ocorridos em agosto de 2002 no estado do Piauí, Brasil (POULOS et al., 2006). Posteriormente, a doença se disseminou atingindo criações nos estados do Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba e Pernambuco. Apenas em 2004 a doença foi reconhecida oficialmente como de etiologia viral (PINHEIRO, 2007).

Após a confirmação da natureza infecciosa, realizada por meio de inoculação experimental de tecidos provenientes de camarões com sinais clínicos em indivíduos SPF (*Specific Pathogen Free*), o agente etiológico da IMN foi identificado como um vírus pertencente à família *Totiviridae* (LIGHTNER e PANTOJA, 2004). A purificação e caracterização do vírus da mionecrose infecciosa (*infectious myonecrosis virus* – IMNV) foram realizadas por Poulos et al. (2006). O virion apresenta formato icosaédrico, mede 40

nm de diâmetro e o genoma é constituído por uma molécula de RNA dupla fita (dsRNA) contendo 7.560 pares de bases (KUNANOPPARAT et. al. 2011).

O IMNV infecta camarões lesionando, inicialmente, o órgão linfóide com conseqüente disseminação para outros tecidos. Em seu último estágio, a enfermidade atinge a porção distal do abdome, causando inflamação aguda do tecido muscular, seguida de necrose degenerativa progressiva, levando o animal à morte. Na histopatologia é possível observar no órgão linfóide os esferóides do órgão linfóide (LOS). Também podem ser observados LOS ectópicos, distribuídos pelo hemocelo, glândula antenal, cordão nervoso ventral e em outros tecidos dos animais infectados (KUNANOPPARAT et. al. 2011).

O IMNV foi apontado como uma das causas da redução da produção nacional de camarão cultivado em 2004. Nas fazendas infectadas, a doença determinou altas taxas de mortalidade. Nos sistemas de produção o estresse é um dos fatores responsáveis pela intensificação das conseqüências da infecção. Como medida de prevenção recomenda-se reduzir a densidade de povoamento (MADRID, 2005).

O presente estudo teve o objetivo identificar a presença do IMNV em camarões marinhos *L. vannamei* cultivados no estado de Santa Catarina.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de camarões

No período de novembro 2007 a maio de 2008 foram analisadas 76 amostras de camarões provenientes de laboratórios de produção de pós-larvas (PLs) do município de Laguna do estado de Santa Catarina. Inicialmente, foram analisadas 10 amostras de tecidos de fêmeas adultas (pleópodos) provenientes de fazendas de cultivos que foram selecionadas, confinadas e tratadas como reprodutores no laboratório de reprodução e que morreram após a ablação. Foram também incluídas na análise amostras de 66 tanques de PLs provenientes da região sul do estado da Bahia que foram encaminhadas ao estado de Santa Catarina para a recria. Em cada um dos 66 tanques foram colhidas 1000 pós-larvas com idade entre 12 a 14 dias. De todas as 76 amostras colhidas foram separadas duas frações. Uma fração foi processada de acordo com os procedimentos padrão para a realização de exame histopatológico. A partir da outra fração foram preparadas suspensões (10-20% p/v) em PBS

(137mM NaCl, 3mM KCl, 8mM Na₂HPO₄, 15mM KH₂PO₄) pH 7,2. Após centrifugação a 1.500 x g por 15 s os sobrenadantes foram estocados a -20° C.

Diagnóstico molecular do IMNV

Para a identificação do RNA do IMNV as suspensões de tecido de camarão foram analisadas por meio de um sistema comercial de *nested*-PCR IQ2000[®] (Farming IntelliGene Thechnology Corporation, Taiwan[™]). Todas as etapas, incluindo a extração do RNA, a transcrição reversa, a PCR e a *nested*-PCR foram realizadas em sistema *one-step* de acordo com as instruções do fabricante. Aliquotas de 10 µL dos produtos amplificados na *nested*-PCR foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 2% (Invitrogen[®] Life Techonologies, EUA) em tampão TBE pH 8,4 (89 mM Tris; 89 mM ácido bórico; 2 mM EDTA), sob voltagem constante (100V) por 60 min, contendo brometo de etídio (0,5 µg/mL) e visualizado sob luz UV.

Avaliação da especificidade da nested-PCR

A avaliação da especificidade do sistema comercial IQ2000[®] (Farming IntelliGene Thechnology Corporation, Taiwan[™]) de *nested*-PCR empregado para o diagnóstico do IMNV foi realizada em uma amostra de tecido proveniente de uma fêmea adulta. Como a sequência dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) constituintes do kit comercial não é fornecida pelo fabricante uma das amostras positivas, na qual foi amplificado um produto de 255 pb, também foi analisada por RT-PCR empregando os *primers* descritos por Poulos e Lightner (2006) que amplificam um produto de 328 pb da ORF1 do IMNV.

O RNA foi extraído utilizando o método sugerido pelo sistema comercial IQ2000[®] (Farming IntelliGene Thechnology Corporation, Taiwan[™]). A transcrição reversa foi realizada em uma solução contendo 5 µL do RNA extraído e 15 µL de RT-MIX constituído por 20 pmol do *primer* 4587 F-CGA CGC TGC TAA CCA TAC AA (nt. 4584 – 4603), 0,25 mM de cada dNTP (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), PCR *buffer* (20 mM Tris HCl pH 8,4 e 50 mM KCl), 1,5 mM MgCl₂, 5 U/µL da *Superscript III Reverse Transcriptase* (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) e água ultra-pura

autoclavada para o volume final de 20 μL . A amostra de RNA foi desnaturada a 97°C por 4 min e mantida em banho de gelo até a adição dos reagentes. A síntese do cDNA foi realizada em termociclador (PTC-200 MJ Research Co., EUA) a 42°C por 30 min com posterior inativação da enzima a 95°C por 5 min.

A PCR foi realizada em uma solução contendo 8 μL do cDNA e 42 μL de PCR-MIX constituído por 20 pmol dos *primers* F e 4914 R-ACT CGG CTG TTC GAT CAA GT (nt.4992 – 4911), 0,1 mM de cada dNTP, 5 U/ μL de Platinum *Taq* DNA polimerase recombinante (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), PCR *buffer* (20 mM Tris HCl pH 8,4 e 50 mM de KCl), 1,5 mM MgCl_2 e água ultra-pura autoclavada para o volume final de 50 μL . O cDNA foi desnaturado a 94°C por 4 min e mantido em banho de gelo até a adição dos reagentes. O processo de amplificação foi realizado em termociclador com as seguintes condições de tempo e temperatura: i) uma etapa de 3 min a 94°C; ii) 34 ciclos de 1 min a 94°C; 1 min a 55°C; e 1 min a 72°C; iii) uma etapa de extensão final de 5 min a 72°C.

O produto da RT-PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 2%, contendo brometo de etídio, em tampão TBE pH 8,4 e visualizado sob luz UV.

Sequenciamento do produto da RT-PCR

O produto com 328 pb da RT-PCR foi purificado utilizando-se o kit *GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE/Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden), de acordo com as especificações do fabricante.

O sequenciamento foi realizado no sequenciador *MEGABace 1000*[®] *DNA Analysis System*, utilizando o kit *DYEnamic*[®] *ET Dye Terminator* (GE/Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden), conforme especificações do fabricante. A reação foi realizada no volume final de 10 μL com 3,2 μL de mix (Sequenase, dNTP, ddNTP marcados com fluoróforos e tampão), 5,0 pmol dos *primers* 4587 F -CGA CGC TGC TAA CCA TAC AA e 4914 R -ACT CGG CTG TTC GAT CAA GT e 0,5 μL do produto da RT-PCR nas seguintes condições térmicas: 95°C a 25 s, seguidos de 35 ciclos de 95°C a 15 s, 55°C a 20 s e 60°C a 90 s. Posteriormente, o produto marcado foi precipitado com isopropanol 70%, lavado com etanol 70% e eluído em tampão próprio do kit contendo formamida e EDTA. O produto purificado foi eletroinjetado a 2KV por 120 s e eletroeluído por 150min a 9KV.

A sequência obtida foi analisada pelo programa *Sequence Analyser* (GE/Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden), com estringência e confiabilidade (>90%). A confirmação da identidade do fragmento foi realizada utilizando o programa BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) e a análise da qualidade foi avaliada por meio do programa Phred/Phrap/Consed (<http://www.phrap.org>) com qualidade de PHRED ≥ 15 (probabilidade de menos de 1 erro a cada 500 bases) (EWING e GREEN, 1998; EWING et al., 1998). A sequência foi alinhada utilizando o programa *ClustalW* (THOMPSON et al., 1994).

Histopatologia

Para a histopatologia uma amostra de tecido de camarão foi fixada em líquido de Davidson's e corada com hematoxilina e eosina (HE) conforme procedimento padrão do Laboratório de Patologia Animal da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC).

RESULTADOS

A técnica de PCR e *nested*-PCR utilizando o kit comercial IQ2000[®] (Farming IntelliGene Thechnology Corporation, TaiwanTM) proporcionou a amplificação de produtos com 510 pb e 255 pb, respectivamente, do IMNV em 10% (1/10) das amostras provenientes de camarão adulto e em 21,2% (14/66) das amostras de pós-larvas incluídas nesse estudo.

A especificidade do sistema comercial de *nested*-PCR para identificação do IMNV foi avaliada por meio da amplificação por RT-PCR de uma amostra positiva seguida do sequenciamento do produto amplificado. A análise da sequência de nucleotídeos obtida demonstrou a especificidade do produto amplificado que apresentou 99% de similaridade com o IMNV (GenBank número de acesso Ay570982.1).

No exame histopatológico foram identificadas lesões compatíveis com as ocasionadas pela infecção com o IMNV. O animal apresentou necrose de grupos de fibras musculares com leve infiltrado de células polimorfonucleares (Figura 1).

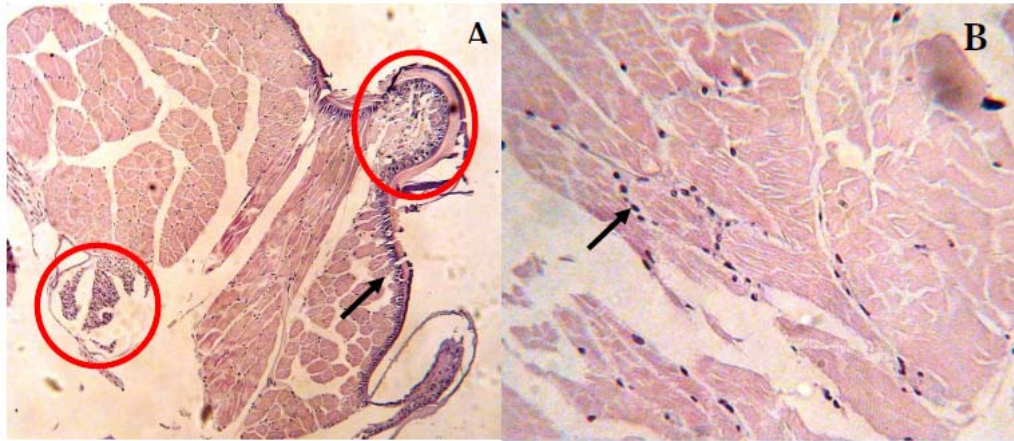


Figura 1 – Painel A. Infiltração de hemócitos no tecido muscular (*seta*). Alteração nos feixes de fibras musculares (*círculos*). **Painel B.** A seta indica um infiltrado de polimorfonucleares de intensidade leve com necrose de grupos de fibras musculares

Fonte: UDESC.

DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo possibilitaram identificar, pela primeira vez, a infecção pelo IMNV em camarões marinhos cultivados no estado da Santa Catarina. O IMNV foi identificado pela *nested*-PCR em um exemplar de fêmea adulta e em *pools* de pós-larvas utilizadas para recria, provenientes do sul do estado da Bahia.

O IMNV está presente em todos os estados do nordeste brasileiro nos quais a carcinicultura é uma atividade com importância econômica (PINHEIRO, 2007). Provavelmente, a importação de reprodutores e de pós-larvas dessa região tenha sido responsável pela introdução do IMNV nos sistemas de cultivo de camarão marinho do estado de Santa Catarina. Destaca-se ainda a comercialização, muitas vezes clandestina, de camarões frescos que abastecem os estabelecimentos comerciais como peixarias, restaurantes e redes de supermercados. Geralmente os animais são processados e o exoesqueleto (cabeça e pleópodos), potencialmente infectado, é eliminado no ambiente sem qualquer tratamento. Esse material constitui-se em risco biológico, principalmente para espécies nativas de camarões.

Segundo Pereira et al. (2008), a falta de barreiras sanitárias em atividades aquícolas agravou a situação epidemiológica do IMNV, pois permitiu a rápida disseminação da doença entre fazendas de camarão na região nordeste do Brasil, muito antes do pleno conhecimento da dimensão do problema. A desinformação dos produtores sobre a doença,

suas formas de prevenção e de ações corretivas perante um problema sanitário, contribuíram para agravar o problema. Em muitas situações, por desconhecimento, o produtor utiliza técnicas não apropriadas de manejo. Durante a despesca pode ser liberada no ambiente uma carga excessiva de efluentes contaminados por vírus que contribui com a disseminação da infecção.

Outra justificativa para os resultados obtidos no presente trabalho é a possibilidade da presença anterior do IMNV no estuário catarinense e que, devido à falta de diagnóstico, ainda não tenha sido descrita. A possível presença do vírus na região pode ser justificada pela entrada constante de navios que despejam milhares de litros de água de lastro trazidos das mais diferentes regiões do país e do mundo. A água de lastro, utilizada para equilibrar o navio durante a navegação, pode carrear diversos micro-organismos potencialmente patogênicos ou mesmo outros organismos já infectados. A utilização de água dos estuários tanto para o cultivo de camarão em fazendas quanto nos laboratórios intensifica ainda mais a importância da contaminação ambiental.

Na região e no período da realização desse estudo as normas básicas de biossegurança em áreas de cultivo de camarões, recomendadas pela Associação Brasileira de Criadores de Camarões (ABCC), não eram cumpridas na íntegra ou quando implementadas eram mal executadas. Sem dúvida, o desconhecimento e a falta de preparo dos produtores frente aos fatores de risco envolvidos na epidemiologia da infecção podem ter sido os responsáveis por sua disseminação.

Os camarões na fase aguda da infecção pelo IMNV apresentam necrose muscular coagulativa, frequentemente associada a edema. Esta progressão da mionecrose é acompanhada por infiltração hemocítica e fibrose e o aparecimento de esferóides do órgão linfóide é um dos sinais característicos da presença da doença (TANG et al., 2005b; KUNANOPPARAT et al., 2011). No presente estudo, as análises histopatológicas realizadas nos tecidos de camarões que apresentaram lesões macroscópicas confirmaram a presença de alterações compatíveis com a mionecrose, ratificando os resultados moleculares obtidos pela PCR.

Existem alguns relatos de enfermidades com sinais clínicos idênticos aos da mionecrose infecciosa identificadas em camarões da espécie *Farfantepenaeus subtilis* no Brasil, na costa piauiense na década de 80 (SANTANA, et al, 2004) e em *Penaeus aztecus* na década de 70 na Baía de Galveston nos EUA (RIGDON e BAXTER, 1970). No estudo realizado com amostras de camarões colhidas em Santa Catarina também foram encontrados sinais clínicos compatíveis com outras doenças que causam a mionecrose. Entretanto, no

presente estudo a presença do IMNV nos tecidos de camarões foi confirmada por meio do sequenciamento e análise de nucleotídeos realizada no produto amplificado pela RT-PCR. O conjunto das informações obtidas incluindo os sinais clínicos; as alterações macroscópicas; as lesões histopatológicas; a amplificação por *nested*-PCR de um produto com tamanho molecular esperado; e, principalmente, o resultado do sequenciamento do amplicon da RT-PCR, ratificam que a lesão muscular observada foi ocasionada pela infecção pelo IMNV, bem como confirmam a sua presença na carcinicultura do estado de Santa Catarina.

Os resultados encontrados nesse estudo ratificam a importância da implementação e o monitoramento de medidas de mitigação de riscos envolvidos na cadeia epidemiológica dessa virose responsável por prejuízos econômicos consideráveis para a indústria da carcinicultura brasileira e mundial.

REFERÊNCIAS

- EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Research**, v.8, n.3, p.186-94, 1998.
- EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M.C. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, v.8, n.3, p.175-85, 1998.
- KUNANOPPARAT, A.; CHAVISUTHANGKURA, P.; SENAPIN, S.; LONGYANT, S.; RUKPRATANPORN, S.; FLEGEL, T.W.; SITHIGORNGUL, P. Detection of infectious myonecrosis virus using monoclonal antibody specific to N and C fragments of the capsid protein expressed heterologously. **Journal of Virological Methods**. v.171, p.141-148, 2011.
- LIGHTNER, D.V. Infectious Myonecrosis (IMN): a new virus disease of *Litopenaeus vannamei*. In: **Aquaculture 2004 books of abstract**, Baton Rouge, LA: World Aquaculture Society, p.353, 2004.
- LIGHTNER, D.V.; PANTOJA, C.R. Infectious Myonecrosis (IMV): current status report on the biology of etiological agente and development of diagnostic methods. in: FEIRA NACIONAL DO CAMARÃO, Rio Grande do Norte. **Anais...** p.22, 2004.
- MADRID, R.M. Análise das exportações da carcinicultura brasileira de 1999 a 2003: cinco anos de sucesso e 2004, o início de uma nova fase. **Revista da ABCC**, n.1, p.76-84, 2005.
- PANTOJA, C.R.; LIGHTNER, D.V. *Enfermedades Virales*. In: MORALES, V.; CUÉLLAR-ANJEL, J. **Guía Técnica -Patología e Inmunología de Camarones Penaeidos**, Programa CYTED Red II-D Vannamei, Panamá, c.2, 2008, p.8.
- PEREIRA, A.M.L.; MENDES, E.S.; GESTEIRA, T.C.V. Mionecrosis infecciosa viral (IMNV) y sus implicaciones en los cultivos de camarones brasileños. In: MORALES, V.; CUÉLLAR-ANJEL, J. **Guía Técnica -Patología e Inmunología de Camarones Penaeidos**, Programa CYTED Red II-D Vannamei, Panamá, c.2, 2008, p. 8.
- PINHEIRO, A.C.A.S.; LIMA A.P.S.; SOUZA M.E.; NETO, E.C.L.; ADRIÃO M.; GONÇALVES, V.S.P.; COIMBRA, M.R.M. Epidemiological status of Taura syndrome and Infectious myonecrosis viruses in *Penaeus vannamei* reared in Pernambuco (Brazil). **Aquaculture**. v.262, p. 17-22, 2007.
- POULOS, B.T.; TANG, K.F.J.; PANTOJA, C.R.; BONAMI, J.R.; LIGHTNER, D.V. Purification and characterization of infectious myonecrosis virus of penaeid shrimp. **Journal of General Virology**, v.87, p.987-996, 2006.
- POULOS B.T., LIGHTNER D.V. Detection of infectious myonecrosis virus (IMNV) of penaeid shrimp by reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). **Diseases of Aquatic Organisms**, v.73, p.69-72, 2006.
- RIGDON, R.H.; BAXTER, K.N. Spontaneous necrosis in muscle of brown shrimp *Penaeus aztecus* Ives. **Transaction American Fisheries Society**, v.99, p.583-587, 1970.

ROCHA I.P. Carcinicultura brasileira: situação atual e sugestões para sua sustentabilidade. **Revista da ABCC**, v.2, p.26-28, 1999.

SANTANA, W.M. et al. **O vírus da mionecrose infecciosa (IMNV): uma nova enfermidade?** Jornada de ensino, pesquisa e extensão da UFRPE, 4, 2004, Recife. Anais, Recife, 2004. 1 CD-ROM.

SILVA, V.A. **Estudo anatomopatológico da minecrose infecciosa viral (IMNV) no camarão cultivado, *Litopenaeus Vannamei*, em Pernambuco, Brasil**, Dissertação de mestrado em Recursos Pesqueiros e Aqüicultura da Universidade Federal Rural de Pernambuco – PB, 2007.

TANG, K.F.J.; PANTOJA, C.R.; POULOS, B.T.; REDMAN, M.R.; LIGHTNER, D.V. *In situ* hybridization demonstrates that *Litopenaeus vannamei*, *L. stylirostris* and *Penaeus monodon* are susceptible to experimental infection with infectious myonecrosis virus (IMNV). **Diseases of Aquatic Organisms**, v.63, p.261-265, 2005.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G; GIBSON, T.J.; CLUSTAL W. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v.22, n.22, p.4673-80, 1994.

3.2 ARTIGO B: OTIMIZAÇÃO DA RT-PCR PARA A IDENTIFICAÇÃO DO VÍRUS DA SÍNDROME DE TAURA EM CAMARÕES

RESUMO

Desde 1992, quando foi descrita pela primeira vez no Equador a síndrome de Taura (*Taura syndrome* – TS) se disseminou por diversos países produtores de camarões da América Latina. Este estudo teve como objetivo otimizar a técnica da RT-PCR para o diagnóstico do vírus da síndrome de Taura (TSV) em camarões marinhos utilizando os oligonucleotídeos iniciadores recomendados pela OIE e um DNA plasmidial contendo um gene do TSV como controle positivo. Os melhores resultados, avaliados pela amplificação de um produto de 231 pb com maior intensidade de coloração em gel de agarose contendo brometo de etídio foram obtidos empregando a temperatura de anelamento de 59°C; 2,5 mM MgCl₂ e 100 µM de dNTP. Nestas condições, a técnica apresentou alta sensibilidade sendo possível amplificar o DNA plasmidial até a diluição de 10⁻⁹. Nas análises de sensibilidade não foram produzidas reações positivas em tecido de camarão assintomático e em amostras contendo vírus da mancha branca (WSSV), mionecrose infecciosa (IMNV) e infecção hipodermal e necrose hematopoiética (IHHNV). Após a padronização o sistema foi empregado na análise de amostras provenientes de camarão adulto ($n=10$) e de *pools* de pós-larvas ($n=66$) colhidas no litoral norte do estado de Santa Catarina. Porém, nenhuma das amostras incluídas nesse estudo foi positiva para o TSV. As altas taxas de sensibilidade e especificidade na detecção do TSV obtidas nesse estudo demonstram que a RT-PCR é uma boa ferramenta para uso na rotina de diagnóstico de monitoramento sanitário do TSV em populações de camarão marinho cultivado.

Palavras-Chave: Camarão, *L. vannamei*, TSV, RT-PCR.

OPTIMIZATION OF A RT-PCR ASSAY FOR THE TAURA SYNDROME VIRUS DETECTION IN SHRIMP.

ABSTRACT

Since 1992, when it was first described in Ecuador the Taura syndrome (TS) has spread to several shrimp producing countries in Latin America. This study aims to optimize the RT-PCR assay for diagnosis of the Taura syndrome virus (TSV) in marine shrimp using the primers recommend by OIE and a plasmid DNA with TSV gene as positive control. The best results were evaluated by the amplification of a product with 231 bp. The high intensity of staining in agarose gel stained with ethidium bromide was obtained with the annealing temperature of 59°C, 2.5 mM MgCl₂, and 100 µM dNTP. In these conditions, the RT-PCR assay showed high sensibility being possible to amplify DNA plasmid until the dilution of 10⁻⁹. In the specificity analyses positive reactions were not produced in samples of asymptomatic shrimp and in samples of shrimp naturally infected with white spot (WSSV), infectious myonecrosis IMNV and infectious hypodermal and hematopietic necrosis virus (IHHNV). After the RT-PCR assay standardization the technique was used in the analysis of shrimp samples (adult, *n*=10; PLs pools, *n*=66) of the north coast of the state of Santa Catarina. However, none of the samples included in this study was TSV positive. The high rates of sensitivity and specificity in the TSV detection obtained in this study demonstrate that RT-PCR assay is a good tool for use in the routine of TSV diagnosis in sea shrimp herds.

Keywords: Shrimp, *L. vannamei*, TSV, RT-PCR.

INTRODUÇÃO

Desde 1992, quando foi descrita pela primeira vez no Equador (Jimenez, 1992), a Síndrome de Taura (*Taura syndrome* – TS) se disseminou por diversos países produtores de camarões da América Latina (PINHEIRO, 2007). Em 2000 a TS foi também descrita em Taiwan (CHIEN et al., 1999; YU e SONG, 2000).

Em 1994 a TS causou prejuízos econômicos da ordem de US\$100 milhões para a carcinicultura do Peru, Colômbia, Honduras, Jamaica, Guatemala, El Salvador, Belize, México e Hawai (BROCK et al., 1995).

O vírus da síndrome de Taura (*Taura syndrome virus* -TSV) pertencente à família *Dicistroviridae* não possui envelope, apresenta morfologia icosaédrica, diâmetro de 31 a 32 nm e densidade em gradiente de CsCl de 1,338g/mL. O genoma viral é constituído por RNA fita simples linear com 10.205 nucleotídeos dispostos em dois quadros abertos de leitura (*Open Reading Frame* -ORF). A ORF 1 contém as sequências de nucleotídeos que codificam as proteínas não-estruturais como a helicase, protease e a RNA polimerase. A ORF 2 codifica as proteínas estruturais (VP1, VP2 e VP3) do capsídeo (HASSON et al., 1995). Até o momento foram descritos três sorotipos do TSV denominados TSV-A, TSV-B e TSV-C (ERICKSON et al., 2002; DHAR et. al., 2010).

Os camarões infectados com o TSV apresentam-se avermelhados em função da expansão de cromatóforos. Os animais moribundos não conseguem completar o processo de muda, morrendo com o exoesqueleto ainda mole. Quando capturados vivos, os animais apresentam comportamento letárgico e não se alimentam. As maiores taxas de mortalidade ocorrem, com maior frequência, entre 15 a 45 dias após a estocagem das pós-larvas no viveiro. A taxa diária de mortalidade pode alcançar 25%. Ao final do ciclo a taxa de sobreviventes varia entre 5 a 25%. Na fase crônica da doença os camarões conseguem sobreviver à muda, podendo apresentar comportamento ativo e alimentar-se normalmente. Neste estágio, os indivíduos infectados apresentam lesões e melanizações na cutícula, podendo sucumbir nos ciclos de mudas subsequentes. Em algumas situações, os animais podem apresentar cutícula mole e expansão avermelhada dos cromatóforos. A transmissão da infecção pode ser vertical, durante o desenvolvimento embrionário, ou horizontal, por meio da ingestão de tecido contaminado com o vírus e contato com água ou equipamentos contaminados (OIE, 2003).

Os métodos de diagnóstico disponíveis para a detecção de doenças infecciosas que comprometem os camarões peneídeos incluem métodos tradicionais de

patologia morfológica (microscopia direta, histopatologia e microscopia eletrônica), bioensaios e métodos moleculares (OIE, 2003).

A aplicação de tecnologias moleculares em sistemas de diagnóstico na aquicultura evoluiu rapidamente. Técnicas moleculares apresentam a vantagem de fornecer resultados rápidos e de apresentarem alta sensibilidade e especificidade. Essas técnicas são particularmente recomendadas para o diagnóstico das infecções nas quais a histopatologia convencional não é conclusiva (BONDAD-REANTASO et al., 2005).

O objetivo do presente trabalho foi otimizar a técnica da RT-PCR para o diagnóstico do TSV a partir de amostras de tecidos de camarões marinhos.

MATERIAL E MÉTODOS

RT-PCR:

Uma amostra de RNA extraído do TSV, eluído em etanol 95%, proveniente do Centro de Investigação em Aquicultura da Colômbia (CENIACUA), foi utilizada para a otimização da RT-PCR. Todas as etapas de padronização da técnica foram realizadas utilizando os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) 9992 F -AAG TAG ACA GCC GCG CTT (nt.6910 – 6927) e 9195 R -TCA ATG AGA GCT TGG TCC (nt.7123 – 7140) descritos no Manual de Diagnóstico de Enfermidades de Organismos Aquáticos da OIE (OIE, 2003).

Inicialmente 5µL do RNA extraído foram submetidos a pré-desnaturação a 97°C por 4 min utilizando 4µL de água ultra-pura autoclavada e 1µL do *primer* F. A reação foi realizada com 10µL de RT-MIX contendo 0,25 mM de cada dNTP (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), PCR *buffer* (20 mM Tris HCl pH 8,4 e 50 mM KCl), 2,0 mM MgCl₂, 5 U/µL da *Superscript III Reverse Transcriptase* (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) e água ultra-pura autoclavada para o volume final de 20 µL. A síntese do cDNA foi realizada em termociclador (PTC-200 MJ Research Co., EUA) a 42°C por 30 min com posterior inativação da enzima a 95°C por 5 min.

A PCR foi realizada em uma solução contendo 8 µL do cDNA e 42 µL de PCRMIX constituído por 20 pmol dos *primers* F e R, 0,1 mM de cada dNTP, 5 U/µL de Platinum *Taq* DNA polimerase recombinante (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), PCR *buffer* (20 mM Tris HCl pH 8,4 e 50 mM de KCl), 2,0 mM MgCl₂ e água ultra-

pura autoclavada para o volume final de 50 µL. O cDNA foi desnaturado a 94°C por 4 min e mantido em banho de gelo até a adição dos reagentes. O processo de amplificação foi realizado em termociclador com as seguintes condições de tempo e temperatura: i) uma etapa de 3 min a 94°C; ii) 34 ciclos de 1 min a 94°C; 1 min a 55°C; e 1 min a 72°C; iii) uma etapa de extensão final de 4 min a 72°C.

O produto da RT-PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 2%, contendo brometo de etídio em tampão TBE pH 8,4 e visualizado sob luz UV.

Clonagem do produto amplificado pela RT-PCR:

O produto com 231 pb amplificado pela RT-PCR, foi recortado e purificado do gel de agarose com os kits comerciais illustraTM GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare UK Limited Little Chalfont). Para a clonagem foi utilizado o kit TOPO TA Cloning kit for Sequencing (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. O DNA plasmidial de dois clones foi submetido ao sequenciamento direto, em ambas as direções, com os *primers* M13 *forward* e *reverse*, utilizando o *kit DYEnamic ET dye terminator cycle sequencing* (Amersham Biosciences, UK) em sequenciador automático MegaBACE 1000/Automated 96 Capillary DNA Sequencer (GE Healthcare, Little Chalfont, UK).

A qualidade das sequências obtidas dos dois clones foi analisada no programa PHRED (<http://www.phrap.org/phredphrapconsed.html>), sendo aceitas somente sequências com qualidade de base igual ou superior a 20. A sequência consenso foi gerada no programa CAP3 e comparada com as sequências depositadas em bases públicas de dados (GenBank – *National Institute of Health*, Bethesda, MD, EUA) utilizando o programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Extração e purificação do DNA plasmidial

A extração do DNA plasmidial foi realizada de acordo com o *Kit ILLUSTRATETM PlasmidPrep Mini Spin Kit*, (GE Healthcare, UK Limited Little Chalfont) de

acordo com as instruções do fabricante. A quantificação foi realizada por meio do *QUBIT™ Fluorometer* (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA).

Sensibilidade da RT-PCR

A partir do DNA plasmidial foram realizadas diluições seriadas na base 10 (10^{-1} até 10^{-14}). As diluições foram submetidas à PCR em uma solução contendo 1 μ L do DNA plasmidial e 25 μ L de PCR-MIX contendo 20 pmol dos *primers* F e R, 2,5 mM de cada dNTP, 2,5 U/ μ L de Platinum *Taq* DNA polimerase recombinante (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), PCR *buffer* (20 mM Tris HCl pH 8,4 e 50 mM de KCl), 1,0 mM MgCl₂ e água ultra-pura autoclavada para o volume final de 25 μ L. O processo de amplificação foi realizado em termociclador com as seguintes condições de tempo e temperatura: i) uma etapa de 3 min a 94°C; ii) 34 ciclos de 1 min a 94°C; 1 min a 55°C; e 1 min a 72°C; iii) uma etapa de extensão final de 4 min a 72°C. O produto da RT-PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 2%, contendo brometo de etídio em tampão TBE pH 8,4 e visualizado sob luz UV.

Temperatura de anelamento

Para o teste do gradiente de temperatura foi utilizado uma alíquota da diluição 10^{-9} do DNA plasmidial quantificado em 160 ag/ μ L. A diluição foi submetida à PCR em uma solução contendo 1 μ L do DNA e 25 μ L de PCR-MIX constituído por 20 pmol dos *primers* F e R, 2,5 mM de cada dNTP, 2,5 U/ μ L de Platinum *Taq* DNA polimerase recombinante (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), PCR *buffer* (20 mM Tris HCl pH 8,4 e 50 mM de KCl), 1,0 mM MgCl₂ e água ultra-pura autoclavada para o volume final de 25 μ L. O processo de amplificação foi realizado em termociclador com gradiente de temperatura de anelamento, com as seguintes condições: i) uma etapa de 3 min a 94°C; ii) 34 ciclos de 1 min a 94°C; 1 min a 51°C, 53°C, 55°C, 57°C, 59°C e 61°C; e 1 min a 72°C; iii) uma etapa de extensão final de 4 min a 72°C. O produto da RT-PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 2%, contendo brometo de etídio em tampão TBE pH 8,4 e visualizado sob luz UV.

Concentração de dNTP

Para a análise da melhor concentração de dNTP foi utilizada uma alíquota da diluição 10^{-9} do DNA plasmidial. A diluição foi submetida à PCR em uma solução contendo 1 μ L do DNA plasmidial e 25 μ L de PCR-MIX constituído por 20 pmol dos *primers* F e R, 100 μ M, 200 μ M, 300 μ M de dNTP, 2,5 U/ μ L de Platinum *Taq* DNA polimerase recombinante (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), PCR buffer (20 mM Tris HCl pH 8,4 e 50 mM de KCl), 1,0 mM MgCl₂ e água ultra-pura autoclavada para o volume final de 25 μ L. O processo de amplificação foi realizado em termociclador com as seguintes condições de tempo e temperatura: i) uma etapa de 3 min a 94°C; ii) 34 ciclos de 1 min a 94°C; 1 min a 59 °C; e 1 min a 72°C; iii) uma etapa de extensão final de 4 min a 72°C. O produto da RT-PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 2%, contendo brometo de etídio em tampão TBE pH 8,4 e visualizado sob luz UV.

Concentração de MgCl₂

Para a avaliação da melhor concentração de MgCl₂ foi utilizada uma alíquota da diluição 10^{-9} . A diluição foi submetida à PCR em uma solução contendo 1 μ L do DNA plasmidial e 25 μ L de PCR-MIX constituído por 20 pmol dos *primers* F e R, 100 μ M de dNTP a 2,5 mM, 2,5 U/ μ L de Platinum *Taq* DNA polimerase recombinante (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), PCR buffer (20 mM Tris HCl pH 8,4 e 50 mM de KCl), 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0 mM de MgCl₂ e água ultra-pura autoclavada para o volume final de 25 μ L. A amplificação e análise do produto amplificado foram realizadas como descrito no tópico anterior.

Especificidade da reação

Foram utilizados 400 μ L de uma suspensão a 20% (p/v) de pleópodos de camarão assintomático em PBS, artificialmente contaminado com 15,7 ng de plasmídeo TSV e pleópodos de camarão positivo pela PCR para os vírus da doença da mancha branca

(WSSV), da infecção hipodermal e necrose hematopoiética (IHHNV) e da mionecrose infecciosa (IMNV). A extração do DNA foi realizada segundo Boom et al. (1990).

Amostras biológicas

No período de novembro 2007 a maio de 2008 foram analisadas 76 amostras de camarões provenientes de laboratórios de produção de pós-larvas (PLs) do município de Laguna do estado de Santa Catarina. Inicialmente, foram analisadas 10 amostras de tecidos de fêmeas adultas (pleópodos) provenientes de fazendas de cultivos que foram selecionadas, confinadas e tratadas como reprodutores no laboratório de reprodução e que morreram após a ablação. Foram também incluídas na análise amostras de 66 tanques de PLs provenientes da região sul do estado da Bahia que foram encaminhadas ao estado de Santa Catarina para a recria. Em cada um dos 66 tanques foram colhidas 1000 pós-larvas com idade entre 12 a 14 dias. De todas as 76 amostras colhidas foram separadas duas frações. Foram preparadas suspensões (10-20% p/v) em PBS (137mM NaCl, 3mM KCl, 8mM Na₂HPO₄, 15mM KH₂PO₄) pH 7,2. Após centrifugação a 1.500 x g por 15 s os sobrenadantes foram estocados a -20° C. Primeiramente, 5µL do ácido nucléico extraído foram submetidos desnaturação a 97°C por 4 min utilizando 4µL de água ultra-pura autoclavada e 1µL do *primer* F -AAG TAG ACA GCC GCG CTT (nt.6910 – 6827), 10 µL do RT-MIX constituído por 0,25 mM de cada dNTP (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), PCR *buffer* (20 mM Tris HCl pH 8,4 e 50 mM KCl), 2,0 mM de MgCl₂, 5 U/µL da *Superscript* (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) e água ultra-pura autoclavada para o volume final de 20 µL. A síntese do cDNA foi realizada em termociclador (PTC-200 MJ Research Co., EUA) a 42°C por 30 min com posterior inativação da enzima a 95°C por 5 min. Para continuidade da reação foram utilizados 8 µL do produto da RT. A PCR foi realizada nas melhores condições obtidas nas etapas de padronização.

RESULTADOS

Os melhores resultados, avaliados pela amplificação de um produto de 231 pb com maior intensidade de coloração em gel de agarose contendo brometo de etídio, foram obtidos empregando a temperatura de anelamento de 59°C; 2,5 mM MgCl₂ e 100 µM de

dNTP. Nestas condições a técnica apresentou alta sensibilidade sendo possível amplificar o gene do TSV clonado em plasmídeo até a diluição de 10^{-9} , equivalente a 160 atograma de DNA plasmidial. O teste de sensibilidade do sistema utilizando diluições seriadas de material biológico de camarão artificialmente contaminadas com 15,7 ng de DNA plasmidial produziu reações positivas até a diluição 10^{-8} que corresponde a concentração de 1,6 fg de DNA. Nas análises de especificidade não foram produzidas reações positivas em tecido de camarão assintomático e em amostras contendo os vírus IMNV, WSSV e IHHNV. Nenhuma das amostra de camarão adulto ($n=10$) e de pools ($n=66$) de PLs incluída no estudo foi positiva para o TSV.

DISCUSSÃO

O sistema de PCR para a detecção do TSV otimizado nesse estudo apresentou alta sensibilidade e especificidade demonstrando ser uma boa ferramenta para uso na rotina de diagnóstico e monitoramento sanitário da infecção pelo TSV em populações de camarão marinho cultivado.

Devido à dificuldade na obtenção de amostras do TSV e, principalmente, por condições de biossegurança optamos por utilizar nas etapas de padronização do sistema o cDNA do produto amplificado clonado em plasmídeo. Apesar de não representar de forma fidedigna as condições encontradas em infecções naturais, o uso de plasmídios é universalmente aceito e utilizado para a padronização de sistemas de diagnóstico pela ausência de risco biológico como contaminação e/ou escape do vírus para o ambiente. A clonagem do DNA facilita o isolamento e a manipulação dos fragmentos do genoma de um organismo, replicando-os independentemente como parte de um vetor autônomo (TURNER et al., 2004).

Nenhuma das amostras biológicas avaliadas nesse estudo apresentou reação positiva para o vírus. Estudos sobre a distribuição geográfica do TSV realizados em 13 países das Américas, incluindo o Brasil, registraram a presença do vírus em todos os locais. Hasson et al. (1995) avaliaram cinco espécimes provenientes do estado de Pernambuco, por meio da hibridização *in situ* e detectaram o TSV em quatro amostras. Apesar deste registro, nenhum surto de TSV foi relatado no local ou mesmo em outras regiões do país até o momento. Em outro estudo realizado por Pinheiro (2007) foi constatado que dos 530 camarões analisados

pela RT-PCR, nenhum apresentou diagnóstico positivo para o TSV indicando que a prevalência deste patógeno no estado de Pernambuco é inferior a 0,6%.

As populações de camarões marinhos cultivados são susceptíveis a uma série de infecções de etiologia viral que apresentam como principais características a quase impossibilidade da realização de diagnóstico clínico propiciando a sua rápida disseminação. A disponibilidade de um sistema sensível e específico para o monitoramento da infecção pelo TSV é de grande importância para o monitoramento sanitário na carcinicultura, pois, o diagnóstico rápido e efetivo proporciona a adoção imediata de medidas de controle e profilaxia trazendo reflexos diretos na produção e retorno financeiro da atividade.

REFERÊNCIAS

- BONDAD-REANTASO, M.G.; SUBASINGHE, R.P.; ARTHUR, J.R.; OGAWA, K.; CHINABUT, S.; ADLARD R.; TAN, Z.; SHARIFF, M. Disease and health management in Asian aquaculture. **Veterinary Parasitology**, v.132, p.249–272, 2005.
- BOOM R.; SOL C.J.A. SALIMANS M.M.M.; JANSEN C.L.; WERTHEIM-VAN DILLEN P.M.E.; NOORDAA-VAN DER J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal Clinical Microbiology**, v.28, p.843-850, 1990.
- BROCK, J.A.; GOSE, R.; LIGHTNER, D.V.; HASSON, K.W. An overview on Taura syndrome, an important disease of farmed *Penaeus vannamei*. In: Hopkins, J.K.S. (Eds). Swimming through troubled water, proceedings of the special session on shrimp farms. **Aquaculture**, v.95, p.84-94, 1995.
- CHIEN, T.; HSU-TIEN, H.; SHENG-HSIENG, C.; JUNG-PING, H.; SHU-TING, K.; NAN-JUNG, L.; TIEN-LAI, H.; MING-CHANG, L.; SHIH-YUH, L.. Taura syndrome in Pacific white shrimp *Penaeus vannamei* cultured in Taiwan. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.38, n.8, p.159–161, 1999.
- DHAR, A.K.; LAKSHMAN, D.K.; AMUNDSEN, K.; ROBLES-SIKISAKA, R.; KAIZER, K.N.; ROY, S.; HASSON, K.W.; ALLNUTT, F.C.T. Characterization of a Taura syndrome virus isolate originating from the 2004 Texas epizootic in cultured shrimp. **Archives Virology**. v.155, p.315-327, 2010.
- ERICKSON, H.S.; ZARAIN-HERZBERG, M.; LIGHTNER, D.V. Detection of Taura syndrome virus (TSV) strain differences using selected diagnostics implications in penaeid shrimp. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.52, p.1-10, 2002.
- HASSON, K.W.; LIGHTNER, D.V.; POULOS, B.T.; REDMAN, R.M.; WHITE, B.L.; BROCK, J.A.; BONAMI, J.R. Taura syndrome in *Penaeus vannamei*: Demonstration of viral etiology. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.23, p.115-126, 1995.
- JIMENEZ, R. Síndrome de Taura (Resumen). In: **Acuicultura del Ecuador. Cámara Nacional de Acuicultura**, Guayaquil, Ecuador, 1992, p. 1-16.
- OIE (Office International Epizootics), **Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals**, 2003. Disponível em: <http://www.oie.int/eng/normes/fmanuel/A_00047.htm>. Acesso: 23 de novembro de 2009.
- PINHEIRO, A.C.A.S.; LIMA A.P.S.; SOUZA M.E.; NETO, E.C.L.; ADRIÃO M.; GONÇALVES, V.S.P.; COIMBRA, M.R.M. Epidemiological status of Taura syndrome and Infectious myonecrosis viruses in *Penaeus vannamei* reared in Pernambuco (Brazil). **Aquaculture**. v.262, p. 17-22, 2007.
- TURNER, P.C.; McLENNAN, A.G.; BATES, A.D.; WHITE, M.R.H. **Biologia Molecular**, 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004, p. 287.

YU, C.I.; SONG, Y.L. Outbreaks of Taura Syndrome in Pacific white shrimp *Penaeus vannamei* cultured in Taiwan. **Fish Pathology**, v.1, n.35, p.21-24, 2000.

4 CONCLUSÕES

- O IMNV está presente tanto em amostras de animais adultos quanto em PLs provenientes de laboratórios de reprodução do estado de Santa Catarina;
- O sistema de PCR para a detecção do TSV, otimizado nesse estudo, apresentou alta sensibilidade e especificidade demonstrando ser uma boa ferramenta para uso na rotina de diagnóstico e monitoramento sanitário desta doença em populações de camarão marinho cultivado;
- A não detecção do TSV não exclui a possibilidade da presença do vírus nas populações de camarões de cultivo ou em outros laboratórios de Santa Catarina.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Lista de reagentes

1. 100 mM dNTP Set, 4 x 250 µL; 25 mM each (100 mM dATP Solution, 100 mM dCTP Solution, 100 mM dGTP Solution, 100 mM dTTP Solution) (Invitrogen Life Technologies[®])
2. 10 x PCR-Buffer (200 mM Tris-HCl, pH 8.4, 500 mM KCl) (Invitrogen Life Technologies[®])
3. 100 bp DNA Ladder (Invitrogen Life Technologies[®])
4. 2-Mercapto-ethanol (C₂H₆O₅) P.M. 78,13 (Fluka[®])
5. 5 x RT-Buffer (250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 15 mM MgCl₂, 375 mM KCl) (Invitrogen Life Technologies[®])
6. Acetona, P.A. (CH₃COCH₃) P.M. 58,08 (Dinâmica[®])
7. Ácido acético glacial, P.A. (CH₃COOH) P.M. 60,05 (Nuclear[®])
8. Ácido bórico (H₃BO₃) P.M. 61,83
9. Ácido clorídrico (HCl) P.M. 36,46 (Reagen[®])
10. Ácido etilenodiaminotetraácido Sal di-sódico – EDTA, P.A. (C₁₀H₁₄N₂O₈Na₂H₂O) P.M. 372,24 (Reagen[®])
11. Agarose (Gibco BRL[®])
12. Álcool etílico absoluto (C₂H₂OH) P.M. 46,07 (Nuclear[®])
13. Álcool isoamílico ((CH₃)₂CHCH₂CH₂OH) P.M. 88,15 (Synth[®])
14. Azul de bromofenol (Sigma[®])
15. Cloreto de magnésio (MgCl₂) (Gibco BRL[®])
16. Cloreto de Sódio, P.A. (NaCl) P.M. 58,45 (Reagen[®])
17. Dodecil Sulfato de Sódio – Lauril Sulfato de Sódio – SDS (C₁₂H₂₅NaO₄S) P.M. 288,38 (Synth[®])
18. EDTA dissodium (PM 372,24)
19. Ethidium bromide (C₂₁H₂₀N₃Br) P.M. 394,3 (Sigma[®])
20. Glicina, P.A. (Nuclear[®])
21. Guanidine isothiocyanate P.M. 118,16 (Gibco BRL[®])

22. Hidróxido de Sódio, P.A. (NaOH) P.M. 40,00 (Dinâmica[®])
23. Hidroximetil amino metano – TRIS 99% P.M. 121,14 (Inlab[®])
24. Metanol, P.A. (CH₃OH) P.M. 32,04 (Allkimia[®])
25. M-MLV Reverse Transcriptase -200 units/μL (Invitrogen Life Technologies[®])
26. Oligonucleotídeos iniciadores (Invitrogen[®], Life Technologies[®] EUA)
27. *Platinum* Taq DNA Polymerase recombinant 500 units (Invitrogen Life Technologies[®])
28. Sacarose, P.A. – sucrose (C₁₂H₂₂O₁₁) p.m. 342,31 (Reagen[®])
29. Silicon dioxide (SiO₂) P.M. 60,08 (Sigma[®])
30. Triton -100 (Gibco BRL[®])
31. SFB-Soro fetal bovino (Gibco, BRL[®])
32. FungizoneTM Antimycotic, liquid (Gibco, BRL[®])
33. Gentamicin Reagent Solution (10 mg/mL), liquid
34. D-MEM – Dulbecco's modified Eagle Medium (Gibco BRL[®])
35. Trypsin 2,5% (1X), liquid (Gibco, BRL[®])

APÊNDICE B – Soluções e Tampões

• Hidratação da sílica

- 60 g de sílica (SIGMA[®])
- Adicionar 500 mL de água MilliQ autoclavada
- Agitar lentamente e manter em repouso durante 24 h
- Por sucção, desprezar 430 mL do sobrenadante
- Ressuspender a sílica em 500 mL de água bidestilada
- Manter em repouso durante 5 h para sedimentar
- Desprezar 440 mL do sobrenadante
- Adicionar 600 µL de HCl (32% w/v) para ajustar o pH (pH=2,0)
- Aliquotar e autoclavar

• Solução L6

- 120 g de tiocianato de guanidina (GUSCN)
- 100 mL de TRIS-HCl 0,1 M pH 6,4
- 22 mL de EDTA 0,2 M pH 8,0
- 2,6 mL de Triton x 100

• Solução L2

- 120 g de tiocianato de guanidina (GUSCN)
- 100 mL de TRIS-HCl 0,1 M pH 6,4

• Tampão de Amostra

- Azul de bromofenol 0,25%
- Sacarose – sucrose (C₁₂H₂₂O₁₁) 45%

• Tampão de corrida: TBE (TRIS – Ácido bórico – EDTA) 10 x []

- 0,89 M TRIS
- 0,89 M ácido bórico
- 0,02 M EDTA dissodium
- Água bidestilada qsp. 1 L
- pH = 8,4

- **Tampão fosfato salina (PBS)**

- 137 mM cloreto de sódio (NaCl)

- 3 mM cloreto de potássio (KCl)

- 8 mM fosfato de sódio dibásico (Na₂HPO₄)

- 15 mM fosfato monobásico de potássio (KH₂PO₄)

- Água MilliQ autoclavada q.s.p. 1 L

- pH = 7,2

APÊNDICE C – Protocolo de Técnicas

• **Extração do RNA:** método sílica / isotiocianato de guanidina (BOOM et al., 1990)

1. 50 µL da amostra
2. 20 µL de sílica hidratada
3. 200 µL de tampão L6
4. Homogeneizar em vórtex
5. Agitar 30 min / t° ambiente
6. Centrifugar a 10.000 x g / 30 s
7. Desprezar sobrenadante
8. Adicionar 200 µL de tampão L2
9. Homogeneizar em vórtex
10. Centrifugar a 10.000 x g / 30 s
11. Desprezar o sobrenadante em solução contendo NaOH 10M
12. Repetir passos 8, 9, 10 e 11
13. Adicionar 500 µL de etanol a 70%
14. Repetir passos 9, 10 e 11
15. Repetir passos 13 e 14
16. Adicionar 500 µL de acetona PA
17. Repetir passos 9, 10 e 11
18. Secar o pellet em estufa a 37° C / 15 min (tubo aberto)
19. Adicionar 50 µL de H₂O ultra pura Milli-Q[®] autoclavada qsp
20. Homogeneizar em vórtex
21. Banho-Maria a 56° C / 15 min
22. Homogeneizar em vórtex
23. Centrifugar a 10.000 x g / 2 min
24. Recolher sobrenadante

• **Gel de agarose a 2%**

- 1 g de agarose
- 50 mL TEB1 x
- 30 µL ethidium bromide

- **Extração de RNA para TSV e IMNV pelo *kit IQ2000*[®] (Farming IntelliGene Thechnology Corporation, TaiwanTM)**
 - Colocar a amostra em um tubo de 1,5 mL com 500 μ L de tampão de extração de RNA;
 - Triturar o tecido dentro do tubo utilizando um moedor descartável e deixe descansar em temperatura ambiente por 5 min;
 - Adicionar 100 μ L de clorofórmio, homogeneizar em vortex por 20 s. Deixar descansar em temperatura ambiente por 3 min e centrifugar a 1.500 x g por 15 s;
 - Transferir 200 μ L da fase aquosa para um tubo de 0,5 mL e adicionar 200 μ L de isopropanol;
 - Homogeneizar em vortex e centrifugar a 12.000 x g por 10 min e desprezar o sobrenadante;
 - Lavar o sedimento com 500 μ L de etanol a 75% e centrifugar por 5 min a 7.500 x g para recolher o sedimento. Deprezar o etanol e secar o sedimento;
 - Dissolver o sedimento com 200 μ L de água DEPEC;

- **Protocolo de Amplificação para TSV e IMNV pelo *kit IQ2000*[®] (Farming IntelliGene Thechnology Corporation, TaiwanTM)**
 - Reagentes para reação de RT-PCR (8 μ L por reação) RT-PCR PreMix – 7 μ L; IQzyme DNA polymerase 2un/ μ L – 0,5 μ L; RT Enzyme mix – 0,5 μ L.
 - Reagentes para reação de *Nested* PCR (15 μ L por reação) *Nested* PCR PreMix – 14 μ L; IQzyme DNA polimerase 2un/ μ L -1 μ L.

- **Procedimentos para reação**
 - Pipetar 8 μ L da reação de RT-PCR em cada tubo de 0,2 mL;
 - Adicionar 2 μ L do RNA extraído em cada reação;
 - Encaminhar para o termociclador (RT-PCR);
 - Adicionar 15 μ L da reação de *nested* PCR em cada tubo após a reação de RT-PCR terminar;
 - Encaminhar para o termociclador (*Nested*-PCR);
 - Ao término, adicionar 5 μ L de 6X *Loading Dye* em cada tubo e homogenize;

- **Programas do termociclador**

- RT-PCR

- 42°C 30 min e 94°C 2 min;

- 94°C 20 s, 62°C 20 s, 72°C 30 s

- Repetir 15 vezes

- 72°C 30 s, 20°C 30 s

- Nested*-PCR

- 94°C 20 s, 62°C 20 s, 72°C 30 s

- Repetir 30 ciclos.

- 72°C 30 s, 20°C 30 s

ANEXO

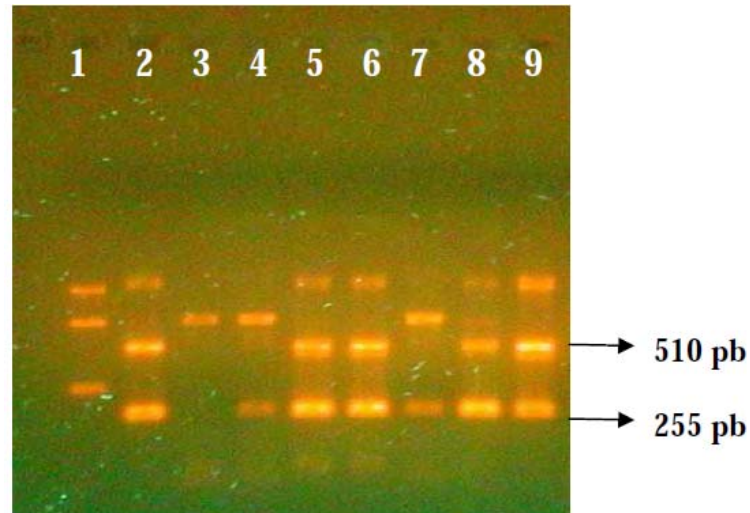
ANEXO A – Documentação fotográfica

Figura 1 – Eletroforese em gel de agarose 2% com brometo de etídio dos produtos (510 e 255 pb) amplificados pela PCR e *nested* PCR no diagnóstico da IMNV. Canaletas: 1 (Padrão de tamanho molecular 848, 630 e 333 pb); 2 (controle positivo); 3 (controle negativo); 4 a 9 (amostras positivas para o IMNV).

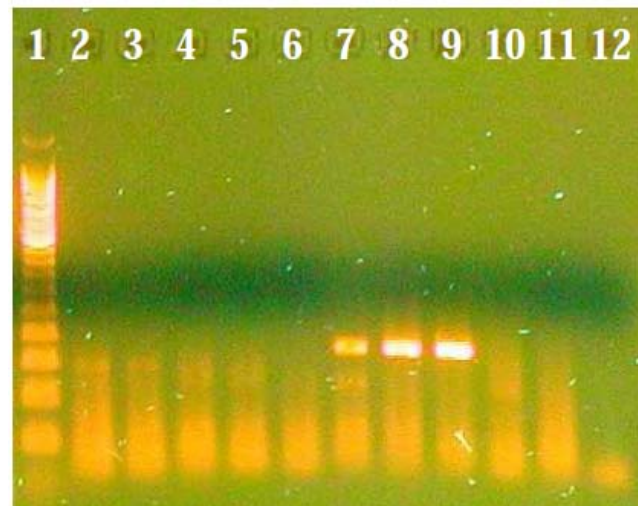


Figura 2 – Eletroforese em gel de agarose 2% com brometo de etídio dos produtos (328 pb) amplificados pela PCR para sequenciamento no diagnóstico da IMNV. Canaletas: 1 (Padrão de tamanho molecular 100 pb); 7, 8 e 9 (amostras positivas para o IMNV); 12 (controle negativo).

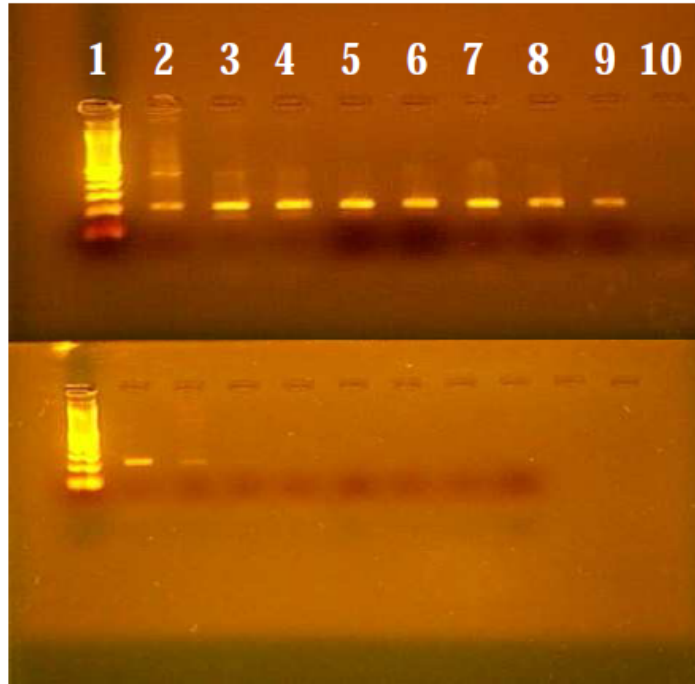


Figura 3 – Eletroforese em gel de agarose 2% com brometo de etídio dos produtos (231pb) amplificados pela PCR na otimização da técnica para o diagnóstico do TSV. Teste de sensibilidade. **Superior** – Canaletas: 1 (Padrão de tamanho molecular 100 pb); 2 a 9 Diluições 10^{-1} (15,7 ng/ μ L); 10^{-2} (1,57 ng/ μ L); 10^{-3} (160 pg/ μ L); 10^{-4} (16 pg/ μ L); 10^{-5} (1,6 pg/ μ L); 10^{-6} (160 fg/ μ L); 10^{-7} 10^{-8} (16 fg/ μ L); (1,6 fg/ μ L); 10 (Controle negativo). **Inferior** – Canaletas: 1 (Padrão de tamanho molecular 100pb); 2 a 7 Diluições 10^{-8} (1,6 fg/ μ L); 10^{-9} (160 atograma/ μ L); 10^{-10} (16 ag/ μ L); 10^{-11} (1,6 ag/ μ L); 10^{-12} (160 zeptograma/ μ L); 10^{-13} (16 zg/ μ L); 10^{-14} (1,6 zg/ μ L); 8 (Controle negativo).

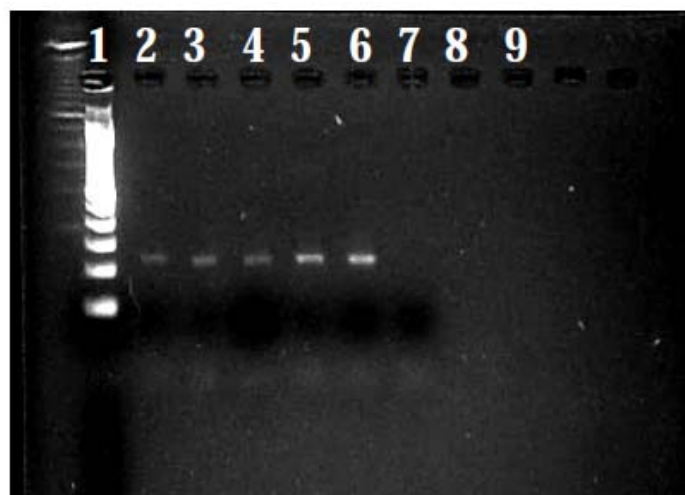


Figura 4 – Eletroforese em gel de agarose 2% com brometo de etídio dos produtos (231pb) amplificados pela PCR na otimização da técnica para o diagnóstico do TSV. Gradiente de temperatura. Canaletas: 1 (Padrão de tamanho molecular 100 pb); 2 a 7 (gradiente de temperaturas: 51, 53, 55, 57, 59 e 61°C).



Figura – 5 – Eletroforese em gel de agarose 2% com brometo de etídio dos produtos (231pb) amplificados pela PCR na otimização da técnica para o diagnóstico do TSV. Concentrações de dNTP. Canaletas: 1 (Padrão de tamanho molecular 100 pb); 2 à 4 (concentrações de 100 μ M, 200 μ M e 300 μ M, respectivamente).

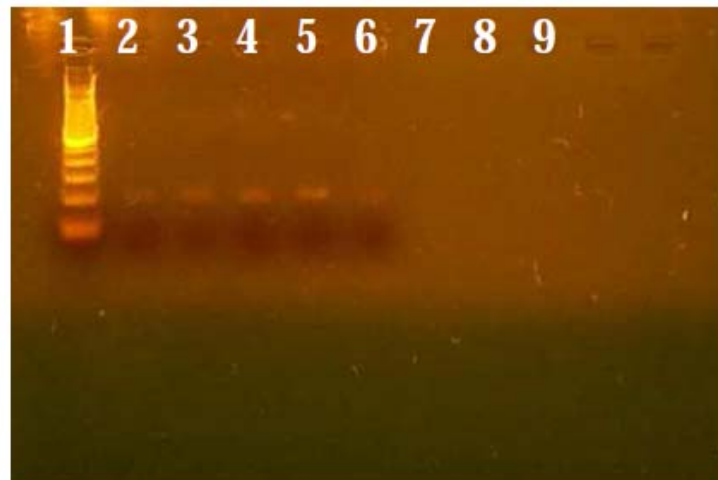


Figura – 6 – Eletroforese em gel de agarose 2% com brometo de etídio dos produtos (231pb) amplificados pela PCR na otimização da técnica para o diagnóstico do TSV. Concentrações de cloreto de magnésio. Canaletas: 1 (Padrão de tamanho molecular 100 pb); 2 à 6 (1,0, 1,5, 2,0, 2,5 e 3,0 mM $MgCl_2$, respectivamente).

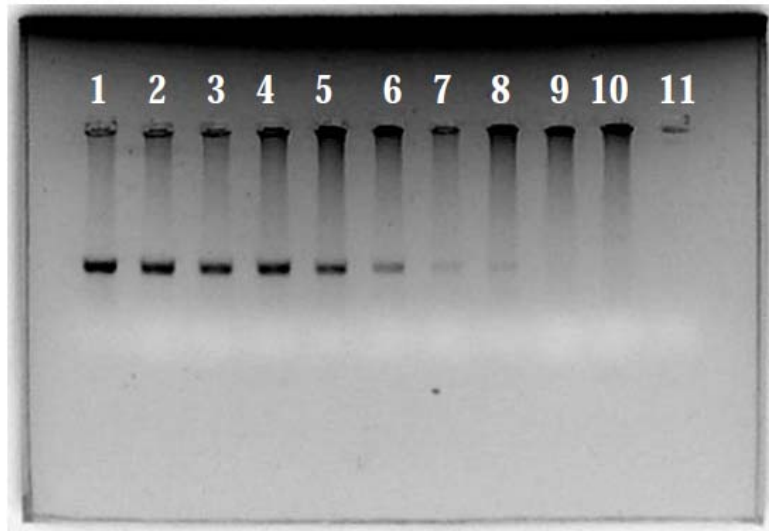


Figura 7 – Eletroforese em gel de agarose 2% com brometo de etídio, dos produtos (231pb) amplificados pela PCR na otimização da técnica para o diagnóstico do TSV utilizando tecido de camarão com o plasmídeo diluído. Canaletas: 1 a 10 (diluições 10^{-1} a 10^{-10}); 11 (controle negativo).



Figura 8 – Eletroforese em gel de agarose 2% com brometo de etídio referente ao teste de sensibilidade da técnica de RT-PCR para o diagnóstico do TSV. Canaletas: 1 (Padrão de tamanho molecular 100 pb); 2 (TSV controle positivo com 231 pb); 3 (controle negativo); 4 e 5 (*white spot syndrome virus* -WSSV); 6 e 7 (*infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus* -IHHNV); 8e9(*infectious myonecrosis virus* -IMNV).



INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Os trabalhos para submissão podem ser enviados pelo correio, em uma via impressa, com arquivos em disquete ou CD (de preferência na versão mais recente do Word), ao Dr. Jürgen Döbereiner, Revista PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA, Embrapa-CNPAB/PSA, 23890-000 Seropédica, Rio de Janeiro, ou por via eletrônica, através do e-mail pvb@pvb.com.br. Devem constituir-se de resultados de pesquisa ainda não publicados e não considerados para publicação em outra revista.

NOTE: Para abreviar sua tramitação e aceitação, os trabalhos sempre devem ser submetidos conforme as normas de apresentação da revista. Os originais submetidos fora das normas de apresentação serão devolvidos aos autores para a devida adequação.

Apesar de não serem aceitas comunicações (*Short communications*) sob forma de “Notas Científicas”, não há limite mínimo do número de páginas do trabalho enviado, que deve, porém, conter pormenores suficientes sobre os experimentos ou a metodologia empregada no estudo. Embora sejam de responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos trabalhos, o Conselho Editorial, com a assistência da Assessoria Científica, reserva-se o direito de sugerir ou solicitar modificações aconselháveis ou necessárias. Os trabalhos submetidos são aceitos através da aprovação pelos pares (*peer review*).

1. Os trabalhos devem ser organizados, sempre que possível, em TÍTULO, ABSTRACT, RESUMO, INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO, CONCLUSÕES (ou combinações destes três últimos), AGRADECIMENTOS e REFERÊNCIAS:

- a) O título do artigo deve ser conciso e indicar o conteúdo do trabalho;
- b) O(s) autor(es) deve(m) adotar um “nome de guerra” (não necessariamente o nome de batismo completo), para sua identificação científica: Paulo Fernando de Vargas Peixoto, usa Paulo V. Peixoto ou Peixoto P.V., Franklin Riet-Correa Amaral, usa Franklin Riet-Correa ou Riet-Correa F., Claudio Severo Lombardo de Barros, usa Claudio S.L. Barros ou Barros C.S.L.;
- c) o Abstract deverá ser apresentado com os elementos constituintes do Resumo em português, podendo ser mais extenso. Ambos devem ser seguidos de “Index Terms” ou “Termos de Indexação”, respectivamente;
- d) o Resumo deve apresentar, de forma direta e no passado, o que foi feito e estudado, dando os mais importantes resultados e conclusões.

Nos trabalhos em inglês, o título em português do trabalho, deve constar em negrito e entre colchetes, logo após a palavra RESUMO;

e) a Introdução deve ser breve, com citação bibliográfica específica sem que a mesma assuma importância principal, e finalizar com a indicação do objetivo do trabalho;

f) em Material e Métodos devem ser reunidos os dados que permitam a repetição do trabalho por outros pesquisadores. Na experimentação com animais, deve constar a aprovação do projeto pela Comissão de Ética local;

g) em Resultados deve ser feita a apresentação concisa dos dados obtidos; Quadros devem ser preparados sem dados supérfluos, apresentando, sempre que indicado, médias de várias repetições. É conveniente, às vezes, expressar dados complexos por gráficos (Figuras), ao invés de apresentá-los em quadros extensos;

h) na Discussão, os resultados devem ser discutidos diante da literatura. Não convém mencionar trabalhos em desenvolvimento ou planos futuros, de modo a evitar uma obrigação do autor e da revista de publicá-los;

i) As Conclusões devem basear-se somente nos resultados apresentados no trabalho;

j) Agradecimentos devem ser sucintos e não devem aparecer no texto ou em notas de rodapé;

k) a lista de Referências, que só incluirá a bibliografia citada no trabalho e a que tenha servido como fonte para consulta indireta, deverá ser ordenada alfabeticamente pelo sobrenome do primeiro autor, registrando-se os nomes de todos os autores (em caixa alta e baixa), o título de cada publicação e, abreviado ou por extenso (se tiver dúvida), o nome da revista ou obra, usando as instruções do “Style Manual for Biological Journals” (American Institute for Biological Sciences) e/ou “Bibliographic Guide for Editors and Authors” (American Chemical Society, Washington, DC.).

2. Na elaboração do texto deverão ser atendidas as seguintes normas:

a) os trabalhos devem ser impressos em uma só face do papel, com margens de, no mínimo, 2,5cm. A formatação do original a ser submetido para publicação deve seguir o exemplo de apresentação no último fascículo da revista (www.pvb.com.br). O texto deve ser corrido e não deve ser formatado em duas colunas, com as legendas das figuras e os Quadros no final. As Figuras (inclusive gráficos) devem ter seus arquivos fornecidos separados do texto. Devem ser introduzidos no texto do trabalho, através da ferramenta “Inserir” do Word, pois imagens copiadas e coladas, perdem as informações do programa onde foram geradas, resultando, sempre, em má qualidade;

b) a redação dos trabalhos deve ser concisa, com a linguagem, tanto quanto possível, no passado e impessoal; no texto, os sinais de chamada para notas de rodapé serão números arábicos colocados em sobrescrito após a palavra ou frase que motivou a nota. Essa numeração será contínua; as notas serão lançadas ao pé da página em que estiver o respectivo sinal de chamada.

Todos os Quadros e todas as Figuras serão mencionados no texto. Estas remissões serão feitas pelos respectivos números e, sempre que possível, na ordem crescente destes. Abstract e Resumo serão escritos corridamente em um só parágrafo e não deverão conter citações bibliográficas.

c) no rodapé da primeira página deverá constar endereço profissional completo do(s) autor(es) e E-mail do autor para correspondência;

d) siglas e abreviações dos nomes de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no trabalho, serão colocadas entre parênteses e precedidas do nome por extenso;

e) citações bibliográficas serão feitas pelo sistema “autor e ano”; trabalhos de dois autores serão citados pelos nomes de ambos, e de três ou mais, pelo nome do primeiro, seguido de “et al.”, mais o ano; se dois trabalhos não se distinguirem por esses elementos, a diferenciação será feita através do acréscimo de letras minúsculas ao ano, em ambos.

Trabalhos não consultados na íntegra pelo(s) autor(es), devem ser diferenciados, colocando-se no final da respectiva referência, “(Resumo)” ou “(Cit. Fulano 19..)”; a referência do trabalho que serviu de fonte, será incluída na lista uma só vez. A menção de comunicação pessoal e de dados não publicados é feita no texto somente com citação de Nome e Ano, colocando-se na lista das Referências dados adicionais, como a Instituição de origem do(s) autor(es). Nas citações de trabalhos colocados entre parênteses, não se usará vírgula entre o nome do autor e o ano, nem ponto-e-vírgula após cada ano; a separação entre trabalhos, nesse caso, se fará apenas por vírgulas, exemplo: (Flores & Houssay 1917, Roberts 1963a,b, Perreau et al. 1968, Hanson 1971);

f) a lista das Referências deverá ser apresentada com o mínimo de pontuação e isenta do uso de caixa alta, com os nomes científicos em itálico (grifo), e sempre em conformidade com o padrão adotado no último fascículo da revista, inclusive quanto à ordenação de seus vários elementos.

3. As Figuras (gráficos, desenhos, mapas ou fotografias) originais, em papel ou outro suporte, deverão ser anexadas ao trabalho, mesmo quando escaneadas pelo autor. As chaves das convenções adotadas serão incluídas preferentemente, na área da Figura; evitar-se-á o uso de título ao alto da figura. Cada Figura será identificada na margem ou no verso, a traço leve de lápis, pelo respectivo número e o nome do autor; havendo possibilidade de dúvida, deve ser indicada a parte inferior da figura pela palavra “pé”.

Fotografias deverão ser apresentadas preferentemente em preto e branco, em papel brilhante, ou em diapositivos (“slides”) coloridos. Quando as fotos forem obtidas através de câmeras digitais (com extensão “jpg”), os arquivos deverão ser enviados como obtidos (sem tratamento ou alterações); na versão online, fotos e gráficos poderão ser publicados em cores; na versão impressa, somente quando a cor for elemento primordial a impressão das figuras poderá ser em cores. Para evitar danos por grampos, desenhos e fotografias deverão ser colocados em envelope.

4. As legendas explicativas das Figuras conterão informações suficientes para que estas sejam compreensíveis, e serão apresentadas no final do trabalho.

5. Os Quadros deverão ser explicativos por si mesmos e colocados no final do texto. Cada um terá seu título completo e será caracterizado por dois traços longos, um acima e outro abaixo do cabeçalho das colunas; entre esses dois traços poderá haver outros mais curtos, para grupamento de colunas.

Não há traços verticais. Os sinais de chamada serão alfabéticos, começando de *a* em cada Quadro; as notas serão lançadas logo abaixo do Quadro respectivo, do qual serão separadas por um traço curto, à esquerda.