

ANA CRISTINA DE AGUIAR SALDANHA PINHEIRO

**INVESTIGAÇÃO DOS VÍRUS DA SÍNDROME DE TAURA E
DA MIONECROSE INFECCIOSA EM CULTIVOS DE
CAMARÃO MARINHO *Litopenaeus vannamei* EM
PERNAMBUCO**

**RECIFE-PE
2006**

ANA CRISTINA DE AGUIAR SALDANHA PINHEIRO

**INVESTIGAÇÃO DOS VÍRUS DA SÍNDROME DE TAURA E
DA MIONECROSE INFECCIOSA EM FAZENDAS DE
CAMARÃO MARINHO *Litopenaeus vannamei* EM
PERNAMBUCO**

Dissertação apresentada ao **Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Aqüicultura** da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de **Mestre em Recursos Pesqueiros e Aqüicultura**.

Orientadora: **Dra. Maria Raquel Moura Coimbra**, Depto. de Pesca e Aqüicultura, da UFRPE.

**RECIFE-PE
Fevereiro, 2006.**

Universidade Federal Rural de Pernambuco

Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Aqüicultura

Parecer da comissão examinadora da defesa de dissertação de mestrado de

Ana Cristina de Aguiar Saldanha Pinheiro

INVESTIGAÇÃO DOS VÍRUS DA SÍNDROME DE TAURA E DA MIONECROSE INFECCIOSA EM CULTIVOS DE CAMARÃO MARINHO *Litopenaeus vannamei* EM PERNAMBUCO

Área de concentração: **Aqüicultura**

A comissão examinadora, composta pelos professores abaixo, sob a presidência do primeiro, considera a candidata **Ana Cristina de Aguiar Saldanha Pinheiro** como aprovada.

Recife, 20 de Fevereiro de 2006.

Profa. Dra. Maria Raquel Moura Coimbra (UFRPE)
Orientador

Prof. Dr Roberto Soares de Castro (UFRPE)
Membro externo

Prof. Dr. Fernando Leandro dos Santos (UFRPE)
Membro interno

Prof. Dr. Alfredo Olivera Gálvez (UFRPE)
Membro interno

*À minha Família, pelo grande amor
que sempre me dedicaram.*

*A Alfredo Freire, por todo amor e
companheirismo.*

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof^a Maria Raquel Moura Coimbra, por toda paciência, amizade e orientação dedicada.

Ao Laboratório de Genética Aplicada – LAGA, do Departamento de Pesca e Aqüicultura da Universidade Rural de Pernambuco, pelo apoio técnico e material na realização de todas as etapas envolvidas neste trabalho.

Ao Prof Manoel Adrião, coordenador do Laboratório de Fisiologia Animal Molecular Aplicada – FAMA, pelo livre acesso as instalações e ajuda proporcionada.

Ao Prof. Reginaldo, do Laboratório Genoma pelo suporte e ajuda prestada.

Ao Prof Victor Gonçalvez da UNB, pela grande ajuda na avaliação dos resultados deste trabalho.

Aos proprietários, gerentes e funcionários das fazendas de camarão, nas quais realizei coletas, pela receptividade e colaboração.

Aos Amigos e companheiros de laboratório, Ana Patrícia, Marília Espíndola, Suzianny, Andréa, Karine, Edvaldo Lima, Henrique, Samuel e a todos aqueles que me ajudaram direta ou indiretamente na realização deste trabalho.

À Deus por mais um sonho realizado.

SUMÁRIO

Lista de Tabelas	ii
Lista de Figuras	iv
Resumo	vi
Abstract	vii
1.Introdução	1
2.Objetivos	3
3. Revisão da literatura	4
3.1 Cenário Mundial da Carcinicultura Marinha	4
3.2 Carcinicultura Brasileira	5
3.3 Enfermidades dos camarões marinhos	7
3.4 Métodos de diagnóstico	11
3.4.1 Diagnóstico molecular	11
3.4.2 RT-PCR	12
3.5 Síndrome de Taura	14
3.5.1 Impacto econômico	16
3.5.2 Susceptibilidade	16
3.5.3 Distribuição Geográfica e Disseminação	17
3.5.4 Atributos Clínicos e Patologia	17
3.6 Mionecrose infecciosa	21
3.7 Análise da Prevalência	25
3.8 Biosseguridade	26
4. Artigo Científico	28
4.1. Artigo I – Investigação dos vírus da síndrome de taura e da mionecrose infecciosa em fazendas de camarão marinho <i>Litopenaeus vannamei</i> em Pernambuco	28
5. Conclusões	43
6. Referências bibliográficas	44
7. Anexos	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais produtores mundias de camarão cultivado.	5
Tabela 2. Distribuição da carcinicultura marinha por regiões do Brasil em 2004.	7
Tabela 3. Prejuízos estimados da industria de cultivo de camarões marinhos causados por enfermidades virais desde sua primeira detecção.	10
Tabela 4. Métodos de diagnóstico e detecção de patógenos virais que atingem camarões Peneídeos e estão listados na OIE.	12
Tabela 5. Sorotipos do vírus da Síndrome de Taura, origem e virulência.	15

Artigo I

Tabela 1. Localização por município e números de camarões coletados das fazendas amostradas.	34
--	----

Tabela 2. Seqüência dos primers utilizados para detecção do vírus da síndrome de Taura e da Mionecrose infecciosa por RT-PCR.

36

Tabela 3. Ciclos de temperatura utilizados na PCR para detecção dos vírus TSV e IMNV.

36

Tabela 4. Prevalência do vírus da Mionecrose infecciosa nas 11 fazendas de camarão analisadas em Pernambuco.

39

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Círculos que mostram intercessões que representam a interação entre o hospedeiro, o patógeno e o meio ambiente. 8
- Figura 2. Reação de RT-PCR, conversão do RNAm para cDNA. 14
- Figura 3. vírions do TSV, icosaédricos, tamanho 31-32nm e densidade de 1,338 g/ml medida com cloreto de céσιο. 16
- Figura 4. Lesões histopatológicas do tipo “buckshot”, (aparência de pimenta em pó) no epitélio cuticular de um camarão *Litopenaeus vannamei* com infecção aguda de TSV. 18
- Figura 5. Ciclo da Síndrome de Taura em juvenis de *L. vannamei*. 19
- Figura 6. (a) e (b) Camarões infectados com TSV, exibindo carapaça com lesões melanizadas multifocais, (c) Camarão saudável e camarão com urópodos avermelhados. 20

Figura 7. Lesões ocasionadas pelo vírus da síndrome de Taura, (a) e (b) urópodos avermelhados.

21

Figura 8. Juvenis de *Litopenaeus vannamei* que exibem sinais clínicos de IMN, mostrando áreas extensas de necrose esbranquiçadas do músculo esquelético, na cauda e abdômen.

23

Figura 9. Necrose muscular coagulativa liquefativa, causada pelo vírus IMN.

23

Figura 10. Partículas virais de 40nm de diâmetro isoladas de camarão naturalmente infetado com IMNV.

24

Artigo I

Figura 1. Mapa do Litoral do Estado de Pernambuco-Brasil e os seis municípios de coleta.

33

Figura 2. Gel de agarose 2% corado com Brometo de etídio (TSV).

37

Figura 3. Gel de agarose a 2% corado com Brometo de etídio (IMNV).

38

Figura 4. Gel de agarose a 2% corado com Brometo de etídio (IMNV).

39

RESUMO

A carcinicultura cresceu rapidamente em todo o mundo e hoje constitui uma grande indústria, proporcionando emprego para milhares de trabalhadores e milhões em receita. Como toda atividade de aquicultura, a passagem do ambiente selvagem para o cativeiro, é acompanhada de mudanças, que propiciam o surgimento de doenças. Surtos de diversas doenças foram reconhecidos como uma ameaça a sustentabilidade da indústria do camarão, e alguns deles causaram sérias perdas econômicas para os produtores de vários países. O vírus da Síndrome de Taura é considerado um dos mais perigosos, com mortalidade cumulativa de 60 a 90%, sendo responsável por grandes prejuízos na América Latina. O vírus da mionecrose infecciosa - IMNV (Infectious Myonecrosis Virus), ainda não registrado em outros países, foi identificado no Nordeste brasileiro e apontado como uma das causas para a diminuição da produção nacional em 2004. O objetivo deste trabalho foi investigar a ocorrência dos vírus Taura e IMN, a partir do diagnóstico molecular de Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR), no estado de Pernambuco a fim de subsidiar informações importantes para a construção de um plano de biossegurança. Onze fazendas pertencentes a seis municípios diferentes, localizados no litoral norte e sul do Estado de Pernambuco, foram amostradas aleatoriamente no período de agosto a dezembro de 2004. Dos 530 camarões analisados, nenhum apresentou diagnóstico positivo para o TSV, o que significa que a prevalência deste patógeno no estado de Pernambuco é inferior a uma prevalência mínima por fazenda de 0.06%, mesmo diante dos surtos recentes em países próximos. Em nove das onze fazendas analisadas foram encontrados casos positivos para o IMNV. O vírus IMN apresentou uma prevalência que variou de 0,00% a 35,56%, por fazenda, o que é considerado preocupante, e desperta a necessidade de um monitoramento em

nível nacional. Este resultado constitui o primeiro levantamento de vírus de camarão realizado no país, conduzido em uma amostragem não dirigida.

Palavras-chave: *Litopenaeus vannamei*, TSV, IMNV, Prevalência, RT-PCR.

ABSTRACT

Shrimp culture has grown rapidly worldwide and nowadays constitutes a solid industry generating jobs for thousand people. In any aquatic species, the transition from life in a wild environment to aquaculture systems is usually followed by several changes, such as culture densities, frequent degradation of environmental quality, mixing of populations of different origin and manipulations, etc. These facts increase the probability of outbreaks of serious diseases. Several virus diseases have occurred, threatening the sustainability of shrimp industry worldwide. Taura virus is considered one of the most harmful pathogens in the Americas, with cumulative mortality between 40 and 95%. Another virus, named Infectious Myonecrosis Virus (IMNV) was first identified in *Litopenaeus vannamei* reared in Northern Brazil and it is pointed as one of the main causes of the crash in shrimp production in 2004. The objective of this study was to investigate the prevalence of TSV and IMNV by Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) in Pernambuco state, in order to provide important information for the construction of a biosecurity plan. Eleven commercial farms, located in six different cities of the north and south coast, were randomly sampled between August and December of 2004. Among the 530 animals analyzed, none were vírus positive for Taura, suggesting that the prevalence of this pathogen is lower than 0,06%, even with recent outbreaks in nearby countries. The IMN virus prevalence lied between 0 and 35,56% among the farms, which is considered alarming and requires monitoring mechanisms at the national level. These results constitute the first survey of these shrimp virus carried out in the Americas using a total randomized sample.

Keywords: *Litopenaeus vannamei*, TSV, IMNV, Prevalence, RT-PCR.

1. INTRODUÇÃO

A carcinicultura marinha brasileira fundamentou-se na introdução do camarão *Litopenaeus vannamei*, graças 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).

A carcinicultura cresceu rapidamente em todo o mundo e hoje constitui uma grande indústria, proporcionando emprego para milhares de trabalhadores e milhões em receita. Entretanto, como toda atividade de aquicultura, a passagem do ambiente selvagem para o cativeiro, é acompanhada por mudanças, tais como aumento da densidade, baixa qualidade ambiental e a mistura de populações com diferentes origens genéticas, que propiciam o surgimento de doenças.

Depois de crescer a uma média de 50% ao ano, desde o início da exploração comercial da atividade no Brasil em 1996, a carcinicultura viveu um ano atípico em 2004. Em relação ao ano de 2003, a produção de camarão registrou uma queda de 15,84%, caindo de 90.190 para 75.904 toneladas e a produtividade passou de 6.084 kg/ha/ano para 4.573 kg/ha/ano. As exportações foram reduzidas em 12,5%, caindo de US\$ 225,9 milhões para US\$ 198,6 milhões (Madrid, 2005).

Surtos de diversas doenças foram reconhecidos como uma ameaça a sustentabilidade da indústria do camarão, e alguns deles causaram sérias perdas econômicas para os produtores mundiais (Bachère, 2000, Lightner et al., 1998b). Atribui-se a estes surtos uma queda na produção anual de camarões de cultivo de 11% desde 1996 (Aquatic Stock Improvement Company, 2006).

As doenças virais, em especial, podem causar mortalidades maciças, destacando-se a Síndrome de Taura (TSV-Taura Syndrome Vírus), a Mancha Branca (WSSV-White Spot Syndrome Vírus) e a IHNV (Infectious Hypodermal and Haematopoietic Necrosis Vírus) como as enfermidades de maior importância para a carcinicultura na América Latina (Shellfish Diseases, 1996).

O vírus da Síndrome de Taura é membro da família *Discitroviridae* (Pantoja et al., 2004) e disseminou-se rapidamente por diversos países da América latina, provocando mortalidades cumulativas entre 60 e 90% (Lightner, 1999b), despontando como uma das maiores ameaças ao cultivo de camarão nas Américas, com surtos recentes na Venezuela (Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, 2005). Estima-se que o vírus Taura tenha causado perdas econômicas diretas nas Américas de 1 a 1.3 bilhões de dólares (Lightner, 2003).

O vírus da IMN (Infectious Myonecrosis) foi recentemente identificado no Nordeste brasileiro (Lightner e Pantoja, 2004), pertencente à família *Totiviridae* (Tang et al., 2005a), não tendo sido registrado em outros países. O IMNV é apontado como uma das causas da diminuição da produção nacional em 2004, por provocar queda na sobrevivência do camarão em fazendas afetadas e redução na densidade de povoamento como medida de prevenção contra o estresse, indicado como um dos fatores de intensificação da doença (Madrid, 2005).

A sustentabilidade da indústria de camarões depende em grande parte do controle de doenças e do estado de saúde do camarão e para controlar eficazmente uma enfermidade, é necessário antes de tudo, compreender a distribuição do patógeno, se ele realmente existe e onde se encontra.

Este trabalho tem como objetivo estimar a prevalência dos vírus da síndrome de Taura e da mionecrose infecciosa, a partir do diagnóstico molecular de RT-PCR (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction), no estado de Pernambuco a fim de subsidiar informações importantes para a construção de um plano de biossegurança. Este trabalho representa a primeira iniciativa nacional em estimar a prevalência de dois patógenos que pode ameaçar a sustentabilidade da carcinicultura brasileira.

2. OBJETIVOS

Objetivo Geral:

Avaliar o status sanitário do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* cultivado em fazendas do estado de Pernambuco, na fase de engorda, quanto à presença do vírus Taura (TSV) e o vírus da mionecrose infecciosa (IMNV) baseado em diagnóstico molecular de RT-PCR (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction).

Objetivos Específicos:

- Desenvolver uma metodologia de detecção sem a utilização de “kits” importados;
- Detectar a presença de TSV e IMNV nos viveiros de fazendas de engorda do litoral Norte e Sul do Estado de Pernambuco;
- Estimar a prevalência dos vírus da Síndrome de Taura e da Mionecrose Infecciosa em fazendas de camarão, no estado de Pernambuco.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Cenário Mundial da Carcinicultura Marinha

O cultivo de camarão marinho teve sua origem no sudoeste da Ásia, para fins de subsistência. A atividade se manteve por séculos com características artesanais até a década de 30, quando no Japão, foi obtida em laboratório a primeira desova de fêmeas capturadas do mar para a produção comercial de pós-larvas. O crescimento mundial do cultivo do camarão marinho, em termos comerciais só se evidenciou a partir da década de 80, e teve como base de sustentação, o avanço de novas tecnologias na reprodução em cativeiro e larvicultura, além da crescente demanda do produto no mercado internacional, a boa rentabilidade do agronegócio e sua capacidade de gerar renda, empregos e divisas (Rocha e Rodrigues, 2004).

No ano de 2003, a produção mundial de camarão cultivado em mais de 50 países em desenvolvimento, chegou a 1.703.957 toneladas, cujo volume anual envolvendo captura e cultivo foi de 3.024.808 toneladas, o que indica que o camarão obtido por captura, continua sendo o principal responsável pela oferta global do produto (Rocha et al., 2004).

O hemisfério oriental é responsável pela maior parte da produção mundial do camarão cultivado, com 1.422.292 toneladas em 2003, que correspondem a 83,47% do total, tendo China, Tailândia, Vietnã, Indonésia, Índia, Bangladesh e Filipinas como os principais países produtores (Tabela 1). No hemisfério ocidental, o volume produzido em 2003 chegou a 281.665 toneladas, o que significou 16,53% da produção mundial. Os principais países produtores são Brasil, Equador e México (Rocha, 2005). Duas espécies cultivadas predominam no mercado internacional com cerca de 70% do volume ofertado, são elas o camarão tigre asiático, *Penaeus monodon*, e o camarão branco do Pacífico, *Litopenaeus vannamei*.

Tabela 1. Principais produtores mundiais de camarão cultivado (Rocha, 2005).

Principais países produtores	2004		
	Produção em Toneladas	Área em produção (ha)	Produtividade (Kg/ha/ano)
China	312.000	223.00	1.397
Tailândia	325.000	64.000	5.078
Vietnã	220.000	500.000	440
Indonésia	222.540	504.000	441
Índia	160.000	200.000	800
Brasil	75.904	16.598	4.573
Equador	71.938	130.000	553
Bangladesh	58.000	145.000	400
México	47.000	39.000	1.205
Filipinas	38.000	30.000	1.267
Outros	377.618	199.390	1.894
Total	1.703.957	2.051.788	930

3.2 Carcinicultura Brasileira

O camarão *Litopenaeus vannamei*, foi introduzido no Brasil na década de 80, mas somente a partir da primeira metade dos anos 90, a partir do momento que os laboratórios brasileiros dominaram a reprodução e larvicultura do *Litopenaeus vannamei*, e iniciaram a distribuição comercial de pós-larvas e que as validações tecnológicas nas fazendas de camarão foram intensificadas, é que demonstraram a supremacia desta espécie em relação às espécies nativas. Somente entre 1995 e 1996 ficou realmente demonstrada a viabilidade comercial da produção de camarão marinho no Brasil (Rocha, 2001).

O cultivo de camarão no Brasil cresceu de forma consistente de 1997 até 2003, onde a área cultivada teve um aumento de 317% e um incremento na

produtividade de 499%, o que indica o intenso processo tecnológico a que a atividade foi submetida (Rocha e Rodrigues, 2004).

O Brasil produziu 90.160 toneladas de camarão em 2003, um crescimento de 50% da produção em relação ao ano anterior, consolidando a posição do País como sexto produtor mundial. O Estado de Pernambuco contribuiu com 6,5% da produção de camarão total do Brasil, produzindo 5.831 toneladas de camarão no ano de 2003 (Rocha et al., 2004).

Em 2004, contudo, a carcinicultura viveu um ano atípico, quando a produção de camarão registrou uma queda de 15,84%, caindo de 90.190 para 75.904 toneladas e a produtividade passou de 6.084 kg/ha/ano para 4.573 kg/ha/ano. As exportações foram reduzidas em 12,5%, reduzindo de US\$ 225,9 milhões para US\$ 198,6 milhões (Madrid, 2005). Uma série de fatores foram apontados como responsáveis por esta redução, entre eles a ação “antidumping” movida por pescadores norte americanos contra o camarão brasileiro, que causou uma redução de 50% nas exportações nacionais para os Estados Unidos, os preços baixos do camarão no mercado internacional, a desvalorização do dólar e o surto da Mionecrose infecciosa, que provocou queda na sobrevivência do camarão cultivado e redução na densidade de povoamento, adotada como medida preventiva (Madrid, 2005). A região Nordeste é responsável por 93.1% da produção de camarões cultivados (Tabela 2). Na distribuição da estrutura produtiva por estado, o Rio Grande do Norte é o líder em produção, com mais de 30.000 toneladas produzidas em 2004. O Estado de Pernambuco contribuiu com 6,0% da produção de camarão total do Brasil, produzindo 4.531 toneladas de camarão no ano de 2004, ocupando o quarto lugar no ranking nacional (Rodrigues, 2005).

Tabela 2. Distribuição da carcinicultura marinha por regiões do Brasil em 2004 (Rodrigues, 2005).

Região	Nº de fazendas		Área		Produção		Produtividade
	Nº	%	ha	%	Ton	%	Kg/ha/ano
Norte	5	0.5	38	0.2	242	0.3	6.368
Nordeste	883	88.6	15.039	90.6	70.694	93.1	4.701
Sudeste	12	1.2	103	0.6	370	0.5	3.592
Sul	97	9.7	1.418	8.5	4.598	6.1	3.243
Total	997	100.00	16.598	100.00	75.904	100.00	4.573

3.3 Enfermidades dos camarões marinhos

Snieszko (1973) afirma que o termo “doença” aplicado à aquicultura é o resultado final de uma complexa interação entre o hospedeiro, o ambiente, e o patógeno. Em alguns casos, o hospedeiro e seu patógeno em potencial podem coexistir com um pequeno ou nenhum efeito adverso. O autor utiliza três círculos com intercessões para ilustrar este conceito (Figura 1). De acordo com este esquema, o resultado esperado da interação entre o hospedeiro, patógeno, e o ambiente pode mudar de acordo com alterações em qualquer um dos fatores, quando a intercessão entre os círculos aumenta a incidência ou severidade da doença também aumenta. O hospedeiro pode variar em relação à espécie, idade, fase de vida, estado nutricional, entre outras coisas. O patógeno ou agente etiológico da doença pode ser biótico ou abiótico e pode variar em relação à virulência e a concentração, enquanto o ambiente pode variar de condições ideais até desfavoráveis para o hospedeiro.

As doenças de camarões peneídeos cultivados incluem síndromes com etiologias infecciosas e não infecciosas. As doenças não infecciosas de importância econômica para o camarão de cultivo, estão ligadas aos extremos ambientais, ao desequilíbrio nutricional, a produtos tóxicos e a fatores genéticos.

(Lightner e Redman, 1998a). Embora o cultivo de camarão seja atingido por muitos patógenos, os mais sérios em relação a perdas econômicas são causados por patógenos virais (Flegel, 2001).

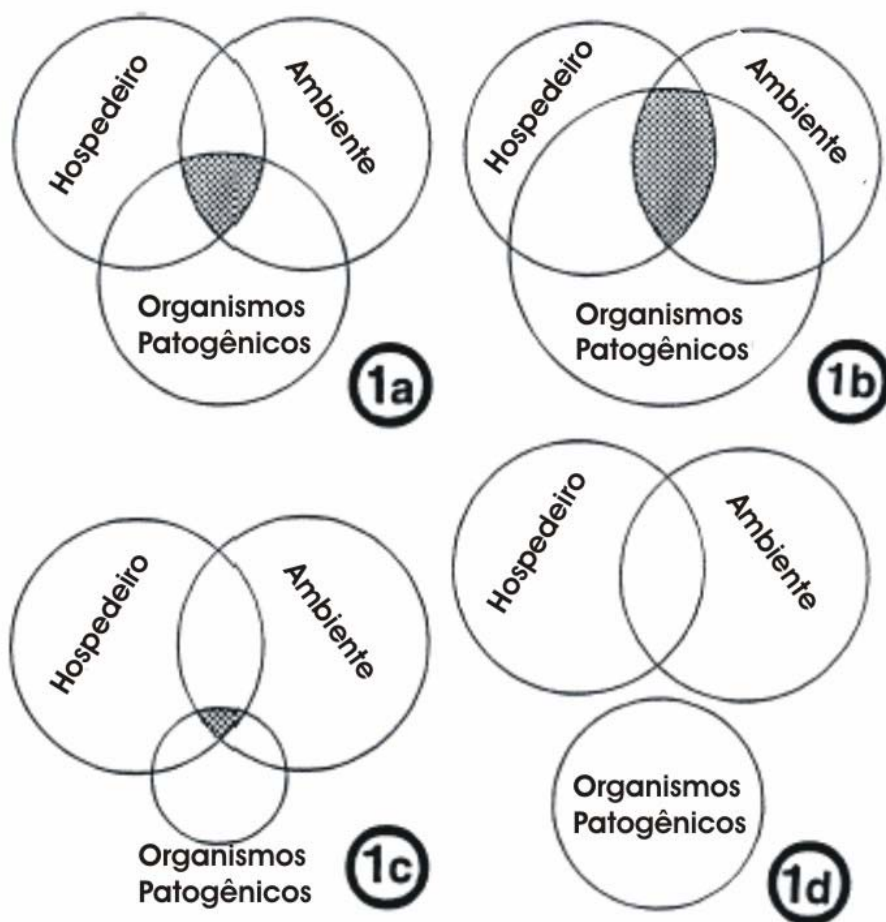


Figura 1. Na figura os círculos mostram as interações entre o hospedeiro, o patógeno e o meio ambiente. (1a) Efeito de uma situação de equilíbrio, (1b) Ilustra o exemplo para um patógeno altamente virulento, (1c) efeito de um patógeno de baixa virulência, (1d) ilustra um organismo “Specific Pathogen Free” (SPF), condição em que o patógeno foi excluído (Snieszko, 1973 modificado por Lightner e Redman, 1998a).

As doenças ocasionadas por patógenos virais já provocam perdas consideráveis de produtividade e produção, tais como as que ocorreram nos países do sudoeste asiático, principalmente na China, Taiwan, Tailândia, e Indonésia a partir da década de 80 e, posteriormente, na segunda metade dos anos 90, nos países da costa sul-americana do pacífico, notadamente no Equador, Peru e Panamá (Galli, 2001).

Desde a primeira descrição de uma doença viral em camarão, realizada por Couch em 1974, mais de vinte vírus já foram descritos para camarões peneídeos (Lightner, 1996a). No Código de Saúde de Animais Aquáticos (Code Aquatic) da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), oito doenças de crustáceos estão listadas atualmente, sete das quais são doenças virais de grande importância para camarões peneídeos na aqüicultura mundial:

Síndrome de Taura (TSV)

Doença da Mancha Branca (WSSV)

Doença da Cabeça Amarela (YHV)

Baculovirose Tetraédrica (BP)

Baculovirose Esférica (MBV)

Infecção da hipoderme e Necrose Hematopoiética (IHHNV)

Doença “Spawner-isolated mortality” (SMV)

A Síndrome de Taura (TSV - Taura Syndrome Virus), a Mancha Branca (WSSV - White Spot Syndrome Virus) e a IHHNV (Infectious Hypodermal and Haematopietic Necrosis Virus) destacam-se como as enfermidades virais de maior importância para a carcinicultura na América Latina. Estima-se que até 2001, os prejuízos causados por este grupo de vírus ultrapassaram US\$ 10 bilhões (Tabela 3), (Lightner, 2003).

No Brasil já foi detectado o TSV, o IHHNV presente em todas as regiões de cultivo no Brasil, o IMNV, que atualmente causa sérios prejuízos ao setor da carcinicultura nordestina e mas recentemente o WSSV, diagnosticado em Santa

Catarina em janeiro de 2005 e notificado à Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), (Seiffeert et al., 2005).

Tabela 3 Prejuízos estimados da indústria de cultivo de camarões marinhos causados por enfermidades virais desde sua primeira detecção até 2001 (Lightner, 2003).

Vírus	Ano	Perdas (US\$bilhões)
WSSV-Asia	1992	4-6
WSSV-Américas	1999	>1
TSV	1991-1992	1-2
YHV	1992	0,1-0,5
IHHNV ^a	1981	0,5-1,0

^a Incluindo as perdas na pesca do Golfo da Califórnia em 1989-1994.

Lotz *et al.* (1995) categorizaram os patógenos de camarão em três tipos, baseado na patogenicidade e no perigo que representam para a carcinicultura: a categoria três (C-3) inclui patógenos que possuem um impacto mínimo sobre os camarões; categoria dois (C-2) representa os patógenos que causam ameaça e podem afetar a produtividade reduzindo o crescimento ou sobrevivência dos camarões de cultivo; categoria um (C-1) representa os patógenos mais perigosos, que causam mortalidades em massa e podem ser uma ameaça à sobrevivência da atividade em uma região. Quatro vírus que atacam camarões peneídeos são reconhecidos como patógenos do tipo C-1: IHHNV, TSV, YHV e WSSV (Lotz, 1997). A disseminação destes patógenos na aquicultura foi efetuada por transporte de camarão vivo e por produtos congelados que carregavam patógenos infecciosos (Lightner 1996a).

3.4 Métodos de diagnóstico

Os diagnósticos que podem ser selecionados para detecção de doenças infecciosas de crustáceos listadas pela OIE ou para detecção de seus agentes etiológicos baseiam-se em:

- Sinais clínicos totais
- Microscopia direta ou de contraste
- Microscopia eletrônica
- Histologia
- Bioensaios
- Testes baseados em anticorpos policlonais (PAbs) ou em anticorpos monoclonais (MAbs)
- Métodos moleculares:
 - Sondas de DNA
 - Hibridização *in situ*
 - Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Transcriptase Reversa acoplada a reação em cadeia da polimerase (RT-PCR).

3.4.1 Diagnóstico molecular

Métodos de diagnóstico molecular têm sido muito importantes para a indústria de camarões nos últimos anos, assim como os métodos clássicos de rotina como histopatologia e microbiologia (Lightner, 1999a).

O primeiro teste de diagnóstico usando tecnologia baseada em DNA, foi realizado há menos de 15 anos para detectar IHHNV, utilizando uma sonda genética (Lightner et al., 1992; Mari et al., 1993). A aplicação de tecnologias moleculares em diagnósticos na aquicultura avançou rapidamente, pois essa ferramenta provê resultados rápidos, com alta sensibilidade e especificidade, e

são particularmente necessários para infecções de difícil diagnóstico na histologia tradicional (Bondad-Reantaso et al., 2005).

Dos métodos de diagnósticos usados atualmente, os métodos moleculares de PCR e RT-PCR, são os mais eficientes para os patógenos virais, pois possuem grande sensibilidade e especificidade (Lightner, 2005) comparando-os com outros métodos de diagnóstico existentes (Tabela 4).

Tabela 4. Métodos de diagnóstico e detecção de patógenos virais que atingem camarões peneídeos (Lightner, 2005).

Método	WSSV	IHHNV	BP	MBV	SMV	YHV-group	TSV
Microscopia Direta/Contraste	+	-	+++	+++	-	++	+
Histopatologia	++	++	++	++	+	+++	+++
Bioensaio	+	+	+	-	-	+	+
Microscopia Eletrônica	+	+	+	+	+	+	+
Testes baseados em Anticorpos (PAb/MAb)	++	-	+	-	-	-	++
Sondas de DNA(DBH/ISH)	+++	+++	++	++	+	+++	+++
PCR/RTPCR	+++	+++	+++	+++	+	+++	+++

PAb, anticorpos policlonais; **MAb**, anticorpos policlonais; **DBH**, hibridização dot-blot; **ISH**, hibridização *in situ*.

- = Técnica não conhecida ou não publicada.

+ = Técnica conhecida ou publicada, mas não comumente utilizada.

++ = Técnica considerada suficientemente precisa na maioria das aplicações.

+++ = técnica com alta sensibilidade na detecção do patógeno.

3.4.2 RT-PCR

A Reação em cadeia da Polimerase (PCR) é uma técnica *in vitro* que permite a amplificação de uma região específica da seqüência de DNA. A amplificação é obtida a partir da utilização da enzima DNA polimerase termorresistente, co-fatores, desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTPs) e oligonucleotídeos (primers), pequenas moléculas de DNA unifilamentar com seqüência complementar às regiões que flanqueiam a região-alvo. A amplificação por PCR ocorrerá quando os primers reconhecerem os sítios complementares e forem estendidos pela DNA polimerase na presença de dNTPs. A mistura é aquecida a 90-95°C, para desnaturação do DNA molde, sofre um resfriamento entre 36 e 60°C para permitir o anelamento dos primers aos sítios complementares e um novo aquecimento de 70-75°C para que a DNA polimerase sintetize novas fitas de DNA, completando-se assim o primeiro ciclo de amplificação.

A RT-PCR é igualmente uma técnica *in vitro* que combina a ação da enzima transcriptase reversa a uma PCR convencional. Seu principal diferencial é que esta reação parte de um molde de DNA diretamente extraído da amostra; a amostra fornece o RNA mensageiro, que é convertido em DNA complementar (cDNA). O primeiro passo da reação consiste na síntese de uma fita de DNA utilizando como molde uma fita de RNA numa reação catalisada por uma transcriptase reversa. Além disso, também são utilizados *primers*, mas inespecíficos e nunca em pares. São oligonucleotídeos compostos por várias timinas consecutivas (de 6 a 35), que são anelados às regiões *Poly-A* (ou *A-Rich*) do RNA, ricas em adeninas (Figura 2). Após este ciclo, obtém-se o cDNA que será utilizado na PCR (Newton e Graham, 1994).

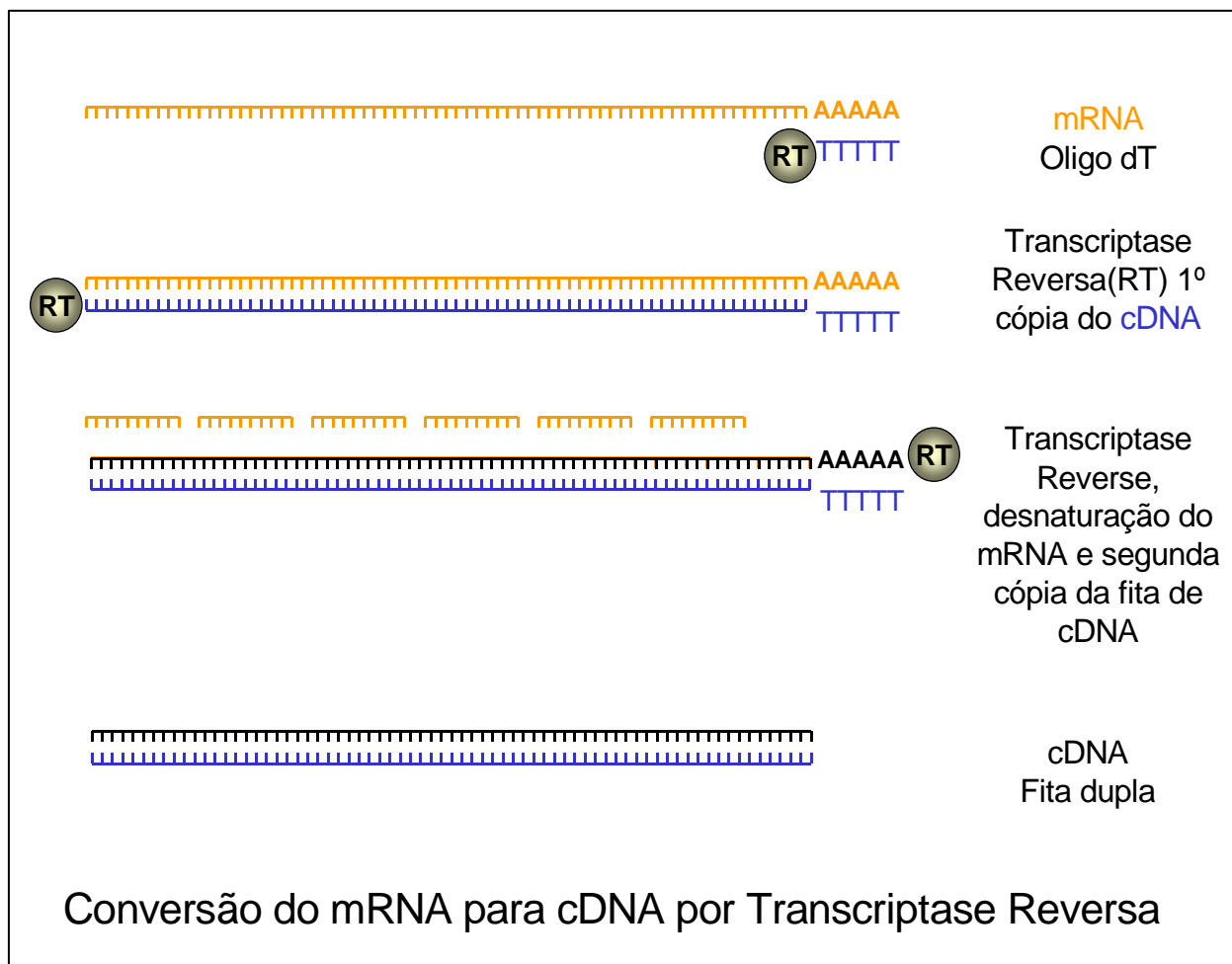


Figura 2. Reação de RT-PCR, conversão do RNAm em cDNA. Fonte: (<http://www.pathmicro.med.sc.edu/pcr/realtime.home.htm>).

3.5 Síndrome de Taura

A Síndrome de Taura surgiu em 1992 nas proximidades do rio Taura no golfo de Guayaquil no Equador (Jimenez, 1992). Inicialmente a causa da síndrome foi atribuída a exposições dos camarões aos fungicidas Benlate™ (benomyl; DuPont), Tilt™ (propiconazole; Ciba-Geigy) e Calixin™ (tridemorph; BASF). Em 1994, contudo, foi identificado o novo vírus chamado de TSV como agente etiológico direto da síndrome de Taura (Brock et al., 1995). O vírus foi classificado

por Bonami *et al.* (1997) como sendo da família *Picornaviridae* baseado em suas características físicas e químicas, entretanto Mari *et al.* (2002) sugeriu que sua seqüência de nucleotídeos pertencia a um membro ainda não classificado do Gênero *Cricket Paralysis vírus*. Atualmente este vírus é classificado como membro da família *Discitroviridae* e do Gênero *Cripavirus* (Mayo 2002; Pantoja *et al.*, 2004).

Vírions de TSV têm morfologia icosaedral, não são envelopados, com diâmetro de 31 a 32 nm e densidade de 1,338g/ml (CsCl). Replicam-se no citoplasma de células hospedeiras e seu genoma consiste de uma fita única de RNA (ssRNA), linear, com 10.205 nucleotídeos e contém ainda dois grandes quadros abertos de leitura (ORFs). A ORF 1 contém as seqüências para proteínas não estruturais como a helicase, protease e *RNA polimerase*. A ORF 2 contém as seqüências para proteínas estruturais como as do capsídeo, VP1, VP2 e VP3 (Hasson *et al.*, 1995). Até o momento já foram identificados três sorotipos do vírus da Síndrome de Taura, TSV-A, TSV-B e TSV-C (Erickson *et al.*, 2002), (Tabela 5).

Tabela 5: Sorotipos do vírus da síndrome de Taura, origem e virulência (Erickson *et al.* 2002).

Tipo	Referência	Origem	Ano	Virulência
A	HI94	Havaí Equador	1994	Baixa
B	SIN98	México	1998	Média
C	BLZ02	Belize	2002	Alta

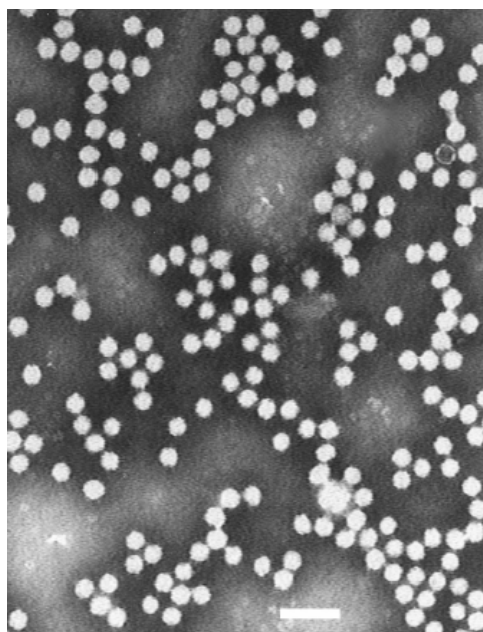


Figura 3. vírions do TSV, icosaédricos, tamanho 31-32nm e densidade de 1,338 g/ml medida com cloreto de cézio (Brock, 1997)

3.5.1 Impacto econômico

A produção equatoriana de camarão marinho cultivado sofreu perdas da ordem de 30%, o que representou um prejuízo de aproximadamente US\$ 400 milhões de dólares para a indústria local. Similarmente, a produção de camarão em Honduras diminuiu em 60% depois de um surto de TSV na região (Lightner, 1996b). Estima-se que o vírus Taura tenha causado perdas econômicas diretas nas Américas de US\$ 1 a 1,3 bilhões (Lightner, 2003).

3.5.2 Susceptibilidade

Espécies de camarões diferem em sua susceptibilidade ao TSV (Brock et al., 1995). Em *Litopenaeus vannamei*, TSV não causa impacto a saúde de

náuplios e larvas até o estágio de misis, mas de pós-larvas até adultos eles são altamente susceptíveis a doença. Pós-larvas de *L. vannamei* silvestres são menos resistentes ao vírus do que pós-larvas provenientes de laboratório (Stern, 1995). *Penaeus setiferus*, *Penaeus stylirostris* são menos sensíveis a doença, *P. monodom*, *P. japonicus*, *P. duorarum* e *P. aztecus* são altamente resistentes (Brock, 1997).

3.5.3 Distribuição Geográfica e Disseminação

Desde 1996, a distribuição do vírus da Síndrome de Taura parecia estar limitada as Américas, contudo, o vírus foi encontrado em Taiwan, onde foram observadas altas mortalidades em *L. vannamei*, provenientes das Américas (Tu et al., 1999, Yu e Song, 2000) e mais recentemente foi confirmada a presença do vírus na Tailândia (Nielsen et al., 2005).

Os prováveis meios de disseminação da doença entre diferentes regiões geográficas são a transferência de reprodutores e camarões congelados infectados. Transferências entre curtas distâncias são normalmente ocasionadas por insetos e aves (Lightner, 1995).

O TSV pode permanecer infeccioso nas fezes de gaivotas e garças que se alimentaram de camarões infectados, implicando que as aves desempenham um papel importante na transmissão do vírus (Vanpatten et al., 2004).

3.5.4 Atributos clínicos e Patologia

A Síndrome de Taura apresenta duas fases distintas: fase aguda e fase crônica. Lesões histológicas associadas à síndrome de Taura em camarões na fase aguda da doença mostram áreas de necroses multi-focais no epitélio cuticular e sub-cuticular e freqüentemente no tecido conectivo sub-cuticular (Figura 4). Na fase crônica, no entanto, pode não haver lesões macro e microscopicamente detectáveis. Suspeita-se que os sobreviventes de Taura podem portar o vírus por toda a vida (Lightner et al., 1995, Brock, 1997).

Macroscopicamente os juvenis de *Litopenaeus vannamei* na fase aguda são frágeis, moribundos, possuem carapaça mole, trato digestivo vazio, expansões difusas dos cromatóforos e os urópodos mostram-se com coloração avermelhada (Figura 6 c e Figura 7, a e b). Camarões com sinais típicos da fase aguda normalmente encontram-se na fase D do ciclo da muda (Figura 5) e geralmente não sobrevivem ao processo de muda. Durante a fase crônica os camarões podem ou não apresentar os sintomas da doença, quando camarões demonstram sintomas da doença, apresentam mortalidades moderadas nos viveiros e lesões multifocais melanizadas na carapaça (Figura 6, a e b). Entretanto, geralmente os camarões são assintomáticos nesta fase, continuam comportando-se e alimentando-se normalmente (Lightner, 1996a).

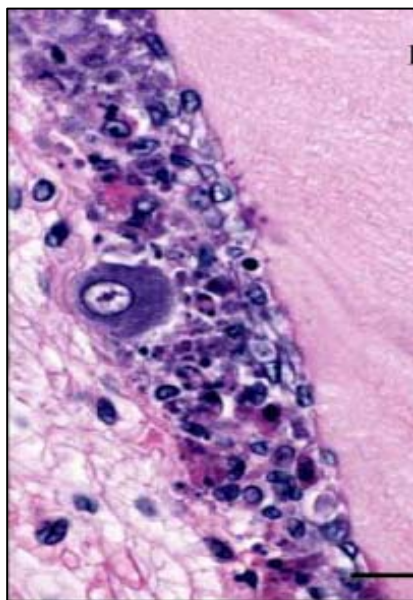


Figura 4. Lesões histopatológicas do tipo “buckshot”, (aparência de pimenta em pó) no epitélio cuticular de um camarão *Litopenaeus vannamei* com infecção aguda de TSV. Corada com H&E (Vanpatten et al., 2004).

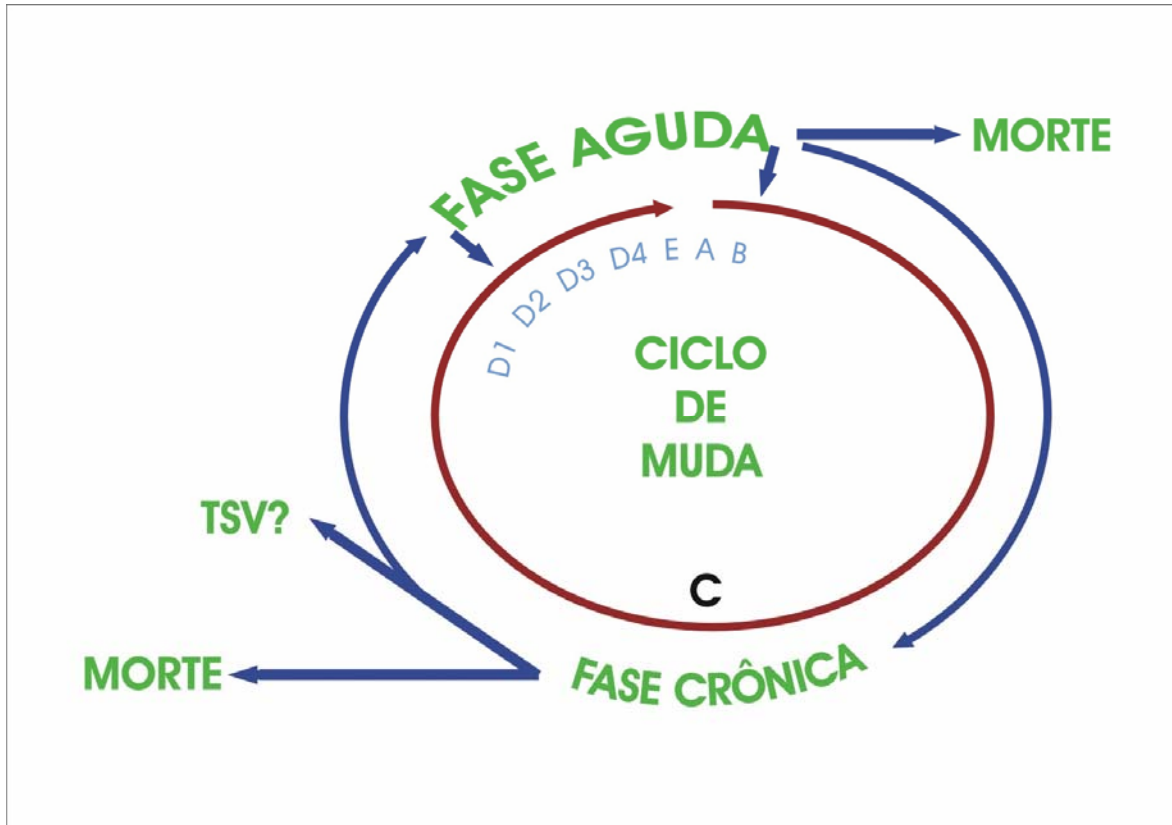


Figura 5. Ciclo da Síndrome de Taura em juvenis de *L. vannamei*. A infecção aguda inicia-se sete dias após a infecção inicial e segue até o estágio de muda (E). Aparentemente nesta fase o ciclo da muda é temporariamente inibido, portanto muitos camarões com TS morrem durante o processo de muda. Os camarões que sobrevivem a muda entram na fase crônica ou fase de recuperação da doença e podem voltar a apresentar comportamento normal (Hasson et al., 1999).



(a)



(b)



(c)

Figura 6. (a) e (b) Camarões infectados com TSV, exibindo carapaça com lesões melanizadas multifocais, (c) Camarão saudável e camarão com urópodos avermelhados (Gusmán e Lightner, 1999).

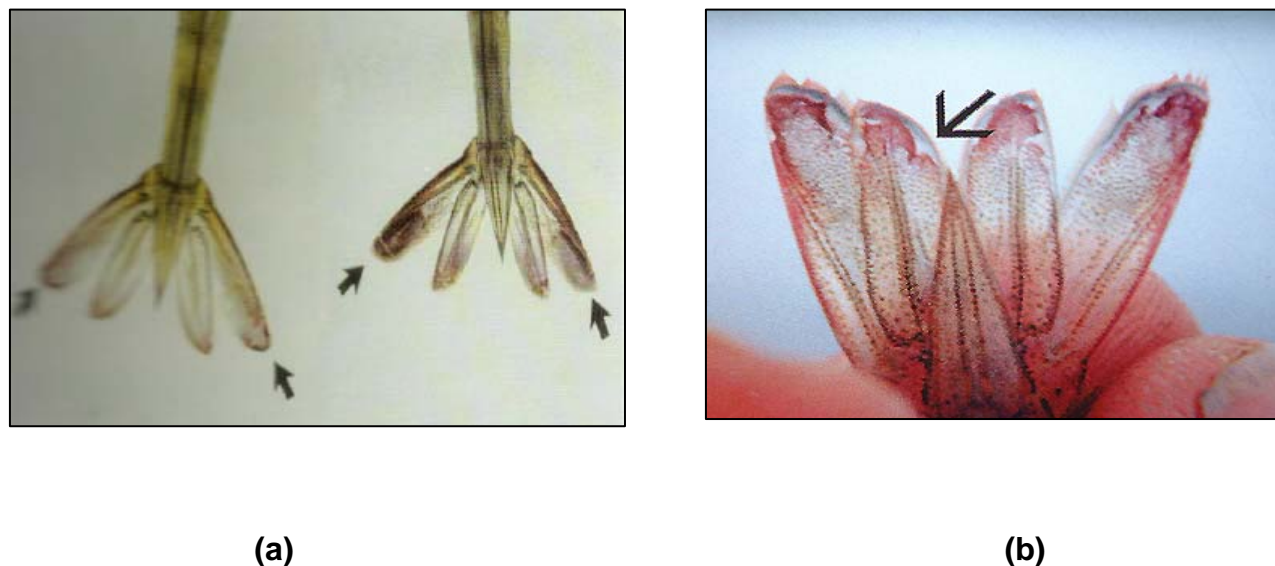


Figura 7. Lesões ocasionadas pelo vírus da síndrome de Taura, (a) e (b) urópodos avermelhados (Lightner, 1996a).

3.6 Mionecrose infecciosa

O primeiro caso da Mionecrose infecciosa (IMN) no Brasil, foi detectado em Agosto de 2002, no Piauí, e depois se disseminou no Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba e Pernambuco. Entretanto existem alguns relatos de enfermidades com sintomatologias idênticas as da Mionecrose muscular identificadas em camarões da espécie *Farfantepenaeus subtilis* no Brasil, na costa piauiense na década de 80 e em *Penaeus Aztecus* na década de 70 na Baía de Galveston, E.U.A. (Rigdon e Baxter, 1970).

Recentemente detectou-se o agente etiológico da doença, o Vírus da Mionecrose Infecciosa (IMNV), foi identificado em *Litopenaeus vannamei* cultivado no nordeste do Brasil (Lightner e Pantoja, 2004), é um vírus que possui RNA de fita dupla (dsRNA) e pertencente à família *Totiviridae* (Tang et al., 2005a).

O IMNV causa mortalidades significativas de 40 a 60% em juvenis e sub-adultos de *L.vannamei* cultivados em cativeiro e as perdas econômicas no Brasil devido à doença foram estimadas em US\$ 20 milhões em 2003 (Nunes et al., 2004). Surtos da doença parecem estar associados a certos tipos de ambientes e 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 Mionecrose Infecciosa apresenta-se como uma doença com sintomas agudos e mortalidades elevadas, mas progride para uma situação crônica acompanhada de uma persistente baixa mortalidade. Atualmente, a IMN parece estar limitada ao nordeste brasileiro, mas camarões com sinais clínicos semelhantes também foram encontrados em outros países onde *L.vannamei* é cultivado (Lightner et al., 2005). Os camarões afetados apresentam extensas áreas de necroses esbranquiçadas no músculo estriado, especialmente nos segmentos abdominais e na cauda (Figura 8). Alguns camarões apresentam coloração avermelhada nas áreas necrosadas (Lightner et al., 2005).

Histopatologicamente, camarões na fase aguda da doença, apresentam necrose muscular coagulativa, freqüentemente com edema (Figura 9). Esta progressão da mionecrose é acompanhada de infiltração hemocítica e fibrose. O aparecimento de esferóides do órgão linfóide é um dos sinais típicos da presença da doença (Tang et al., 2005b). São encontrados freqüentemente esferóides ectópicos no órgão linfóide, no tecido conectivo esponjoso, especialmente no lúmen do coração e túbulos adjacentes da glândula de antenal em camarões que estão se recuperando da fase aguda da doença ou que estão na fase crônica da doença (Lightner et al., 2005).



Figura 8. Juvenis de *Litopenaeus vannamei* com sinais clínicos de IMN, mostrando áreas extensas de necrose esbranquiçadas do músculo esquelético, na cauda e abdômen. Em alguns camarões, a necrose muscular pode apresentar-se de cor avermelhada (Lightner et al., 2005).

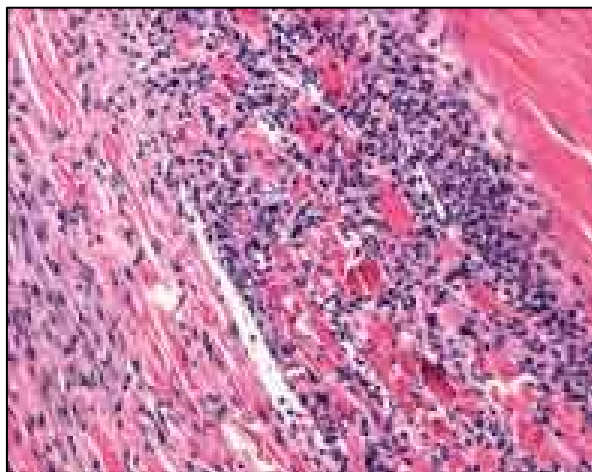


Figura 9. Necrose muscular coagulativa liquefativa, causada pelo vírus IMN (Lightner et al., 2005).

A natureza infecciosa da doença foi demonstrada por transmissão da doença em camarões SPF. Um vírus esférico de 40 nm de diâmetro foi isolado de um camarão naturalmente infectado com a doença. O vírus foi caracterizado parcialmente e porções do seu genoma foram clonadas e seqüenciadas (Lightner et al., 2005).

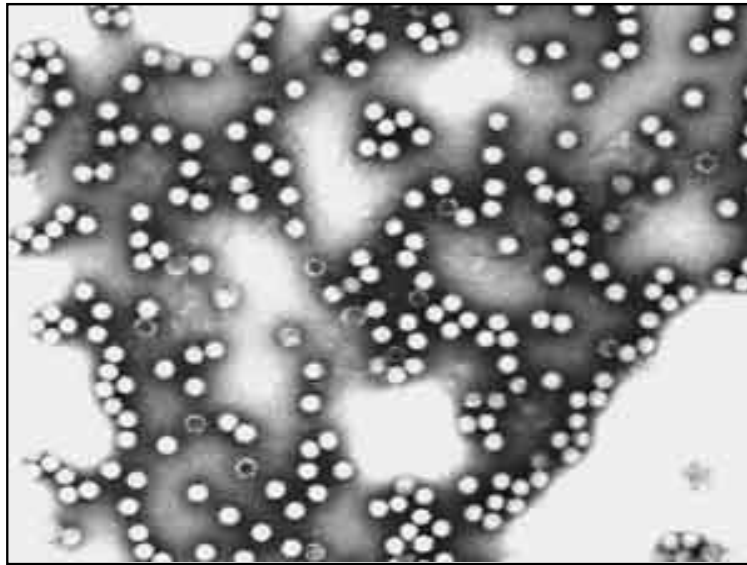


Figura 10. Partículas virais de IMNV com 40nm de diâmetro isoladas de camarão naturalmente infetado com IMNV (Lightner et al., 2005).

As espécies de camarões peneídeos *Litopenaeus vannamei*, *L. stylirostris* e *Penaeus monodon* são susceptíveis ao IMNV e dentre estas espécies *L. vannamei* é a mais susceptível (Tang et al., 2005b).

Foram desenvolvidos métodos de RT-PCR e hibridação *in situ* para diagnóstico da doença e detecção do IMNV (Tang et al., 2005a).

3.7 Análise da Prevalência

Epidemiologia é o estudo da freqüência, dos determinantes e da distribuição de uma doença e tem como objetivo principal, solucionar problemas de saúde animal (Thursfield, 1995). Epidemiologia para saúde de animais aquáticos é um novo conceito introduzido em 1996 e vem sendo aplicado em várias investigações de diagnósticos de doenças (Lilley et al., 2002; Corsin et al., 2001; Mohan et al., 2002).

Para controlar eficazmente uma enfermidade, é necessário antes de tudo, compreender a distribuição da enfermidade, descobrir qual enfermidade existe, quantos animais estão doentes e onde se encontram. Os dados sobre as enfermidades estão baseados na detecção de animais saudáveis e de animais doentes. A partir destes dados pode-se calcular diferentes parâmetros descritivos sobre o estado e avaliação da enfermidade e dentre estes parâmetros um dos mais importantes é a prevalência (Cameron, 1999).

A prevalência baseia-se no número de animais doentes dentro de uma população conhecida, em um tempo designado, sem distinção entre casos velhos e novos. A Prevalência é expressa comumente como prevalência pontual, quer dizer, a quantidade de animais doentes em uma população em um período de tempo específico (Thursfield, 1995). Ou ainda, a prevalência é o número de animais enfermos em um momento determinado e que se expressa como a proporção da população total submetida ao risco de uma enfermidade neste mesmo momento (Cameron, 1999).

$$\text{Prevalência} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de casos de uma doença presente em uma pop.}}{\text{n}^\circ \text{ de ind. da pop. Naquele mesmo tempo.}}$$

(Science fair projects encyclopedia, 2004).

3.8 Biosseguridade

A biosseguridade se refere a um conjunto de medidas proativas direcionadas a prevenção e (ou) diminuição do risco de transmissão de doenças infecciosas (virais ou bacterianas) e parasitárias às populações de animais saudáveis (Moss et al., 1998). Na indústria de aves, biosseguridade é definida como um grupo de ações essenciais na prevenção, controle e erradicação de doenças infecciosas economicamente importantes (Zavala, 1999).

Biosseguridade, aplicada à carcinicultura, pode ser definida como a prática da exclusão de patógenos específicos em estoques de organismos aquáticos cultivados em instalações de reprodução, laboratórios, e fazendas, ou de regiões inteiras ou países, com o propósito de prevenção da doença (Lightner, 2003).

Para realização de programas de biosseguridade eficazes, as enfermidades devem ser bem monitoradas. Para isto é necessário conhecimento das doenças que ocorrem, assim como é indispensável ter acesso a eficientes métodos de diagnóstico e a laboratórios apropriados (Lightner, 2003).

Programas de Biosseguridade geralmente têm uma base científica forte para avaliação de risco das doenças mais significantes, suas possíveis rotas de entrada, a probabilidade de estabelecimento delas e suas possibilidades de expansão para assegurar proteção apropriada aos produtores aquícolas. Deve possuir informação científica e técnica como base para o desenvolvimento de políticas e decisões, priorizando o desenvolvimento de pesquisas que envolvam princípios epidemiológicos. Os estudos epidemiológicos geram dados essenciais para as análises de risco e para medidas de biosseguridade, permitindo através das informações realizar uma avaliação precisa, com o objetivo de administrar de maneira eficaz as decisões. Assim, biosseguridade e epidemiologia estão altamente relacionadas, pois é extremamente necessário utilizar pesquisa científica para prevenção, controle e administração de doenças (Bondad-Reantaso et al., 2005).

Uma das maneiras de estabelecer medidas de controle sanitário é através da implementação de “códigos de biossegurança”, que são uma série de medidas que devem ser sistematizadas para prevenir o ingresso ou disseminação de uma enfermidade em um determinado território (Galli, 2001).

Diagnóstico e a vigilância das doenças em estoques de produção são componentes essenciais em um programa de biossegurança na carcinicultura. A função do diagnóstico em um programa de biossegurança em sistemas de cultivo é determinar a causa do surto de uma doença, assim como as causas de um baixo crescimento, elevada taxa de conversão alimentar, redução no número de desovas, etc. (Lightner, 2005). Na produção de camarões os componentes básicos de um programa de biossegurança devem ser: conhecimento das patologias existentes; relação das doenças e patógenos que devem ser excluídos; Apropriados métodos de diagnóstico; controle dos vetores no ambiente; boas práticas de manejo e planos de desinfecção, contenção e erradicação das doenças nas fazendas e laboratório de produção de pós-larvas (Pruder, 2004).

Várias estratégias são empregadas para minimizar o risco de entrada das doenças nas unidades de produção da aquicultura de camarões, entre elas, o uso de animais livres de um ou mais patógenos específico ou SPF (specific pathogens free), sistemas com zero troca de água, utilização de probióticos e monitoramento dos efluentes (Pruder, 2004), quarentena, controle do tráfego de pessoas, veículos e equipamentos e testes de diagnóstico.

A aplicação de vigilância das doenças e informação da saúde animal na aquicultura é complicada por vários fatores como, alto custo, a falta de desenvolvimento sócio-econômico e tecnológico em muitos países, 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).

4. ARTIGO CIENTÍFICO

Abstract

Shrimp culture has grown rapidly worldwide and nowadays constitutes a solid industry generating jobs for thousand people. In any aquatic species, the transition from life in a wild environment to aquaculture systems is usually followed by several changes, such as culture densities, frequent degradation of environmental quality, mixing of populations of different origin and manipulations, etc. These facts increase the probability of outbreaks of serious diseases. Several virus diseases have occurred, threatening the sustainability of shrimp industry worldwide. Taura virus (TSV) is considered one of the most harmful pathogens in the Americas, with cumulative mortality between 40 and 60%. Another virus, named Infectious Myonecrosis Virus (IMNV) was first identified in *Litopenaeus vannamei* reared in Northern Brazil and it is pointed as one of the main causes of the crash in shrimp production in 2004. The objective of this study was to investigate the prevalence of TSV and IMNV by Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) in Pernambuco state, in order to provide important information for the construction of a biosecurity plan. Eleven commercial farms, located in six different cities of the north and south coast, were randomly sampled between August and December of 2004. Among the 530 animals analyzed, none were positive for Taura, suggesting that the prevalence of this pathogen is lower than 0,06%, even with recent outbreaks in nearby countries. The IMN virus prevalence lied between 0 and 35,56% among the farms, which is considered alarming and requires monitoring mechanisms at the national level. These results constitute the first survey of these shrimp viruses carried out in the Americas using a total randomized sample.

Keywords: *Litopenaeus vannamei*, TSV, IMNV, Prevalence, RT-PCR

1. Introdução

A carcinicultura cresceu rapidamente em todo o mundo e hoje representa uma grande indústria, proporcionando emprego para milhares de trabalhadores e milhões em receita. Entretanto, como toda atividade de aquicultura, a passagem do ambiente selvagem para o cativeiro, é acompanhada de mudanças, tais como aumento da densidade, baixa qualidade ambiental e a mistura de populações com diferentes origens genéticas, propiciam o surgimento de doenças.

Surtos de diversas doenças foram reconhecidos como uma ameaça a sustentabilidade da indústria do camarão, e algumas delas, em especial aquelas de etiologia viral (Bachère, 2000, Lightner e Redman, 1998b), causaram sérias perdas econômicas para os produtores de vários países. Dentre as doenças virais, destacam-se a Síndrome de Taura (TSV-Taura Syndrome Vírus), a Mancha Branca (WSSV-White Spot Syndrome Vírus), e a IHHNV (Infectious Hypodermal and Haematopoietic Necrosis Vírus) como as enfermidades de maior importância para a carcinicultura na América Latina (Shellfish Diseases, 1996).

A Síndrome de Taura Surgiu em 1992 nas proximidades do rio Taura no golfo de Guayaquil no Equador (Jimenez, 1992). Camarões *Litopenaeus vannamei* atingidos pela síndrome de Taura apresentam-se frágeis, moribundos, possuem carapaça mole, trato digestivo vazio, expansões difusas dos cromatóforos e os urópodos mostram-se avermelhados (Lightner, 1996a).

Inicialmente a causa da síndrome de Taura foi atribuída a exposições dos camarões a fungicidas. Entretanto, em 1994 foi identificado o novo vírus chamado de Vírus da Síndrome de Taura ou TSV como agente etiológico direto da doença (Brock et al., 1995, Hasson et al., 1995), classificado como pertencente ao Gênero *Cripavirus* e à família *Discitroviridae* (Mayo, 2002).

O TSV espalhou-se rapidamente por diversos países da América Latina, provocando mortalidades cumulativas entre 60 e 90% (Lightner, 1999b), despontando como uma das maiores ameaças ao cultivo de camarão nas Américas, inclusive com surtos em 2005 na Venezuela (OIE, 2005). Estima-se que o vírus Taura tenha causado perdas econômicas diretas nas Américas de 1 a 1,3 bilhões de dólares (Lightner, 2003).

A distribuição do vírus da síndrome de Taura parecia estar limitada às Américas, contudo, o vírus foi encontrado em Taiwan, onde foram observadas altas mortalidades em *L. vannamei*, provenientes das Américas (Tu et al., 1999, Yu e Song, 2000) e mais recentemente foi confirmada a presença do vírus na Tailândia (Nielsen et al., 2005).

Os prováveis meios de disseminação da doença entre diferentes regiões geográficas são a transferência de reprodutores e camarões congelados infectados. Transferências entre curtas distâncias são normalmente ocasionadas por insetos e aves (Lightner, 1995).

Três sorotipos foram identificados para o vírus da síndrome de Taura, TSV-A, TSV-B e TSV-C, que possuem como país (es) de origem respectivamente Havaí e Equador, México e Belize (Erickson et al., 2002).

Outro vírus, denominado de Vírus da Mionecrose infecciosa (IMNV), foi recentemente identificado em camarões *Litopenaeus vannamei* cultivados no nordeste do Brasil (Lightner e Pantoja, 2004). O vírus da IMNV (Infectious Myonecrosis Virus) pertence à família *Totiviridae*, não tendo sido registrado em outros países (Tang et al., 2005a). O primeiro caso da doença foi detectado em Agosto de 2002, no estado do Piauí, e depois se disseminou nos estados do Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba e Pernambuco.

A Mionecrose infecciosa caracteriza-se como uma doença com sintomas agudos, na qual os camarões afetados apresentam extensas áreas de necroses esbranquiçadas no músculo estriado, especialmente nos segmentos abdominais e na cauda. Alguns camarões apresentam coloração avermelhada nas áreas necrosadas (Lightner et al., 2005). Mortalidades entre 40 e 60% e perdas

econômicas da ordem de US\$ 20 milhões, foram registradas no Brasil no ano de 2003 ocasionadas pelo IMNV (Nunes et al., 2004).

Os Métodos de diagnóstico disponíveis para detecção de doenças infecciosas que atingem os camarões peneídeos, incluem métodos tradicionais de patologia morfológica (microscopia direta, histopatologia, e microscopia eletrônica), bioensaios e métodos moleculares (sondas genéticas e Reação em Cadeia da Polimerase/ PCR) (OIE, 2003).

A aplicação de tecnologias moleculares em diagnósticos na aqüicultura avançou rapidamente, fornecendo resultados rápidos, com alta sensibilidade e especificidade, e tornam-se particularmente necessários para infecções de difícil diagnóstico na histologia tradicional (Bondad-Reantaso et al., 2005).

Este trabalho tem como objetivo estimar a prevalência dos vírus da Síndrome de Taura e da Mionecrose Infecciosa em fazendas de camarão *L. vannamei* no estado de Pernambuco (Nordeste do Brasil), a partir do diagnóstico molecular de RT-PCR (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction). Estes resultados serão extremamente importantes na construção de um plano de biossegurança e representa a primeira iniciativa nacional em estimar a prevalência de dois patógenos, que podem ameaçar a sustentabilidade da carcinicultura brasileira.

2. Material e métodos

2.1 Coleta das amostras

O período de amostragem foi de agosto a dezembro de 2004, em uma área do litoral composta por seis municípios (Figura 1), que incluem onze fazendas comerciais de camarão de diferentes portes, pequena, média e grande. O número total de indivíduos coletados foi calculado com base no programa WinEpiscope versão 2.0, com nível de confiança de 95% e sensibilidade do teste de 95%. Um total de 530 animais em fase juvenil foi coletado de 11 fazendas do estado de

Pernambuco, o que permitiu detectar a presença dos vírus Taura e da Mionecrose infecciosa para uma prevalência mínima estimada de 0.6%. A prevalência mínima detectável de cada fazenda foi calculada segundo Cannon e Roe (1982), (Anexo 1) em função da diferença no número de indivíduos coletados em cada uma (Tabela 1).

Cerca de 50 a 100 mg de tecido branquial foram retirados de camarões com aproximadamente 90 dias de estocagem e peso médio de 5 gramas, Imediatamente após a remoção, os tecidos foram acondicionados em tubos de criopreservação, contendo Trizol (Invitrogen, Califórnia USA) e rapidamente acondicionados em nitrogênio líquido.

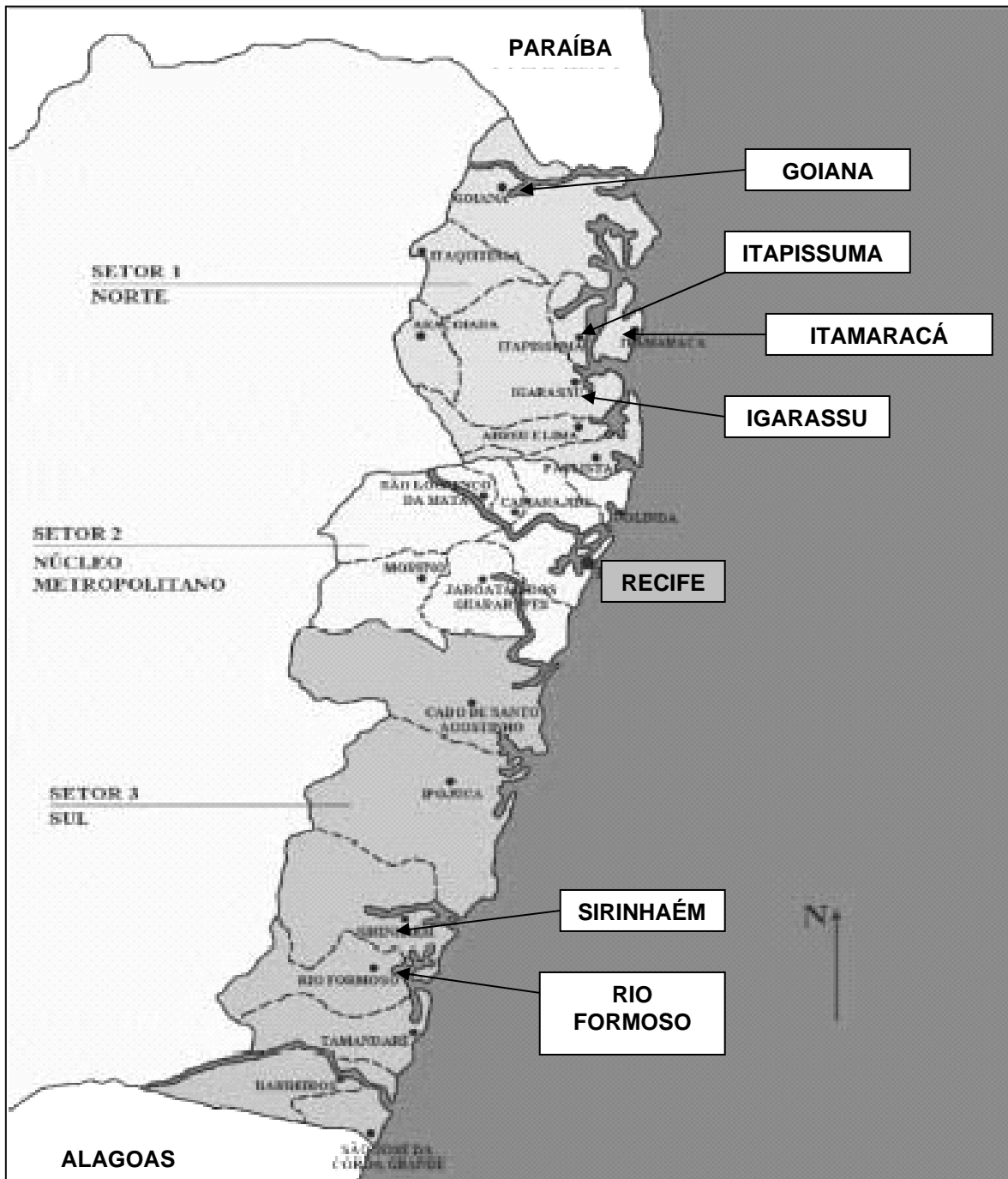


Fig. 1. Mapa do Litoral do Estado de Pernambuco-Brasil e os seis municípios de coleta.

Tabela 1.

Localização por município e números de camarões coletados das fazendas amostradas.

Fazendas	Município	Nº de amostras
1	Sirinhaém (Litoral Sul)	n = 40
2	Rio Formoso (Litoral Sul)	n = 30
3	Itapissuma (Litoral Norte)	n = 90
4	Itamaracá (Litoral Norte)	n = 30
5	Igarassu (Litoral Norte)	n = 55
6	Goiana (Litoral Norte)	n = 90
7	Goiana (Litoral Norte)	n = 40
8	Goiana (Litoral Norte)	n = 30
9	Goiana (Litoral Norte)	n = 40
10	Sirinhaém (Litoral Sul)	n = 40
11	Goiana (Litoral Norte)	n = 45
TOTAL		530

2.2 Extração do RNA

O processo de extração do RNA total foi iniciado retirando-se os tecidos dos tubos de criopreservação e macerando-os, individualmente, em nitrogênio líquido. Em seguida, os tecidos foram transferidos para novo microtubo, no qual acrescentou-se novo Trizol e incubados por 5 minutos a temperatura ambiente. Após a digestão com Trizol, a fase aquosa foi extraída com Clorofórmio e a precipitação do RNA foi feita utilizando-se álcool isopropílico em um volume de 1:1. O precipitado foi lavado com etanol a 75%, secado a temperatura ambiente por cerca de 15 minutos, resuspendido em água com DEPC (Dietilpirocarbonato) e imediatamente armazenado a -80°C até a sua utilização. A presença do RNA foi avaliada após as extrações através de eletroforese em gel de agarose a 1%,

contendo 5% de formaldeído e 10% MOPS (MOPS 200mM, pH 7,0, Acetato de Sódio 80mM e EDTA 10mM, pH 8,0).

2.3 RT-PCR

2.3.1 cDNA

A síntese de cDNA foi conduzida em um volume final de 15ul contendo aproximadamente 1,0 ug de RNA, 200U da enzima RT Superscript™ II, 1X tampão da enzima Superscript II (50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂), 0,02M de Oligo(dT) e 800μM de cada dNTP. Toda a mistura foi aquecida a 37°C por 5 minutos, seguida por 70°C por 50 minutos e finalmente a 42°C por 15 minutos.

2.3.2 PCR

As amplificações por PCR foram conduzidas imediatamente após a construção do cDNA. Cada reação para detecção de Taura foi realizada adicionando-se os 10 ul de cDNA em um volume final de 50 ul contendo 2U de *Taq* polimerase, 100μM de cada dNTP, 3.0 mM de MgCl₂, 10 pmol de cada primer específicos para Taura (Tabela 2) e 1X Tampão de PCR (50mM KCL; 10mM Tris pH 9; Triton X-100 0,1%). A detecção de IMNV foi conduzida em um volume final de 25ul contendo 1U de *Taq* polimerase, 200μM de cada dNTP, 1.5 mM de MgCl₂, 5 pmol dos primers específicos para IMNV (Tabela 2) e 1X Tampão de PCR (50mM KCL; 10mM Tris pH 9; Triton X-100 0,1%).

Controles positivos para Taura e IMNV foram utilizados desde a obtenção de cDNA. Os controles negativos, utilizados para as amplificações de PCR consistiram da substituição de cDNA por água ultra-pura (Sigma, USA).

Tabela 2.

Seqüência dos primers utilizados para detecção do vírus da síndrome de Taura e da Mionecrose infecciosa por RT-PCR.

Vírus	Primer	Seqüência do Primer	Tamanho do Amplicon
TSV	TSV- F		
	9195	5'-TCA-ATG-AGA-GCT-TGG-TCC-3'	
	TSV-R		231pb
	9992	5'-AAG-TAG-ACA-GCC-GCG-CTT-3'	(Nunan et al., 1998)
IMNV	IMNV-F		
	99372G09	5'-CGA-CGC-TGC-TAA-CCA-TAC-AA-3'	372 pb
	IMNV-R		(Poulos et al.,)
	99372G10	5'-ACT-CGC-CTG-TTC-GAT-CAA-GT-3'	

Um total de 40 ciclos de temperatura consistindo de uma temperatura inicial de desnaturação, seguida de anelamento/extensão e extensão final para cada um dos vírus foi utilizado na amplificação (Tabela 3).

Tabela 3.

Ciclos de temperatura utilizados na PCR para detecção dos vírus TSV e IMNV.

Virus	Temperatura (°C)	Tempo	Nº de ciclos
TSV	94	2min.	1
	94,60	45s, 45s	39
	60	7min.	1
	94	2min.	1
IMNV	94,65,72	45s, 45s, 45s	39
	72	7 min.	1

2.4 Eletroforese

As amplificações foram analisadas em gel de agarose (2%) corado com Brometo de Etídio e tampão de corrida SB 1X (10 mM Hidróxido de Sódio -Ácido Bórico pH 8,5) sobre um transluminador de luz ultravioleta. Os produtos de PCR foram avaliados utilizando-se um marcador molecular de 100 pb (Invitrogen, USA) e fotografados em câmera digital.

3. Resultados

3.1 TSV

Dos 530 camarões analisados, nenhum deles apresentou diagnóstico positivo para o vírus da Síndrome de Taura (Figura 1), o que significa que a prevalência deste vírus é inferior a 0.6% para as fazendas de camarão analisadas.

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 C- C+ M

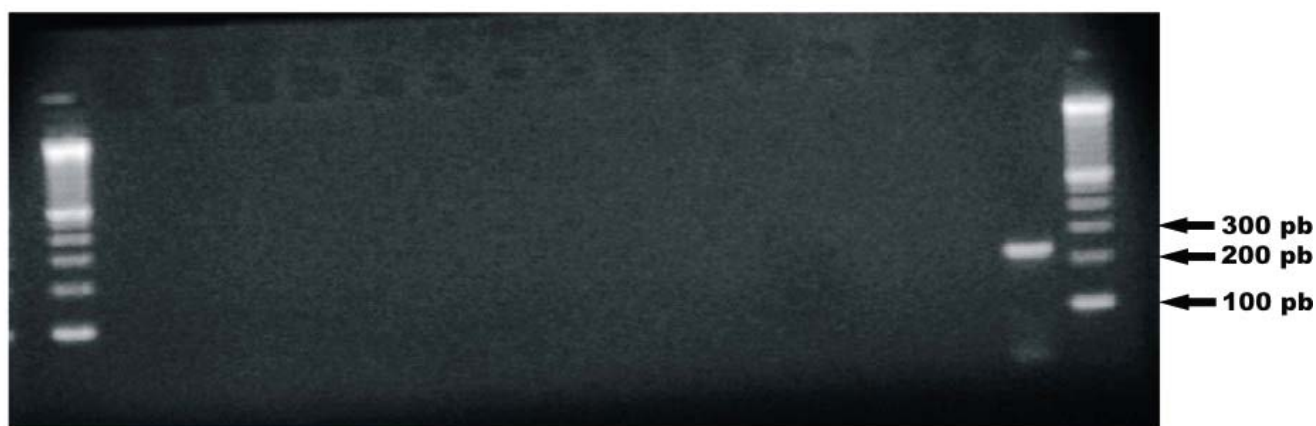


Fig. 2. Gel de Agarose a 2% corado com Brometo de etídio. M, corresponde ao marcador molecular de 100bp (Invitrogen, USA); Coluna 1 a 13 amostras de camarões negativas para o TSV; C - corresponde ao controle negativo (água ultra-pura/Sigma, USA); C+, controle positivo do TSV (fragmento de 231pb).

3.2 IMNV

Os resultados mostram que o vírus IMNV está presente em 9 das fazendas 11 fazendas analisadas e que não houve variação entre o litoral norte e sul, uma vez que ambos apresentaram fazendas infectadas. A prevalência do vírus por fazenda oscilou entre 0% e 35,56% e dentre os 530 indivíduos analisados, 76 mostraram-se positivos para o IMNV.

Das onze fazendas analisadas somente duas não apresentaram nenhum caso positivo para o vírus da mionecrose infecciosa, tais resultados demonstram, com 95% de confiança que a doença não está presente nestas duas fazendas, assumindo que a prevalência mínima detectável para estes casos é de 5,56% para a fazenda 5 e 7,60% para a fazenda 10, detectado com base no programa WinEpiscope versão 2.0 de acordo com a fórmula de Cannon e Roe, 1982.

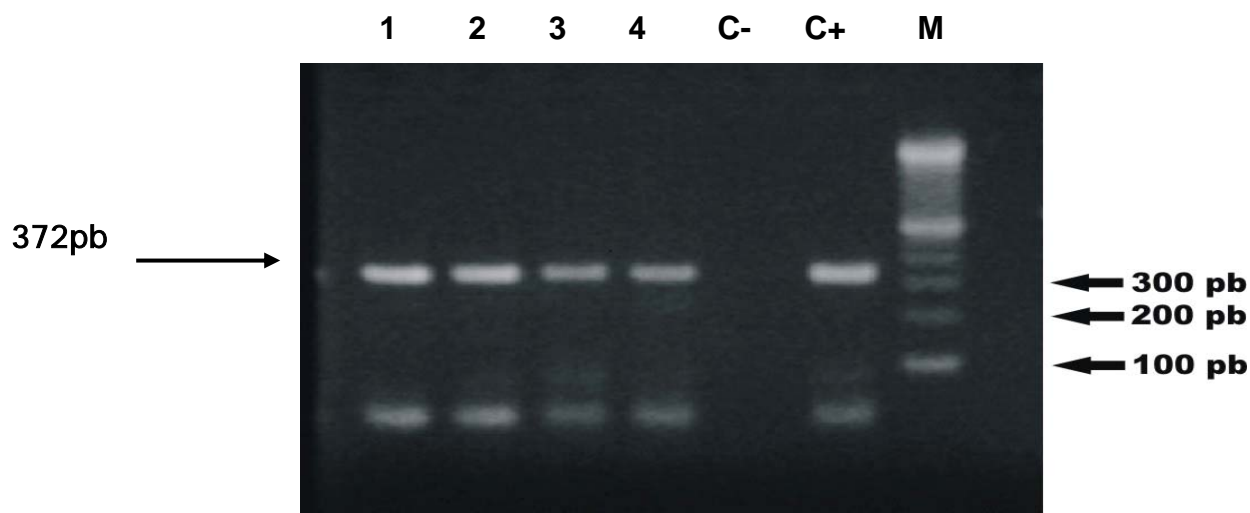


Fig. 3. Gel de agarose a 2% corado com Brometo de Etídio. Amostras de camarões 1 a 4 são positivas para o IMNV; C-, corresponde ao controle negativo (água ultra-pura/Sigma, USA); C+, controle positivo do IMNV (fragmento de 372pb).

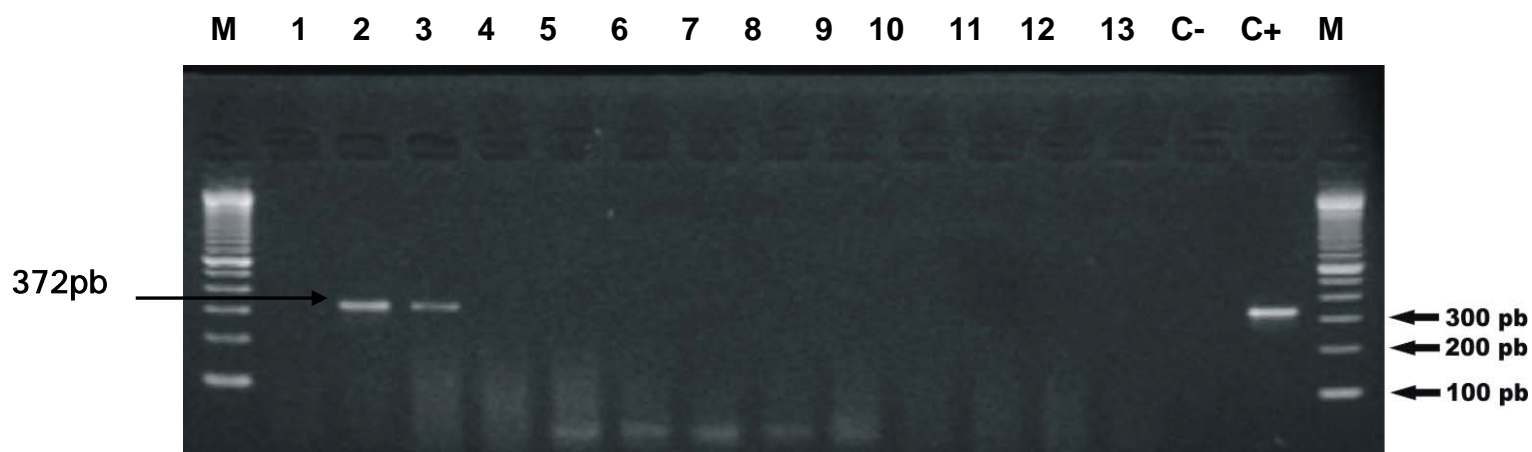


Fig. 3. Gel de agarose corado com Brometo de Etídio. Amostras 2 e 3, correspondem a camarões positivos para IMNV; amostras 1 e amostras 4 a 13 correspondem a camarões negativos para IMNV; C-, corresponde ao controle negativo (água ultra-pura/Sigma, USA); C+, controle positivo do IMNV(fragmento de 372pb).

Tabela 4.

Prevalência do vírus da Mionecrose infecciosa nas 11 fazendas de camarão analisadas em Pernambuco.

Fazenda	N.de camarões analisados	N. de positivos	Prevalência (%)	Linf_IC 95%	Lsup_IC 95%
1	n=40	5	12,50%	4,19	26,8
2	n=30	8	26,67%	12,28	45,89
3	n=90	18	20,00%	12,31	29,75
4	n=30	8	26,67%	12,28	45,89
5	n=55	0	0,00%	0	6,49
6	n=90	3	3,33%	0,69	9,43
7	n=40	2	5,00%	0,61	16,92
8	n=30	8	26,67%	12,28	45,89
9	n=40	8	20,00%	9,05	35,65
10	n=40	0	0,00%	0	8,81
11	n=45	16	35,56%	21,87	51,22
TOTAL	530	76	-	-	-

4. Discussão

Desde 1992 quando foi descrita primeiramente (Jimenez, 1992), a Síndrome de Taura vem se expandindo por diversos países produtores de camarão, tanto da América Latina como em países do hemisfério Ocidental.

Um estudo sobre a distribuição geográfica do vírus da Síndrome de Taura em 13 Países das Américas, incluindo o Brasil, registrou sua presença em todos os locais. Neste estudo, os autores avaliaram 5 indivíduos no estado de Pernambuco, através de hibridização *in situ* e detectaram TSV em 4 deles (Hasson et al., 1999). Apesar deste registro, nenhum surto de TSV foi relatado no local ou mesmo em outras regiões do país até o momento.

Em um outro estudo de prevalência do vírus Taura em camarões *Litopenaeus vannamei*, realizado na região de Sinaloa no México, apenas os indivíduos com sinais clínicos foram coletados, o que gerou uma prevalência superestimada entre 75 e 100% para a região (Herzberg e Valle, 2001). Contrastando com estes valores, nosso estudo mostrou que dos 530 camarões analisados, nenhum apresentou diagnóstico positivo para o vírus da Taura, indicando que a prevalência deste patógeno no estado de Pernambuco é inferior a 0.6%. Este resultado é de extrema relevância em se tratando dos prejuízos recentes causados pelo vírus Taura em países próximos como a Venezuela, com 26 surtos em 2005 (OIE,2005).

Estes resultados refletem os efeitos benéficos da Instrução Normativa N°39, instituída em 1997, que proíbe a importação de crustáceos no Brasil como forma de evitar a introdução de patógenos no país. Na Tailândia o departamento de Pesca permitiu a importação legal de *L. vannamei* em 2002 se as matrizes importadas fossem certificadas como livres de TSV através de RT-PCR, entretanto apesar desta ação de proteção, um surto de TSV foi confirmado por RT-PCR em 2003 (Nielsen et al., 2005).

A Mionecrose infecciosa (IMN) surgiu primeiramente no Brasil em Agosto de 2002, no Piauí, e depois se disseminou no Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba e Pernambuco, entretanto apenas em 2004 a doença foi reconhecida oficialmente como de etiologia viral.

Os dados relativos a IMNV demandam medidas sanitárias de controle. Os resultados revelaram que o vírus da IMN está presente em 81% das fazendas analisadas e não houve variação entre o litoral norte e sul, uma vez que ambos apresentaram fazendas infectadas, a prevalência do IMNV por fazenda oscilou entre 0% e 35,56%.

Existem fazendas vizinhas, alimentadas pelos mesmos efluentes, que contrastam amplamente nas prevalências, como é o caso das fazendas 5 e 11 com prevalências de 0% e 25% respectivamente, implicando em diferentes práticas de manejo como mitigadores efetivos (ração, tratamento de solo, origem

das larvas, etc) na disseminação do vírus. Este fato inclusive desperta para a necessidade de uma investigação sistemática sobre os fatores que acarretam níveis diferentes de prevalência.

Segundo análise realizada por Rodrigues (2005) a produção de camarões do Brasil foi seriamente afetada em 2004 devido a aspectos econômicos e biológicos (Vírus da Mionecrose Infecciosa) que reduziram a produção nacional em 15,84%.

A prevalência é um parâmetro usado para avaliar a prioridade de uma enfermidade e para desenvolver estratégias de controle, estudos sobre prevalência geram dados essenciais para as análises de risco e para realização de medidas de biossegurança.

Os resultados aqui apresentados constituem o primeiro levantamento de dois vírus de camarão realizado no Brasil, conduzido em uma amostragem não dirigida e apontam para a necessidade de um plano de biossegurança urgente para a carcinicultura, onde possam ser estabelecidas barreiras sanitárias para a movimentação interestadual e práticas de manejo apropriadas.

5. CONCLUSÕES

A prevenção constitui o elemento mais importante no manejo e tratamento de enfermidades. Este estudo representou o primeiro monitoramento da prevalência de dois vírus de camarão no Brasil e identificou uma escala de prioridades em relação ao seu controle.

O vírus da Síndrome de Taura, não foi encontrado em nenhuma das onze fazendas de camarão do estado de Pernambuco que foram analisadas. O vírus Taura apresenta, por tanto, uma prevalência inferior a 0.6% nas fazendas analisadas, o que demonstra um controle eficiente nas barreiras sanitárias.

Tanto as fazendas do litoral norte como as do litoral sul apresentaram camarões infectados com o vírus da Mionecrose infecciosa.

A prevalência do IMNV nas fazendas de camarão em Pernambuco desperta a necessidade de um monitoramento em nível nacional e o estabelecimento de medidas preventivas e de controle para elaboração de um plano de biossegurança eficiente.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AQUATIC STOCK IMPROVEMENT COMPANY (ASICo), Disponível em: <http://www.asicoaquaticmarkers.com/SustainabilityinShrimp.htm> .Acesso: 23 de jan. 2006

BACHÉRE, E. Shrimp immunity and diseases control. **Aquaculture**. Vol. 191, p.3-11, 2000.

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**. Vol. 78, p. 313-319.1997.

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**. Vol.132, p.249–272. 2005.

BROCK, J. A. Special topic review: Taura syndrome, a disease important to shrimp farms in the Americas. **World Journal Microbiology Biotechnology** Vol.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*. In: browdy, c.l. & hopkings, j.k.s. (Eds). **Swimming through troubled water, proceedings of**

the special session on shrimp farms, Aquaculture'95. p. 84-94. Baton Rouge, LA. World Aquaculture Society, 1995.

CAMERON, A. R., Survey toolbox. **A practical manual and software package for active surveillance of livestock diseases in developing countries.** ACLAR, Australian Center for International Agricultural Research, Monograph N° 54, 330p. 1999.

CANNON, R. M., ROE, R. T. **Livestock disease surveys: a field manual for veterinarians.** Australian Bureau of Animal Health. Canberra, p. 14-17. 1982.

CORSIN, F., TURNBULL, J.F., HAO, N.V., MOHAN, C.V., PHI, T.T., PHUOC, L.H., TINH, N.T.N., MORGAN, K.L. Risk factors associated with white spot syndrome virus infection in a Vietnamese riceshrimp farming system. **Diseases of Aquatic Organisms.** Vol. 47, p.1–12. 2001.

COUCH, J. A. Free and occluded virus similar to *Baculovirus* in hepatopancreas of pink shrimp. **Nature.** 247 (5438): p.229-231. 1974.

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.** Vol.52, p.1-10. 2002.

FLEGEL, T. W. The shrimp response to viral pathogens. In: Browdy, C.L., Jory, D.E. (Eds). **Proceedings of the special session on sustainable shrimp**

aquaculture. The new wave. World Aquaculture Society, Boca Raton, p. 190–214. 2001.

GALLI, L. Biossegurança. In: **Segmentos estratégicos e ação integrada da plataforma**. Plataforma Tecnológica do Camarão Marinho Cultivado. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 276p.Cap.10. p.177-196. 2001.

GUSMÁN, J.F., LIGHTNER, D.V. **Atlas de Enfermedades de Peneídeos**. Secretaría de medio ambiente, Recursos Naturales y Pesca. México.68p.p.21-22. 1999.

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**. Vol. 23, p.115-126. 1995.

HASSON, K.W., LIGHTNER, D.V., MOHNEY, L. L., REDMAN, R.M., POULOS, B.T., WHITE, B.L. Taura syndrome virus (TSV) lesion development and the diseases cycle in the Pacific white shrimp *Penaeus vannamei*. **Diseases of Aquatic Organisms**. Vol. 36. p .81-93.1999.

HERZBERG, Z.M., VALLE, F.A. Taura syndrome in México: follow-up study in shrimp farms of Sinaloa. **Aquaculture**. Vol.193. p.1-9. 2001.

JIMENEZ, R. Síndrome de Taura (Resumen). **Acuicultura del Ecuador**, p 1-16. 1992.

LIGHTNER, D. V. A Handbook of pathology and diagnostic procedures for diseases of penaeid shrimp. **World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA.** 1996a.

LIGHTNER D.V. Biosecurity in shrimp farming: Pathogen Exclusion through use of SPF stock and routine surveillance. **Journal of the world aquaculture society.** Vol. 36(3): p.229-248. 2005.

LIGHTNER, D.V. Epizootiology, distribution and the impact on international trade of two penaeid shrimp viruses in the Americas. **Revue Scientifique et Technique Office International des Epizooties.** Vol.15(2), p.579-601. 1996b.

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

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

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.2004>. Acesso: 09 de Jul. 2005.

LIGHTNER, D.V., POULOS, B.T., REDMAN, R.M., MARI, J., BONAMI, J.R. New developments in penaeid virology: Application of biotechnology in research and disease diagnosis for shrimp viruses of concern in the Americas. In: Fulks, W., Main, K. Eds. **Proceedings of the Asian Interchange Program Workshop on the Diseases of Cultured Penaeid Shrimp**. Asian Interchange Program, The Oceanic Institute, Oahu, HI, p.233–253. 1992.

LIGHTNER, D.V. **Taura syndrome: an economically important viral disease impacting the shrimp farming industries of the Americas including the United States**. In: Campbell and Associates. Eds. Proceedings of the 99th Annual Meeting USAHA, Reno, Nevada. Campbell and Associates, Richmond. p. 36-52. 1995.

LIGHTNER, D.V. The Penaeid Shrimp Viruses TSV, IHHNV, WSSV, and YHV: Currents Status in the Americas, Available Diagnostics Methods, and Management Strategies. **Journal of Applied Aquaculture**, vol. 9 (2). 1999.

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

LIGHTNER, D.V., REDMAN, R.M. Shrimp diseases and current diagnostic methods. **Aquaculture**. Vol. 164, p.201–220. 1998a.

LIGHTNER, D.V., REDMAN, R.M. Strategies for the Control of Viral Diseases of shrimp in the Americas. **Fish Pathology**. Vol. 33(4), p. 165-180. 1998b.

LILLEY, J.H., CALLINAN, R.B., KHAN, M.H. Social, economic and biodiversity impacts of epizootic ulcerative syndrome (EUS). In: Primary Aquatic Animal Health Care in Rural, Small-Scale, Aquaculture Development. (Eds) ARTHUR, J.R., PHILLIPS, M.J., SUBASINGHE, R.P., REANTASO, M.B., MACRAE, I.H. **FAO Fish. Tech. Pap.** No. 406, p. 127–139. 2002.

LOTZ, J.M., BROWDY, C.L., CARR, W.H., FRELIER, P.F. & LIGHTNER, D.V. (USMSFP) **suggested procedures and guidelines for assuring the specific pathogen status of shrimp broodstock and seed**. In: Swimming Trough Troubled Waters, Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming, Aquaculture `95, Browdy, C.L. & Hopkins, J.S.. Baton Rouge, LA: World Aquaculture Society. p. 66-75.1995.

LOTZ, J.M. Special topic review: Viruses, biosecurity and specific pathogen-free stocks in shrimp aquaculture. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. Vol. 13, p.405-413.1997.

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**,1: p.76-84. 2005.

MARI, J., BONAMI, J.R., LIGHTNER, D.V. Partial cloning of the genome of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus, an unusual parvovirus

pathogenic for penaeid shrimps; diagnosis of the disease using a specific probe. *J. Gen. Virol.* Vol.74, p. 2637–2643. 1993.

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**. Vol. 83, p.915-926. 2002.

MAYO, M. A. ICTV at the Paris ICV: Results of the plenary session and the binomial ballot. **Arch. Virol.** Vol. 147, p.2254-2260. 2002.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Departamento de defesa animal. Informe Sanitário Semanal. Nº 10, 2005.

MOHAN, C.V., CORSIN, F., THAKUR, P.C., PADIYAR, P.A., MADHUSUDAN, M., TURNBULL, J.F., HAO, N.V., MORGAN, K.L. Usefulness of dead shrimp specimens in studying the epidemiology of white spot syndrome virus (WSSV) and chronic bacterial infection **Diseases of Aquatic Organisms**. Vol.50, p.1–8.2002

MOSS, S.M., REYNOLDS, W.J., MAHLER, L. **Design and economic analysis of a prototype biosecure shrimp growout facility**. Anais do U.S. Marine Shrimp Farming Program. The Oceanic institute, Honolulu, EUA, pp 5-18. 1998.

NEWTON C.R., GRAHAM, A. PCR in: **The Introduction to Biotechniques Series**. GRAHAM, J. M., BILLINGTON D., GILMARTIN, P.M. Ed. Bios Scientific Publishers Limited, p. 52-53.1994.

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**. Vol.63, p.101-106. 2005.

NUNES, A.J.P., MARTINS, P.C.C., GESTEIRA, T.C.V. Produtores sofrem com as mortalidades decorrentes do vírus da mionecrose infecciosa (IMNV). **Panorama da Aqüicultura**. p.37-51.2004.

OIE (Office International Epizotics), Disease Information 11 Março 2005 Vol. 18 - No. 10 Disponível em: <<http://www.oie.int/eng/info/hebdo/AIS02.HTM#Sec1>>. Acesso: 23 de Jan. 2006

OIE (Office International Epizotics), Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals, 2003. Disponível em:<<http://www.oie.int/eng/normes/fmanuel/A00047.htm>>. Acesso: 12 de Jan. de 2005.

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**. Vol. 10, No. 12, December 2004.

PRUDER G.D. Biosecurity: application in aquaculture. **Aquacultural Engineering**. Vol. 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. (Eds.), Ninth Symposium of the International Society for Veterinary Epidemiology and Economics (ISVEE), Breckenridge, Colorado, p. 672–674. 2000.

RIGDON, R.H. ,BAXTER, K.N. Spontaneous necrosis in muscle of brown shrimp *Penaeus aztecus* Ives. Trans. Amer. Fish. Soc. Vol 99, p. 583-587.1970.

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

ROCHA I.P. Evolução e estado atual da carcinicultura brasileira. **Plataforma Tecnológica do Camarão Marinho Cultivado**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Pesca e Aqüicultura. 276p. Cap.IV. p.177-196. 2001.

ROCHA, I.P., RODRIGUES, J., AMORIM, L. A Carcinicultura Brasileira em 2003. **Revista ABCC** 1:30-36. 2004.

ROCHA, I.P., RODRIGUES, J. O Agronegócio do camarão cultivado em 2003. **Associação Brasileira de Criadores de camarão – ABCC**. Agosto de 2004.

ROCHA, I.P. Uma análise da produção demanda e preços do camarão no mercado internacional. Revista ABCC, 7:24-35. 2005.

RODRIGUES, J. Carcinicultura Marinha –desempenho 2004. Revista ABCC, 7 : p. 38-44. 2005.

RT-PCR, Disponível em: <http://www.pathmicro.med.sc.edu/pcr/realtime.home.htm>
Acesso:12 de Dez. 2005

SCIENCE FAIR PROJECTS ENCYCLOPEDIA. Disponível em:
<<http://www.allscience-fair-projects.com>>. Acesso: 09 de Set. 2004.

SEIFFERT, W.Q., WINKLER, S., MAGGIONI, D. A Mancha Branca em Santa Catarina. **Panorama da Aqüicultura**, Vol .15, No 87, p.51-53. 2005.

SHELLFISH DISEASES, 1996. Disponível em:
<<http://www.pac.dfompo.gc.ca/sci/sealane/aquac/pages/toc.htm#shr>>. Acesso: 8 Jun. 2005.

SNIESZKO, S.F. The effects of environmental stress on the outbreaks of infectious diseases of fish. **Journal Fish Biology**. Vol. 6, 197–208.1974.

STERN, S. Swimming through troubled waters in shrimp farming: Ecuador Country Review. In: Browdy, C.L. & Hopkins, J.S. Eds. *Swimming Through Troubled Water*, Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming, Aquaculture '95. Baton Rouge, LA. World Aquaculture Society. p. 35-39.1995.

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**. Vol.63. p.261-265. 2005b.

THURSFIELD, M.V., **Veterinary Epidemiology**, 2ed. Blackwell Science Ltd., Oxford. 1995.

TU, C., HUANG, H.T., CHUANG, S.H., HSU, J.P., and 5 others. Taura Syndrome in Pacific White shrimp *Penaeus vannamei* in Taiwan. **Diseases of Aquatic Organisms**. Vol. 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**, 35 (1): p.21-24. 2000.

VANPATTEN, K. A., NUNAN, L. M., LIGHTNER, D. V. Seabirds as potential vectors of penaeid shrimp viruses and the development of a surrogate laboratory model utilizing domestic chickens. **Aquaculture**. 241. p. 31–46. 2004.

ZAVALLA, G. Biosecurity in the poultry industry. p. 75-78. 1999 In: Bullis, R.A. Pruder, G.D. Eds. **Controlled and biosecurity production systems. Evolution and integration of shrimp and chicken models**. Proceedings of Special Session, Sydney, Australia, p.27-30 April 1999. The Oceanic Institute, Honolulu, Hawaii, USA.

ANEXOS

Anexo 1. Tabela do cálculo do número de amostras coletadas, de acordo com a população em risco e a prevalência mínima detectável (Cannon e Roe, 1982).

	0,95	SENSIBILIDADE DO TESTE (*)		0,95	GRAU DE CONFIANCA		
	PREVALENCIA MINIMA						
POPULACAO	25,00%	20,00%	15,00%	10,00%	5,00%	1,00%	0,60%
EM RISCO	0,2500	0,2000	0,1500	0,1000	0,0500	0,0100	0,0060
5	5	5	5	5	5	5	5
10	7	8	9	10	10	10	10
15	8	9	11	13	15	15	15
20	8	10	12	16	19	20	20
25	9	11	13	17	23	25	25
30	9	11	14	19	26	30	30
40	10	12	15	21	31	40	40
50	10	12	16	23	35	50	50
60	10	13	17	24	38	60	60
70	10	13	17	24	41	69	70
80	10	13	17	25	43	79	80
90	10	13	18	25	45	87	90
100	11	13	18	26	46	96	100
120	11	13	18	27	48	111	119
140	11	14	18	27	50	125	137
160	11	14	18	27	51	137	154
180	11	14	18	28	52	148	170
200	11	14	19	28	53	158	185
225	11	14	19	28	54	169	203
250	11	14	19	28	55	179	219
275	11	14	19	28	55	187	234
300	11	14	19	29	56	195	248
350	11	14	19	29	56	207	272
400	11	14	19	29	57	217	292
450	11	14	19	29	58	226	310
500	11	14	19	29	58	233	325
750	11	14	19	29	59	256	377
1000	11	14	19	30	60	269	408
1500	11	14	19	30	60	283	442
2000	11	14	19	30	61	290	461
3000	11	14	19	30	61	298	481
4000	11	14	19	30	61	302	491
5000	11	14	19	30	61	304	498
7500	11	14	19	30	61	307	506
10000	11	14	20	30	61	309	511
15000	11	14	20	30	61	311	515
25000	11	14	20	30	61	312	519
50000	11	14	20	30	62	313	521
100000	11	14	20	30	62	313	523
300000	11	14	20	30	62	314	524

NORMAS PARA PUBLICAÇÃO NO PERIÓDICO AQUACULTURE

Guide for Authors

Types of contribution

1. Original Research Papers (Regular Papers)
2. Review Articles
3. Short Communications
4. Technical Papers
5. Letters to the Editor
6. Book Reviews

Original Research Papers should report the results of original research. The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form.

Review Articles can cover either narrow disciplinary subjects or broad issues requiring interdisciplinary discussion. They should provide objective critical evaluation of a defined subject. Reviews should not consist solely of a summary of published data. Evaluation of the quality of existing data, the status of knowledge, and the research required to advance knowledge of the subject are essential.

Short Communications are used to communicate results which represent a major breakthrough or startling new discovery and which should therefore be published quickly. They should *not* be used for preliminary results. Papers must contain sufficient data to establish that the research has achieved reliable and significant results.

Technical Papers should present new methods and procedures for either research methodology or culture-related techniques.

The *Letters to the Editor* section is intended to provide a forum for discussion of aquacultural science emanating from material published in the journal.

Book Reviews will be solicited by the Book Review Editor. Unsolicited reviews will not usually be accepted, but suggestions for appropriate books for review may be sent to the Book Review Editor: Mrs. A.A.C. de Groot, Brederoodseweg 49, 2082 BS Santpoort-Zuid, The Netherlands.

Submission of manuscripts

Submission of an article is understood to imply that the article is original and unpublished and is not being considered for publication elsewhere. Submission also implies that all authors have approved the paper for release and are in agreement with its content. Upon acceptance of an article by the journal, the author(s) will be asked to transfer the copyright of the article to the publisher. This transfer will ensure the widest possible dissemination of information.

Papers for consideration should be submitted in triplicate directly to the appropriate Section Editor as follows:

Nutrition:

R. P. Wilson, Mississippi State University, Department of Biochemistry and Molecular

Biology, Box 9650, Mississippi State, MS 39762, USA. Tel.: +1 622 325 2640. Fax: +1 622 325 8644. E-mail: rpwl@Ra.MsState.Edu

Husbandry and Management:

B.Costa-Pierce, Rhode Island Sea Grant College Program, Graduate School of Oceanography, University of Rhode Island, 129 Coastal Institute, Narragansett, RI 02882-1197, USA. E-mail: aquaculture@gso.uri.edu

Physiology and Endocrinology:

E.M. Donaldson, West Vancouver Laboratory, Department of Fisheries and Oceans, 4160 Marine Drive, West Vancouver, B.C. V7W 1N6, Canada. Tel: +1 604 666 7928. Fax: +1 604 666 3497. E-mail: donaldso@direct.ca

Diseases:

D.J. Alderman, CEFAS, Weymouth Laboratory, The Nothe, Weymouth, Dorset DT4 8UB, UK. Tel.: +44 1305 206 600. Fax: +44 1305 206 601. E-mail: d.j.alderman@cefas.co.uk

Genetics: G. Hulata, Agricultural Research Organization, Volcani Center, Department of Aquaculture, P.O. Box 6, Bet Dagan 50250, Israel; Tel.: +972 3 968 3388; Fax: +972 3 9605667; E-mail: vlaqua@volcani.agri.gov.il

Electronic manuscripts

Some manuscripts are able to be submitted electronically, please check on:

<http://www.authorgateway.com/journal/pub/503302>. If electronic submission is possible, authors can upload their article as a LaTeX, Microsoft® (MS) Word®, WordPerfect®, PostScript or Adobe® Acrobat® PDF document via the "Author Gateway" page of this journal (<http://authors.elsevier.com>), where you will also find a detailed description on its use. The system generates an Adobe Acrobat PDF version of the article which is used for the reviewing process. It is crucial that all graphical and tabular elements be placed within the text, so that the file is suitable for reviewing. Authors, Reviewers and Editors send and receive all correspondence by e-mail and no paper correspondence is necessary. Note: compuscripts submitted are converted into PDF for the review process but may need to be edited after acceptance to follow journal standards. For this an "editable" file format is necessary. See the section on "Electronic format requirements for accepted articles" and the further general instructions on how to prepare your article below.

Preparation of manuscripts

1. Manuscripts should be written in English, each line consecutively numbered from the beginning to the end of the manuscript. Authors who are unsure of correct English usage should have their manuscript checked by someone proficient in the language. Manuscripts in which the English is difficult to understand may be returned to the author for revision before scientific review. The following external services are offered here for your consideration only: International Science Editing Limited and Asia Science Editing offer a language and copyediting service to authors who want to publish in scientific peer-reviewed journals. All of their science editors are native English speakers and those working for International Science Editing Limited also have postgraduate qualifications and experience in science research. For more information please see:

<http://www.internationalscienceediting.com> or <http://asiascienceediting.com>. With Asia Science Editing, Elsevier has negotiated a rate of EUR 0.024 per word (ca EUR 6 per page). A EUR 10 handling fee per manuscript is added, if payment is by credit card. Different rates apply

for mathematic-based manuscripts. Turnaround time is typically 5 days.

Authors in Japan: Upon request, Elsevier Japan will provide authors with a list of people who can check and improve the English of their paper (before submission). Please contact our Tokyo office: Tel. +81 3-5561-5033; Fax: +81 3-5561-5047, E-mail: info@elsevier.co.jp. For all third party language editing recommendations, all interaction and responsibility is between the Author and the Language Editor. Language editing should not be confused with the copy-editing that takes place during the production process after a manuscript has been accepted.

2. The preferred medium of submission is on disk with accompanying manuscript (see 'Electronic manuscripts' above). Submit the original and two copies of your manuscript. Enclose the original illustrations and two sets of photocopies (three prints of any photographs).

3. Manuscripts should be typewritten, typed on one side of the paper (with numbered lines), with wide margins and double spacing throughout, i.e. also for abstracts, footnotes and references. **Every page of the manuscript, including the title page, references, tables, etc. should be numbered in the upper right-hand corner.** However, in the text no reference should be made to page numbers; if necessary, one may refer to sections. Underline words that should be in italics, and do not underline any other words. Avoid excessive usage of italics to emphasize part of the text.

4. Manuscripts in general should be organized in the following order:

Title (should be clear, descriptive and concise)

Name(s) of author(s)

Complete postal address(es) of affiliations

Full telephone and fax number and E-mail address of the corresponding author

Present address(es) of author(s) if applicable

Abstract

Keywords (indexing terms), normally 3–6 items.

Introduction

Material studied, area descriptions, methods, techniques

Results

Discussion

Conclusion

Acknowledgements and any additional information concerning research grants, etc.

References

Tables

Figure captions

5. In typing the manuscript, titles and subtitles should not be run within the text. They should be typed on a separate line, without indentation. Use bold face, lower-case letter type for titles; use non-bold, italic letter type for sub-titles.

6. SI units should be used.

7. If a special instruction to the copy editor or typesetter is written on the copy it should be encircled. The typesetter will then know that the enclosed matter is not to be set in type.

When a typewritten character may have more than one meaning (e.g. the lower case letter l may be confused with the numeral 1), a note should be inserted in a circle in the margin to make the meaning clear to the typesetter. If Greek letters or uncommon symbols are used in the manuscript, they should be written very clearly, and if necessary a note such as "Greek lower-case chi" should be put in the margin and encircled.

8. Elsevier reserves the privilege of returning the author for revision accepted manuscripts and illustrations which are not in the proper form given in this guide.

Abstracts

The abstract should be clear, descriptive and not longer than 400 words. It should provide a very brief introduction to the problem and a statement about the methods used in the study. This should generally be followed by a brief summary of results, including numerical data (means and standard errors, for example). The abstract should end with an indication of the significance of the results.

Tables

1. Authors should take notice of the limitations set by the size and lay-out of the journal. Large tables should be avoided. Reversing columns and rows will often reduce the dimensions a table.
2. If many data are to be presented, an attempt should be made to divide them over two or more tables.
3. Drawn tables, from which prints need to be made, should not be folded.
4. Tables should be numbered according to their sequence in the text. The text should include references to all tables.
5. Each table should be typewritten on a separate page of the manuscript. Tables should never be included in the text.
6. Each table should have a brief and self-explanatory title.
7. Column headings should be brief, but sufficiently explanatory. Standard abbreviations of units of measurement should be added between parentheses.
8. Vertical lines should not be used to separate columns. Leave some extra space between the columns instead.
9. Any explanation essential to the understanding of the table should be given as a footnote at the bottom of the table.

Illustrations

1. All illustrations (line drawings and photographs) should be submitted separately, unmounted and not folded.
2. Illustrations should be numbered according to their sequence in the text. References should be made in the text to each illustration.
3. Each illustration should be identified on the reverse side (or – in the case of line drawings – on the lower front side) by its number and the name of the author. An indication of the top of the illustrations is required in photographs of profiles, thin sections, and other cases where doubt can arise.
4. Illustrations should be designed with the format of the page of the journal in mind. Illustrations should be of such a size as to allow a reduction of 50%.
5. Lettering should be clear and large enough to allow a reduction of 50% without becoming illegible. The lettering should be in English. Use the same kind of lettering throughout and follow the style of the journal.
6. If a scale should be given, use bar scales on all illustrations instead of numerical scales that must be changed with reduction.
7. Each illustration should have a caption. The captions to all illustrations should be typed on a separate sheet of the manuscript.

8. Explanations should be given in the typewritten legend. Drawn text in the illustrations should be kept to a minimum.
9. Photographs are only acceptable if they have good contrast and intensity. Sharp and glossy copies are required. Reproductions of photographs already printed cannot be accepted.
10. Colour illustrations can be included if the cost of their reproduction is paid for by the author. For details of the costs involved, please contact the publisher at: ninfo-f@elsevier.com.

Colour illustrations

Submit colour illustrations as original photographs, high-quality computer prints or transparencies, close to the size expected in publication, or as 35 mm slides. Polaroid colour prints are not suitable. If, together with your accepted article, you submit usable colour figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in colour on the web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the printed version.

For colour reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://authors.elsevier.com/artwork>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting colour figures to grey scale (for the printed version should you opt to not pay for colour in print) please submit in addition usable black and white prints corresponding to all the colour illustrations.

As only one figure caption may be used for both colour and black and white versions of figures, please ensure that the figure captions are meaningful for both versions, if applicable.

References

1. All publications cited in the text should be presented in a list of references following the text of the manuscript. The manuscript should be carefully checked to ensure that the spelling of author's names and dates are exactly the same in the text as in the reference list.
2. In the text refer to the author's name (without initial) and year of publication, followed – if necessary – by a short reference to appropriate pages. Examples: “Since Peterson (1993) has shown that...” “This is in agreement with results obtained later (Kramer, 1994, pp. 12–16)”.
3. If reference is made in the text to a publication written by more than two authors the name of the first author should be used followed by “et al.”. This indication, however, should never be used in the list of references. In this list names of first author and all co-authors should be mentioned.
4. References cited together in the text should be arranged chronologically. The list of references should be arranged alphabetically by authors' names, and chronologically per author. If an author's name in the list is also mentioned with co-authors the following order should be used: publications of the single author, arranged according to publication dates – publications of the same author with one co-author – publications of the author with more

than one co-author. Publications by the same author(s) in the same year should be listed as 1994a, 1994b, etc.

5. Use the following system for arranging your references:

a. *For periodicals*

Dame, R., Libes, S., 1993. Oyster reefs and nutrient retention in tidal creeks. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 171, 251–258.

b. *For edited symposia, special issues, etc. published in a periodical*

Benzie, J.A.H., Ballment, E., Frusher, S., 1993. Genetic structure of *Penaeus monodon* in Australia: concordant results from mtDNA and allozymes. In: Gall, G.A.E., Chen, H. (Eds.), *Genetics in Aquaculture IV. Proceedings of the Fourth International Symposium*, 29 April-3 May 1991, Wuhan, China. *Aquaculture* 111, 89–93.

c. *For books*

Gaugh, Jr., H.G., 1992. *Statistical Analysis of Regional Yield Trials*. Elsevier, Amsterdam, 278 pp.

d. *For multi-author books*

Shigueno, K., 1992. Shrimp culture industry in Japan. In: Fast, A.W., Lester, L.J. (Eds.), *Marine Shrimp Culture: Principles and Practices*. Elsevier, Amsterdam, pp. 641–652.

6. Titles of periodicals mentioned in the list of references should be abbreviated following ISO 4 standard. The ISSN word abbreviations, for example, can be found at <http://www.issn.org/Istwa.html>.

7. In the case of publications in any language other than English, the original title is to be retained. However, the titles of publications in non-Latin alphabets should be transliterated, and a notation such as “(in Russian)” or “(in Greek, with English abstract)” should be added.

8. Papers accepted for publication but not yet published should be referred to as “in press”.

9. References concerning unpublished data and “personal communications” should not be cited in the reference list but may be mentioned in the text.

Formulae

1. Formulae should be typewritten, if possible. Leave ample space around the formulae.

2. Subscripts and superscripts should be clear.

3. Greek letters and other non-Latin or handwritten symbols should be explained in the margin where they are first used. Take special care to show clearly the difference between zero (0) and the letter O, and between one (1) and the letter l.

4. Give the meaning of all symbols immediately after the equation in which they are first used.

5. For simple fractions use the solidus (/) instead of a horizontal line.

6. Equations should be numbered serially at the right-hand side in parentheses. In general only equations explicitly referred to in the text need be numbered.

7. The use of fractional powers instead of root signs is recommended. Also powers of e are often more conveniently denoted by exp.

8. Levels of statistical significance which can be mentioned without further explanation are * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$.

9. In chemical formulae, valence of ions should be given as, e.g. Ca^{2+} and not Ca^{++} .

10. Isotope numbers should precede the symbols, e.g., ^{18}O .

11. The repeated writing of chemical formulae in the text is to be avoided where reasonably possible; instead, the name of the compound should be given in full. Exceptions may be

made in the case of a very long name occurring very frequently or in the case of a compound being described as the end product of a gravimetric determination (e.g., phosphate as P₂O₅).

GenBank/DNA sequence linking

DNA sequences and GenBank Accession numbers Many Elsevier journals cite "gene accession numbers" in their running text and footnotes. Gene accession numbers refer to genes or DNA sequences about which further information can be found in the databases at the National Center for Biotechnical Information (NCBI) at the National Library of Medicine. Elsevier authors wishing to enable other scientists to use the accession numbers cited in their papers via links to these sources, should type this information in the following manner:

For each and every accession number cited in an article, authors should type the accession number in **bold, underlined text**. Letters in the accession number should always be capitalised. (See Example 1 below). This combination of letters and format will enable Elsevier's typesetters to recognize the relevant texts as accession numbers and add the required link to GenBank's sequences.

Example 1: "GenBank accession nos. **AI631510**, **AI631511**, **AI632198**, and **BF223228**), a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. BE675048), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. AA361117)".

Authors are encouraged to check accession numbers used very carefully. An error in a letter or number can result in a dead link.

In the final version of the printed article, the accession number text will not appear bold or underlined (see Example 2 below).

Example 2: "GenBank accession nos. AI631510, AI631511, AI632198, and BF223228), a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. BE675048), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. AA361117)".

In the final version of the electronic copy, the accession number text will be linked to the appropriate source in the NCBI databases enabling readers to go directly to that source from the article (see Example 3 below).

Example 3: "GenBank accession nos. AI631510, AI631511, AI632198, and BF223228), a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. BE675048), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. AA361117)".

Footnotes

1. Footnotes should only be used if absolutely essential. In most cases it should be possible to incorporate the information in normal text.
2. If used, they should be numbered in the text, indicated by superscript numbers, and kept as short as possible.

Nomenclature

1. Authors and editors are, by general agreement, obliged to accept the rules governing biological nomenclature, as laid down in the *International Code of Botanical Nomenclature*, the *International Code of Nomenclature of Bacteria*, and the *International Code of Zoological Nomenclature*.
2. All botica (crops, plants, insects, birds, mammals, etc.) should be identified by their scientific names when the English term is first used, with the exception of common domestic animals.
3. All biocides and other organic compounds must be identified by their Geneva names when first used in the text. Active ingredients of all formulations should be likewise identified.
4. For chemical nomenclature, the conventions of the *International Union of Pure and Applied Chemistry* and the official recommendations of the *IUPAC IUB Combined Commission on Biochemical Nomenclature* should be followed.

Copyright

1. An author, when quoting from someone else's work or when considering reproducing an illustration or table from a book or journal article, should make sure that he is not infringing a copyright.
2. Although in general an author may quote from other published works, he should obtain permission from the holder of the copyright if he wishes to make substantial extracts or to reproduce tables, plates, or other illustrations. If the copyright-holder is not the author of the quoted or reproduced material, it is recommended that the permission of the author should also be sought.
3. Material in unpublished letters and manuscripts is also protected and must not be published unless permission has been obtained.
4. A suitable acknowledgement of any borrowed material must always be made.

Proofs

One set of proofs will be sent to the corresponding author as given on the title page of the manuscript. Only typesetter's errors may be corrected; no changes in, or additions to, the edited manuscript will be allowed.

Offprints

1. Twenty-five offprints will be supplied free of charge.
2. Additional offprints can be ordered on an offprint order form, which is included with the proofs.
3. UNESCO coupons are acceptable in payment of extra offprints.

Author Services

Authors can also keep a track on the progress of their accepted article, and set up e-mail alerts informing them of changes to their manuscript's status, by using the "Track a Paper" feature of Elsevier's [Author Gateway](#).

***Aquaculture* has no page charges**

Copyright © 2006 [Elsevier B.V.](#) All rights reserved.

