UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

SAMARA RITA DE LUCCA MAGANHA

Detecção e caracterização moleculares de vírus das famílias *Alloherpesviridae* e *Iridoviridae* em espécies de peixes ornamentais no Brasil

Pirassununga

2016

SAMARA RITA DE LUCCA MAGANHA

Detecção e caracterização moleculares de vírus das famílias *Alloherpesviridae* e *Iridoviridae* em espécies de peixes ornamentais no Brasil

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biociência Animal

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Luiz Moro de Sousa

Pirassununga

2016

Ficha catalográfica elaborada pelo
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

MM188d

Maganha, Samara Rita de Lucca
Detecção e caracterização moleculares de de vírus das famílias Alloherpesviridae e Iridoviridae em espécies de peixes ornamentais no Brasil / Samara Rita de Lucca Maganha ; orientador Ricardo Luiz Moro de Sousa. -- Pirassununga, 2016.
118 f.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo.

1. Epidemiologia molecular. 2. Peixes. 3. Alloherpesviridae. 4. Iridoviridae. I. Sousa, Ricardo Luiz Moro de, orient. II. Título.

Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte - o autor

SAMARA RITA DE LUCCA MAGANHA

Detecção e caracterização moleculares de vírus das famílias *Alloherpesviridae* e *Iridoviridae* em espécies de peixes ornamentais no Brasil

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biociência Animal

Data da aprovação: ____/____/____

Banca Examinadora:

_____

Professor Doutor Ricardo Luiz Moro de Sousa (FZEA – USP) - Orientador

_____

Professor Doutor Adriano de Oliveira Torres Carrasco (UNICENTRO/PR)

_____

Professora Doutora Simone de Carvalho Balian (FMVZ-USP/SP)

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais, EDNO JOSÉ MAGANHA e MARIA EMILIA DE LUCCA MAGANHA, pelo amor incondicional, por me ensinarem bons valores e por me apoiarem em todas as minhas decisões.

AGRADECIMENTOS

Agradeço...

Primeiramente a Deus, força maior, por ter me dado saúde, força e coragem para correr em busca dos meus sonhos, por mais distante que eles pareciam ser;

Aos meus queridos e amados pais, Edno José Maganha e Maria Emilia de Lucca Maganha, pelo amor imenso, pelos sábios conselhos, por me compreenderem, pela paciência, por confiarem no meu potencial, por me ajudarem e me apoiarem sempre em minhas decisões;

Ao Professor Doutor Ricardo Luiz Moro de Sousa, pelas demonstrações de fé, amizade, carinho, coragem, paciência e sabedoria e por todo o imenso conhecimento transmitido;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para a realização deste projeto;

Ao Professor Doutor Antonio Augusto Mendes Maia, pela confiança e amizade;

À Professora Doutora Andrezza Maria Fernandes, pela confiança e amizade;

Ao Pedro Henrique Magalhães Cardoso por ter cedido várias amostras para a realização deste estudo;

À técnica do Laboratório de Higiene Zootécnica e Multiusuário de Microbiologia, Silvia Helena Seraphin de Godoy pela amizade durante esta caminhada;

Aos meus colegas de Pós Graduação do Laboratório de Higiene Zootécnica e Multiusuário de Microbiologia, em especial Andrea Vasquez, Anna Alencar, Euder Michelin, Loiane Sampaio, Marina Massoco, Marisa França e Thaís Corrêa por me ajudarem e me aturarem durante este trajeto;

Às minhas alunas de Iniciação Científica, Erika Félix e Amanda Zilio, por estarem sempre dispostas a me ajudar;

À todos que de alguma forma me ajudaram, mesmo que de longe, para que esse sonho pudesse se tornar realidade;

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

(Arthur Schopenhauer)

RESUMO

MAGANHA, S. R. de L. **Detecção e caracterização moleculares de vírus das famílias *Alloherpesviridae* e *Iridoviridae* em espécies de peixes ornamentais no Brasil**. 2016. 118f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.

As doenças virais de peixes causadas por vírus das famílias *Iridoviridae* e *Alloherpesviridae* estão distribuídas mundialmente e representam uma ameaça real a expansão do sistema aquícola mundial. Desse modo, tornam-se necessários o aprimoramento e aplicação das técnicas de diagnóstico existentes a fim de se controlar ou impedir o avanço dessas viroses entre países. Vírus do gênero *Megalocytivirus* (MV) e o *Cyprinid herpesvirus* (CyHV), tipos 1, 2 e 3, induzem enfermidades em peixes com elevada taxa de mortalidade. Já vírus do gênero *Lymphocystivirus* (LCDV), apesar da menor patogenicidade, causam graves perdas econômicas ao reduzirem o valor comercial dos animais infectados. Devido à escassez de dados disponíveis sobre a circulação desses vírus no Brasil, o presente estudo objetivou a prospecção, incluindo a detecção e caracterização por meio da utilização de técnicas moleculares, de MV, LCDV, CyHV-1, CyHV-2 e CyHV-3 em peixes ornamentais oriundos do município de São Paulo, bem como em espécies de peixes de vida livre e comerciais provenientes de 4 estados brasileiros. Para tanto, foram coletadas e caracterizadas amostras de 306 peixes de 47 espécies diferentes, sendo que todas foram processadas para CyHV-3 e 81 foram submetidas ao diagnóstico para os demais vírus, obtendo-se uma positividade de 47% para MV, 1,2% para LCDV e 2% para CyHV-3. Todas as amostras positivas eram oriundas de peixes ornamentais do município de São Paulo. A sequência nucleotídica de LCDV obtida agrupou-se filogeneticamente em clado do genótipo VII, com similaridade de 44,8-91,1% para com outras sequências homólogas. As sequências de MV agruparam-se em clado com outras sequências de origem asiática, exibindo similaridade de 47,2-99,2% para com outras sequências. Para CyHV-3, a similaridade entre as sequências obtidas e para com outras homólogas foi igual ou superior a 97,4%, agruparando-se em 2 clados distintos. Análises evolutivas indicaram seleção negativa fraca ou relaxada para todas as sequências dos 3 grupos virais estudados. Nesse sentido, destaca-se o ineditismo dos resultados obtidos para a melhor compreensão da epidemiologia molecular desses vírus no Brasil.

Palavras chaves: epidemiologia molecular, peixes, *Iridoviridae*, *Alloherpesviridae*.

ABSTRACT

MAGANHA, S. R. de L. **Detection and molecular characterization of viruses of *Alloherpesviridae* and *Iridoviridae* families in ornamental fish species in Brazil**. 2016. 118f. M. Sc. Dissertation – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.

Viral fish disease caused by viruses of *Iridoviridae* and *Alloherpesviridae* families are distributed globally and represent a real threat to the expansion of world aquaculture system. Thus, improvement and application of current diagnostic techniques in order to control or stop the spread of these infections among countries become necessary. Virus of *Megalocytivirus* (MV) gender and the *Cyprinid herpesvirus* (CyHV), types 1, 2 and 3, induce diseases in fish with high mortality rate. Virus of *Lymphocystivirus* (LCDV) gender, despite their lower pathogenicity, cause severe economic losses by reducing the commercial value of infected animals. Due to the paucity of data available on the circulation of these viruses in Brazil, this study aimed to prospecting, including the detection and characterization through the use of molecular techniques, MV, LCDV, CyHV-1, CyHV-2 and CyHV-3 in ornamental fish come from the city of São Paulo, as well as in fish species of free and commercial life from 5 Brazilian states. For this purpose, 306 samples of 43 different species of fish were collected and characterized, all of which were processed to CyHV-3 and 81 were subjected to the diagnosis of other viruses, yielding a positivity rate of 47% for MV, 1.2% for LCDV and 2% for CyHV-3. All positive samples were from ornamental fish of São Paulo municipality. The only LCDV-nucleotide sequence obtained was grouped phylogenetically in the genotype VII clade, showing 44.8-91.1% similarity to other homologous sequences. Sequences of MV grouped into clade with Asian sequences, displaying 47.2-99.2% similarity to other homologous sequences. For CyHV-3, the similarity among the sequences obtained in this study and the similarity to homologous sequences was equal or superior to 97.4%, grouping into 2 distinct clades. Evolutionary analysis indicated weak or relaxed negative selection for all the sequences from the 3 studied virus groups. In this sense, it can highlight the novelty of the obtained results for a better understanding of the molecular epidemiology of these viruses in Brazil.

Keywords: molecular epidemiology, fish, *Iridoviridae*, *Alloherpesviridae*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Fotografia de gel de agarose a 1,5% corado com SYBR® Gold, sob luz UV, ilustrando resultados de amplificação de fragmento de 250pb, obtidos através da técnica de *nested*-PCR, relativo ao gene MCP do genoma de LCDV.....59

Figura 2 - Fotografia de gel de agarose a 1,5% corado com SYBR® Gold, sob luz UV, ilustrando resultados de amplificação de fragmento de 369pb, obtidos através da técnica de *nested*-PCR, relativo ao gene MCP do genoma de MV.....60

Figura 3 - Fotografia de gel de agarose a 1,5% corado com SYBR® Gold, sob luz UV, ilustrando resultados de amplificação de fragmento de 348pb, obtidos através da técnica de *nested*-PCR, relativo ao gene TK do genoma de CyHV-3.....61

Figura 4 - Fotografia de gel de agarose a 1,5% corado com SYBR® Gold, sob luz UV, ilustrando resultados de amplificação de fragmento de 348pb, obtidos através da técnica de *nested*-PCR, relativo ao gene TK do genoma de CyHV-3 (controle positivo).....62

Figura 5 – Alinhamento entre as sequências deduzidas de 66 aminoácidos do gene MCP de *Lymphocystivirus* para a amostra LCDV-BRA, detectada no presente estudo, e de outros *Lymphocystivirus* recuperados do GenBank.....63

Figura 6 – Alinhamento entre as sequências deduzidas de 116 aminoácidos do gene MCP de *Megalocytivirus* para as amostras MV-BRA, detectadas no presente estudo, e de outros *Megalocytivirus* recuperados do GenBank.....64

Figura 7 - Alinhamento entre as sequências deduzidas de 102 aminoácidos do gene TK de *Cyprinid herpesvirus 3* para as amostras CyHV, detectadas no presente estudo, e de outros *Cyprinid herpesvirus 3* recuperados do GenBank.....65

Figura 8 - Cladograma representando reconstrução filogenética baseada no alinhamento de sequências nucleotídicas referentes à amplificação de um fragmento de 250pb do gene MCP de *Lymphocystivirus.* A sequência obtida neste estudo corresponde a LCDV-BRA.....69

Figura 9 - Reconstrução filogenética baseada no alinhamento de sequências nucleotídicas de de 369pb do gene MCP de *Megalocytivirus.* As sequências obtidas neste estudo correspondem a MV-BRA.....70

Figura 10 - Cladograma representando reconstrução filogenética baseada no alinhamento de sequências nucleotídicas referentes à amplificação de um fragmento de 348pb do gene TK de *Cyprinid herpesvirus 3*. As sequências obtidas neste estudo correspondem a CyHV-3.....71

Figura 11 - Curva de saturação obtida no programa DAMBE, mostrando as frequências de transições (Xs) e transversões (Δv) em relação ao gene MCP de *Lymphocystivirus*.....72

Figura 12 - Curva de saturação, obtida no programa DAMBE, mostrando as frequências de transições (Xs) e transversões (Δv) em relação ao gene MCP de *Megalocytivirus*.....73

Figura 13 - Curva de saturação, obtida no programa DAMBE, mostrando as frequências de transições (Xs) e transversões (Δv) em relação ao gene TK de *Cyprinid herpesvirus 3*.....74

Figura 14 - Representação gráfica da ocorrência de mutações sinônimas e não sinônimas nos nucleotídeos do gene MCP de *Lymphocystivirus* obtida a partir do programa SNAP.....75

Figura 15 - Representação gráfica da ocorrência de mutações sinônimas e não sinônimas nos nucleotídeos do gene MCP de *Megalocytivirus* obtida a partir do programa SNAP.....76

Figura 16 - Representação gráfica da ocorrência de mutações sinônimas e não sinônimas nos nucleotídeos do gene TK de *Cyprinid herpesvirus* 3 obtida a partir do programa SNAP.....77

Figura 17 - Análise de *likelihood mapping* para o gene MCP de *Lymphocystivirus*.....78

Figura 18 - Análise de *likelihood mapping* para o gene MCP de *Megalocytivirus*.....78

Figura 19 - Análise de *likelihood mapping* para o gene TK de *Cyprinid herpesvirus 3*.....78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - *Primers* utilizados na obtenção de produtos de PCR do gene TK de CyHV-3.....39

Tabela 2 - *Primers* degenerados utilizados na obtenção de produtos de PCR do gene da DNA polimerase de CyHV-1, CyHV-2 e CyHV-3.....40

Tabela 3 - *Primers* utilizados na obtenção de produtos de PCR dos genes MCP de *Megalocytivirus* e *Lymphocystivirus*.....41

Tabela 4 – Sequências nucleotídicas de *Lymphocystivirus* utilizadas para reconstrução filogenética com indicação de nome, genótipo, origem e respectivos números de acesso no GenBank.....48

Tabela 5 – Sequências nucleotídicas de *Megalocytivirus* utilizadas para reconstrução filogenética com indicação de nome, genótipo, origem e respectivos números de acesso no GenBank.....49

Tabela 6 – Sequências nucleotídicas de *Cyprinid herpesvirus 3* utilizadas para reconstrução filogenética com indicação de nome, genótipo, origem e respectivos números de acesso no GenBank.....51

Tabela 7 – Relação de espécies investigadas neste estudo para a presença de infecções virais.....54

Tabela 8 – Relação de espécies positivas ao *nested*-PCR para *Megalocytivirus*.....55

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Comparação das porcentagens de similaridade e identidade das sequências nucleotídicas para fragmentos de 250pb do gene MCP de *Lymphocystivirus*, entre 1 amostra detectada por PCR, e posteriormente sequenciada, e sequências de outros *Lymphocystivirus* recuperadas do GenBank.....66

Quadro 2 – Comparação das porcentagens de similaridade e identidade das sequências nucleotídicas para fragmentos de 369pb do gene MCP de *Megalocytivirus*, entre 12 amostras detectadas por PCR, e posteriormente sequenciadas, e sequências de outros *Megalocytivirus* recuperadas do GenBank.....67

Quadro 3 - Comparação das porcentagens de similaridade e identidade das sequências nucleotídicas para fragmentos de 348pb do gene TK de *Cyprinid herpesvirus 3*, entre 4 amostras detectada por PCR, e posteriormente sequenciadas, e sequências de outros *Cyprinid herpesvirus 3* recuperadas do GenBank.....68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CyHV-1 – *Cyprinid herpesvirus 1*

CyHV-2 – *Cyprinid herpesvirus 2*

CyHV-3 – *Cyprinid herpesvirus 3*

DNA – Deoxyribonucleic Acid (Ácido Desoxirribonucleico)

dNTP - Desoxirribonucleotídeo Fosfatado

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations (Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura)

ISKNV - *Infectious Spleen and Kidney Necrosis Virus*

FV3 – *Frog virus 3*

Kb – 1.000 pares de base

KHV – *Koi herpesvirus*

LYCIV - Large Yellow Croaker Iridovirus

LCDV – *Lymphocystis disease virus*

MCP – Major Capsid Protein

$MgCl_2$ – Cloreto de Magnésio

MV – *Megalocytivirus*

OIE – World Organization for Animal Health (Escritório Internacional de Epizootias)

ORF - Open Reading Frames (Fase aberta de leitura)

OSGIV – Orange-Spotted Grouper Iridovirus

pb - Par de bases

PCR – Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia pela Polimerase)

RNA – Ribonucleic Acid (Ácido Ribunucleico)

RSIV – *Red Sea Bream Iridovirus*

RBIV – *Rock Bream Iridovirus*

TK – Timidine Kinase (Timidina Quinase)

TRBIV - *Turbot Reddish Body Iridovirus*

TGIV - *Taiwan Grouper Iridovirus*

TSIV - *Threespine Stickleback Iridovirus*

LISTA DE SÍMBOLOS

% - Por cento

°C – Grau Celsius

mg – Miligrama

mM - Milimolar

ng – Nanograma

pH – Potencial hidrogeniônico

µL – Microlitro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 19
2.1. Aquicultura Global 19
2.2. Aquicultura Brasileira 20
2.3. Principais patógenos de organismos aquáticos 22
2.4. Família *Iridoviridae* 23
2.5. Família *Alloherpesviridae* 28
3. JUSTIFICATIVA 35
4. OBJETIVOS 37
5. MATERIAL E MÉTODOS 38
5.1. Coleta de peixes e amostras 38
5.2. Diagnóstico molecular das infecções por CyHV-1, CyHV-2, CyHV-3, M*egalocytivirus* e *Lymphocystivirus* 38
5.2.1. Extração de DNA 38
5.2.2. *Primers* 39
5.2.2.1. *Cyprinid herpesvirus 3* (CyHV-3) 39
5.2.2.2. *Cyprinid herpesvirus 1* (CyHV-1) e *Cyprinid herpesvirus 2* (CyHV-2) 39
5.2.2.3. Família *Iridoviridae* 40
5.2.3. PCR e *nested*-PCR 41
5.2.3.1. *Cyprinid herpesvirus 3* 41
5.2.3.2. *Cyprinid herpesvirus* 1 e *Cyprinid herpesvirus* 2 43
5.2.3.3. Família *Iridoviridae* 43
5.2.4. Extração de DNA de Gel de Agarose 45
5.2.5. Sequenciamento Nucleotídico 46
5.2.6. Alinhamento de Sequências Nucleotídicas 46
5.2.7. Análise Filogenética 47
5.2.8. Análises Evolutivas e de Polimorfismo 52
5.2.9. Análise Estatística 53
6. RESULTADOS 53
6.1. Coleta de amostras teciduais de peixes 53

6.2. Aplicação da técnica de PCR para detecção de fragmentos genômicos de vírus das famílias *Alloherpesviridae* e *Iridoviridae* 55
6.3. Sequenciamento nucleotídico e alinhamento de sequências 56
6.4. Análises filogenéticas e de similaridade 56
6.5. Análises evolutivas e de polimorfismo 57
7. DISCUSSÃO 79
8. CONCLUSÕES 88
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 89
APÊNDICE 105

1. INTRODUÇÃO

Há milhões de anos, os vírus estão presentes em abundância no ambiente terrestre e com o tempo vem aprimorando a sua capacidade de infectar diversos organismos, sejam eles terrestres ou aquáticos, podendo causar enfermidades graves que podem levar a extinção de espécies domésticas e selvagens. Nos últimos anos, com a rápida expansão da aquicultura, várias doenças virais estão surgindo, ameaçando o crescimento do setor, a garantia de qualidade dos produtos e consequentemente a saúde da população.

Entre os vírus emergentes causadores de enfermidades em diversas espécies de peixes, podemos destacar os vírus pertencentes às famílias *Iridoviridae* e *Alloherpesviridae*.

Os vírus pertencentes á família *Iridoviridae* estão divididos em 5 gêneros denominados *Iridovirus*, *Ranavirus*, *Megalocytivirus*, *Lymphocystivirus* e *Chloriridovirus*. Os gêneros *Megalocytivirus* e *Ranavirus* causam infecções sistêmicas que na maioria das vezes levam os animais infectados á óbito, gerando graves perdas econômicas e ecológicas ao redor do mundo. Já o gênero *Lymphocystivirus* apesar de apresentar uma baixa taxa de letalidade, também pode causar graves perdas econômicas na indústria aquícola, pois a aparência do peixe infectado o torna sem valor comercial.

A família *Alloherpesviridae* é formada por 4 gêneros: *Cyprinivirus*, *Batrachovirus*, *Salmonivirus* e *Ictalurivirus*. Fazem parte do gênero *Cyprinivirus*: *Cyprinid herpesvirus 1* (CyHV-1), *Cyprinid herpesvirus 2* (CyHV-2) e *Cyprinid herpesvirus 3* (CyHV-3), sendo que *Cyprinid herpesvirus 1* e *Cyprinid herpesvirus 3* infectam predominantemente carpas comuns e carpas Koi (*Cyprinus carpio carpio* e *Cyprinus carpio koi*) e o *Cyprinid herpesvirus 2* acomete peixes dourados da espécie *Carassius auratus* causando uma doença conhecida como necrose hematopoética dos dourados.

A doença causada pelo CyHV-1 apresenta uma baixa taxa de letalidade e caracteriza-se pelo surgimento de lesões na superfície da pele do animal infectado. Já na necrose hematopoética dos dourados também há surgimento de lesões externas, podendo ocorrer o comprometimento de órgãos internos, como rins, fígado e baço, entretanto apresenta uma alta taxa de mortalidade e trata-se de doença de difícil controle e erradicação.

O CyHV-3 é um vírus envelopado de DNA fita dupla que causa uma doença conhecida como doença do *Koi herpesvirus*, sendo esta a outra nomenclatura que o vírus pode receber. O vírus é amplamente distribuído nos continentes, apresenta um alto índice de

mortalidade que pode chegar a 100% e, portanto, é de notificação obrigatória pelo Escritório Internacional de Epizootias (OIE).

Desse modo, as técnicas moleculares como a reação em cadeia pela polimerase (PCR) associadas ou não a técnicas sorológicas representam um avanço na metodologia empregada para o diagnóstico dessas enfermidades e são preconizadas pelos órgãos internacionais para a detecção e caracterização dessas doenças em peixes.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Aquicultura Global

A prática da aquicultura tradicional remota de longos tempos, sendo descrita em diversas culturas pelos continentes (OLIVEIRA et al., 2009). Há relatos que a prática da aquicultura já existia na China pré-Feudal há pelo menos 4.000 anos atrás (WALKER; WINTON, 2010). Evidências históricas encontradas em documentos e manuscritos chineses são datadas de séculos remotos; além disso, existem relatos da prática da aquicultura em hieróglifos egípcios (OLIVEIRA, 2009). Até no Antigo Testamento da Bíblia existem referências de lagoas de peixe, revelando que a aquicultura é uma prática antiga (WALKER; WINTON, 2010).

A aquicultura pode ser definida como uma prática multidisciplinar, que inclui o cultivo de diversos organismos pertencentes ao ambiente aquático, sendo eles moluscos, plantas aquáticas, peixes e crustáceos, compreendendo a produção de mais de 600 espécies de organismos aquáticos, de modo que existe uma necessidade constante de melhorias no processo de manejo da produção a fim de garantir o crescimento da mesma com qualidade. (OLIVEIRA, 2009; TROELL et al., 2014; OTTINGER; CLAUSS; KUENZER, 2016).

Com uma taxa média anual de crescimento de 8,3% no período de 1970 a 2008, a aquicultura é considerada uma das áreas da produção de alimentos com maior expansão no mundo (FAO, 2010; SAFEENA; RAI; KARUNASAGAR, 2012). O rápido crescimento do setor é visto de maneira satisfatória, pois reduz a lacuna existente entre o fornecimento de peixe e a demanda do mesmo, além de representar uma importante fonte de renda em países que sobrevivem do comércio de organismos aquáticos (BOISON; TURNIPSEED, 2015). Somente no ano de 2008, a pesca de captura somada à aquicultura forneceram ao mundo cerca de 142 milhões de toneladas de peixes sendo que 115 milhões de toneladas foram destinadas ao consumo humano (FAO, 2010). Apenas no ano de 2008, foram produzidas 52,5 milhões de toneladas de alimentos à base de crustáceos, peixes ósseos, moluscos e outros organismos aquáticos (SAFEENA; RAI; KARUNASAGAR, 2012).

Nas últimas três décadas, a aquicultura tem sido considerada o setor da indústria aquícola mundial com maior e mais rápido crescimento, sendo que a produção mundial de produtos aquáticos alcançou a marca de 61,72 milhões de toneladas, nos quais 45,6 milhões de toneladas foram oriundas da aquicultura (ZHANG; GUI, 2015).

O país dominante na produção aquícola é a China que, em conjunto com outros países desenvolvidos da região Pacifico-Ásia, é responsável por 89% do total de produtos comercializados pela aquicultura no mundo, sendo que as principais espécies produzidas pela aquicultura são carpas (98%), ostras (95%) e camarões (88%) (FAO, 2008; WALKER; WINTON, 2010).

Em países muito pobres e com carência de alimentos, as proteínas oriundas de peixes representam 20% ou mais do total de proteínas ingeridas, sendo o consumo de peixes, portanto, importante fonte de proteínas para a população. O consumo diário de 150g de peixe pode suprir cerca de 50-60% das necessidades diárias de proteínas de um indivíduo adulto (FAO, 2014). Além de ser um importante modo de nutrição, a produção de alimentos à base de peixes também gera uma alta taxa de empregos (FAO, 2010; GOSTESMAN et al., 2013).

Segundo dados da (FAO, 2012), no ano de 2010, cerca de 148 milhões de toneladas (com um valor total de US$ 217,5 bilhões) foram produzidos no mundo pela pesca de captura e pela aquicultura, sendo que aproximadamente 128 milhões de toneladas foram consumidos como fonte de alimento pela população. O consumo mundial de peixes sofreu um crescimento significativo nos últimos anos, subindo de 95,8 milhões de toneladas no ano de 2000 para 115,1 milhões de toneladas no ano de 2008 (FAO, 2010; PAHLOW et al., 2015).

Neste contexto, nos últimos anos, a aquicultura vem, portanto, se estabelecendo como atividade de relevância zootécnica, inclusive no território brasileiro, onde atualmente é praticada em todo o território nacional (CAVALLI; DOMINGUES; HAMILTON, 2011). A rápida expansão da aquicultura é vista de maneira satisfatória já que está relacionada ao aumento na oferta global de proteína, aumento na geração de empregos e garantia de qualidade dos produtos ofertados (OTTINGER; CLAUSS; KUENZER, 2016).

A aquicultura, como qualquer sistema de produção, é susceptível à ocorrência de episódios adversos como doenças, crises econômicas e condições ambientais desfavoráveis como secas e enchentes. Ao longo dos anos, o setor tem passado por vários surtos de doenças, entre elas podemos destacar aquelas que acometeram salmões cultivados no Chile, camarões nos continentes Asiático e Africano e ostras na Europa (BOISON; TURNIPSEED, 2015).

2.2. Aquicultura Brasileira

No Brasil, a aquicultura é considerada o setor da agropecuária que mais cresceu nas últimas décadas, sendo que a expansão do setor ultrapassou a média mundial. Adicionalmente, a aquicultura brasileira é ressaltada como uma grande fonte para a produção

de alimentos, desenvolvimento sustentável e reconhecimento de locais ainda não explorados no território brasileiro (FAO, 2006; FIGUEIREDO; LEAL, 2008).

Atualmente, cada uma das 5 regiões pertencentes ao território brasileiro vem centralizando sua produção em determinadas espécies de peixe e outros organismos aquáticos. Peixes como o tambaqui e o pirarucu são cultivados na região Norte do país. As tilápias são produzidas nas regiões Nordeste, Sudeste e Sul. Na região Sul, além das tilápias, existe uma grande produção de carpas, ostras e mexilhões. Já no Centro-Oeste brasileiro, os principais peixes cultivados são o pacu, o tambaqui e o pintado. Há também uma intensa produção de tilápia, pacu, tambaqui e pirapitinga nos parques aquícolas continentais (BRASIL, 2014).

No Brasil, existe uma vasta quantidade de recursos hídricos, o que gera um incentivo adicional na produção de peixes, aumento na oferta de empregos e melhoria na renda da população. Na região Amazônica, onde há um predomínio de uma atividade econômica depredatória causada pelo extrativismo e pela criação de gado, a produção de organismos aquáticos pode representar uma forma de renda mais sustentável e menos prejudicial ao meio ambiente. Já na região Nordeste do país, a aquicultura pode representar uma da poucas opções disponíveis para o desenvolvimento econômico da região, inclusive por questões de escassez de recursos hídricos, como é o caso da utilização de poços salinizados para a produção. De modo que as ações em conjunto das cinco regiões do país contribuem para as melhorias socioeconômicas do país (BRASIL, 2011).

Apesar do enorme potencial brasileiro na produção de pescado e da recomendação da Organização Mundial de Saúde, que um indivíduo deve consumir no mínimo 12 quilos de pescado por ano, o consumo de peixes pelos brasileiros ainda está bem abaixo dessa meta (BRASIL, 2014a).

Entretanto, devido à rápida expansão da aquicultura, algumas doenças vem causando graves perdas econômicas no setor (QUESASA; PASCHOAL; REYES, 2013). Alguns fatores como variações bruscas de temperatura e pH do ambiente aquático, interferem diretamente na sanidade dos peixes, deixando-os na maioria das vezes mais sensíveis às infecções por patógenos. Este panorama, associado a práticas de manejo incorretas e condições ambientais desfavoráveis, contribui para o aparecimento de doenças causadas por parasitas, bactérias, vírus e fungos (ROBERTS; BULLOCK, 1980; SCHALCH et al., 2005; QUESADA; PASCHOAL; REYES, 2013).

Essas enfermidades representam um entrave para a expansão da aquicultura (ZHANG; GUI, 2015). Desse modo, o surgimento das doenças causadas por patógenos emergentes

contribui de forma significativa para o aumento no risco de extinção das espécies selvagens (UCHUII et al., 2013).

2.3. Principais patógenos de organismos aquáticos

As bacterioses de peixes são inúmeras e de sintomatologia variada; entre as principais bactérias causadoras de doença podemos ressaltar algumas: *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio anguillarum*, *Streptococcus spp.* e *Lactococcus ssp.* (JAGRUTHI et al., 2014; COSCELLI et al., 2015; LING et al., 2016; MUSTHAFA et al. 2016; PRADEEP et al., 2016).

A *Aeromanas salmonicida* é um dos principais patógenos de várias espécies de peixes de água doce e salgada causando uma doença conhecida como furunculose que apresenta alta taxa de mortalidade e promove graves perdas econômicas na produção de peixes (SILVA et al., 2016). Uma das bacterioses mais comuns em peixes, incluindo carpas (*Cyprinus carpio*), é causada pela *Aeromonas hydrophila,* considerada como uma bactéria oportunista, de modo que os peixes infectados desenvolvem uma doença de natureza hemorrágica cujos sinais clínicos são: hidropsia, ulceração, necrose, apodrecimento das nadadeiras e cauda e aumento no volume dos tecidos (MUSA et al., 2008; SARKAR; RASHID, 2012; YE et al., 2012; JAGRUTHI et al., 2014; LING, et al., 2016; MUSTHAFA et al., 2016).

As bactérias dos gêneros *Streptococcus* e *Lactococcus* causam uma doença denominada estreptococose que atinge vários animais, incluindo principalmente tilápias (*Oreochromis* spp.) (JOHRI et al., 2006; AMAL; ZAMRI-SAAD, 2011; PRADEEP et al., 2016). As principais espécies do gênero *Streptococcus* que causam doenças, principalmente no sistema nervoso de peixes de água doce e salgada são: o *Streptococcus agalactiae* e o *Streptococcus iniae* (FIGUEIREDO; LEAL, 2008).

O parasita de peixe mais conhecido é o *Ichthyophthirius multifiliis,* que causa uma doença cuja principal característica é o aparecimento de pontos brancos ao longo do corpo do animal infectado (WEI; LI; YU, 2013). Outros parasitas de peixe de importância médica e econômica são: *Cryptobia salmositica*, *Loma salmonae*, *Gyrodactylus salaries*, *Lepeophtheirus salmonis* e *Caligus rogercresseyi*, sendo que a doença causada pelo ectoparasita *Gyrodactylus salaries* é de notificação obrigatória pela OIE (GUO; WUO, 2009; OIE, 2016).

Alguns dos fungos causadores de doenças em peixes, geralmente levando a grandes perdas econômicas são: *Saprolegnia diclina* e *Aphanomyces invadans*, sendo que a doença

causada pelo fungo *Aphanomyces invadans* conhecida como síndrome ulcerativa epizoótica é de notificação obrigatória pela OIE (LILLEY et al., 2003; LIU et al., 2015; LIU et al., 2016; OIE, 2016).

As principais doenças virais de peixes conhecidas atualmente são: a Necrose Hematopoética Infecciosa causada por um vírus de RNA fita simples, polaridade negativa, da família *Rhabdoviridae*; a Septicemia Hemorrágica Viral, cujo agente etiológico é um vírus de RNA fita simples, polaridade negativa, também membro da família *Rhabdoviridae* e pertencente ao gênero *Novirhabdovirus*; Viremia Primaveril da Carpa, causada por um *Rhabdovirus*; a Anemia Infecciosa do Salmão, que atinge principalmente salmões e é causada por um membro da família *Orthomyxoviridae* e a doença do *Koi herpesvirus* transmitida por um vírus de DNA fita dupla membro da família *Alloherpesviridae* (WALKER; WINTER, 2010).

Entre as doenças causadas por vírus de DNA pertencentes à família *Iridoviridae*, podemos destacar a Necrose Hematopoética Epizoótica, entre outras doenças causadas por vírus do gênero *Ranavirus*, e a *Red sea bream iridoviridal disease*, entre outras doenças causadas por membros do gênero *Megalocytivirus*. Já a Necrose Viral Nervosa acomete principalmente peixes de água salgada e é causada por um vírus de RNA fita simples, polaridade negativa, pertencente à família *Nodaviridae* (WALKER; WINTER, 2010).

2.4. Família *Iridoviridae*

A família *Iridoviridae*, cujos membros são denominados iridovírus, é composta por 5 gêneros virais assim denominados: *Iridovirus*, *Ranavirus*, *Megalocytivirus*, *Lymphocystivirus* e *Chloriridovirus* (WHITTINGTON; BECKER; DENNIS, 2010). Os gêneros *Ranavirus*, *Megalocytivirus* e *Lymphocystivirus* infectam vertebrados, enquanto os outros dois gêneros (*Iridovirus* e *Chloriridovirus*) infectam invertebrados (WHITTINGTON; BECKER; DENNIS, 2010). A maioria dos membros dessa família apresenta como material genético uma molécula de DNA fita dupla e possuem a capacidade de infectar mais de 140 espécies de organismos aquáticos incluindo peixes, anfíbios, répteis, insetos e crustáceos causando grandes problemas na indústria aquícola mundial (WILLIAMS, 1996; WILLIAMS; BARBOSA-SOLOMIEU; CHINCHAR, 2005; EATON; RING; BRUNETTI, 2010; ZHANG; GUI, 2015).

Os membros da família *Iridoviridae* possuem uma ampla variedade de hospedeiros e com isso apresentam uma enorme variedade de manifestações clínicas sendo que os animais

infectados podem ser assintomáticos ou sintomáticos com morte rápida (LANGDON et al., 1986; AHNE; SCHLOTFELDT; THOMSEN, 1989; HEDRICK et al., 1992; POZET et al., 1992; HEDRICK; MCDOWELL, 1995; ELEATON; RING; BRUNETTI, 2010). Desse modo, as altas taxas de morbidade e mortalidade nos animais infectados causam prejuízos econômicos e ecológicos podendo levar a extinção de espécies (DASZAK et al., 1999; DASZAK; CUNNINGHAM; HYATT, 2003; COLLINS; STORFER, 2003; JANCOVICH et al., 2005; EATON; RING; BRUNETTI, 2010).

Os membros do gênero *Lymphocystivirus* causam infecções dérmicas com índice de mortalidade muito baixo; já os vírus pertencentes aos gêneros *Megalocytivirus* e *Ranavirus* causam infecções sistêmicas com patologias distintas onde a taxa de mortalidade pode atingir 100% (LEU; WU; CHOU, 2013).

Os membros do gênero *Ranavirus* são vírus de DNA fita dupla que apresentam capsídeo com formato icosaédrico e infectam animais de sangue frio, ou seja, peixes, répteis e anfíbios (LEBARRÈRES et al., 2012). Os motivos relacionados à emergência dos ranavirus como causadores de doenças ainda permanecem obscuros, mas já se sabe que está relacionado a ação antropogênica e a transmissão entre classes filogenéticas de hospedeiros. Sendo assim existe a necessidade de estudos epidemiológicos mais aprofundados na tentativa de impedir ou controlar o avanço da infecção entre os animais de sangue frio (WHITTINGTON et al., 2010).

A espécie tipo do gênero *Ranavirus* é o *Frog virus 3* (FV3) que foi identificado há mais de 50 anos (GRANOFF; CAME; BREEZE, 1966; FORZÁN et al., 2015). As principais manifestações clínicas que os animais infectados desenvolvem são: nados irregulares, inchaço de membros e letargia, sendo que alguns animais podem apresentar infecções subclínicas e assintomáticas, o que favorece a transmissão do vírus para outros organismos (TAPIOVAARA et al., 1998; MILLER et al., 2009; CHINCHAR, 2012; KIM et al., 2015)

Megalocytivirus, um dos 5 gêneros pertencentes a família *Iridoviridae* cuja primeira descrição ocorreu em peixes Pargo-Japonês (*Pagrus major*) no ano de 1990 no Japão, são vírus de DNA fita dupla com capsídeo icosaédrico e tamanho variável entre 140 a 200nm de diâmetro que causam alta mortalidade em peixes de água doce e salgada levando a graves perdas econômicas na indústria aquícola (INOYUE et al., 1992; SUBRAMANIAM et al., 2014; KURITA; NAKAJIMA, 2012; NOLAN et al., 2015). Trata-se de um gênero viral com ampla distribuição mundial devido ao intenso comércio internacional de organismos aquáticos que muitas vezes acontece de forma descontrolada e sem a presença de certificações de sanidade desses animais (MAO et al., 1999; GO et al., 2006; NOLAN et al., 2015).

O gênero *Megalocytivirus* é composto atualmente por quatro espécies virais denominadas *Red Sea Bream Iridovirus* (RSIV), *Infectious Spleen and Kidney Necrosis Virus* (ISKNV), *Turbot Reddish Body Iridovirus* (TRBIV) e *Threespine Stickleback Iridovirus* (TSIV) (KURITA; NAKAJIMA, 2012; WALTZEK et al., 2012; SRIWANAYOS et al., 2013). Embora o gênero compreenda 4 espécies, existem diversas descrições científicas de isolados relacionados ao gênero e atualmente 7 deles já tiveram seu genoma sequenciado completamente (ZHANG; GUI, 2015). São eles: *Red sea bream iridovirus* (RSIV) (JEONG et al., 2003*), Infectious spleen and kidney necrosis virus* (ISKNV) (HE et al., 2001), *Rock bream iridovirus* (RBIV) (DO et al., 2004), *Orange-spotted grouper iridovirus* (OSGIV) (LÜ et al., 2005), *Large yellow croaker iridovirus* (LYCIV) (AO; CHEN, 2006), *Turbot reddish body iridovirus* (TRBIV) (SHI et al., 2010) e *Rock bream iridovirus* isolado da China (ZHANG et al., 2013) (ZHANG; GUI, 2015). Outros isolados do gênero também, ainda não descritos como espécies, são *Taiwan grouper Iridovirus* (TGIV) (CHOU et al., 1998; CHAO et al., 2004) e *Dwarf gourami Iridovirus* (HE et al., 2000; GO et al., 2006) (KURITA; NAKAJIMA, 2012) . Essa quantidade de espécies virais dentro de um mesmo gênero revela a ampla variedade de hospedeiros que *Megalocytivirus* apresenta (SONG et al., 2008).

Algumas das espécies de água doce que são atingidas pelo *Megalocytivirus* são: *Scophthalmus maximus*, *Paralichthys olivaceus*, *Lateolabrax japonicas*, *Pagrus major* e *Oplegnathus fasciatus* (KAWAKAMI; NAKAJIMA, 2002; WANG et al., 2003; DO et al., 2005; KIM et al., 2005; JEONG et al., 2006a; LEE et al., 2009; SHINMOTO et al., 2009; ZHANG et al., 2012).

Os principais sinais clínicos apresentados pelos animais acometidos pelo vírus são anorexia, letargia, exoftalmia, lesões na superfície da pele, anemia, natação irregular e fezes esbranquiçadas (CHEN; LIN; WANG, 2003; WEBER et al., 2009; WANG et al., 2011; WALTZEK et al., 2012; KURITA; NAKAJIMA, 2012; SRIWANAYOS et al., 2013). Já as alterações internas no animal infectado incluem hepatomegalia, esplenomegalia e presença de lesões hemorrágicas (CHEN; LIN; WANG, 2003; WEBER et al., 2009; WANG et al., 2011; ZHANG et al., 2011; WALTZEK et al., 2012; KURITA; NAKAJIMA, 2012; SRIWANAYOS et al., 2013).

Os principais achados na histopatologia dos peixes infectados por *Megalocytivirus* incluem a observação de células mesenquimais citomegálicas e a presença de inclusões intracitoplasmáticas anfifílicas ou basofílicas em vários órgãos do corpo do animal como rim, fígado, baço, intestino, coração, gônadas e olhos (CHEN; LIN; WANG, 2003; WEBER et al.,

2009; WANG et al., 2011; ZHANG et al., 2011; WALTZEK et al., 2012; SRIWANAYOS et al., 2013).

O *Infectious spleen and kidney necrosis virus* é um vírus que acomete principalmente peixes da espécie mandarim (*Siniperca chuatsi)*, sendo palidez de brânquias, anorexia e nado irregular os principais sinais clínicos indicativos de infecção (HE et al., 2000; SUBRAMANIAM et al., 2014; ZHANG; GUI, 2015). Já o *Rock bream iridovirus* infecta principalmente peixes da espécie *Oplegnathus fasciatus*, levando a altos índices de mortalidade nessa população de peixes, sendo a sintomatologia apresentada pelos animais infectados caracterizada por letargia, escurecimento corporal, redução na ingestão de alimentos e nados irregulares (INOUYE et al., 1992; JUNG; OH, 2000; JUNG et al., 2015).

O *Turbot reddish body iridovirus* acomete peixes marítimos da espécie *Scophthalmus maximus* causando graves perdas econômicas principalmente na produção aquícola chinesa visto que trata-se de uma espécie bastante cultivada nas áreas costais do norte da China (SHI et al., 2010). Na análise histopatológica do corte do animal infectado observa-se a presença de hipertrofia celular nos rins, no baço, no endocárdio e nos tecidos conectivos craniais do animal (SHI et al., 2010). O *Orange-spotted grouper iridovirus* é um agente viral de alta taxa de letalidade que causa doença grave predominantemente em organismos aquáticos da espécie *Ephinephelus coioides* (LÜ et al., 2005).

O *Large yellow croaker iridovirus* acomete predominantemente peixes marinhos da espécie *Larimichthys crocea*, que apresenta grande importância econômica na região costal do sul da China. O peixe infectado apresenta anoxeria, nados irregulares, presença de brânquias pálidas e ulceradas e escurecimento corporal. Na necrópsia, os principais achados são a presença de pontos avermelhados no fígado e a presença de hepatomegalia (CHEN; LI; WANG, 2003).

Os métodos de diagnóstico das infecções causadas por *Megalocytivirus* inicialmente eram baseados em achados histopatológicos característicos da doença, mas atualmente consistem na realização de técnicas moleculares como o PCR para amplificação do DNA viral e posterior análises de regiões do gene MCP viral (NOLAN et al., 2015).

O gênero *Lymphocystivirus*, um dos membros da família *Iridoviridae*, é composto pela espécie viral denominada *Lymphocystis disease virus* (LCDV). O LCDV é um vírus envelopado que apresenta capsídeo icosaédrico com diâmetro em torno de 200nm e DNA fita simples ou dupla (DARAI et al., 1993; TIDONA; DARAI, 1997; KITAMURA; JUNG; OH, 2006; HOSSAIN et al., 2008; ZHENG et al., 2016). Trata-se de um vírus que afeta espécies de peixe de água doce e salgada, apresenta pouca patogenicidade visto que raramente leva o

animal a óbito; entretanto, por afetar a aparência do peixe com o surgimento de lesões externas, gera perdas econômicas (KITAMURA; JUNG; OH, 2006; HOSSAIN et al., 2008).

Os vírus pertencentes ao gênero *Lymphocystivirus* estão distribuídos mundialmente e causam patologias em mais de 125 espécies de peixes de água doce e salgada pertencentes a 34 famílias diferentes (SHENG; ZHAN; WANG, 2007; CANO et al., 2010; PIRARAT et al., 2011; XU; FENG; HUANG, 2014).

Atualmente, com base na proteína principal do capsídeo, o LCDV é dividido em 9 genótipos (CANO et al., 2010; PALMER; HOGAN; VAN DEN HEUVEL, 2012; CIULLI et al., 2015). Os genótipos de LCDV descritos são: genótipo I (LCDV-1) que inclui isolados da espécie *Platichtys flesus*, genótipo II que apresenta isolados da espécie *Paralichthys olivaceus*, genótipo III que inclui isolados da espécie *Sebastes schlegeli*, genótipo IV que inclui isolados das espécies *Lateolabrax* sp e *Rachycentron canadum*, genótipo V que inclui isolados da espécie *Pseudambassis baculis*, genótipo VI que agrupa iolados oriundos das espécies *Trichogaster leeri* e *Trichogaster trichopterus*, genótipo VII representado por membros isolados das espécies *Sparus aurata* e *S. senegalensis*, genótipo VIII que inclui isolados da espécie *Micropterus salmoides* e genótipo IX que inclui isolados de Perca Amarela (KITAMURA; JUNG; OH, 2006; HOSSAIN et al., 2008; CANO et al., 2010; PALMER; HOGAN; VAN DEN HEUVEL, 2012; YAN et al., 2011; CIULLI et al., 2015).

A ocorrência de infecções por *Lymphocystivirus* está relacionada a condições ambientais estressantes nos tanques de criação apesar de existirem relatos da mesma em peixes de vida livre (ALONSO et al., 2005; CIULLI et al, 2015). Os principais sinais clínicos indicativos da doença são a presença de nódulos hipertróficos únicos ou múltiplos semelhantes a tumores nas nadadeiras, na pele e na cauda do animal, esses nódulos crescem durante a evolução da doença, se rompem ocorrendo a liberação de partículas virais na água (ALONSO et al., 2005; KVITT; HEINISCH; DIAMANT, 2008; CIULLI et al., 2015). Em alguns casos, a infecção por *Lymphocystivirus* pode atingir órgãos internos do animal como olhos, coração e baço (COLORNI; DIAMANT, 1995; CIULLI et al., 2015).

A doença apresenta evolução e duração variáveis dependendo da espécie infectada e da temperatura da água do tanque. Sabe-se que a principal forma de transmissão da doença é através da coabitação de animais infectados com peixes sadios; entretanto, não se sabe como o vírus se comporta fora do hospedeiro. Acredita-se que ele torna-se inativo e permanece viável por um grande período de tempo (KVITT; HEINISCH; DIAMANT, 2008).

Apesar da doença causada pelo LCDV ser benigna e na maioria das vezes não levar o peixe a óbito, apresenta grande importância visto que causa perdas econômicas significativas

ao reduzir o valor de mercado dos peixes infectados devido à aparência e também predispõe os animais infectados à ocorrência de infecções secundárias por bactérias (ALONSO et al., 2005; CIULLI et al., 2015).

A técnica utilizada no diagnóstico da doença consiste no isolamento viral; entretanto, existem poucas linhagens celulares susceptíveis ao LCDV (PEREZ-PRIETO et al., 1999; IWAMOTO et al., 2002), de modo que melhorias nas técnicas moleculares, associadas a realização de técnicas sorológicas, representam um avanço para a rápida detecção da doença nos animais infectados (GARCÍA-ROSADO et al., 2002; KITAMURA; JUNG; OH, 2006).

Já foram realizadas inúmeras tentantivas de replicação do LCDV *in vitro*, entretanto pouco é conhecido sobre o ciclo replicativo, bem como sobre o mecanismo exato pelo qual o vírus exerce sua patogenicidade (XU; FENG; HUANG, 2014).

Embora existam diversos estudos na área de vacinas para o LCDV, ainda não há medidas profiláticas ou tratamentos eficazes para a doença; desse modo, o diagnóstico rápido e eficaz é a melhor forma de controle para a proliferação da doença em aquários ou tanques comerciais (CANO et al., 2007; CIULLI et al., 2015).

2.5. Família *Alloherpesviridae*

A família *Alloherpesviridae* é composta por vírus que infectam peixes e anfíbios e é atualmente dividida em 4 gêneros: *Cyprinivirus, Batrachovirus, Salmonivirus* e *Ictalurivirus*, sendo que os vírus pertencentes ao gênero *Cyprinivirus* apresentam o maior genoma (248 – 295kb) dentro da ordem *Herpesvirales* (WALTZEK et al., 2009b; DAVISON et al., 2013; RAKUS et al., 2013).

Três vírus pertencentes ao gênero *Cyprinivirus*, família *Alloherpesviridae* e ordem *Herpesvirales*, são agentes etiológicos de doenças presentes em peixes ciprínideos. Esses vírus são denominados *Cyprinid herpesvirus 1* (CyHV-1), *Cyprinid herpesvirus 2* (CyHV-2) e *Cyprinid herpesvirus 3* (CyHV-3) (também conhecido como Koi herpesvirus), sendo que o primeiro e o terceiro causam doenças em carpas comum (*Cyprinus carpio carpio*) e carpas Koi (*Cyprinus carpio Koi*) e o *Cyprinid herpesvirus 2* causa a doença conhecida como necrose hematopoética dos dourados em peixes ornamentais da espécie *Carassius auratus* (DAVISON et al., 2013). Os três herpesvirus (CyHV-1, CyHV-2 e CyHV-3) apresentam 80% de homologia entre seus genomas de DNA fita dupla (AOKI et al., 2007; DAVISON et al., 2013; WANG; XU; LU, 2016).

A doença causada pelo CyHV-1 apresenta ampla distribuição geográfica e caracteriza-se pelo surgimentos de lesões proliferativas na pele, geralmente associadas a quedas na temperatura da água (DAVISON et al., 2013). A doença apresenta, em geral, 2 fases, a aguda e a recorrente. Na fase aguda são atingidos peixes juvenis causando altos índices de mortalidade entre os infectados, já na fase recorrente da doença ocorre o surgimento das lesões proliferativas ao longo do corpo do animal adulto com baixa taxa de mortalidade entre os animais (SANO; FUKUDA; FURUKAWA, 1985; SANO et al., 1990; SANO et al., 1993; DAVISON et al., 2013). Os peixes que sobrevivem à fase aguda tornam-se carreadores do vírus (SANO; MORIWAKE; HONDO, 1993; DAVISON et al., 2013).

Já a doença da necrose hematopoética dos dourados gera grandes perdas econômicas mundiais devido aos elevados índices de mortalidade da doença. O CyHV-2 afeta praticamente todas as idades dos peixes da espécie *Carassius auratus*, conhecidos popularmente como peixes-dourados ou Kinguio, e a virose ocorre principalmente no outono e na primavera, sendo que a temperatura ideal para a ocorrência de surtos está entre 15-25°C (XU et al., 2013). O primeiro relato de surto causado por CyHV-2 aconteceu no outono e na primavera de 1992 no Japão, causando a morte de peixes juvenis da espécie *Carrasius auratus* (JUNG; MIYAZAKI, 1995; XU et al., 2013) .

Há relatos da ocorrência de infecção por CyHV-2 em diversos países ao redor do mundo, entre eles podemos destacar: Japão, China, Estados Unidos, Austrália, Nova Zelândia e Reino Unido, sendo portanto um patógeno de ampla distribuição mundial (ITO; MAENO, 2014b; DING et al., 2014; MA et al., 2015).

Os peixes acometidos pelo CyHV-2 caracterizam-se externamente pelo surgimento de lesões e, internamente, os animais podem apresentar rins, fígado e baço de tamanho aumentado e de coloração pálida, e alguns tecidos podem apresentar nódulos granulares esbranquiçados (JUNG; MIYAZAKI, 1995; DAVISON et al., 2013). Os principais sinais clínicos característicos da doença são: letargia, inapetência, anorexia e palidez nas brânquias, sendo que a taxa de mortalidade varia de 50-100% (GOODWIN; MERRY; SADLER, 2006; XU et al., 2013; SAHOO et al., 2016). Apesar dos poucos dados epidemiológicos disponíveis sobre a doença, trata-se de uma enfermidade de difícil controle e principalmente erradicação (GOODWIN; MERRY; SADLER, 2006).

Os principais métodos de diagnóstico para a doença da necrose hematopoética dos dourados é a realização de técnicas moleculares como o PCR visando à amplificação do gene da DNA polimerase viral, exames histopatológicos e microscopia eletrônica (JUNG;

MIYAZAKI, 1995; GROFF et al., 1998; CHANG et al., 1999; STEPHENS; RAIDAL; JONES, 2004; GOODWIN; MERRY; SADLER, 2006).

No final dos anos de 1990, a produção mundial de carpas comuns e Koi sofreu graves abalos econômicos devido ao aparecimento de uma doença altamente contagiosa e virulenta, que posteriormente descobriu-se ser causada por um vírus de DNA pertencente à família *Alloherpesviridae* (MATSUI et al., 2008; MICHEL et al., 2010). Desde o ano de 1998, vários surtos com mortalidade em massa dessas espécies foram observados nos Estados Unidos, Alemanha, Bélgica, França, Dinamarca, Suiça, Áustria, Luxemburgo, Israel, Inglaterra, Itália, Holanda, Polônia, Indonésia e Japão, sendo que a doença já foi descrita em mais de 28 países ao redor do mundo (BERCOVIER et al., 2005; EL-MATBOULI; RUCKER; SOLIMAN, 2007; GARVER et al., 2010; SUNARTO et al., 2014; WANG et al., 2015).

A carpa comum, cujo nome científico é *Cyprinus carpio carpio* é uma das espécies mais antigas de água doce cultivadas, além disso é uma das espécies que apresenta maior valor econômico na aquicultura, movimentando um mercado bastante valioso (DONG et al., 2015; DAWOOD; KOSHIO, 2016).

Cerca de 2,9 milhões de toneladas por metro dessa espécie são produzidas anualmente no mundo (MICHEL et al., 2010). A produção de carpas comuns na maioria das vezes é voltada para consumo humano, sendo que a China foi uma das pioneiras na produção dessa espécie para essa finalidade (MICHEL et al., 2010; JAGRUTHI et al., 2014). Já as carpas Koi (*Cyprinus carpio Koi*), subespécie de carpa, geralmente colorida e bastante atraente pela beleza, tem sua produção focada nos colecionadores de peixes que exibem seus animais em grandes feiras de exposição (MICHEL et al., 2010).

Atualmente, com uma produção mundial de 3,4 milhões de toneladas por ano, a carpa comum é considerada uma das espécies com maior valor econômico agregado na aquicultura e uma das principais espécies de peixes com produção voltada para o consumo da população (RAKUS et al., 2013).

Entre as principais causas da rápida propagação do vírus pelos continentes, podemos destacar a intensa cultura de peixes, as exposições de carpas e o comércio nacional e internacional de espécies de peixes sem os laudos de saúde ou certificados de inspeções sanitárias (HEDRICK, 1996; GILAD et al., 2003; BERCOVIER et al., 2005). Além disso, as deficiências em métodos de diagnóstico rápido disponíveis no mercado atualmente e a ausência de leis mais rígidas para controlar e prevenir a introdução e expansão do vírus dentro dos diferentes países também contribui de forma significativa para propagação da doença (GARVER, 2010).

No início, o agente etiológico foi denominado *Koi herpesvirus* (KHV) devido a sua morfologia ser semelhante aos vírus que estão incluídos na ordem *Herpesvirales* (HEDRICK et al., 2000; MICHEL et al., 2010). Posteriormente, o vírus foi chamado de vírus da nefrite intersticial e da necrose de brânquias em carpas (CNGV), devido às lesões que surgem em decorrência da infecção pelo patógeno (RONEN et al., 2003; MICHEL et al, 2010). Recentemente, estudos do genoma do CyHV-3 demonstraram homologia do genoma viral com os herpesvírus ciprinídios. Desse modo, o vírus foi incluído na família *Alloherpesviridae*, gênero *Cyprinivirus* e denominado de *Cyprinid herpesvirus 3* (CyHV-3) (DAVISON et al., 2009; MICHEL et al., 2010).

A partícula viral de 170-200nm de diâmetro do CyHV-3 é composta por um capsídeo icosaédrico que envolve uma molécula única e linear de DNA dupla-fita de 295Kb, apresentando desse modo uma estrutura típica dos vírus da ordem *Herpesvirales* (HEDRICK et al., 2000; NEUKIRCH; KUNS, 2001; MICHEL et al., 2010). O CyHV-3 codifica 156 ORFS (Open Reading Frames) sendo que 40 proteínas estão presentes na partícula viral madura (DAVISON et al., 2013; ZHAO et al., 2015). Trata-se de um vírus de alta infecciosidade que pode permanecer viável em água por até 24 horas (PERELBERG et al., 2003; DISHON et al., 2005; SHIMIZU et al., 2006; SALEH; EL-MATIBOULI, 2015). A taxa de mortalidade dos animais infectados pelo CyHV-3 pode chegar a 100%, justificando a realização de diversas pesquisas sobre o vírus (GILAD et al., 2013; PIKARSKY et al., 2004; MONAGHAN et al., 2015).

Atualmente, o CyHV-3 apresenta três cepas que já tiveram seu genoma sequenciado completamente: a cepa de Israel (CyHV3-I), a cepa dos Estados Unidos (CyHV-3-U) e a cepa Japonesa (CyHV3-J), sendo que a análise dos genomas demonstram que há uma alta taxa de identidade entre elas (AOKI et al., 2007; RAKUS et al., 2013; LI et al., 2015). A existência dessas cepas permite a classificação em dois genótipos distintos de CyHV-3, sendo o genótipo Europeu que inclui as cepas CyHV-3-U e CyHV-3-I, e o genótipo Asiático que inclui a cepa CyHV-3-J (AOKI et al., 2007; KURITA et al., 2009; RAKUS et al., 2013; DONG et al., 2013). Atualmente, já foi determinada a sequência completa do genoma de uma nova cepa de CyHV-3 da China denominada de CyHV3-GZ11 (LI et al., 2015).

Visto que a pele é um dos órgãos mais afetados pela infecção por CyHV-3, considera-se que a principal rota de infecção do vírus no hospedeiro acontece por essa via (COSTES et al., 2009; ADAMEK et al., 2013). Além disso, a pele representa o primeiro local de replicação do vírus no hospedeiro (COSTES et al., 2009; MIWA et al., 2015). Há uma maior probabilidade de infecção pelo CyHV-3 de carpas expostas a variações diárias de temperatura,

sendo que a susceptibilidade do animal é maior em altas temperaturas (23°C e 28°C) e menor em baixas temperaturas (16°C) (YUASA; ITO; SANO, 2008; TAKAHARA et al., 2014). Parte dessa susceptibilidade é atribuída a um aumento nos níveis de costisol do peixe com consequente queda de imunidade decorrente do estresse causado pela variação de temperatura (VARSAMOS et al., 2006; YUASA; ITO; SANO, 2008; TAKAHARA et al., 2014).

Considerando que a temperatura média da água nos ambientes onde os peixes estão confinados exerce um papel importante na interação patógeno – hospedeiro, há relatos de ocorrência de surtos de infecção pelo *Koi herpesvirus* nas estações do ano como o outono e a primavera, visto que nesse período a temperatura da água permanece entre 18°C e 26°C (GILAD et al., 2003; PERELBERG et al., 2003; TAKAHARA et al., 2014).

A infecção por *Koi herpesvirus* pode se propagar através de peixes infectados, equipamentos de manejo contaminados, plâncton, moluscos e pássaros que se alimentam de peixes. Assim, podemos perceber que trata-se de uma doença de difícil controle e erradicação devido a grande quantidade de formas de transmissão (MATSUI et al. 2008; KIELPINSKI et al., 2010; MINAMOTO et al., 2011; FABIAN et al., 2015).

Os sinais clínicos mais característicos da infecção causada pelo CyHV-3 são olhos fundos, anorexia, descoloração, apatia, dispnéia, aumento da frequência respiratória, palidez, inchaço, brânquias irregulares e necrosadas e lesões na pele (HEDRICK et al., 2000; OH et al., 2001; GRAY et al., 2002; EL-MATBOULI; RUCKER; SOLIMAN, 2007; BAUMER et al., 2013; ADAMEK et al., 2014; NEGENBORN et al., 2015). Na maioria das vezes, as análises de cortes histológicos mostram proliferação em massa do epitélio das brânquias e inclusões intranucleares em células infectadas pelo CyHV-3 (EL-MATBOULI; RUCKER; SOLIMAN, 2007). Internamente, a animal pode apresentar aumento do rim e do baço (GILAD et al., 2004).

Os animais apresentam sintomatologia no período de 7 a 10 dias após serem infectados, sendo que os episódios de morte ocorrem entre o primeiro e o segundo dia após o aparecimento dos sinais clínicos (HEDRICK et al., 2000; SALEH; EL-MATIBOULI, 2015).

O diagnóstico presuntivo da doença inclui a observação da alta mortalidade de carpas *Koi* e carpas comuns, mesmo com a adoção de medidas para tratamentos contra bactérias e parasitas externos em água com temperatura variando de 18 a 26°C (GILAD et al., 2004). Por sua vez, a confirmação do diagnóstico de infecção por *Koi herpesvirus* depende da demonstração da presença do vírus através do isolamento do mesmo em cultivo celular, utilizando-se para isso linhagens de células da nadadeira de carpa *Koi* (*Koi fin*-KF-1) ou

outras células passíveis de infecção pelo KHV, seguido pelo teste de PCR (*polymerase chain reaction*) dos vírus isolados (GRAY et al., 2002; GILAD et al., 2002; GILAD et al., 2004).

Apesar do método padrão de escolha para diagnóstico do CyHV-3 ser a reação em cadeia pela polimerase, ele não é o mais indicado para a identificação da doença em portadores assintomáticos do vírus ou indivíduos que apresentem o vírus em estado de latência. Desse modo existe a necessidade constante de realizações de testes sob condições controladas na tentativa de melhorar os métodos de diagnósticos atualmente disponíveis (BERGMANN et al., 2010b).

Além da carpa, membro pertencente à família *Cyprinidae*, já foram detectadas infecções por CyHV-3 em outras 8 famílias de espécies de peixes de águas temperadas e tropicais, envolvendo mais de 25 espécies, entre as quais a tenca (*Tinca tinca*) e cascudo (*Ancistrus* sp.) encontrados no Brasil, muitas delas vivendo em condições de cohabitação com carpas e carreando assintomaticamente o vírus para as mesmas (RAKUS et al., 2013).

Apesar da existência de espécies de peixes refratárias à infecção pelo CyHV-3, elas podem se comportar como carreadores ou reservatórios naturais do vírus, de modo que ocorra a transmissão da doença para outras espécies de peixes susceptíveis em casos de coabitação em um mesmo tanque ou no ambiente natural dessas espécies em condições de temperatura ideal (FABIAN; BAUMER; STEINHAGEN, 2013; CHO et al., 2014). Existem relatos de infecção de carpas selvagens sadias (*Rutilus rutilus*) e tencas (*Tinca tinca*) quando colocadas em coabitação com peixes portadores de infecção pelo *Koi herpesvirus* (FABIAN; BAUMER; STEINHAGEN, 2013; CHO et al., 2014).

Infelizmente, o isolamento viral ou quantificação de KHV utilizando-se cultivo celular não apresenta sucesso, especialmente se a tentativa de isolamento é feita após várias horas da morte do espécime infectado ou se o mesmo foi congelado (GILAD et al., 2004). Desse modo, o teste diagnóstico de maior sensibilidade para a detecção de KHV consiste na reação em cadeia pela polimerase (GARVER, 2010). Devido à especificidade dos *primers* (nucleotídeos iniciadores) e tempo de realização, a PCR representa uma técnica molecular amplamente utilizada para a detecção e caracterização de enfermidades em seres humanos, em animais e plantas (FIGUEIREDO; LEAL, 2008).

Microscopias de exames histopatológicos revelam que os principais tecidos infectados pelo CyHV-3 são as brânquias, o rim e o baço; porém, alguns outros tecidos como cérebro, intestino, fígado, olhos e coração podem ser infectados, principalmente nas fases de latência da infecção (HEDRICK et al., 2000; GRAY et al., 2002; GILAD et al., 2003; GILAD et al., 2004; MIYAZAKI et al., 2008; EIDE et al., 2011; ADAMEK et al., 2014; MIWA et al.,

2015). Os testes de diagnósticos mais modernos geralmente usam fragmentos das brânquias, do fígado e do baço para tentativa de isolamento do agente viral e/ou realização de métodos moleculares (análise por PCR), embora essas técnicas tenham sensibilidade reduzida para detecção do vírus em portadores assintomáticos (GILAD et al., 2004).

Com um avanço na capacidade e na sensibilidade dos métodos atuais de detecção do CyHV-3 e uma necessidade de controlar e até mesmo impedir a disseminação do CyHV-3 pelos continentes através do comércio de peixes infectados, no ano de 2006, o Escritório Internacional de Epizootias incluiu a doença causada pelo *Koi herpesvirus* na lista de doenças de notificação obrigatória (GARVER, 2010). Por ser considerado um agente viral de grande relevância ecológica e econômica, a doença causada pelo CyHV-3 foi adicionada também a lista de doenças sérias notificáveis da União Européia (EU) (ENGELSMA et al., 2013).

Atualmente, há uma deficiência de métodos de controle eficientes aplicados especificamente para o KHV (GILAD et al. 2003). E, apesar da existência de várias pesquisas científicas voltadas para a caracterização e descrição do patógeno, além do diagnóstico rápido e preciso da doença, os dados científicos sobre sua epidemiologia são escassos, particularmente em relação a outras espécies de peixes permissivas à infecção e a dinâmica de infecção do vírus CyHV-3 dentro do ambiente dos tanques de aquicultura (BAUMER et al., 2013).

Como os herpesvírus humanos, o CyHV-3 induz infecções latentes que em situações de imunossupressão do hospedeiro são reativadas decorridos vários meses da exposição inicial do hospedeiro ao agente (ST-HILAIRE et al., 2005; BERGMANN et al., 2009; EIDE et al., 2011; BAUMER et al., 2013). Apesar do vírus já ter sido identificado em amostras de água de diferentes fontes, pouco é conhecido sobre a dinâmica da infecção pelo vírus dentro e entre os tanques (BAUMER et al., 2013).

3. JUSTIFICATIVA

Os vírus são agentes biológicos presentes em grande quantidade no planeta Terra e o surgimento de vírus causadores de doenças em peixes representa uma ameaça grave à aquicultura mundial e à pesca de organismos aquáticos, podendo causar grandes perdas econônicas e prejuízos ecológicos e sociais incalculáveis (WALKER; WINTON, 2010; ALAVANDI; POORNIMA, 2012).

Apesar disso, os métodos de diagnóstico disponíveis até o momento, como por exemplo as técnicas moleculares e os ensaios imunológicos, possuem capacidade limitada em identificar de maneira rápida os vírus emergentes que ameaçam os sistemas de produção de peixe (ALAVANDI; POORNIMA, 2012), em decorrência de reações sorológicas cruzadas e amplificações inespecíficas, particularmente com outros vírus estreitamente relacionados dentro de uma mesma família, e resultados falso negativos, em casos de alterações nas sequências de nucleotídeos/aminoácidos em epítopos/sequências-alvo de nucleotídeos. Além disso, a emergência de vírus patogênicos representa um entrave para o rápido crescimento do sistema aquícola mundial, visto que está diretamente relacionado à saúde da população (SUBASINGHE, 2005).

É importante ressaltar que a emergência de doenças virais apresenta grandes impactos negativos no âmbito social e ambiental dos países afetados, podendo levar a extinção de espécies selvagens e predadores naturais, causando desequilíbrios dos ecossistemas naturais do planeta (WALKER; WINTON, 2010).

Desse modo, torna-se cada vez mais necessário o rápido conhecimento das diversas espécies virais presentes no mundo e suas enfermidades associadas, mesmo em condições de saúde, realçando o papel de reservatórios naturais das espécies cultivadas na aquicultura (ALAVANDI; POORNIMA, 2012).

Os membros da família *Iridoviridae* apresentam uma ampla variedade de hospedeiros e sintomatologia associada, sendo que as espécies pertencentes aos gêneros *Ranavirus* e *Megalocytivirus* são consideradas vírus emergentes de alta importância econômica e ambiental (WHITTINGTON; BECKER; DENNIS, 2010). Embora os membros do gênero *Lymphocystivirus* apresentem pouca patogenicidade com índice de mortalidade reduzido, causam perdas econômicas significativas na aquicultura, pois afetam a aparência do peixe devido ao surgimento de lesões externas, comprometendo sua comercialização (KITAMURA; JUNG; OH, 2006; HOSSAIN et al., 2008). Isso evidencia a necessidade imediata de

pesquisas mais aprofundadas relacionadas a essa família tanto na área de técnicas de diagnóstico rápido como nas medidas de controle e erradicação do vírus.

O *Cyprinid herpesvirus 2* acomete principalmente peixes da espécie *Carassius auratus*, conhecidos popularmente como Kinguio, podendo causar 100% de mortalidade entre os peixes infectados (SAHOO et al., 2016). Além disso, estudos recentes sugerem que o vírus pode acometer outras espécies de peixes além do gênero *Carassius*, de modo que ressalva-se a importância da realização de estudos sobre as caracterísiticas do vírus e seu modelo de infecção, a fim de se evitar a disseminação do vírus entre outras espécies de peixes e prevenir o surgimento de novos surtos da doença (ITO; MAENO, 2014a).

O *Koi herpesvirus* infecta carpas Koi jovens e adultas que são uma das principais espécies de peixes produzidas na Ásia e apresenta uma alta taxa de letalidade (80-100%) nos peixes infectados (SOLIMAN; EL-MATBOULI, 2005; WALKER; WINTON, 2010; DONOHOE et al., 2015; MONAGHAN et al., 2015; ZHAO et al., 2015). Desse modo, a elevada mortalidade causada pelo vírus representa uma ameaça para o comércio internacional dessas espécies de carpa (SOLIMAN; EL-MATBOULI, 2005).

Além disso, carpas comuns expostas ao *Cyprinid herpesvirus 3* podem, em alguns casos, tornarem-se persistentemente infectadas com o agente, disssemínando-o para carpas sadias quando colocadas em tanques com outros peixes em temperaturas superior à 20°C (ST-HILAIRE et al., 2005). Outrossim, considerando a capacidade desses vírus de infectar outras espécies de peixes tropicais, tanto em ambientes naturais como de exploração zootécnica, torna-se premente o melhor conhecimento sobre a possível diversidade de espécies suscetíveis a infecção, tanto de forma sintomática como assintomática, elucidando, ainda que de maneira preliminar, o papel que essas espécies apresentam na cadeia epidemiológica das infecções por CyHV-3 em território paulista.

No Brasil, os dados oficiais sobre prejuízos econômicos oriundos de doenças que acometem peixes nas pisciculturas e nos centros comerciais são escassos; entretanto, os patógenos estão presentes e podem ameaçar o setor à medida que a aquicultura se desenvolve e os sistemas aquícolas se tornam maiores. Assim, devem existir legislações locais mais severas na tentativa de se evitar a introdução de patógenos através da importação de peixes na ausência de certificações de saúde (LIMA, 2007).

Desse modo, o projeto em questão, através da utilização de técnicas de diagnóstico e epidemiologia moleculares, pretende contribuir para a melhor compreensão da importância e das infecções causadas pelos *Cyprinid herpesvirus 1*, *Cyprinid herpesvirus 2*, *Cyprinid herpesvirus 3*, *Megalocytivirus* e *Lymphocystivirus* em peixes de vida livre, oriundos de

tanques de criação comerciais do interior do estado de São Paulo (regiões nordeste e centro-leste) e espécies ornamentais oriundas da cidade de São Paulo, possibilitando assim a obtenção de dados de grande utilidade na caracterização da sanidade de peixes brasileiros, trazendo subsídios para posterior desenvolvimento e estabelecimento de estratégias visando o controle e prevenção das enfermidades causadas pelos vírus estudados.

4. OBJETIVOS

Nesse contexto, tendo-se em vista a necessidade de estudos envolvendo a possível circulação de *Cyprinid herpesvirus 1, Cyprinid herpesvirus 2, Cyprinid herpesvirus 3, Megalocytivirus e Lymphocystivirus* em peixes brasileiros ornamentais, comerciais e de vida livre, enfocando-se o diagnóstico laboratorial através de técnicas moleculares, empreendeu-se o presente projeto que teve como objetivos:

1. Caracterizar peixes coletados dentro da região compreendida pelas bacias hidrográficas dos rios Mogi Guaçu e Pardo, bem como peixes ornamentais recebidos no Laboratório de Higiene Zootécnica (FZEA-USP), incluindo aqueles oriundos de criações comerciais e de espécimes de vida livre, de acordo com a espécie e presença ou ausência de sinais clínicos;

2. Realizar o diagnóstico molecular de infecções causadas por *Cyprinid herpesvirus 1*, *Cyprinid herpesvirus 2*, *Cyprinid herpesvirus 3*, *Megalocytivirus* e *Lymphocystivirus* pela técnica de PCR, a partir de amostras clínicas dos espécimes coletados;

3. Realizar a caracterização molecular dos fragmentos genômicos obtidos através de análises de similaridade, filogenética, evolutiva e de polimorfismos, envolvendo sequências de estirpes descritas na literatura e/ou depositadas em banco de dados pertinente.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Coleta de peixes e amostras

Foram coletados um total de 306 peixes em criações comerciais, pesqueiros e rios na área compreendida pelas bacias hidrográficas dos rios Pardo e Mogi Guaçu, nas regiões nordeste e centro-leste do estado de São Paulo, além de peixes ornamentais oriundos de estabelecimentos comerciais do estado de São Paulo. Entre as espécies de vida livre coletadas, tem-se a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), curimba (*Prochilodus spp*.), pacu (*Mylossoma spp.*), cascudo (*Ancistrus sp*.) e carpas (*Cyprinus carpio*). Já entre as espécies de peixes ornamentais coletadas tem-se: Lebiste (*Poecilia reiticulata*), Piranha-Vermelha (*Pygocentrus nattereri*), Ácara Bandeira (*Pterophyllum scalare*), Plati (*Xiphophorus maculatus*), Kinguio (*Carassius auratus*), Dojô (*Misgurnus anguillicaudatus*) e Tricogaster (*Trichogaster leeri*). Posteriormente à realização da coleta, os peixes coletados foram identificados, examinados clinicamente para a detecção de lesões aparentes, eutanasiados e mantidos a -20ºC até a realização da coleta de amostras dos tecidos (fígado, baço e rim) que posteriormente foram utilizados para a extração do DNA e diagnóstico molecular. Para a extração de DNA foram coletados fragmentos de aproximadamente 50mg desses tecidos (pool) e estocados a -20°C.

5.2. Diagnóstico molecular das infecções por CyHV-1, CyHV-2, CyHV-3, M*egalocytivirus* e *Lymphocystivirus*

5.2.1. Extração de DNA

Aproximadamente 50 mg de tecidos (*pool* de tecidos) foram fragmentados e submetidos a extração de DNA utilizando-se o kit NucleoSpin Extract II (Macherey-Nalgel, Alemanha). Após a extração, o DNA foi solubilizado em 60µL água livre de nucleases (Life Technologies™/Thermo Fisher Scientific, EUA) e armazenado a – 80°C até o seu uso. A concentração de DNA foi mensurada por espectrofotometria (DS-11, DeNovix, EUA), segundo a razão de absorbância A_{260}/A_{280}.

5.2.2. *Primers*

5.2.2.1. *Cyprinid herpesvirus 3* (CyHV-3)

Os primers foram selecionados para a amplificação de fragmentos do gene da Timidina Kinase (TK) (nomeados como KHV F_1, KHV R_1, KHV F_2 e KHV R_2) do CyHV-3 de acordo com BERCOVIER et al. (2005) e POKOROVA et al. (2010), bem como da β-actina de peixe. As sequências dos primers utilizados, os respectivos tamanhos dos produtos amplificados, bem como os genes alvos correspondentes estão descritos na tabela 1.

Tabela 1 - *Primers* utilizados na obtenção de produtos de PCR do gene TK de CyHV-3.

Nome	Orientação	Sequência (5' - 3')	Gene	Produto (bp)
KHV F_1	Senso	GGGTTACCTGTACGAG	*Timidina Kinase*	409[a]
KHV R_1	Senso	CACCCAGTAGATTATGC	*Timidina Kinase*	
KHV F_2	Antisenso	CGTCTGGAG GAATACGAC G	*Timidina Kinase*	348[b]
KHV R_2	Senso	ACCGTACAGCTCGTACTGG	*Timidina Kinase*	
Fish Actin-F	Senso	GTAGATATCCGTAAGGACCT	β-*Actina*	209
Fish Actin-R	Antisenso	CACATCTGCTGGAAGGTGG	β-*Actina*	

[a] BERCOVIER, H. et al. Cloning of the *koi herpesvirus* (KHV) gene encoding thymidine kinase and its use for a highly sensitive PCR based diagnosis. **BMC Microbiology**, London, v. 5, n. 13, p. 1-9, 2005.; [b] POKOROVA, D. et al. Detection of Cyprinid Herpesvirus-3 in field samples of common and koi carp by various single-round and nested PCR methods. **Journal of the World Aquaculture Society,** Hoboken, v. 41, n. 5, p. 773-779, 2010.

5.2.2.2. *Cyprinid herpesvirus 1* (CyHV-1) e *Cyprinid herpesvirus 2* (CyHV-2)

Para a detecção molecular simultânea de *Cyprinid herpesvirus 1* (CyHV-1) e *Cyprinid herpesvirus 2* (CyHV-2), seguiram-se as recomendações de SHLAPOBERSKY et al. (2010), cujo protocolo também iclui a detecção de *Cyprinid herpesvirus 3* (CyHV-3). Para tanto, foram utilizados primers degenerados (Tabela 2) com base no gene da DNA polimerase viral que é conservado entre as espécies. Os *primers* foram assim denominados I-ILK, I-DFA, I-KGI, I-TGV e I-IYG.

Tabela 2 - *Primers* degenerados utilizados na obtenção de produtos de PCR dos genes da DNA Polimerase de CyHV-1, CyHV-2 e CyHV-3.

Nome	Orientação	Sequência (5' - 3')	Gene	Produto (bp)
I-ILK	Senso	TCCTGGACAAGCAGCARIYSGCIMTIAA	*DNA polimerase*	
I-DFA	Senso	GAYTTYGCIAGYYTITAYCC	*DNA polimerase*	
I-KG1	Antissenso	GTCTTGCTCACCAGITCIACICCYTT	*DNA polimerase*	170[a]
I-TGV	Senso	TGTAACTCGGTGTAYGGTGT	*DNA polimerase*	
I-IYG	Antissenso	ACAGAGTCCGTRTCICCRTAIAT	*DNA polimerase*	

[a] SHLAPOBERSKY, M. et al. Viral encephalitis of tilapia larvae: Primary characterization of a novel herpes-like virus. **Virology**, Waltham, v. 399, p. 239-247, 2010.

5.2.2.3.Família *Iridoviridae*

Foram utilizados 2 pares de *primers* para a amplificação do gene MCP de *Megalocytivirus*, denominados MV-F/MV-R e nMV-F/nMV-R de acordo com CHOI et al. (2006). Para o diagnóstico de *Lymphocystivirus*, foi utilizado um par de *primers* descrito por KITAMURA; JUNG; OH (2006) e denominados LCDV-F/LCDV-R que foi desenhado com base numa região conservada do gene MCP dos três genótipos virais conhecidos (LCDV GI, LCDV GII e LCDV GIII). Posteriormente, foram utilizados primers senso (LCDV GI, LCDV GII e LCDV GIII) desenhados com base em uma região hipervariável do gene MCP do *Lymphocystivirus* de acordo com KITAMURA; JUNG: OH (2006) juntamente com o *primer* LCDV-R. Os *primers* citados encontram-se descritos na tabela 3. Como controle interno foi utilizado o par de *primers* para amplificação de fragmento do gene para β-actina, como descrito anteriormente na tabela 1.

Tabela 3. *Primers* utilizados na obtenção de produtos de PCR dos genes MCP de *Megalocytivirus e Lymphocystivirus*.

Nome	Orientação	Sequência (5' - 3')	Gênero	Produto (bp)
MV-F	Senso	ATGTCTGCAATCTCAGGTG	*Megalocytivirus*	1.362[a]
MV-R	Antissenso	TTACAGGATAGGGAAGCCTGC	*Megalocytivirus*	
nMV-F	Senso	CACCGCAACGTGCAAAGCAA	*Megalocytivirus*	369[a]
nMV-R	Antissenso	TTGACTGCAATAACGACCAGTTCAAAC	*Megalocytivirus*	
LCDV-F	Senso	YTGGTTCAGTAAATTACCRG	*Limphocystivrus*	609[b]
LCDV-R	Antissenso	GTAATCCATACTTGHACRTC	*Limphocystivrus*	
LCDV GI	Senso	TTAGATTATTGGGCAGCGTT	*Limphocystivrus*	341[b]
LCDV GII	Senso	TYGATTCCAAYGGTCAATTA	*Limphocystivrus*	250[b]
LCDV GIII	Senso	AGGAAATAACAACCGTATGAATGCA	*Limphocystivrus*	468[b]

[a] CHOI, S. K. et al. Organ distribution of red sea bream iridovirus (RSIV), DNA in asymptomatic yearling and fingerling rock bream (*Oplegnathus fasciatus*) and effects of water temperature on transmition of RSIV into acute phase. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 256, p. 23-26, 2006. ; [b] KITAMURA, S.; JUNG, S. J.; OH, M. J. Differentiation of lymphocystis disease virus genotype by multiplex PCR. **The Journal of Microbiology**, Seoul, v. 44, p. 248-253, 2006.

5.2.3. PCR e *nested*-PCR

5.2.3.1. *Cyprinid herpesvirus 3*

O DNA obtido após a realização da extração foi submetido à reação em cadeia pela polimerase (PCR) por meio da utilização de quatro *primers*, baseados na sequência do gene Timidina Kinase (TK). O par KHV-F_1/KHV-R_1 foi utilizado para o PCR inicial e o par KHV-F_2/KHV-R_2 para o *nested*-PCR, com produtos esperados de 409 pares de bases (pb) e 348pb. Utilizou-se a amplificação de produto do gene da β-actina de peixes como controle interno e para o controle negativo foi utilizado alíquota livre de nucleases.

Para as reações de PCR, foi utilizado o kit GoTaq® Colorless Mastermix 2X (Promega, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Em síntese, 1µL do DNA extraído do *pool* de tecidos (fígado, rim e baço) foi misturado com 12,5µL de GoTaq® Colorless Mastermix 2X, 1µL do *primer* senso específico (KHV F_1 ou KHV F_2) a 10µM, 1µL do *primer* antissenso específico (KHV R_1 ou KHV R_2) a 10µM e 9,5µL de água livre de nucleases, totalizando 25µL.

Posteriormente, para as reações de PCR foram utilizados os componentes da reação separadamente. Em síntese, 1µL do DNA extraído do *pool* de tecidos (fígado, rim e baço) foi misturado com 0,25µL de Platus *Taq* DNA Polymerase 5U/µL (Sinapse Inc. EUA), 2,5µL de 10X Tampão com KCl, 1µL do *primer* senso específico (KHV F_1 ou KHV F_2) a 10µM, 1µL do *primer* antissenso específico (KHV R_1 ou KHV R_2) a 10µM, 2,0µL de $MgCl_2$ (Promega, EUA), 0,5 dNTP mix 10mM (Promega, EUA) e 17,75µL de água livre de nucleases totalizando 25µL.

A reação de PCR para a β-actina constituiu, em síntese, de 1µL do DNA extraído do *pool* de tecidos (fígado, rim e baço), 12,5µL de GoTaq® Colorless Mastermix 2X, 1,5µL do *primer* senso específico (Fish Actin-F) a 10µM, 1µL do *primer* antissenso específico (Fish Actin-R) a 10µM e 8,5µL de água livre de nucleases, totalizando 25µL.

O protocolo de termociclagem empregado (Swift™ MaxPro Thermal Cycler, Esco Technologies Inc., EUA) para a primeira reação visando a amplificação do fragmento de 409pb compreendeu: incubação inicial a 94ºC por 5min, e, em seguida, 40 ciclos de 95ºC por 1 minuto, anelamento a 55ºC por 1 minuto e extensão a 72ºC por 1 minuto, com uma extensão final a 72ºC por 10 minutos, conforme recomendações da OIE (2012). O protocolo de termociclagem para a amplificação do fragmento de 348pb (*nested*-PCR), como recomendado por POKOROVA et al. (2010) compreendeu uma incubação inicial a 94ºC por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de 95ºC por 1 minuto, 55ºC por 1 minuto, 72ºC por 1 minuto e uma extensão final a 72ºC por 10 minutos.

Para amplificação do fragmento de β-actina foi utilizado o seguinte protocolo de termociclagem: incubação inicial a 95ºC por 2 minutos, seguido de 30 ciclos de 95ºC por 30 segundos, 55ºC por 30 segundos, 72ºC por 15 segundos e uma extensão final a 72ºC por 5 minutos.

Os amplicons obtidos no PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão Tris-Acetato/EDTA (TAE 1X), incluindo-se padrão de tamanho molecular de 100pb (GE Healthcare, EUA). Posteriormente, o gel foi corado em solução de SYBR®*Gold nucleic acid gel stain* (Life Technologies™/Thermo Fisher Scientific, EUA) e observado à luz UV, utilizando-se sistema de foto documentação L-Pix ST e *software* L-Pix Image (Loccus Biotecnologia, Brasil).

5.2.3.2. *Cyprinid herpesvirus* 1 e *Cyprinid herpesvirus* 2

Para as reações de PCR foi utilizado o kit GoTaq® Colorless Mastermix 2X (Promega, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Em síntese, 1µL do DNA extraído do *pool* de tecidos (fígado, rim e baço) foi misturado com 12,5µL de GoTaq® Colorless Mastermix 2X, 1µL do *primer* senso (I-ILK) a 10µM, 1µL do *primer* senso (I-TGV) a 10µM, 1µL do *primer* antissenso (I-KG1) a 10µM e 8,5µL de água livre de nucleases, totalizando 25µL. Utilizou-se a amplificação de produto do gene da β-actina de peixes como controle interno conforme descrito anteriormente e, para o controle negativo, foi utilizado alíquota livre de nucleases.

Para o *nested*-PCR, 1µL do DNA extraído do *pool* de tecidos (fígado, rim e baço) foi misturado com 12,5µL de GoTaq® Colorless Mastermix 2X, 1µL do *primer* senso (I-TGV) a 10µM, 1µL do *primer* antissenso (I-IYG) a 10µM e 9,5µL de água livre de nucleases, totalizando 25µL.

O protocolo de termociclagem empregado (Swift™ MaxPro Thermal Cycler, Esco Technologies Inc., EUA) para as ambas as reações visando a amplificação do fragmento de 170pb compreendeu: incubação inicial a 94ºC por 4min, e, em seguida, 45 ciclos de 94ºC por 30 segundos, anelamento a 46ºC por 1 minuto e extensão a 72ºC por 1 minuto, com uma extensão final a 72ºC por 7 minutos, conforme recomendações de SHLAPOBERSKY et al. (2010).

5.2.3.3. Família *Iridoviridae*

Para as reações de PCR para *Megalocytivirus* foi utilizado o kit GoTaq® Colorless Mastermix 2X (Promega, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Em síntese, 1µL do DNA extraído do *pool* de tecidos (fígado, rim e baço) foi misturado com 12,5µL de GoTaq® Colorless Mastermix 2X, 1µL do *primer* senso específico (MV-F ou nMV-F) a 10µM, 1µL do *primer* antissenso específico (MV-R ou nMV-R) a 10µM e 9,5µL de água livre de nucleases, totalizando 25µL. Utilizou-se a amplificação de produto do gene da β-actina de peixes como controle interno conforme descrito anteriormente e, para o controle negativo, foi utilizado alíquota livre de nucleases.

O protocolo de termociclagem empregado (Swift™ MaxPro Thermal Cycler, Esco Technologies Inc., EUA) para a primeira reação visando a amplificação do fragmento de 1.362pb compreendeu: incubação inicial a 95ºC por 1min, e, em seguida, 30 ciclos de 94ºC por 30 segundos, anelamento a 58ºC por 1 minuto e extensão a 72ºC por 1 minuto, com uma

extensão final a 72ºC por 5 minutos, conforme recomendações da OIE (2012). O protocolo de termociclagem para a amplificação do fragmento de 369pb (*nested*-PCR), como recomendado por OIE (2012) foi idêntico ao utilizado para a amplificação do fragmento de 1.362pb.

Os amplicons obtidos no *nested*-PCR para *Megalocytivirus* foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão Tris-Acetato/EDTA (TAE 1X), incluindo-se padrão de tamanho molecular de 100pb (GE Healthcare, EUA). Posteriormente, o gel foi corado em solução de SYBR®*Gold nucleic acid gel stain* (Life Technologies™/Thermo Fisher Scientific, EUA) e observado à luz UV, utilizando-se sistema de fotodocumentação L-Pix ST e *software* L-Pix Image (Loccus Biotecnologia, Brasil).

Para as reações de PCR para *Lymphocystivirus* foi utilizado inicialmente o kit GoTaq® Colorless Mastermix 2X (Promega, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Em síntese, 1µL do DNA extraído do *pool* de tecidos (fígado, rim e baço) foi misturado com 12,5µL de GoTaq® Colorless Mastermix 2X, 1µL do *primer* senso específico (LCDV-F) a 10µM, 1µL do *primer* antissenso específico (LCDV-R) a 10µM e 9,5µL de água livre de nucleases, totalizando 25µL. Posteriormente, utilizaram-se os *primers* mais específicos para os três genótipos de *Lymphocystivirus* conforme segue: 1µL do DNA extraído do *pool* de tecidos (fígado, rim e baço) foi misturado com 12,5µL de GoTaq® Colorless Mastermix 2X, 1µL do *primer* senso LCDV GI a 10µM, 1µL do *primer* senso LCDV GII a 10µM , 1µL do *primer* senso LCDV GIII a 10µM , 1µL do *primer* antissenso LCDV-R a 10µM e 7,5µL de água livre de nucleases, totalizando 25µL.

O protocolo de termociclagem empregado (Swift™ MaxPro Thermal Cycler, Esco Technologies Inc., EUA) para a reação visando a amplificação dos fragmentos de 341pb, 250pb e 468pb compreendeu: incubação inicial a 95ºC por 3min, e, em seguida, 30 ciclos de 95ºC por 1 minuto, anelamento a 58ºC por 1 minuto e extensão a 72ºC por 1 minuto, com uma extensão final a 72ºC por 5 minutos, conforme KITAMURA; JUNG; OH (2006).

Os amplicons obtidos no PCR para *Lymphocystivirus* foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2,0% em tampão Tris-Acetato/EDTA (TAE 1X), incluindo-se padrão de tamanho molecular de 100pb (GE Healthcare, EUA). Posteriormente, o gel foi corado em solução de SYBR®*Gold nucleic acid gel stain* (Life Technologies™/Thermo Fisher Scientific, EUA) e observado à luz UV, utilizando-se sistema de foto documentação L-Pix ST e *software* L-Pix Image (Loccus Biotecnologia, Brasil).

5.2.4. Extração de DNA de Gel de Agarose

Para as amostras positivas ao *nested*-PCR, foi realizada a extração dos fragmentos de DNA dos géis de agarose, após reamplificação pelo PCR anteriormente descrito (item 5.2.3), utilizando o kit illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare, EUA), segundo as recomendações do fabricante. O procedimento de extração de DNA envolveu a excisão do fragmento do gel de agarose, por meio de lâmina de vidro estéril, sendo acondicionado em microtubo estéril. Em seguida, o fragmento excisado foi pesado em balança analítica, uma vez que, de acordo com o protocolo, para cada 100mg do gel de agarose deve-se acrescentar 100µL de Buffer NT tipo 3, primeiro reagente utilizado no protocolo de extração. Uma vez adicionado o tampão NT, as amostras foram incubadas em temperatura de 60°C por 15 a 30 minutos, sendo submetidas à homogeneização em vórtex a cada 2-3 minutos até a completa dissolução do fragmento de gel. Na sequência, a amostra foi colocada em coluna com membrana de sílica do illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit, apoiada em tubo coletor, incubada por 1 minuto em temperatura ambiente e submetida à centrifugação por 30 segundos a 11.000 × *g*, em temperatura ambiente, descartando-se o conteúdo que passou pelo filtro e colocando-se a coluna novamente no tubo coletor. Procedeu-se então a lavagem da membrana de sílica; para tanto, foram adicionados 500µL de Wash Buffer tipo 1 na coluna, submetendo-a à centrifugação a 11.000 × *g* durante 30 segundos; novamente o eluato foi descartado e a coluna colocada no tubo coletor. A secagem da membrana de sílica foi realizada através da centrifugação a 11.000 × *g* durante 30 segundos, a fim de se remover o tampão Wash Buffer tipo 1 completamente.

Por fim, o DNA foi eluído com 18µL do tampão Elution Buffer tipo 6 em microtubo estéril de 1,5mL, deixando-se, inicialmente, a coluna em repouso, após a adição do eluente, em temperatura ambiente por 1 minuto, sendo, na sequência, submetida à centrifugação por 11.000 × *g*, durante 1 minuto, em temperatura ambiente. O DNA obtido para cada amostra através do procedimento de extração de DNA de géis de agarose foi devidamente quantificado, em nanograma/microlitro (ng/µL), por espectrofotometria (DS-11/DS-11 + Spectrophotometer, DeNovix, EUA), segundo a razão de absorbância A_{260}/A_{280}, com o intuito de se determinar a quantidade de DNA em cada amostra, uma vez que, para a realização do sequenciamento dos fragmentos genômicos obtidos, as amostras testadas precisam apresentar concentração mínima de DNA de 15ng/µL. Adicionalmente à quantificação por espectrofotometria, foi realizada a eletroforese em gel de agarose utilizando-se marcador de massa molecular (Low DNA Mass™ Ladder, Life Technologies, EUA) para estimativa da

quantidade de DNA dos fragmentos genômicos obtidos. Para tanto, os amplicons obtidos na extração de DNA a partir de gel de agarose foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão Tris Acetato/EDTA (TAE 1X), num volume de 4µL por amostra, adicionado de um volume de 1µL de uma solução contendo 10mM Tris-HCl, 10mM EDTA, 0,3% (w/v) de azul de bromofenol e 65% (p/v) de sacarose, pH=7,5 (tampão de carregamento) (BlueJuice™ GelLoading Buffer, Life Technologies, EUA). O marcador de massa molecular foi também utilizado num volume de 4µL com 1µL do tampão de carregamento, volumes idênticos aos aplicados às amostras para uma confiável estimativa da massa molecular dos amplicons obtidos.

5.2.5. Sequenciamento Nucleotídico

A reação de sequenciamento foi realizada com a utilização do BigDye®Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems/ Thermo Fisher Scientific, EUA), contendo AmpliTaq DNA Polymerase, de acordo com as especificações do fabricante, e dos *primers* senso e antissenso utilizados no *nested*-PCR. As reações foram preparadas em microplaca de 96 cavidades (MicroAmp Optical 96 wells, Applied Biosystems/Thermo Fisher Scientific, EUA) e o sequenciamento foi realizado num sequenciador automático Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer (Life Technologies™/Thermo Fisher Scientific, EUA) no Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

5.2.6. Alinhamento de Sequências Nucleotídicas

A busca de similaridade das seqüências geradas e editadas com o programa BioEdit 7.0.9 (HALL et al., 1999) foi realizada pelo programa BLAST versão 2.0 (ALTSCHUL et al., 1997). A edição e alinhamento múltiplo das seqüências nucleotídicas obtidas foram realizadas com o programa ClustalW versão 1.4 (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994), implementado no programa BioEdit Sequence Alignment Editor versão 7.0.2 (HALL, 1999), utilizando-se, para tanto, dos parâmetros em ‘default’ e sequências depositadas no GenBank. A visualização do alinhamento, utilizando-se as sequências deduzidas de aminoácidos, foi realizada através do programa Jalview versão 2.8.1 (WATERHOUSE et al., 2009).

Matrizes de distâncias, dadas em porcentagens de similaridade/identidade, entre as sequências nucleotídicas foram calculadas através do programa MatGAT versão 2.0 (CAMPANELLA; BITINCKA; SMALLEY, 2003), utilizando algoritmo de alinhamento

global.

5.2.7. Análise Filogenética

Reconstruções filogenéticas, utilizando-se o programa MEGA 7.0 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016), para sequências de 250 nucleotídeos, 369 nucleotídeos e 348pb relativas ao gene MCP de *Lymphocystivirus* e de *Megalocytivirus*, bem com o gene TK de *Cyprinid herpesvirus 3* respectivamente, foram realizadas através do método *Maximum Likelihood* (ML), utilizando-se os seguintes modelos de substituição, baseados no critério de informação de Akaike (*Akaike information criterion*, AIC) ou AIC corrigido (AICc), conforme determinado pelo programa jModelTest v.2.1.5 (POSADA, 2008) e com suporte nodal de bootstrap para 1000 pseudo-réplicas: HKY (Hasegawa-Kishino-Yano) + G para *Lymphocystivirus* (distribuição gama, α=0,67) e *Megalocytivirus* (distribuição gama, α=1,48), e TrN (Tamura-Nei) para *Cyprinid herpesvirus* 3 (HASEGAWA; KISHINO; YANO, 1985; TAMURA; NEI, 1993). Para as reconstruções, foram utilizadas outras sequências de *Megalocytivirus*, *Lymphocystivirus* e *Cyrpinid herpesvirus 3* depositadas no GenBank, conforme indicado nas tabelas 4, 5 e 6.

Tabela 4 – Sequências nucleotídicas de *Lymphocystivirus* utilizadas para reconstrução filogenética com indicação de nome, genótipo, origem e respectivos números de acesso no GenBank.

Nome	Genótipo	Origem	N° de Acesso GenBank
LCDV-1	LCDV GI	Europa	L63545
LCDV-C	LCDV GII	China	AY380826
KLDV-1	LCDV GII	Coréia	AY297741
PG06	LCDV GVI	Coréia	AB299164
PGF05	LCDV GV	Coréia	AB299163
LCDV RC	LCDV GIV	China	EF059992
LCDV RC-Taiwan	LCDV GIV	Taiwan	EF378607
JF00Kuma	LCDV GII	Japão	AB212997
JF03Yoshi	LCDV GII	Japão	AB212998
JF03ShinJi	LCDV GII	Coréia	AB213000
SB98Yosu	LCDV GIV	Coréia	AB247938
JF00Yosu	LCDV GII	Coréia	AB212999
JF03GunNeA	LCDV GII	Coréia	AB213001
JF03GunNeB	LCDV GII	Coréia	AB213002
JF04JeJu	LCDV GII	Coréia	AB213003
RF03Yosu	LCDV GIII	Coréia	AB213004
RF04Yosu	LCDV GIII	Coréia	AB213005
RF04JinJu	LCDV GIII	Coréia	AB213006
LCDV-RF	LCDV GIII	Coréia do Sul	AY823414
SAEilat	LDCV GVII	Israel	EF184306
LCDV-K1	LCDV GII	Coréia	AY303804
LCDV-RC	LCDV GIV	China	EF103188

Fonte: Própria autoria.

Tabela 5 – Sequências nucleotídicas de *Megalocytivirus* utilizadas para reconstrução filogenética com indicação de nome, origem e respectivos números de acesso no GenBank.

Nome	Origem	N° de Acesso GenBank
Orange-Spotted Grouper Iridovirus	China	AY894343
Infectious Spleen and Kidney Necrosis Virus	China	AF371960
Rock Bream Iridovirus	Coréia do Sul	AY532606
Sea Bass Iridovirus	Japão	AB109372
African Lampeye Iridovirus	Japão	AY285745
Grouper Sleepy Disease Iridovirus	Tailândia	AY285746
Red Sea Bream Iridovirus	Japão	AY310918
Rock Bream Iridovirus	Coréia	AY532608
Rock Bream Iridovirus	Coréia	AY532613
Turbot Reddish Body Iridovirus	China	AY590687
Murray Cod Iridovirus	Austrália	AY936203
Dwarf Gourami Iridovirus	Austrália	AY989901
Turbot Iridovirus	Coréia	AB166788
Dwarf Gourami Iridovirus	Japão	AY285744
Sea Bass Iridovirus	China	AY310917
Rock Bream iridovirus	Coréia	AY532607
Rock Bream iridovirus	Coréia	AY533035
Korean Flounder Iridovirus	Coréia	AY633988
Rock Bream Iridovirus	Coréia do Sul	AY849393
Olive Flounder Iridovirus	Coréia do Sul	DQ198145
Giant Seaperch Iridovirus	Taiwan	EU315313
Red Sea Bream Iridovirus	Japão	AB080362
Dwarf Gourami Iridovirus	Malásia	AB109369
Grouper Sleepy Disease Iridovirus	Tailândia	AB109370
Sea Bass Iridovirus	Coréia	AB178942
Red Sea Bream Iridovirus	Japão	AB263097
Red Sea Bream Iridovirus	Japão	AB461855
Infectious Spleen and Kidney Necrosis Virus	China	AF370008
Korean Flounder Iridovirus	Coréia	AY633980
Korean Flounder Iridovirus	Coréia	AY633990
Olive Flounder Iridovirus	Coréia do Sul	AY661546
Large Yellow Croaker Iridovirus	China	AY779031
Olive Flounder Iridovirus	Coréia	EU276417
Silver Sea Bream Iridovirus	Taiwan	EU847419
Common Ponyfish Iridovirus	Taiwan	EU847420

Fonte: Própria autoria.

Tabela 5 – Sequências nucleotídicas de *Megalocytivirus* utilizadas para reconstrução filogenética com indicação de nome, origem e respectivos números de acesso no GenBank (continuação).

Nome	Origem	N° de Acesso GenBank
African Lampeye Iridovirus	Indonésia	AB109368
Red Sea Bream Iridovirus	Japão	AB109371
Red Sea Bream Iridovirus	Hong Kong	AB666318
Infectious Spleen and Kidney Necrosis Virus	Malásia	AB666337
King Grouper Iridovirus	Taiwan	EU847414
King Grouper Iridovirus	Taiwan	EU847415
Spotted Knifejaw Iridovirus	China	GQ202216
Turbot Reddish Body Iridovirus	China	GQ273492
Sea Perch Iridovirus	Coréia do Sul	HM067603
Marble Sleepy Goby Iridovirus	China	HM067835
Stone Flounder Iridovirus	China	HQ263620
Perch Iridovirus	China	HQ263621
Infectious Spleen and Kidney Necrosis Virus	China	HQ317459
Infectious Spleen and Kidney Necrosis Virus	China	HQ317463
Threespine Sticklibacк Iridovirus	Canadá	HQ857785
Grouper Iridovirus	Taiwan	JF264345
Giant Seaperch Iridovirus	Taiwan	JF264346

Fonte: Própria autoria.

Tabela 6 – Sequências nucleotídicas de *Cyprinid herpesvirus 3* utilizadas para reconstrução filogenética com indicação de nome, origem e respectivos números de acesso no GenBank.

Nome	Origem	N° de Acesso GenBank
KHV-GZ10	China	JQ247182
KHV-GZ11	China	JQ247183
KHV-J	Japão	AP008984
IR KHV2	Irã	KT290517
IR KHV	Irã	KP280047
Indo 8C05EK2	Indonésia	HM347110
Indo 4C03SS2	Indonésia	HM347103
Indo 7C04NS1	Indonésia	HM347106
Indo 0K02SS1	Indonésia	HM347113
Indo 2K02J2	Indonésia	HM347101
Indo 10C06WP4	Indonésia	HM347111
Indo 3C06WJ3	Indonésia	HM347102
Indo 5C04WS1	Indonésia	HM347105
Indo 7C06NS3	Indonésia	HM347107
Indo C07	Indonésia	HM347099
Indo K07	Indonésia	HM347098
UK G406	Reino Unido	HM347097
Indo 0C05WNT2	Indonésia	HM347112
Indo 1C02EJ4	Indonésia	HM347100
Indo 4C03B1	Indonésia	HM347104
Indo 6C06SK1	Indonésia	HM347108
Indo 8C05EK1	Indonésia	HM347109
US F9850	EUA	HM347096
KHV-U	EUA	DQ657948
KHV-I	Israel	DQ177346
A1	Japão/Indonésia/Taiwan/Filipinas	AB375390
A2	Indonésia/Taiwan	AB375391
E1, E2, E3	USA/Países Baixos	AB375385
E4	Países Baixos	AB375387
E5	Países Baixos	AB375388
E6	Israel	AB375386
E7	Reino Unido	AB375389
KHV-QY08	China	JN180630

Fonte: Própria autoria.

5.2.8. Análises Evolutivas e de Polimorfismo

Objetivando-se verificar o sinal filogenético dos conjuntos de sequências utilizados, utilizou-se o método de *likelihood mapping*, implementado no programa TreePuzzle versão 5.2 (STRIMMER; VON HAESELER, 1997; SCHMIDT et al., 2002), analisando-se 10.000 quartetos randômicos. O referido método avalia grupos de quatro sequências aleatoriamente escolhidas (quartetos), através de *maximum likelihood*. As três possíveis topologias de árvores não enraizadas para cada quarteto são calculadas e os valores associados são então plotados usando coordenadas triangulares, de maneira que cada vértice do triângulo representa uma topologia completamente resolvida. A distribuição dos pontos mostra, portanto, se as sequências sob análise são adequadas para a reconstrução filogenética.

Adicionalmente à aplicação do método de *likelihood mapping*, o sinal filogenético também foi determinado pelo cálculo da saturação de substituição nas sequências, através do método de Xia (XIA et al., 2003). Nesse teste, um conjunto de sequências alinhadas é considerado filogeneticamente informativo se o índice de saturação de substituição observado (*Iss*) é significativamente menor do que o valor crítico de Iss (*Iss.c*). O nível de saturação também foi investigado graficamente, plotando-se o número de transições e transversões pareadas contra a distância genética. Ambos os testes foram realizados através do programa DAMBE versão 5.2.5 (XIA; XIE, 2001).

Análise gráfica *sliding-window* para verificação de pressão seletiva com base na razão entre o número de substituições não sinônimas por sítio não sinônimo (*dN*) e o número de substituições sinônimas por sítio sinônimo (*dS*) (ω ou *dS*/*dN*) foi realizada através do programa SNAP (*Synonymous Non-synonymous Analysis Program*) versão 2.2.1(KORBER, 2000a; KORBER, 2000b). Em linhas gerais, regiões de pressão positiva (*diversifying selection*) produzem um crescimento acentuado da curva de substituições não-sinônimas, indicando acúmulo de mutações. Para confirmação do perfil de pressão de seleção sobre as sequências analisadas também foi calculado o valor D de Tajima (*Tajima's D*), que pode assumir: valor negativo nos casos de seleção negativa (*purifying selection*) ou expansão populacional; valor positivo, nos casos de declínio populacional (*population bottleneck*) ou manutenção de alelos diferentes em frequências maiores do que aquelas esperadas por deriva (*drift*) gênica (*balancing selection*); e valor igual a 0 sob o modelo neutro (TAJIMA, 1989).

5.2.9. Análise Estatística

O cálculo de saturação é baseado no Teste T de Student. Tanto para o cálculo de saturação como o de Tajima (pressão seletiva), valores foram considerados estatiscamente significantes se $P<0,10$.

6. RESULTADOS

6.1. Coleta de amostras teciduais de peixes

No total foram coletadas 306 espécies de peixes, incluindo peixes de vida livre e peixes ornamentais. As espécies de peixes analisadas foram provenientes dos estados de São Paulo, Minas Gerais, Bahia e Ceará. O apêndice A apresenta a relação das amostras investigadas e a descrição dos parâmetros analisados como espécie, tipo de manejo, origem, local da coleta e caracterização de sinais clínicos.

Com relação ao tipo de manejo, 66% das espécies eram de interesse zootécnico, 30,7% eram espécies ornamentais e 3,3% eram espécies de vida livre provenientes do Rio Mogi Guaçu.

A relação das espécies amostradas e as respectivas porcentagens coletadas de cada espécies encontram-se listadas na tabela 7.

Tabela 7 – Relação de espécies investigadas neste estudo para a presença de infecções virais.

Nome Popular	Nome Científco	Número de espécimes (% total)
Tilápia	*Oreochromis niloticus*	18,63%
Carpa	*Cyprinus carpio*	13,40%
Curimba	*Prochilodus spp.*	10,13%
Pacú	*Mylossoma spp.*	7,84%
Truta	*Oncorhynchus mykiis*	4,25%
Pirapatinga	*Piaractus brachpomus*	3,59%
Acará	*Geophagus brasiliensis*	3,59%
Lambari	*Astyanax spp.*	3,27%
Piracanjuba	*Brycon orbignyanus*	2,94%
Kinguio	*Carassius auratus*	2,61%
Piranha Vermelha	*Pygocentrus nattereri*	2,61%
Piavuçu	*Leporinus macrocephalus*	2,61%
Catfish	*Siluriformes*	2,29%
Matrinxã	*Brycon amazonicus*	2,29%
Tricogaster Amarelo	*Trichogaster trichopterus*	2,29%
Surubim	*Steindachneridion parahybae*	1,96%
Pintado	*Pseudoplatystoma corruscans*	1,31%
Tetra Fortuna	*Moenkhausia costae*	1,31%
Dourado	*Salminus brasiliensis*	0,98%
Dojô	*Migurnos anguillicaudatus*	0,98%
Cascudo	*Hypostomus plecostomus*	0,98%
Acará Bandeira	*Pterophylum scalare*	0,98%
Paraíso Albino	*Macropodus opercularis*	0,98%
Piraputanga	*Brycon hillari*	0,65%
Pangá	*Pangasius hypophthalmus*	0,65%
Tricoleri	*Trichogaster leeri*	0,65%
Plati	*Xiphophorus maculatus*	0,65%
Lebiste	*Poecilia reticulata*	0,65%
Parú	*Pomacanthus paru*	0,33%
Piapara	*Leporinus elongatus*	0,33%
Bagre	*Siluriformes*	0,33%
Mandi	*Pimelodus maculatus*	0,33%
Caborja	*Hoplosternun littorale*	0,33%
Colisa laila	*Trichogaster lalius*	0,33%
Piranha Diamante	*Serrasalmus gibbus*	0,33%
Melanotaenia Maçã	*Glossolepsis incisus*	0,33%
Peixe Anjo	*Pomacanthus imperator*	0,33%
Finger Fish	*Monodactylus argentus*	0,33%
Mato Grosso	*Hyphessobrycon eques*	0,33%
Pirarucu	*Araipama gigas*	0,33%
Dânio Pérola	*Brachdanio albolineatus*	0,33%
Cruzeiro do Sul	*Hemiodopsis gracilis*	0,33%

Fonte: Própria Autoria

6.2. Aplicação da técnica de PCR para detecção de fragmentos genômicos de vírus das famílias *Alloherpesviridae* e *Iridoviridae*

Do total de 306 amostras de peixes coletadas e caracterizadas, todas foram submetidas ao diagnóstico molecular (*nested*-PCR) para detecção do gene da Timidina Kinase de CyHV-3, sendo que 6 das amostras analisadas apresentaram banda com tamanho próximo ao esperado para o gene estudado (348pb). As espécies positivas para *Cyprinid herpesvirus* 3 foram de peixes ornamentais das espécies *Pygocentrus nattereri*, *Cyprinus carpio*, *Misgurnos anguillicaudatus*, *Carassius auratus*, *Xiphophorus maculatus* e *Hyphessobrycon eques*.

Já o diagnóstico para CyHV-1, CyHV-2, *Lymphocystivirus* e *Megalocytivirus* foi realizado para 81 das 306 amostras, sendo que todas foram negativas para os vírus CyHV-1 e CyHV-2; 1 amostra foi positiva para *Lymphocystivirus* e 38 amostras foram positivas para *Megalocytivirus*.

A amostra positiva para *Lymphocystivirus* (Figura 1) foi proveniente de um peixe ornamental da espécie *Pomacanthus imperator* que apresentava lesões de coloração escura ao longo do corpo, oriundo de uma distribuidora de peixes ornamentais do município de São Paulo.

Tabela 8 – Relação de espécies positivas ao *nested*-PCR para *Megalocytivirus*.

Nome Popular	Nome Científco	Exemplares
Carpa	*Cyprinus carpio*	7,89%
Kinguio	*Carassius auratus*	7,89%
Piranha Vermelha	*Pygocentrus nattereri*	21,05%
Tricogaster Amarelo	*Trichogaster trichopterus*	13,16%
Tetra Fortuna	*Moenkhausia costae*	7,89%
Dojô	*Migurnos anguillicaudatus*	5,27%
Cascudo	*Hypostomus plecostomus*	2,63%
Acará Bandeira	*Pterophylum scalare*	2,63%
Paraíso Albino	*Macropodus opercularis*	5,27%
Pangá	*Pangasius hypophthalmus*	2,63%
Tricoleri	*Trichogaster leeri*	5,27%
Plati	*Xiphophorus maculatus*	2,63%
Lebiste	*Poecilia reticulata*	5,27%
Piranha Diamante	*Serrasalmus gibbus*	2,63%
Pirarucu	*Araipama gigas*	2,63%
Dânio Pérola	*Brachdanio albolineatus*	2,63%
Cruzeiro do Sul	*Hemiodopsis gracilis*	2,63%

Fonte: Autoria Própria

6.3. Sequenciamento nucleotídico e alinhamento de sequências

Das 06 amostras positivas para *Cyprinid herpesvirus 3*, 4 foram submetidas ao sequenciamento nucleotídico dado à concentração adequada de DNA apresentada pelas mesmas (concentração necessária para envio para sequenciamento: 20ng/µL, segundo a razão de absorbância A_{260}/A_{280}). A única amostra que apresentou padrão de banda próximo ao tamanho esperado para *Lymphocystivirus* (250pb) foi submetida ao sequenciamento nucleotídico, assim como 12 amostras positivas, de um total de 38, para *Megalocytivirus*.

Todas as amostras positivas e sequenciadas para *Cyprinid herpesvirus 3*, *Lymphocystivirus* e *Megalocytivirus* eram de peixes ornamentais provenientes do município de São Paulo-SP.

As figura 5, 6 e 7 ilustram o alinhamento das sequências de aminoácidos deduzidos entre as amostras positivas para *Lymphocystivirus*, *Megalocytivirus* e *Cyprinid herpesvirus 3*, respectivamente, com os respectivos histogramas de qualidade, conservação e consenso.

6.4. Análises filogenéticas e de similaridade

A reconstrução filogenética da sequência nucleotídica da amostra positiva para *Lymphocystivirus* em associação com outras sequências obtidas do GenBank está descrita na figura 8. A amostra LCDV-BRA foi agrupada num clado único juntamente com outras sequências de *Lymphocystivirus*, sendo mais próxima filogeneticamente da sequência EF 184306, pertecente ao genótipo VII de *Lymphocystivirus*, originária de Israel.

A figura 9 representa o cladograma obtido a partir da reconstrução filogenética de 369pb para as sequências de *Megalocytivirus*. As sequências brasileiras MV247-BRA, MV248-BRA, MV253-BRA, MV256-BRA, MV257-BRA, MV258-BRA, MV259-BRA, MV260-BRA, MV269-BRA, MV272-BRA, MV275-BRA e MV279-BRA formaram um clado único.

A reconstrução filogenética com base no gene TK do *Cyprinid herpesvirus* 3 (Figura 10) utilizando sequências de 348pb revelou a existência de 2 clados distintos, sendo que um clado agrupou 1 amostra brasileira em associação com amostras pertencentes aos genótipos Europeus e Asiáticos de CyHV-3 e um segundo clado continha apenas amostras brasileiras sequenciadas neste estudo. Muito embora, as distâncias genéticas entre todas as sequências, de maneira geral, são relativamente muito pequenas, indicando alto grau de conservação do alvo gênico adotado (gene para a enzima TK).

Nos Quadros 1, 2 e 3, são mostradas as porcentagens de Similaridade/Identidade relativas à *Lymphocystivirus*, *Megalocytivirus* e *Cyprinid herpesvirus 3*, respectivamente. Os valores encontrados corroboram os agrupamentos observados nas reconstruções filogenéticas. Nesse sentido, a sequência nucleotídica de LCDV apresentou similaridade de 44,8-91,1% para com outras sequências homólogas, enquanto que as sequências de *Megalocytivirus* exibiu similaridade de 47,2-99,2% para com outras sequências. Para CyHV-3, a similaridade entre as sequências obtidas e para com outras homólogas foi igual ou superior a 97,4%.

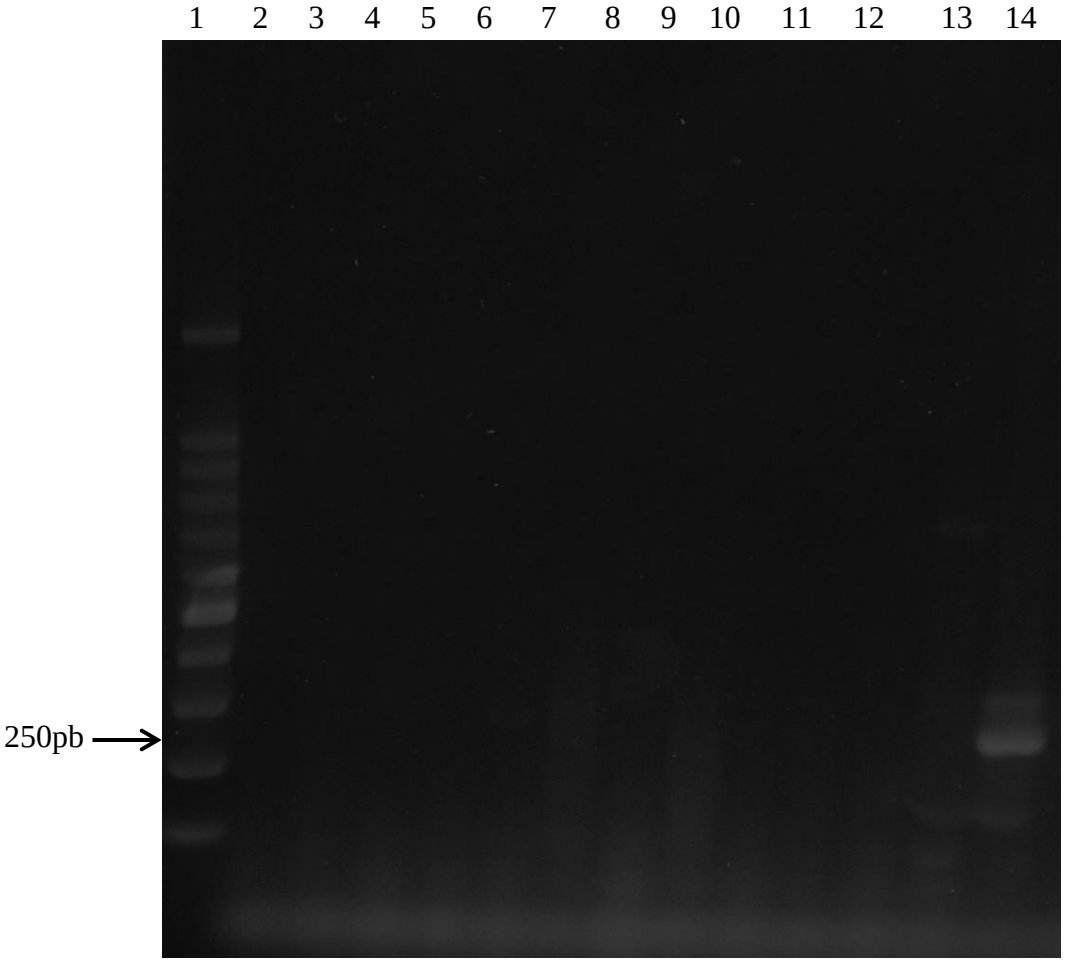
6.5. Análises evolutivas e de polimorfismo

O teste D de Tajima aplicado para as amostras de *Lymphocystivirus* forneceu um valor negativo (D = -1,52765), embora estatisticamente não significante (*P*>0,10), o que a princípio poderia indicar a ocorrência de seleção negativa ou expansão populacional com base no gene MCP. Entretanto, quando analisamos o gráfico relacionando mutações sinônimas e não sinônimas (Figura 14), para a detecção de pressão seletiva, verificamos que houve um predomínio na ocorrência de mutações não sinônimas, ao longo de toda a sequência de MCP utilizada, indicando a ocorrência de seleção positiva. Infere-se, a partir desses dados, que as sequências parciais de MCP analisadas, aparentemente, estão sob uma fraca ou relaxada seleção negativa que tolera a alteração de códons codificadores de aminoácidos diferentes (BARBOUR et al., 2013). Em relação às sequências de *Megalocytivirus*, análise similar pode ser aplicada, uma vez que o valor de D de Tajima também foi negativo (-0,67817) (*P*>0,10) e o gráfico *dS/dN* (Figura 15) revelou predomínio de mutações não sinônimas nas sequências de nucleotídeos estudadas, embora numa magnitude maior em relação às mutações sinônimas, quando comparada com o perfil obtido para *Lymphocystivirus*. Para as sequências de CyHV-3, o mesmo perfil relatado tanto para *Lymphocystivirus* como para *Megalocytivirus* foi obtido, com o valor D de Tajima igual a -1,25719, com *P*>0,10 (Figura 16).

Em relação à análise de *likelihood mapping*, o sinal filogenético obtido, considerando a porcentagem de quartetos totalmente resolvidos localizados nos vértices do triângulo, foi de 77,9% para *Lymphocystivirus* (Figura 17) e 78,3% para *Megalocytivirus* (Figura 18), valores considerados muito próximos ao limiar de 80% considerado adequado (SALEMI et al., 2009). Para *Cyprinid herpesvirus 3*, no entanto, o sinal foi muito baixo (4,3%). Nesse sentido, para confirmação ou não desses resultados, o sinal filogenético também foi determinado pelo nível de saturação das sequências, incluindo-se a estatística e a análise gráfica. Para as sequências dos 3 vírus estudados, o teste indicou nível de saturação significantemente muito baixo

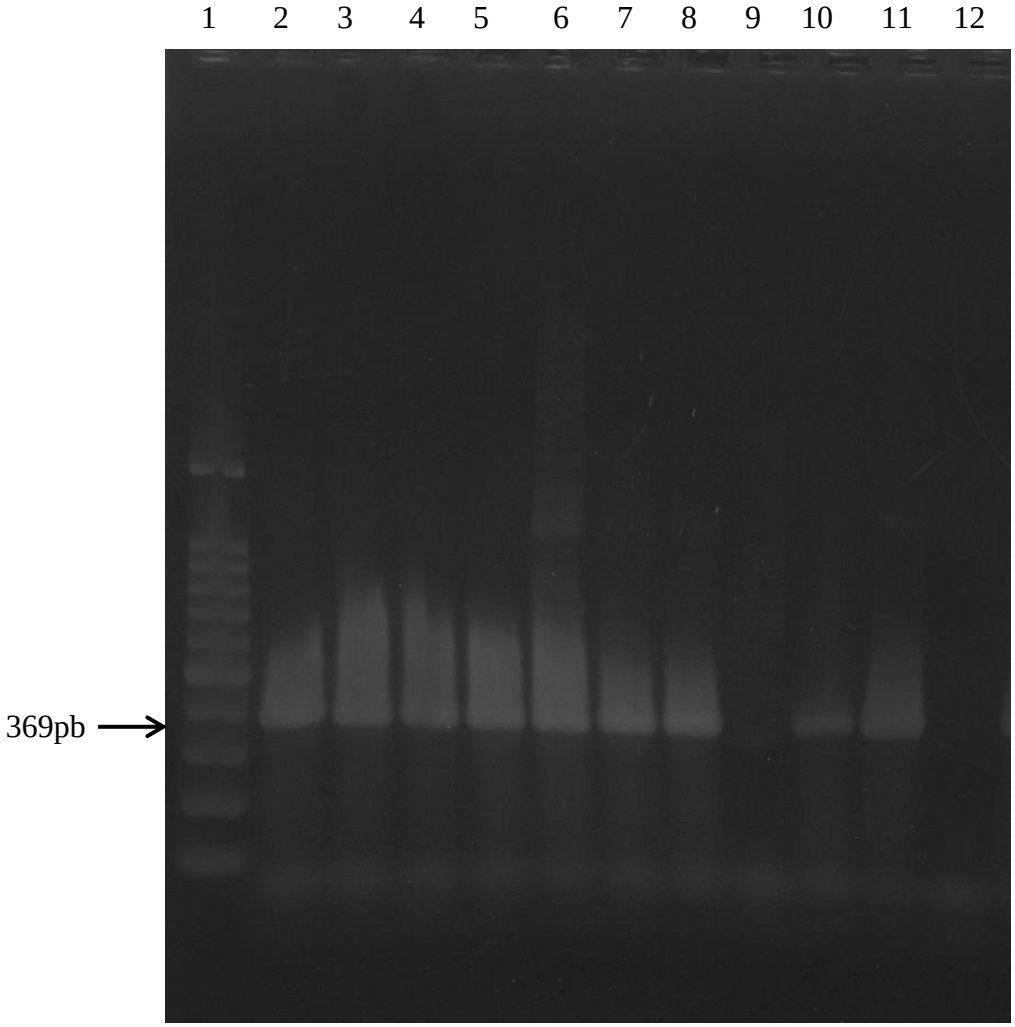
(*Iss*<*Iss.c*, *P*<0,0003), como pode ser observado nas plotagens gráficas realizadas (Figuras 11, 12 e 13); portanto, o conjunto de sequências utilizadas para os 3 grupos de vírus estavam adequadas para a reconstrução filogenética.

Figura 1 - Fotografia de gel de agarose a 1,5% corado com SYBR® Gold, sob luz UV, ilustrando resultados de amplificação de fragmento de 250pb, obtidos através da técnica de *nested*-PCR, relativo ao gene MCP do genoma de LCDV (1) Marcador de peso molecular de 100pb (PROMEGA, EUA). (2) Controle negativo. (3) Amostra 249. (3) Amostra 250. (4) Amostra 251. (5) Amostra 252. (6) Amostra 253. (7) Amostra 254. (8) Amostra 255. (9) Amostra 256. (10) Amostra 257. (11) Amostra 258. (12) Amostra 259. (13) Amostra 260. (14) Amostra 261 (Positiva).



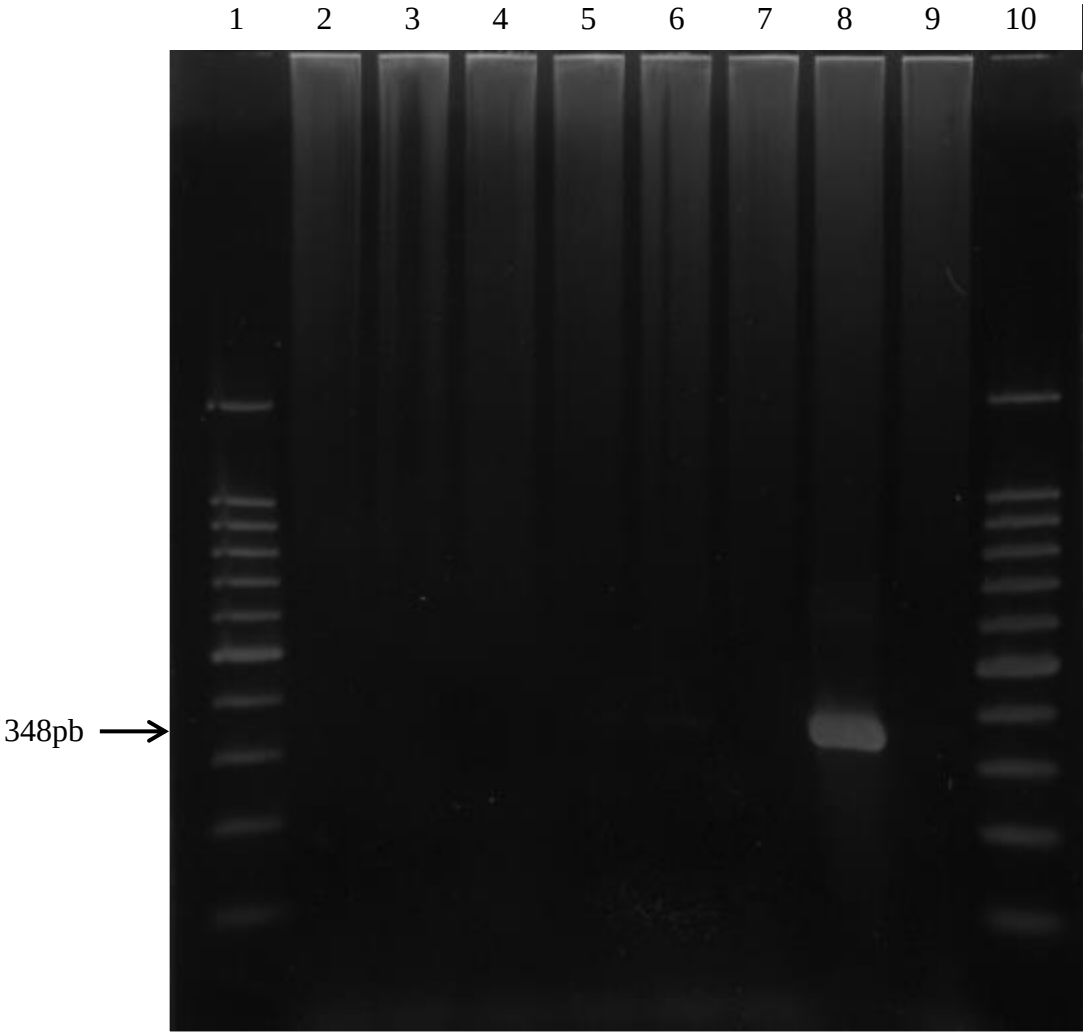
Fonte: Acervo pessoal

Figura 2 - Fotografia de gel de agarose a 1,5% corado com SYBR® Gold, sob luz UV, ilustrando resultados de amplificação de fragmento de 369pb, obtidos através da técnica de *nested*-PCR, relativo ao gene MCP do genoma de MV (1) Marcador de peso molecular de 100pb (PROMEGA, EUA). (2) Amostra 247 (Positiva). (3) Amostra 248 (Positiva). (4) Amostra 249 (Positiva). (5) Amostra 250 (Positiva). (6) Amostra 251 (Positiva). (7) Amostra 252 (Positiva). (8) Amostra 253 (Positiva). (9) Amostra 261. (10) Amostra 255 (Positiva). (11) Amostra 256 (Positiva). (12) Controle negativo.



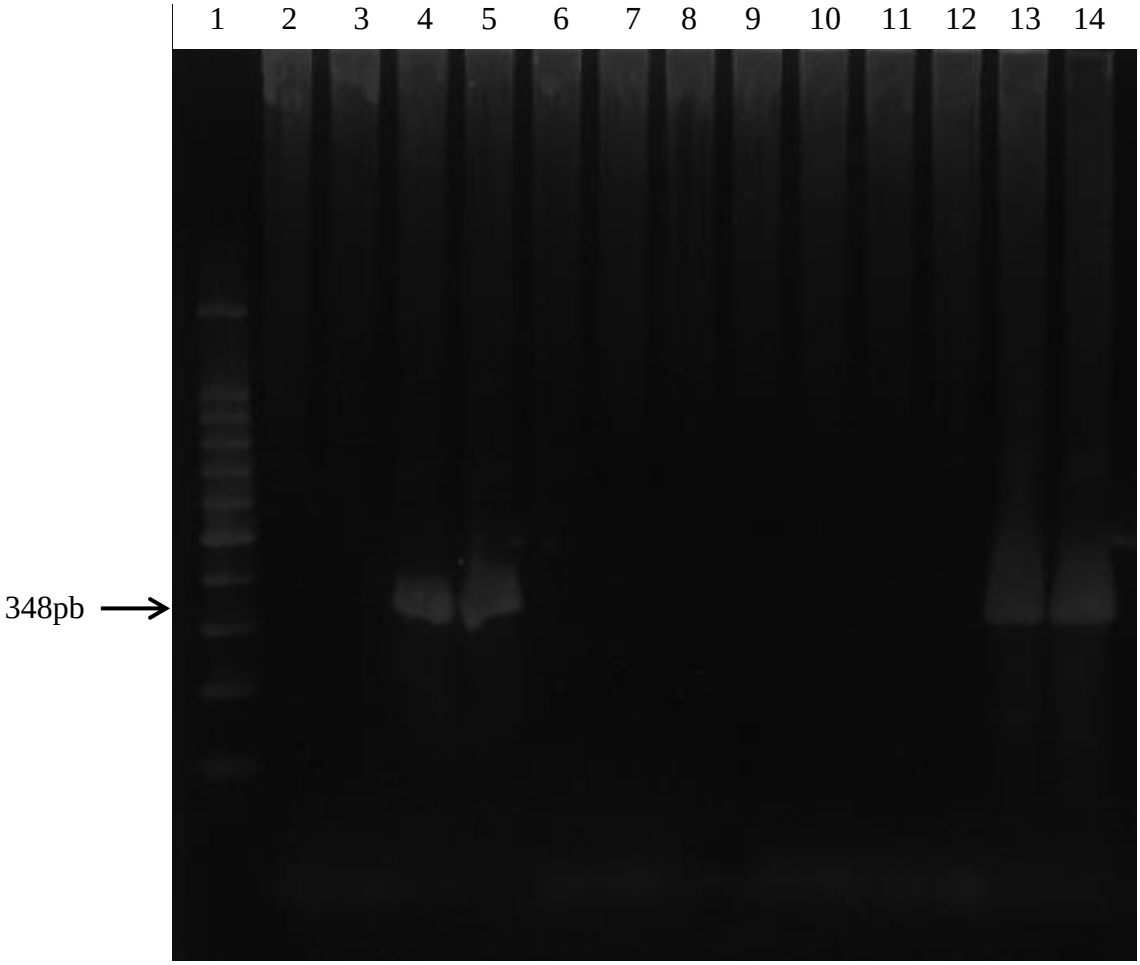
Fonte: Acervo pessoal

Figura 3 - Fotografia de gel de agarose a 1,5% corado com SYBR® Gold, sob luz UV, ilustrando resultados de amplificação de fragmento de 348pb, obtidos através da técnica de *nested*-PCR, relativo ao gene TK do genoma de CyHV-3 (1) Marcador de peso molecular de 100pb (PROMEGA, EUA). (2) Amostra 263. (3) Amostra 264. (4) Amostra 265. (5) Amostra 266. (6) Amostra 267. (7) Amostra 268. (8) Controle Positivo. (9) Controle Negativo. (10) Marcador de peso molecular de 100pb.



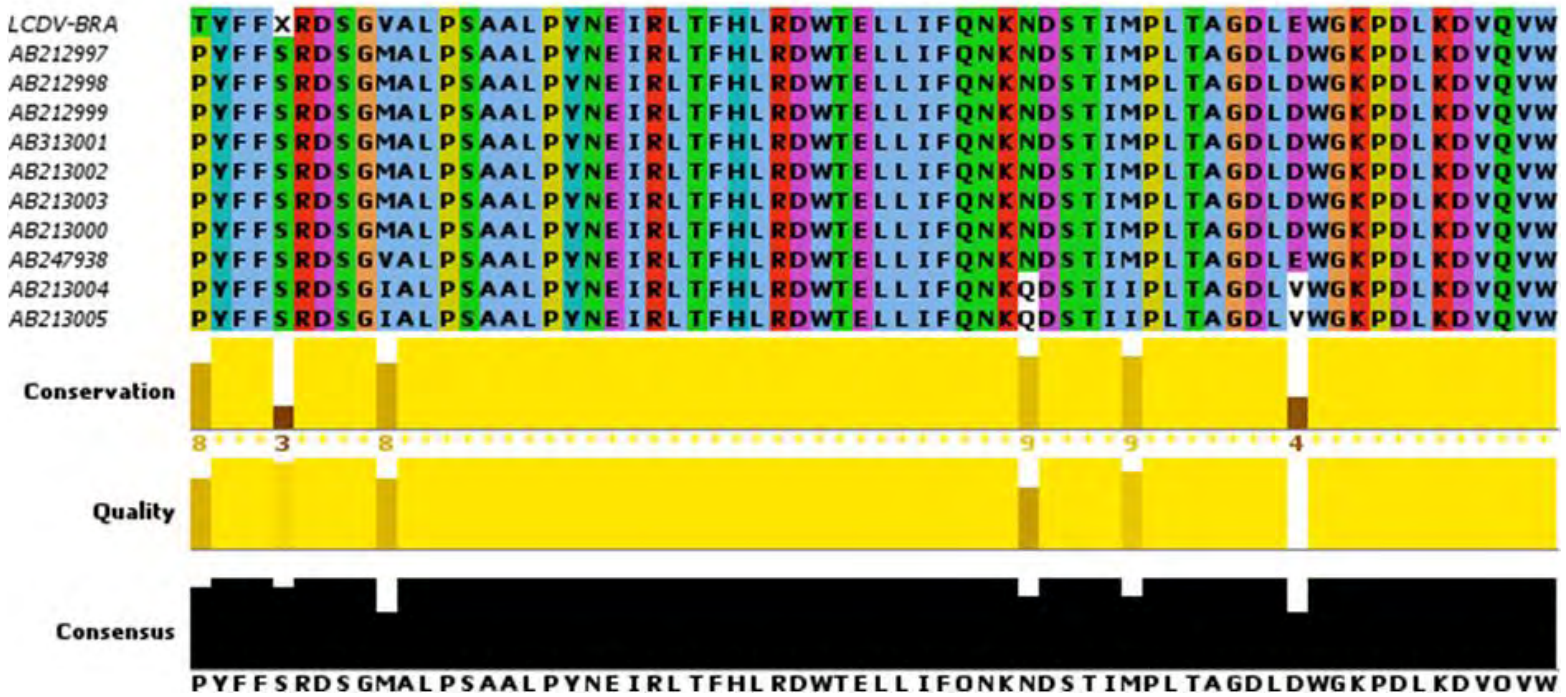
Fonte: Acervo pessoal

Figura 4 - Fotografia de gel de agarose a 1,5% corado com SYBR® Gold, sob luz UV, ilustrando resultados de amplificação de fragmento de 348pb, obtidos através da técnica de *nested*-PCR, relativo ao gene TK do genoma de CyHV-3 (1) Marcador de peso molecular de 100pb (PROMEGA, EUA). (2) Controle Negativo. (3) Amostra 249. (4) Amostra 250 (Positiva). (5) Amostra 258 (Positiva). (6) Amostra 259. (7) Amostra 260. (8) Amostra 261. (9) Amostra 263. (10) Amostra 264. (11) Amostra 265. (12) Amostra 266. (13) Amostra 262 (Positiva). (14) Controle Positivo.



Fonte: Acervo pessoal

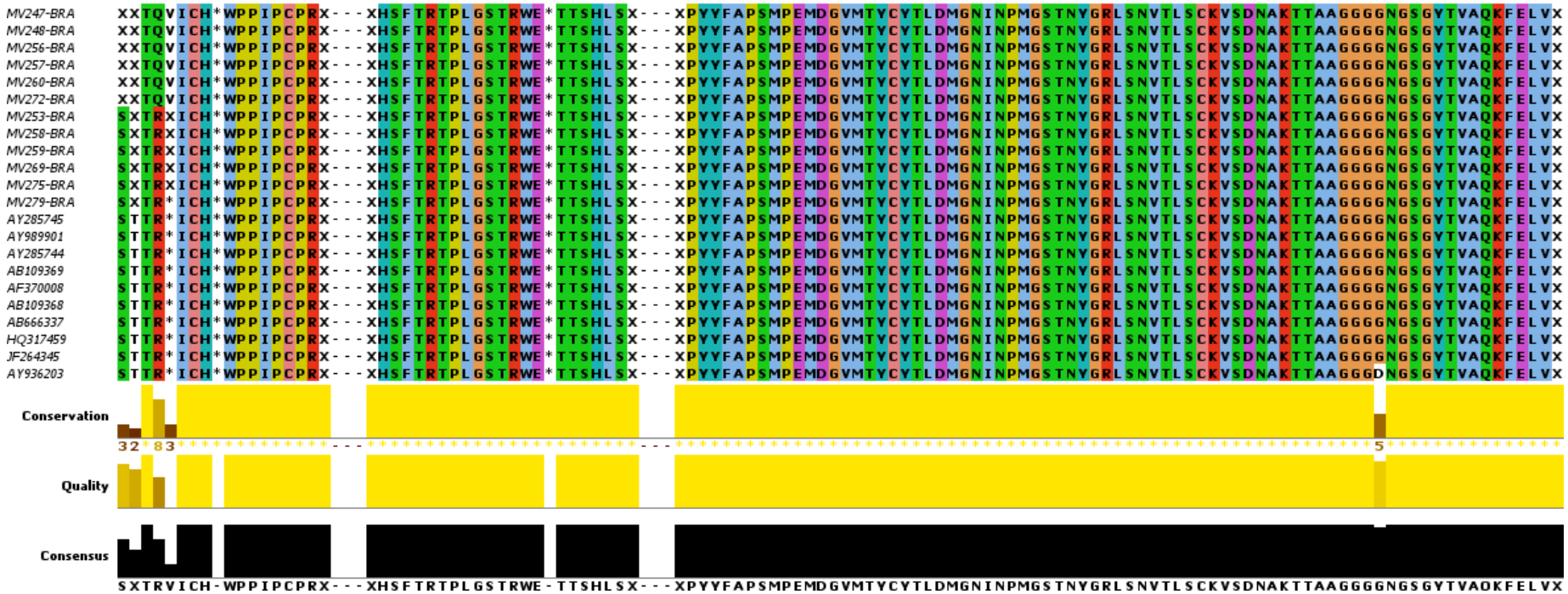
Figura 5 – Alinhamento entre as sequências deduzidas de 66 aminoácidos do gene MCP de *Lymphocystivirus* para a amostra LCDV-BRA, detectada no presente estudo, e de outros *Lymphocystivirus* recuperados do GenBank.



Legenda: O histograma *Conservation* reflete a conservação das propriedades físico-químicas dos aminoácidos e indica resíduos completamente conservados com um asterisco amarelo, sendo as posições menos conservadas mostradas em cores mais escuras. O histograma de qualidade de anotação *Quality* reflete a probabilidade de se observar uma mutação numa coluna qualquer do alinhamento baseada nos escores da matriz BLOSUM62 entre os resíduos mutado e o conservado. O histograma *Consensus* reflete a porcentagem do resíduo modal por coluna ("-" denota gaps).

Fonte: Própria autoria.

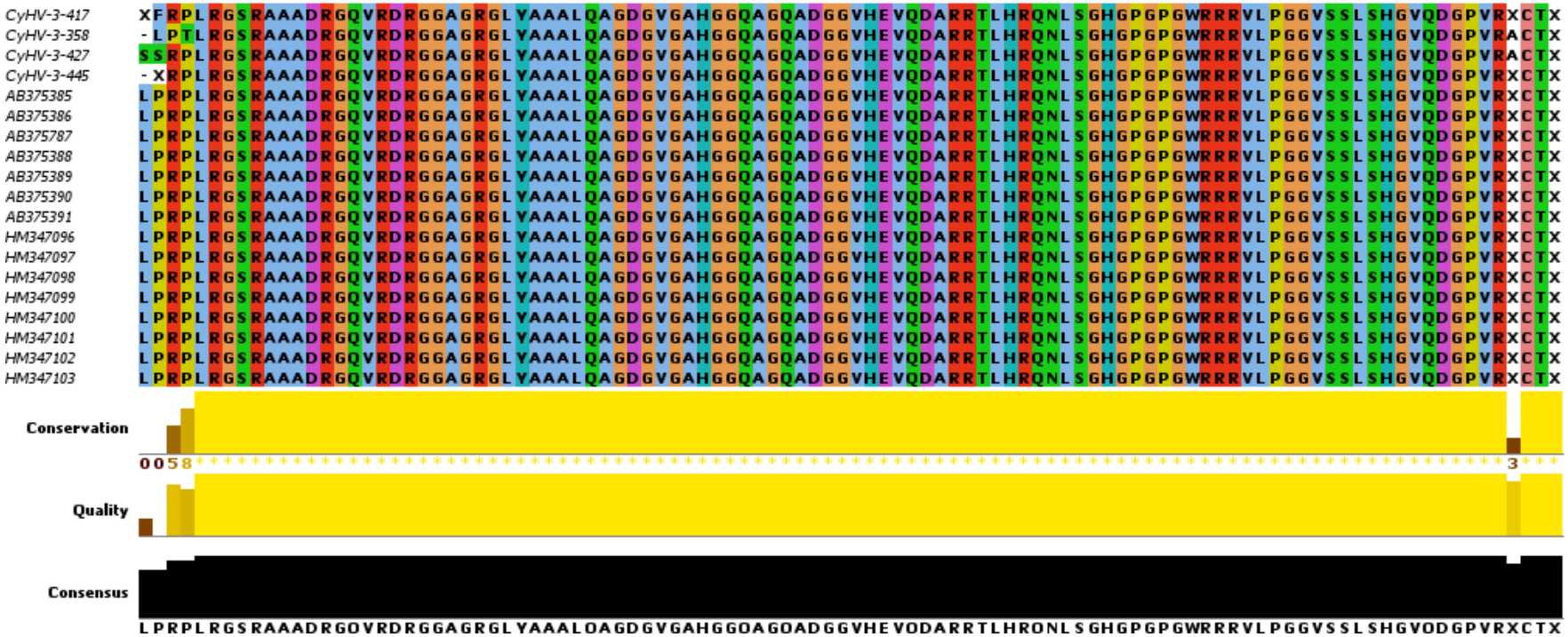
Figura 6 – Alinhamento entre as sequências deduzidas de 116 aminoácidos do gene MCP de *Megalocytivirus* para as amostras MV-BRA, detectadas no presente estudo, e de outros *Megalocytivirus* recuperados do GenBank.



Legenda: O histograma *Conservation* reflete a conservação das propriedades físico-químicas dos aminoácidos e indica resíduos completamente conservados com um asterisco amarelo, sendo as posições menos conservadas mostradas em cores mais escuras. O histograma de qualidade de anotação *Quality* reflete a probabilidade de se observar uma mutação numa coluna qualquer do alinhamento baseada nos escores da matriz BLOSUM62 entre os resíduos mutado e o conservado. O histograma *Consensus* reflete a porcentagem do resíduo modal por coluna ("-" denota gaps).

Fonte: Própria autoria.

Figura 7 – Alinhamento entre as sequências deduzidas de 102 aminoácidos do gene TK de *Cyprinid herpesvirus* 3 para as amostras CyHV, detectadas no presente estudo, e de outros *Cyprinid herpesvirus* 3 recuperados do GenBank.



Legenda: O histograma *Conservation* reflete a conservação das propriedades físico-químicas dos aminoácidos e indica resíduos completamente conservados com um asterisco amarelo, sendo as posições menos conservadas mostradas em cores mais escuras. O histograma de qualidade de anotação *Quality* reflete a probabilidade de se observar uma mutação numa coluna qualquer do alinhamento baseada nos escores da matriz BLOSUM62 entre os resíduos mutado e o conservado. O histograma *Consensus* reflete a porcentagem do resíduo modal por coluna ("-" denota gaps).

Fonte: Própria autoria.

Quadro 1 – Comparação das porcentagens de similaridade (abaixo da diagonal) e identidade (acima da diagonal) das sequências nucleotídicas para fragmentos de 250pb do gene MCP de *Lymphocystivirus*, entre 1 amostra detectada por PCR, e posteriormente sequenciada, e sequências de outros *Lymphocystivirus* recuperadas do GenBank.

Vírus	Similaridade/Identidade (%)																			
	LCDV-BRASIL	L63545	AY380826	AB212997	AB212998	AB213000	AB247938	AB212999	AB213001	AB213002	AB213003	AB213004	AB213005	AB213006	AY823414	EF184306	AY303804	EF103188	AB299163	AB299164
LCDV-BRASIL	—	44,1	42,9	86,2	86,2	85,7	88,7	86,2	86,2	86,2	86,2	83,3	83,3	83,3	82,8	92,1	86,2	87,7	92,1	81,3
L63545	47,3	—	79,3	43,0	43,0	42,5	44,9	43,0	43,0	43,0	43,0	45,5	45,5	45,5	45,5	43,3	43,0	44,2	42,0	43,3
AY380826	44,8	76,8	—	46,0	46,0	46,0	45,3	46,0	46,0	46,0	46,0	47,4	47,4	47,4	47,9	46,2	46,0	47,0	43,6	45,7
AB212997	85,2	43,3	47,3	—	100,0	99,5	90,6	100,0	100,0	100,0	100,0	87,7	87,7	87,7	87,2	86,2	100,0	90,6	89,7	87,2
AB212998	85,2	43,3	47,3	99,0	—	99,5	90,6	100,0	100,0	100,0	100,0	87,7	87,7	87,7	87,2	86,2	100,0	90,6	89,7	87,2
AB213000	84,7	42,9	47,3	98,5	98,5	—	90,1	99,5	99,5	99,5	99,5	87,2	87,2	87,2	86,7	85,7	99,5	90,1	89,2	86,7
AB247938	87,7	46,8	47,3	89,7	89,7	89,2	—	90,6	90,6	90,6	90,6	85,7	85,7	85,7	85,2	87,2	90,6	97,5	88,7	83,7
AB212999	85,2	43,3	47,3	99,0	99,0	98,5	89,7	—	100,0	100,0	100,0	87,7	87,7	87,7	87,2	86,2	100,0	90,6	89,7	87,2
AB213001	85,2	43,3	47,3	99,0	99,0	98,5	89,7	99,0	—	100,0	100,0	87,7	87,7	87,7	87,2	86,2	100,0	90,6	89,7	87,2
AB213002	85,2	43,3	47,3	99,0	99,0	98,5	89,7	99,0	99,0	—	100,0	87,7	87,7	87,7	87,2	86,2	100,0	90,6	89,7	87,2
AB213003	85,2	43,3	47,3	99,0	99,0	98,5	89,7	99,0	99,0	99,0	—	87,7	87,7	87,7	87,2	86,2	100,0	90,6	89,7	87,2
AB213004	82,3	46,3	48,8	86,7	86,7	86,2	84,7	86,7	86,7	86,7	86,7	—	100,0	100,0	99,5	86,2	87,7	87,2	87,7	91,1
AB213005	82,3	46,3	48,8	86,7	86,7	86,2	84,7	86,7	86,7	86,7	86,7	99,0	—	100,0	99,5	86,2	87,7	87,2	87,7	91,1
AB213006	82,3	46,3	48,8	86,7	86,7	86,2	84,7	86,7	86,7	86,7	86,7	99,0	99,0	—	99,5	86,2	87,7	87,2	87,7	91,1
AY823414	81,8	46,3	49,3	86,2	86,2	85,7	84,2	86,2	86,2	86,2	86,2	98,5	98,5	98,5	—	85,7	87,2	86,7	87,2	90,6
EF184306	91,1	44,3	47,8	85,2	85,2	84,7	86,2	85,2	85,2	85,2	85,2	85,2	85,2	85,2	84,7	—	86,2	87,2	91,6	84,2
AY303804	85,2	43,3	47,3	99,0	99,0	98,5	89,7	99,0	99,0	99,0	99,0	86,7	86,7	86,7	86,2	85,2	—	90,6	89,7	87,2
EF103188	86,7	44,8	49,8	89,7	89,7	89,2	96,6	89,7	89,7	89,7	89,7	86,2	86,2	86,2	85,7	86,2	89,7	—	88,7	85,7
AB299163	91,1	41,9	44,8	88,7	88,7	88,2	87.7	88,7	88,7	88,7	88,7	86,7	86,7	86,7	86,2	90,6	88,7	87,7	—	86,2
AB299164	80,3	43,8	46,8	86,2	86,2	85,7	82,8	86,2	86,2	86,2	86,2	90,1	90,1	90,1	89,7	83,3	86,2	84,7	85,2	—

Fonte: Própria autoria.

Quadro 2 – Comparação das porcentagens de similaridade (abaixo da diagonal) e identidade (acima da diagonal) das sequências nucleotídicas para fragmentos de 369pb do gene MCP de *Megalocytivirus*, entre 12 amostras detectadas por PCR, e posteriormente sequenciadas, e sequências de outros *Megalocytivirus* recuperadas do GenBank.

Vírus	Similaridade/Identidade (%)																			
	MV247-BRA	MV248-BRA	MV253-BRA	MV256-BRA	MV257-BRA	MV258-BRA	MV259-BRA	MV260-BRA	MV269-BRA	MV272-BRA	MV275-BRA	MV279-BRA	AY894343	AF371960	AY532606	AY310918	AY590687	AY989901	AY633988	AB263097
MV247-BRA	—	100,0	99,7	100,0	100,0	99,7	99,7	100,0	99,7	100,0	99,7	99,5	47,7	47,9	48,1	95,4	92,7	98,6	92,1	95,4
MV248-BRA	91,3	—	99,7	100,0	100,0	99,7	99,7	100,0	99,7	100,0	99,7	99,5	47,7	47,9	48,1	95,4	92,7	98,6	92,1	95,4
MV253-BRA	91,3	91,3	—	99,7	99,7	100,0	100,0	99,7	100,0	99,7	100,0	99,7	47,7	47,9	48,1	95,7	93,0	98,9	92,4	95,7
MV256-BRA	91,3	91,3	91,3	—	100,0	99,7	99,7	100,0	99,7	100,0	99,7	99,5	47,7	47,9	48,1	95,4	92,7	98,6	92,1	95,4
MV257-BRA	91,3	91,3	91,3	91,3	—	99,7	99,7	100,0	99,7	100,0	99,7	99,5	47,7	47,9	48,1	95,4	92,7	98,6	92,1	95,4
MV258-BRA	91,3	91,3	91,6	91,3	91,3	—	100,0	99,7	100,0	99,7	100,0	99,7	47,7	47,9	48,1	95,7	93,0	98,9	92,4	95,7
MV259-BRA	91,3	91,3	91,6	91,3	91,3	91,6	—	99,7	100,0	99,7	100,0	99,7	47,7	47,9	48,1	95,7	93,0	98,9	92,4	95,7
MV260-BRA	91,3	91,3	91,3	91,3	91,3	91,3	91,3	—	99,7	100,0	99,7	99,5	47,7	47,9	48,1	95,4	92,7	98,6	92,1	95,4
MV269-BRA	91,3	91,3	91,6	91,3	91,3	91,6	91,6	91,3	—	99,7	100,0	99,7	47,7	47,9	48,1	95,7	93,0	98,9	92,4	95,7
MV272-BRA	91,3	91,3	91,3	91,3	91,3	91,3	91,3	91,3	91,3	—	99,7	99,5	47,7	47,9	48,1	95,4	92,7	98,6	92,1	95,4
MV275-BRA	91,3	91,3	91,6	91,3	91,3	91,6	91,6	91,3	91,6	91,3	—	99,7	47,7	47,9	48,1	95,7	93,0	98,9	92,4	95,7
MV279-BRA	91,3	91,3	91,6	91,3	91,3	91,6	91,6	91,3	91,6	91,3	91,6	—	46,9	47,1	47,3	95,9	93,2	99,2	92,7	95,9
AY894343	46,6	46,6	46,6	46,6	46,6	46,6	46,6	46,6	46,6	46,6	46,6	45,5	—	95,1	99,7	46,2	47,1	46,4	48,6	46,2
AF371960	47,2	47,2	47,2	47,2	47,2	47,2	47,2	47,2	47,2	47,2	47,2	46,1	90,2	—	95,4	46,8	46,2	47,2	47,6	46,8
AY532606	47,4	47,4	47,4	47,4	47,4	47,4	47,4	47,4	47,4	47,4	47,4	46,3	94,9	90,5	—	46,6	47,8	46,8	49,2	46,6
AY310918	87,8	87,8	88,1	87,8	87,8	88,1	88,1	87,8	88,1	87,8	88,1	88,3	46,3	47,4	47,2	—	95,7	96,7	95,1	100,0
AY590687	85,1	85,1	85,4	85,1	85,1	85,4	85,4	85,1	85,4	85,1	85,4	85,6	46,6	45,5	47,4	88,1	—	94,0	99,5	95,7
AY989901	91,1	91,1	91,3	91,1	91,1	91,3	91,3	91,1	91,3	91,1	91,3	91,6	45,5	47,2	46,3	89,2	86,4	—	93,5	96,7
AY633988	84,6	84,6	84,8	84,6	84,6	84,8	84,8	84,6	84,8	84,6	84,8	85,1	48,8	47,7	49,6	87,5	91,9	85,9	—	95,1
AB263097	87,8	87,8	88,1	87,8	87,8	88,1	88,1	87,8	88,1	87,8	88,1	88,3	46,3	47,4	47,2	92,4	88,1	89,2	87,5	—

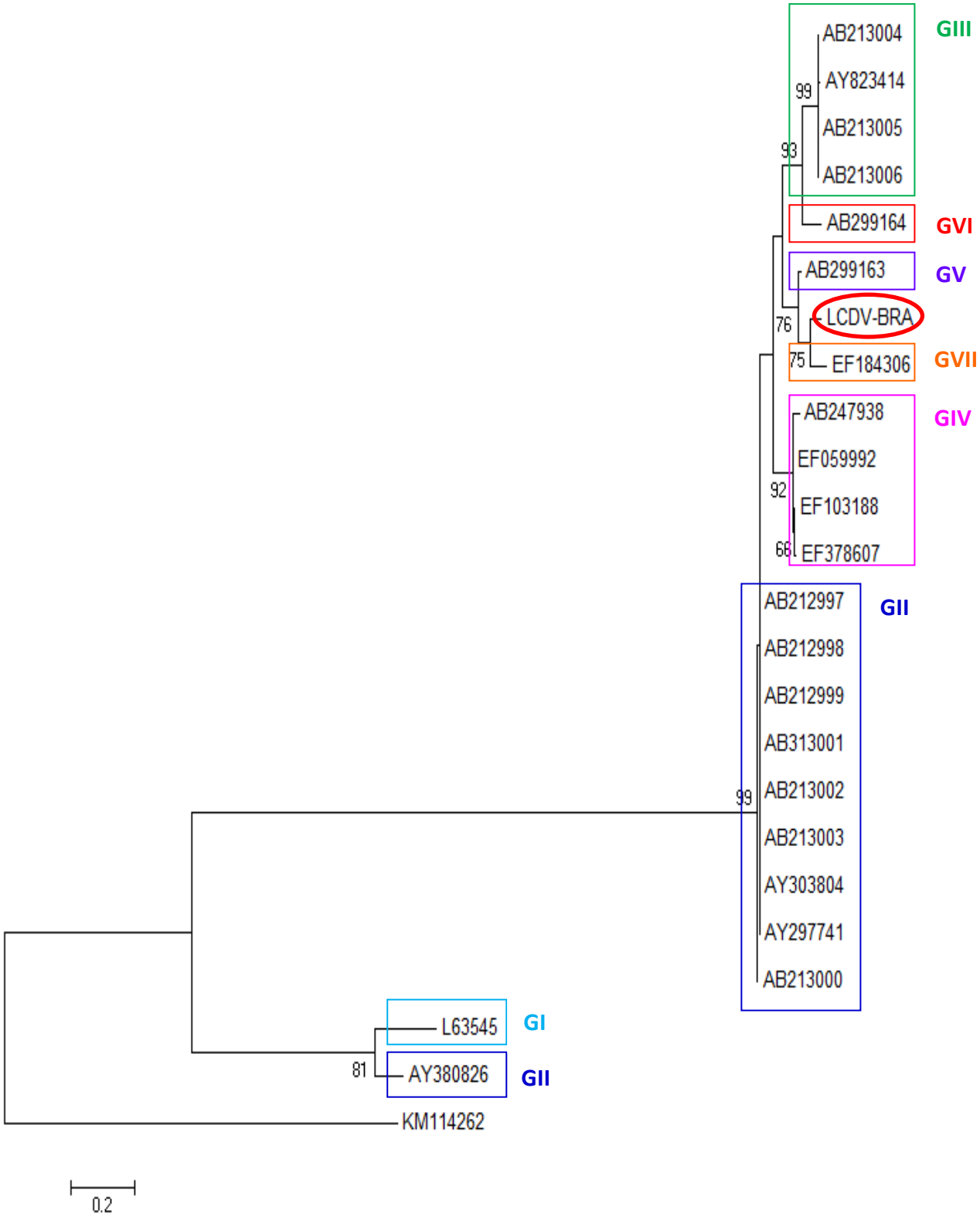
Fonte: Própria autoria.

Quadro 3 – Comparação das porcentagens de similaridade (abaixo da diagonal) e identidade (acima da diagonal) das sequências nucleotídicas para fragmentos de 348pb do gene TK de *Cyprinid herpesvirus 3*, entre 4 amostras detectada por PCR, e posteriormente sequenciadas, e sequências de outros *Cyprinid herpesvirus 3* recuperadas do GenBank.

Vírus	Similaridade/Identidade (%)																			
	CyHV-3(417)	CyHV-3(358)	CyHV-3(427)	CyHV-3(445)	AB375385	AB375386	AB375387	AB375389	AB395390	AB395391	HM347096	HM347097	HM347098	JN180630	JQ247182	KP280047	KT290517	AP008984	DQ657948	DQ177346
CyHV-3(417)	—	98,7	97,7	98,7	98,4	98,4	98,4	98,4	98,4	98,4	98,4	98,4	98,4	98,0	98,4	98,4	98,4	98,4	98,4	98,4
CyHV-3(358)	98,4	—	98,0	98,0	97,7	97,7	97,7	97,7	97,7	97,7	97,7	97,7	97,7	97,4	97,7	97,7	97,7	97,7	97,7	97,7
CyHV-3(427)	97,7	98,0	—	97,7	98,4	98,4	98,4	98,4	98,4	98,4	98,4	98,4	98,4	98,0	98,4	98,4	98,4	98,4	98,4	98,4
CyHV-3(445)	98,0	97,4	97,4	—	97,7	97,7	97,7	97,7	97,7	97,7	97,7	97,7	97,7	97,4	97,7	97,7	97,7	97,7	97,7	97,7
AB375385	98,0	97,7	98,4	97,4	—	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	99,7	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
AB375386	98,0	97,7	98,4	97,4	99,7	—	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	99,7	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
AB375387	98,0	97,7	98,4	97,4	99,7	99,7	—	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	99,7	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
AB375389	98,0	97,7	98,4	97,4	99,7	99,7	99,7	—	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	99,7	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
AB375390	98,0	97,7	98,4	97,4	99,7	99,7	99,7	99,7	—	100,0	100,0	87,8	87,8	99,7	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
AB375391	98,0	97,7	98,4	97,4	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	—	100,0	87,8	87,8	99,7	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
HM347096	98,0	97,7	98,4	97,4	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	—	87,8	87,8	99,7	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
HM347097	98,0	97,7	98,4	97,4	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	—	100,0	99,7	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
HM347098	98,0	97,7	98,4	97,4	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	—	99,7	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
JN180630	97,7	97,4	98,0	97,0	99,3	99,3	99,3	99,3	99,3	99,3	99,3	99,3	99,3	—	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7
JQ247182	98,0	97,7	98,4	97,4	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	99,3	—	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
KP280047	98,0	97,7	98,4	97,4	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	99,3	99,7	—	100,0	100,0	100,0	100,0
KT290517	98,0	97,7	98,4	97,4	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	99,3	99,7	99,7	—	100,0	100,0	100,0
AP008984	98,0	97,7	98,4	97,4	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	99,3	99,7	99,7	99,7	—	100,0	100,0
DQ657948	98,0	97,7	98,4	97,4	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	99,3	99,7	99,7	99,7	99,7	—	100,0
DQ177346	98,0	99,7	98,4	97,4	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	99,3	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	—

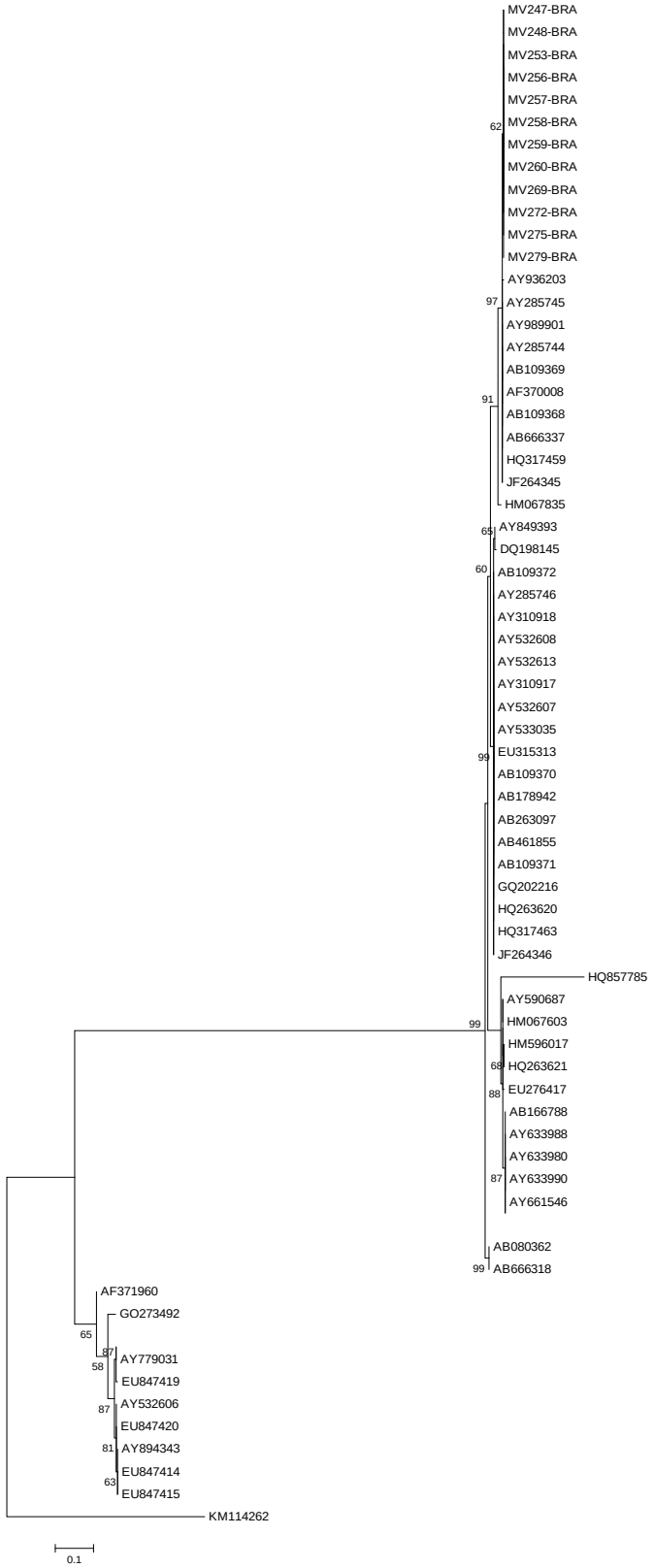
Fonte: Própria autoria.

Figura 8 – Cladograma representando reconstrução filogenética baseada no alinhamento de sequências nucleotídicas referentes à amplificação de um fragmento de 250pb do gene MCP de *Lymphocystivirus.* A sequência obtida neste estudo corresponde a LCDV-BRA. A barra de escala estima a distância filogenética das sequências nucleotídicas.



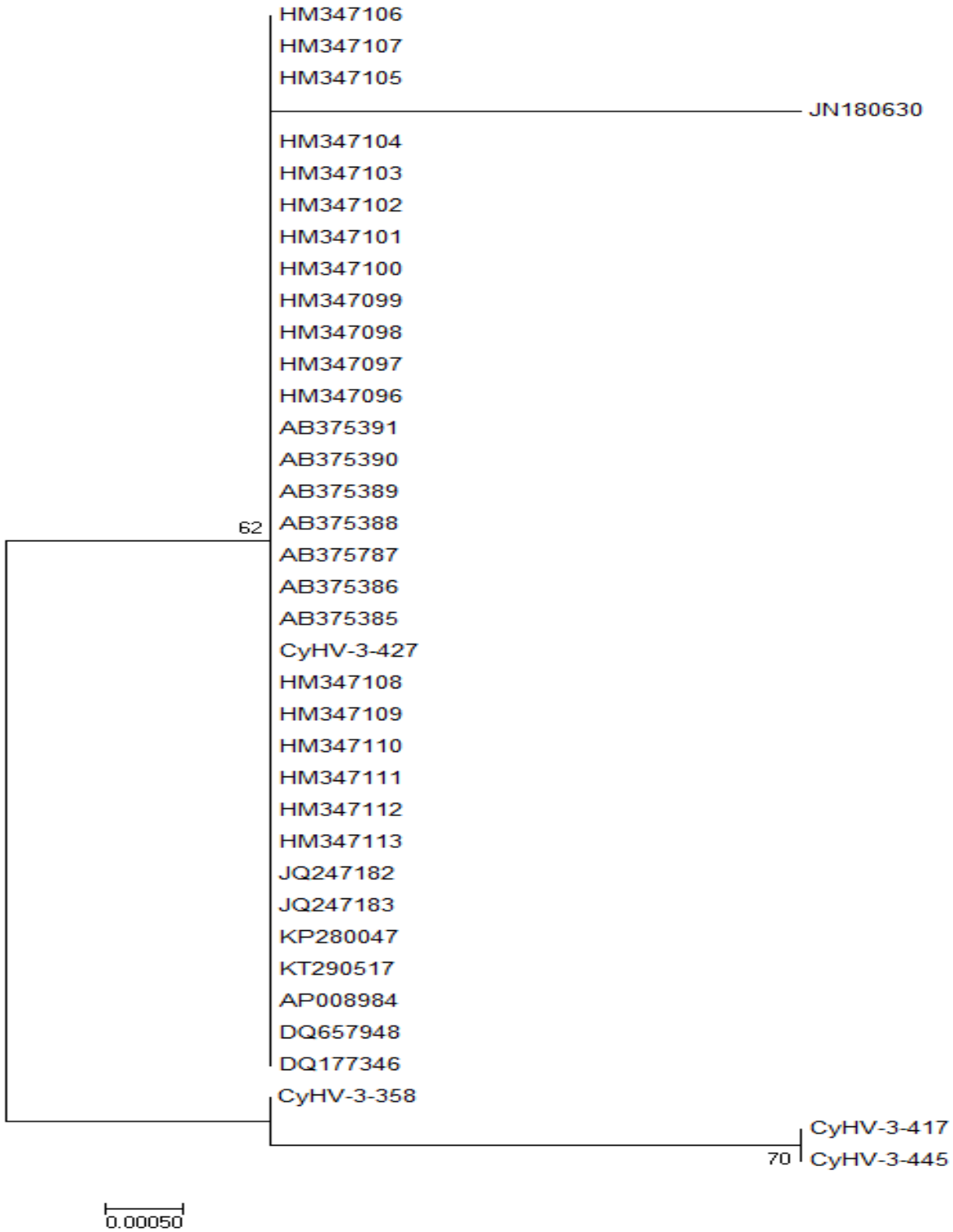
Fonte: Própria autoria.

Figura 9 – Reconstrução filogenética baseada no alinhamento de sequências nucleotídicas de de 369pb do gene MCP de *Megalocytivirus.* As sequências obtidas neste estudo correspondem a MV-BRA. Barra de escala: distância genética das sequências nucleotídicas.



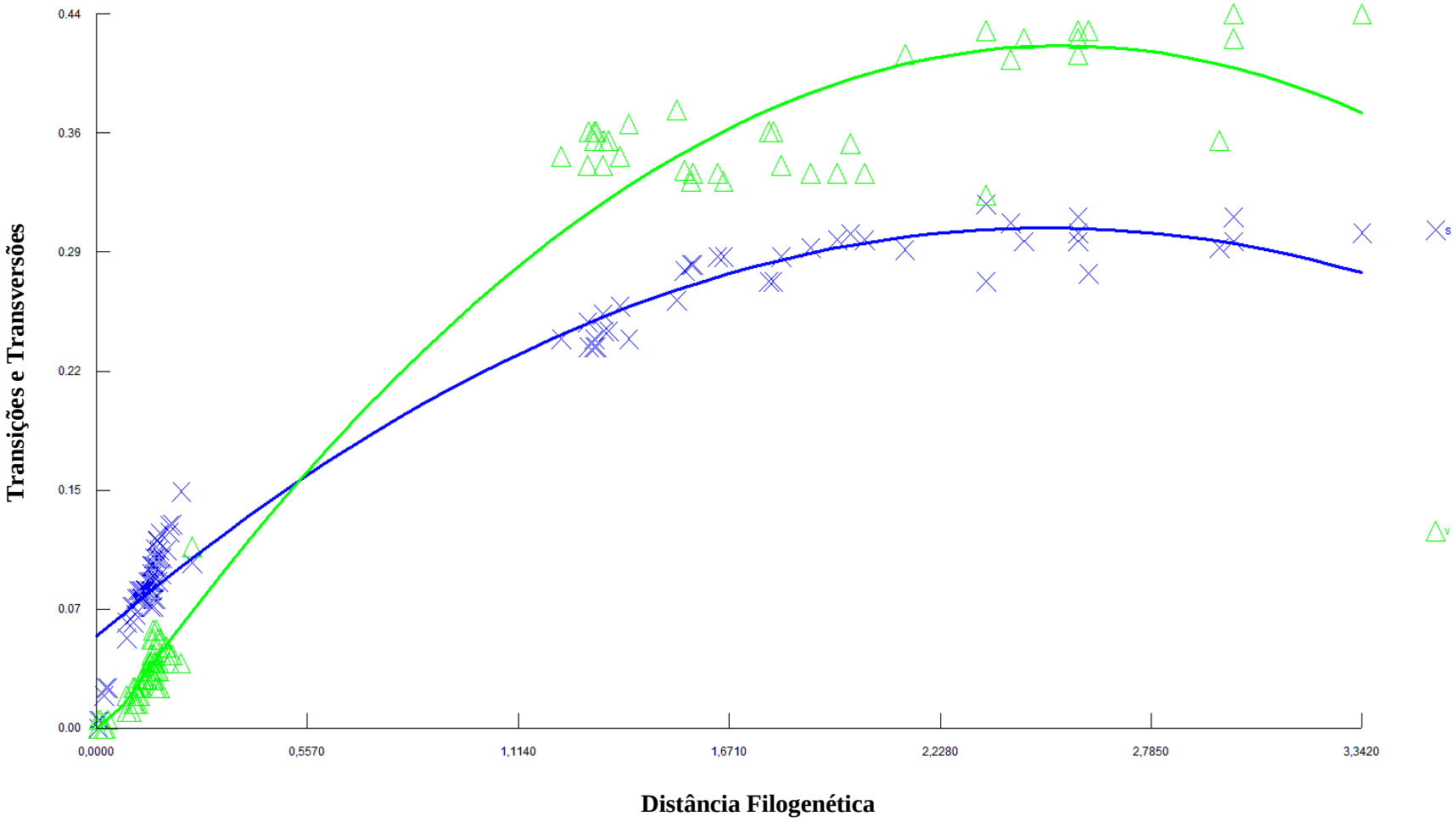
Fonte: Própria autoria.

Figura 10 – Cladograma representando reconstrução filogenética baseada no alinhamento de sequências nucleotídicas referentes à amplificação de um fragmento de 348pb do gene TK de *Cyprinid herpesvirus 3*. As sequências obtidas neste estudo correspondem a CyHV-3. A barra de escala estima a distância filogenética das sequências nucleotídicas.



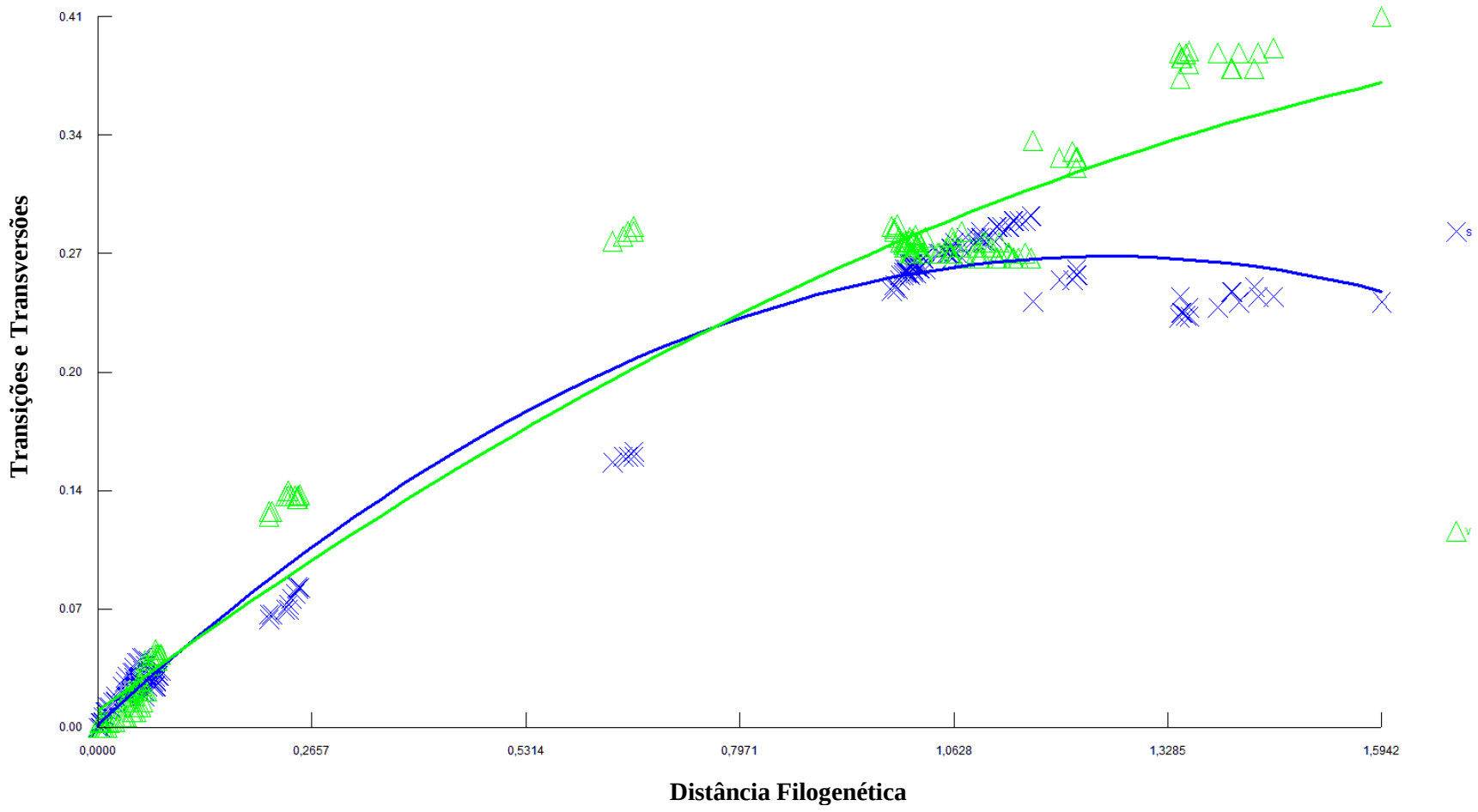
Fonte: Própria autoria.

Figura 11 – Curva de saturação obtida no programa DAMBE, mostrando as frequências de transições (Xs) e transversões (Δv) em relação ao gene MCP de *Lymphocystivirus*.



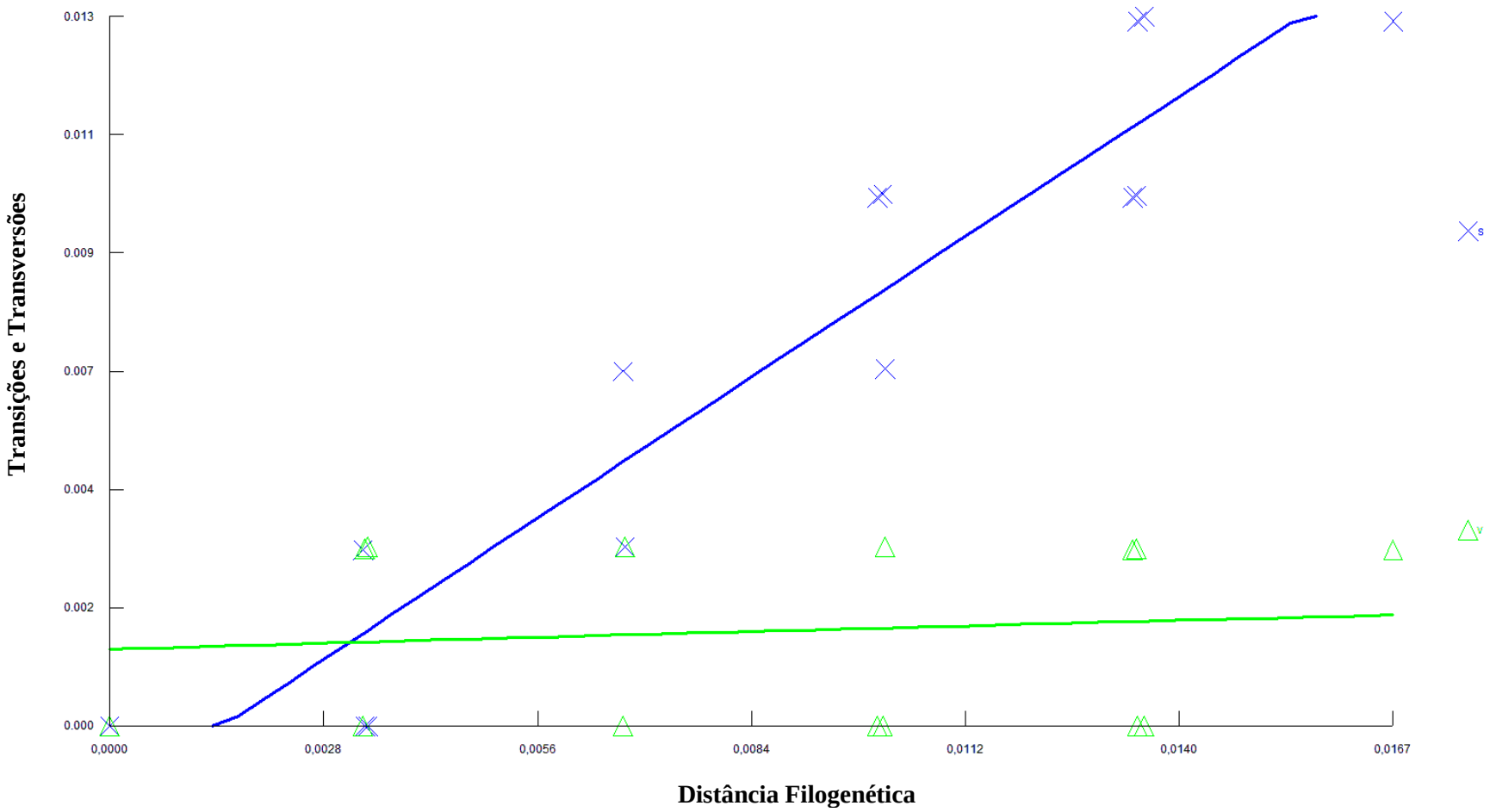
Fonte: Própria autoria.

Figura 12 – Curva de saturação obtida no programa DAMBE, mostrando as frequências de transições (Xs) e transversões (Δv) em relação ao gene MCP de *Megalocytivirus*.



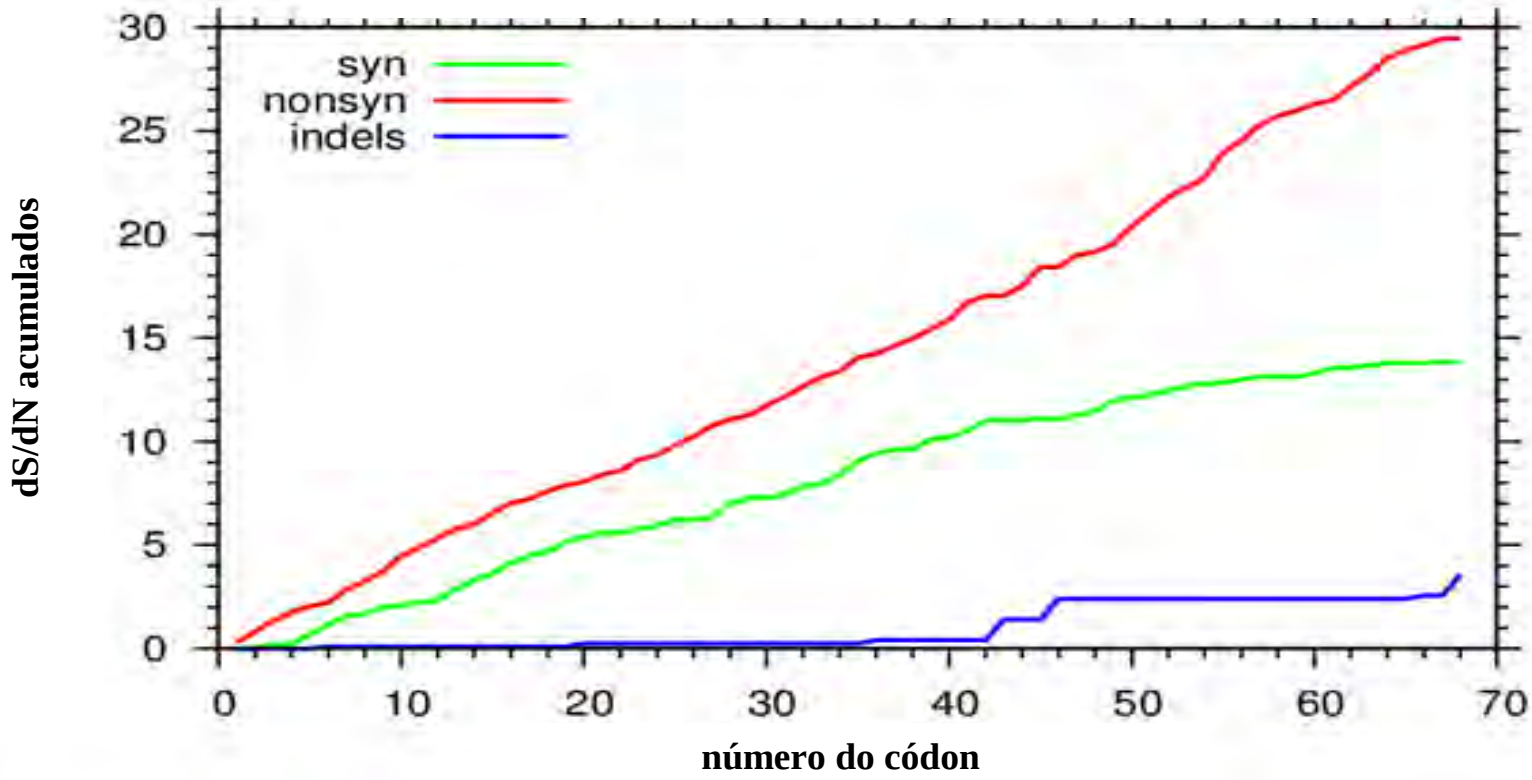
Fonte: Própria autoria.

Figura 13 – Curva de saturação obtida no programa DAMBE, mostrando as frequências de transições (Xs) e transversões (Δv) em relação ao gene TK de *Cyprinid herpesvirus 3*.



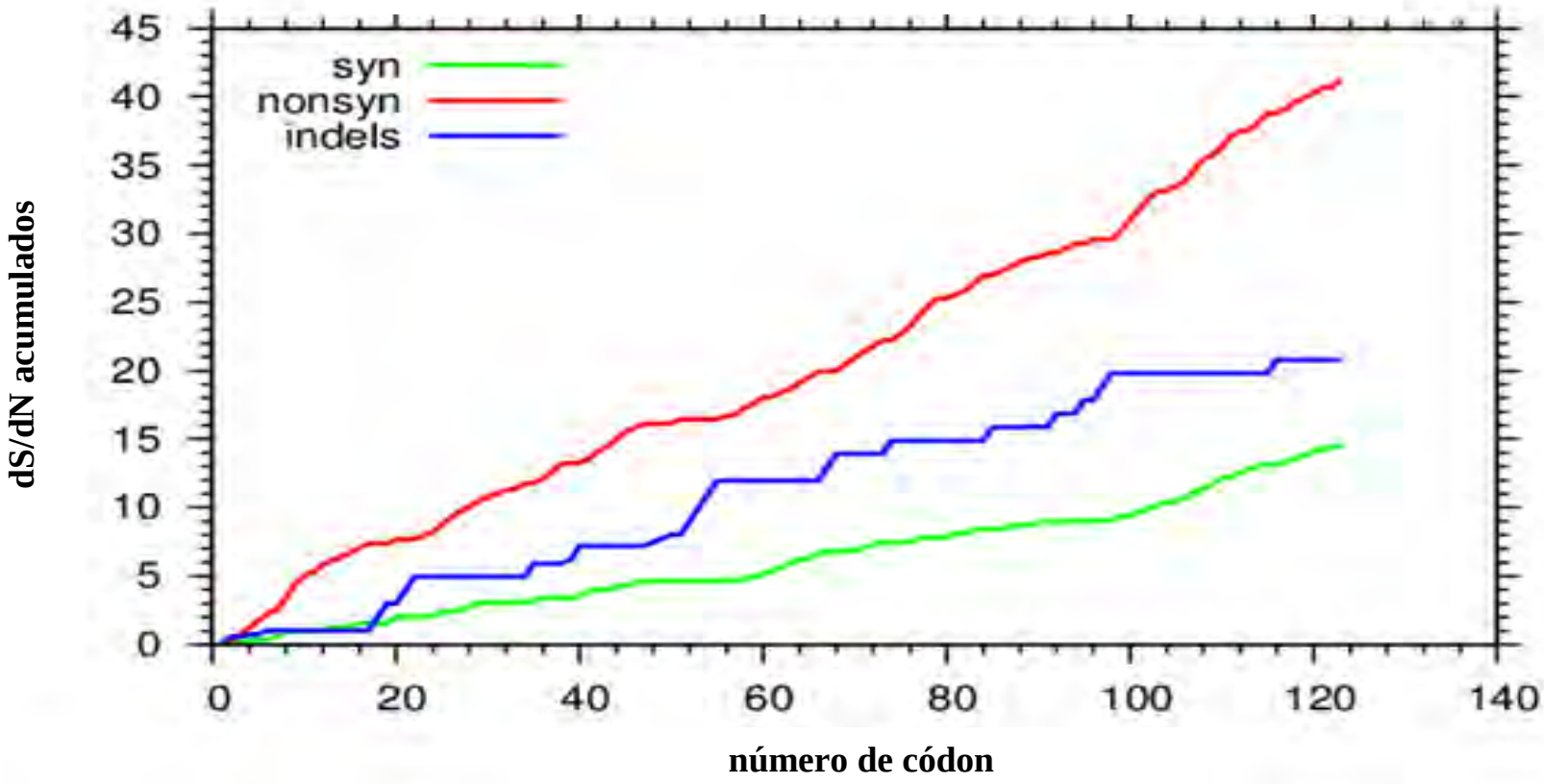
Fonte: Própria autoria.

Figura 14 – Representação gráfica da ocorrência de mutações sinônimas e não sinônimas nos nucleotídeos do gene MCP de *Limphocystivirus* obtida a partir do programa SNAP.



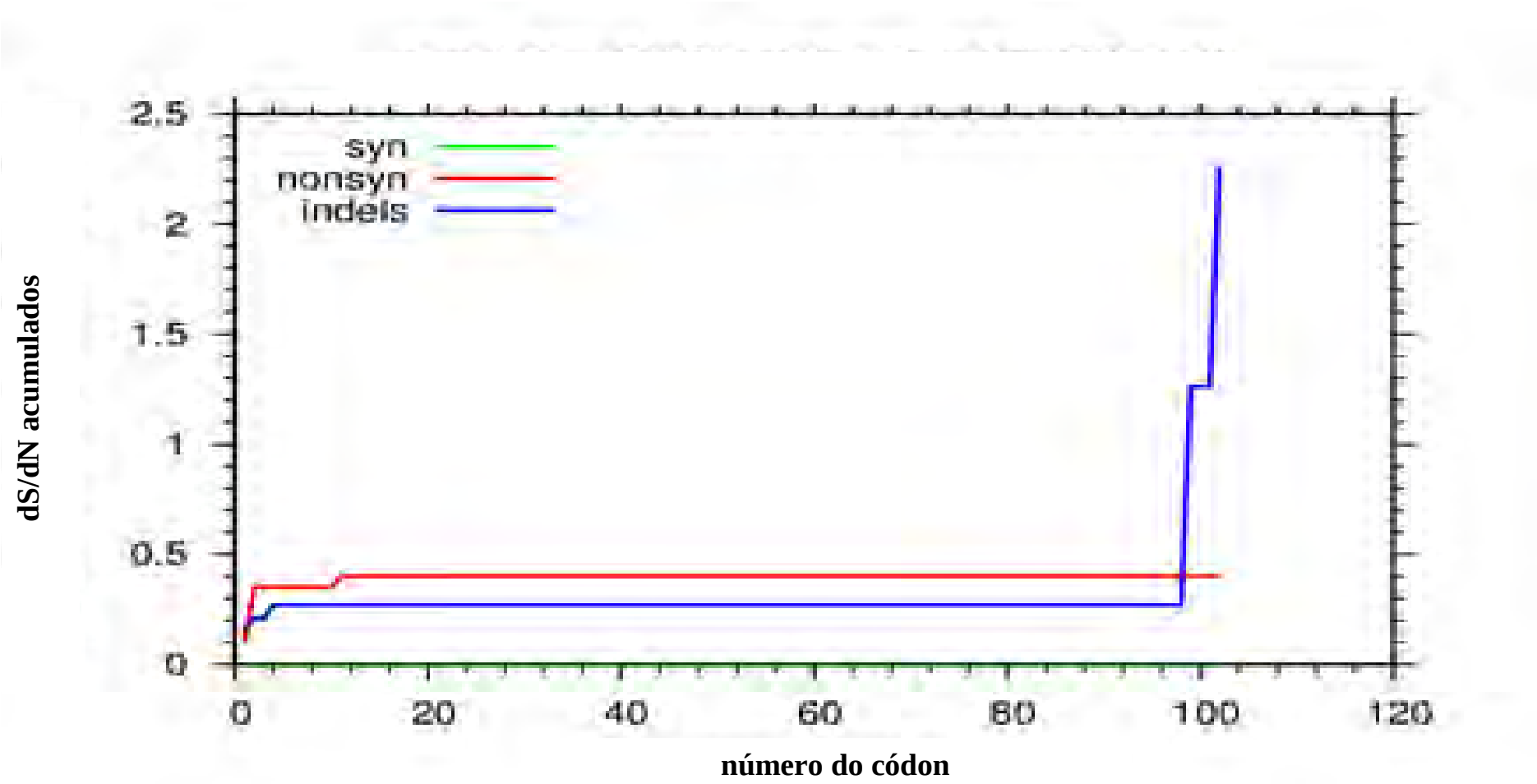
Fonte: Própria autoria.

Figura 15 – Representação gráfica da ocorrência de mutações sinônimas e não sinônimas nos nucleotídeos do gene MCP de *Megalocytivirus* obtida a partir do programa SNAP.



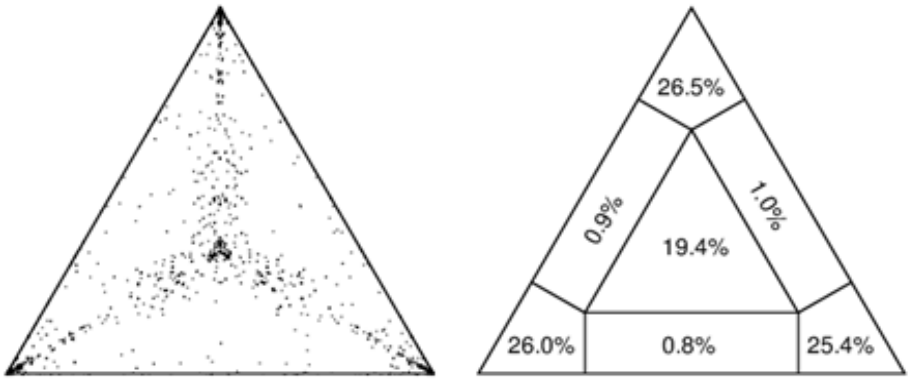
Fonte: Própria autoria.

Figura 16 – Representação gráfica da ocorrência de mutações sinônimas e não sinônimas nos nucleotídeos do gene TK de *Cyprinid herpesvirus 3* obtida a partir do programa SNAP.



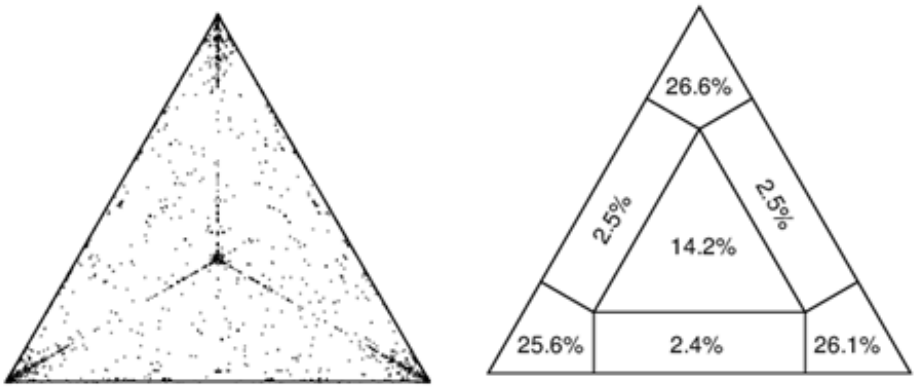
Fonte: Própria autoria.

Figura 17 – Análise de *likelihood mapping* para o gene MCP de para *Lymphocystivirus*.



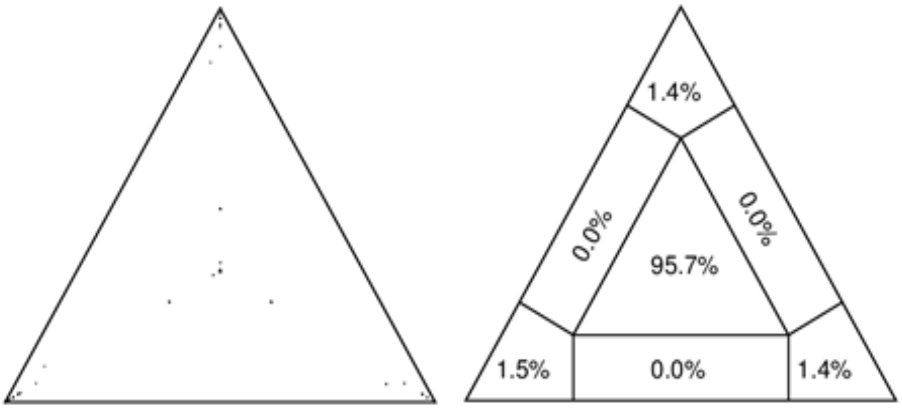
Fonte: Própria autoria.

Figura 18 – Análise de *likelihood mapping* para o gene MCP de *Megalocytivirus*.



Fonte: Própria autoria.

Figura 19 – Análise de *likelihood mapping* para o gene TK de para *Cyprinid herpesvirus 3*.



Fonte: Própria autoria.

7. DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo detectar e caracterizar vírus pertencentes às famílias *Alloherpesviridae* e *Iridoviridae* em peixes brasileiros de vida livre, de interesse zootécnico e ornamentais, provenientes de bacias hidrográficas, criações e estabelecimentos comerciais brasileiros visto que os membros destas famílias, em especial o *Cyprinid herpesvirus 3* e *Megalocytivirus* estão associados a graves perdas econônimas na aquicultura mundial devido à alta taxa de mortalidade apresentada pelos animais infectados. O gênero *Lymphocystivirus*, apesar de não causar uma elevada mortalidade entre os infectados, também representa um entrave ao crescimento exponencial da aquicultura visto que diminui significativamente o valor de mercado dos peixes infectados devido ao surgimento de lesões semelhantes a verrugas. Embora esses vírus sejam uma realidade no mundo, os dados epidemiológicos sobre a ocorrência destes agentes no Brasil são escassos e muitas vezes inexistentes como é o caso do *Cyprinid herpevirus 3* ou do *Megalocytivirus* cuja ocorrência ainda não foi descrita no território brasileiro.

Desse modo, formou-se uma banco de 306 amostras de peixes de diferentes espécies das quais todas foram processadas para *Cyprinid herpesvirus 3* e 81 foram processadas para os demais vírus incluindo *Cyprinid herpesvirus 1*, *Cyprinid herpesvirus 2*, *Megalocytivirus* e *Lymphocystivirus*. Para a detecção do *Cyprinid herpesvirus 3* foi realizado a técnica molecular de *nested*-PCR para a amplificação do gene TK, de acordo com Bercovier et al. (2005) e Pokorova et al. (2010). O mesmo gene alvo foi utilizado nos estudos de Sunarto et al. (2001) e Rahmati-Holasoo et al. (2016). Para a detecção dos vírus *Cyprinid herpesvirus 1* e *2*, foi utilizada a reação de PCR descrita por Shlapobersky et al. (2010). Para o diagnóstico das infecções causadas por membros dos gêneros *Lymphocystivirus* e *Megalocytivirus* também foi utilizada a técnica de PCR, visando a amplificação de fragmento do gene MCP de acordo com (KITAMURA; JUNG; OH, 2006) e Choi et al. (2006), respectivamente, sendo que algumas das amostras com padrão de banda dentro do esperado foram submetidas ao sequenciamento nucleotídico para confirmação dos resultados. O gene MCP por ser relativamente conservado, dentro da família *Iridoviridae*, permitindo contudo a discriminação entre gêneros e genotipos/variantes virais, é indicado para a realização de inferências filogenéticas (TIDONA et al., 1998; CANO et al., 2010). A utilização do gene MCP para a detecção e caracterização molecular do *Lymphocystivirus* também corrobora o trabalho de Hossain et al. (2008) que também utilizaram esse mesmo alvo para a realização da reconstrução filogenética.

Apenas 1 amostra de peixe ornamental, da espécie *Pomacanthus imperator*, proveniente de uma empresa do município de São Paulo, foi positiva para *Lymphocystivirus* corroborando resultados de Hossain et al. (2008) que também relataram a ocorrência desse gênero de vírus em peixes ornamentais, entre eles a espécie *Trichogaster leeri* proveniente de um estabelecimento comercial coreano.

Com relação à análise das sequências nucleotídicas, a similaridade da sequência parcial do gene MCP de *Lymphocystivirus* neste estudo, quando comparada com outras sequências homólogas de *Lymphocystivirus* retiradas do GenBank e que ficaram no mesmo clado filogenético da sequência brasileira, foi igual ou superior a 81,3%. Comparando a sequência obtida neste estudo com todas as sequências retiradas do GenBank, os valores de similaridade ficaram entre 44,8% e 91,1%. Já a identidade entre as mesmas sequências de nucleotídeos já descritas pertencentes ao mesmo clado da amostra brasileira foi igual ou superior a 81,3%. Considerando todas as sequências os valores de identidade variaram entre 42,9% e 92,1%.

A árvore filogenética baseada no gene MCP mostrou que a sequência de nucleotídeos obtida neste estudo para *Lymphocystivirus* ficou agrupada no mesmo clado da sequência EF184306 (KVITT et al., 2007), proveniente de Israel, e que é atualmente descrita como genótipo VII, com alto valor de *bootstrap* associado (75). A amostra brasileira apresentou 92,1% de identidade quando comparada com a sequência EF184306. Cano et al. (2010) também encontraram valores de identidade elevados (98,8%-99,5%) quando compararam as sequências oriundas de *Sparus aurata* obtidas em seu estudo com a sequência EF184306, sendo que estas sequências, após a reconstrução filogenética, permaneceram no mesmo clado da sequência EF184306.

Ao excluirmos as sequências L63545 e AY380826 da análise filogenética, as demais sequências de nucleotídeos apresentaram valores elevados de identidade (85,7%-92,1%) quando comparadas com a sequência brasileira (LCDV-BRA). Kitamura, Jung e Oh (2006) também obtiveram valores de identidade de nucleotídeos elevados (90,1%) quando compararam a sequência de seu estudo com outras sequências de *Lymphocystivirus* descritas na literatura.

A reconstrução filogenética para *Lymphocystivirus* realizada com base no gene MCP revelou a existência de 8 clados, sendo que cada um dos clados continham amostras pertencentes a um genótipo específico de *Lymphocystivirus*, com exceção das amostras relativas ao genótipo II que dividiram-se 2 clados dentro da árvore. Desse modo, a filogenia revelou a existência de 7 genótipos dentro do gênero, permitindo a divisão e a vizualização

dos mesmos dentro da árvore filogenética. Cano et al. (2007) e Palmer et al. (2012) ao realizarem a reconstrução filogenética para *Lymphocystivirus* com base no mesmo gene também observaram a separação dos clados em função dos genótipos. Cano et al. (2007) também relataram a divisão em dois clados das sequências relativas ao genótipo II.

Na análise filogenética, as sequências L63545 (LCDV-1) e AY380826 (LCDV-C) formaram um clado separado das demais sequências. Além disso, essas amostras apresentaram valores de identidade baixos (40%) quando comparadas com a sequência brasilerira e outras sequências retiradas do GenBank. Esses resultados corroboram com aqueles encontrados por Cano et al.(2007) que obtiveram valores de identidade baixos ao comparar as sequências de peixes da espécie *Sparus auratus* com as sequências dos isolados LCDV-1 e LCDV-C.

O teste de Tajima é um modelo matemático utilizado para se detectar os efeitos da seleção natural sobre o polimorfismo molecular. De acordo com a análise do valor de D obtido para *Lymphocystivirus* (D=-1,52765, com P>0,10) e comparando com o padrão de valores para o teste, conclui-se que D foi menor que 0, inferindo-se que, nas sequências estudadas, está ocorrendo possível seleção negativa no gene MCP analisado, sendo que o resultado indica a ocorrência de mutações silenciosas. Entretanto quando analisamos o gráfico contendo a relação de mutações sinônimas e não sinônimas (Figura 14), nas sequências analisadas através do programa SNAP, verificamos que houve um predomínio na ocorrência de mutações não sinônimas, o que revela a ocorrência de seleção positiva. Desse modo podemos concluir que as mutações provavelmente estão ocorrendo de forma relaxada ou fraca, e, portanto, num primeiro momento, não estão causando o surgimento de novas estirpes virais.

A análise através do *likelihood mapping* obtido através do programa TreePuzzle para *Lymphocystivirus* forneceu um valor de somatória dos quartetos igual a 77,9% (Figura 17), que está próximo ao valor mínimo considerado satisfatório pelo método que é 80%. Adicionalmente, não foi detectada saturação significante no conjunto das sequências analisadas (Figura 11). Desse modo, podemos concluir que as sequências obtidas apresentam conteúdo filogenético que justifica a confecção da árvore filogenética apresentada neste estudo.

Para *Megalocytivirus*, foram diagnosticadas 38 amostras positivas entre as 81 amostras analisadas, sendo que 12 dessas foram submetidas ao sequenciamento de nucleotídeos. Todas as amostras positivas eram provenientes de peixes ornamentais o que corrobora os resultados de Nolan et al. (2015) que encontraram uma alta taxa de positividade de 87,3% para o gênero

Megalocytivirus em 5 espécies de peixes ornamentais de água doce (*Xiphophorus maculatus*, *Aphyosemion gardneri*, *Poecilia latipinna*, *Xiphophorus helleri* e *Astronotus ocellatus*) de um setor de quarentena Australiano e com Sriwanayos et al. (2013) que relataram a ocorrência de infecções por *Megalocytivirus* em peixes ornamentais de água salgada da espécie *Platax orbicularis*, oriundos de um aquário público de quarentena na Bélgica. Os resultados estão de acordo com Jeong et al. (2008) que obtiveram uma positividade elevada para *Megalocytivirus* (61%) ao analisarem 10 espécies de peixes ornamentais de água doce. A principal explicação para a ampla distribuição global dos vírus deste gênero é o intenso comércio internacional de peixes ornamentais associada a outros motivos como a dificuldade no rastreamento da origem dos animais infectados e a ocorrência de contaminação cruzada via equipamentos e tanques (MAO et al., 1999; GO et al., 2006, NOLAN et al., 2015).

Apenas 8 amostras de Piranha Vermelha (*Pygocentrus nattereri)* apresentavam sintomatologia indicativa de infecção por *Megalocytivirus*: letargia e comportamento anormal ao nadar (natação irregular). Chen, Lin e Wang (2003), ao analisarem peixes da espécie *Larimichthys crocea* infectados pelo vírus, também relataram a ocorrência de natação irregular nos animais.

Entre as 38 amostras positivas no *nested*-PCR para *Megalocytivirus*, 10 delas eram oriundas de animais que não apresentavam manifestações clínicas, corroborando com os resultados de Jeong et al. (2008), que também não relataram a ocorrência de sinais clínicos em diferentes espécies de peixes ornamentais infectados pelo *Infectious spleen and kidney necrosis vírus*, pertencente ao gênero *Megalocytivirus*. Wang et al. (2007) também relataram a ocorrência de infecção assintomática por *Megalocytivirus* em 47 espécies de peixes. Neste estudo, foi relatada a ocorrência de infecção por *Megalocytivirus* em 2 peixes ornamentais da espécie *Trichogaster leeri* que apresentavam letargia como sinais clínicos únicos e inespecíficos quando analisada de forma isolada, podendo estar presente em diversas infecções. Esses resultados estão de acordo com Subramaniam et al. (2014) que também relataram a ocorrência de infecções por *Megalocyitivirus* em peixes dessa espécie que se mostravam assintomáticos.

A ocorrência de infecção na ausência de sinais clínicos demonstra que essas espécies, aparentemente sadias, estão infectadas permanentemente com a forma latente do vírus e representam uma importante fonte de transmissão para outras espécies de peixes quando submetidas a condições de coabitação, representando dessa forma um grave problema para a aquicultura mundial (SUBRAMANIAM et al, 2014; JEONG et al., 2006b).

O presente estudo detectou a presença de infecção por *Megalocytivirus* nas espécies de peixes *Poecilia reticulata* e *Hypostomus plecostomus*. Rimmer et al. (2015) também relatram em seu estudo a ocorrência de infecção por *Megalocytivirus* em peixes ornamentais da espécies *Poecilia reticulata*. Já Subramaniam et al. (2014) também estudaram a presença de infecção por vírus desse gênero em peixes das espécies *Poecilia reticulata* e *Hypostomus plecostomus*; entretanto, todas as amostras foram negativas após a realização do PCR.

Com relação à análise de identidade e de similaridade das sequências de nucleotídeos para *Megalocytivirus*, a similaridade entre as 12 amostras sequenciadas foi igual ou superior a 91,3%, quando comparadas umas as outras, já quando comparadas a outras sequências de referência depositadas no GenBank a similaridade variou entre 45,5% e 91,6%. A identidade entre as sequências deste estudo foi elevada (99,5%-100,0%) e quando comparadas com as outras sequências de referência variou entre 46,9% e 99,2%.

Os resultados descritos anteriormente colaboram com os estudos de Subramanian et al. (2014) que também encontraram valores de identidade (99,8-100%) elevados ao compararem, umas com as outras, as 10 sequências de nucleotídeos oriundas de 5 espécies de peixes ornamentais detectadas em seu estudo como portadores de infecção por *Megalocytivirus*.

A análise no programa BLAST da sequência de 369pb revelou que todas as sequências brasileiras, com exceção da sequência MV256-BRA, apresentaram 99%-100% de identidade com a região colinear do gene MCP do *Megalocytivirus* Sabah/RAA1/2012, cepa BMGIV48 (Número de Acesso no GenBank: JQ253374) originária da Malásia. Esses resultados concordam com os estudos de Nolan et al. (2015), que encontraram 100% de identidade entre as sequências por eles obtidas com a sequência JQ235374.

Na reconstrução filogenética do *Megalocytivirus*, utilizando fragmentos de 369pb verificou-se que as sequências brasileiras MV247-BRA, MV248-BRA, MV253-BRA, MV256-BRA, MV257-BRA, MV258-BRA, MV259-BRA, MV260-BRA, MV269-BRA, MV272-BRA, MV275-BRA e MV279-BRA praticamente formaram um clado único. Estes resultados colaboram com Subramanian et al. (2014) que também observaram que as 10 sequências de nucleotídeos obtidas em seu estudo, a partir de peixes ornamentais, localizaram-se no mesmo clado quando foi realizada a reconstrução filogenética.

Na reconstrução filogenética, as sequências brasileiras posicionaram-se no mesmo clado das sequências AF370008, AY285744 e AY285745. Subramanian et al. (2014) observaram que as sequências de seu estudo agruparam-se também com a sequência AF370008 e AY285745. Nolan et al. (2015) também relataram o posicionamento da

sequência obtida de peixe ornamental em seu estudo no mesmo clado das sequências AY285744 e AY285745. A sequência AF370008 é descrita como pertencente à espécie *Infectious spleen and kidney necrosis vírus*, dentro do gênero *Megalocytivirus*, indicando que as sequências brasileiras estão filogeneticamente mais próxima desta espécie.

Subramaniam et al. (2014) observaram que as sequências de seu estudo formaram um clado separado da sequência AY285746, separação esta que também foi vizualizada neste estudo.

O mesmo resultado do teste de Tajima descrito anteriormente para *Lymphocysitivirus* foi obtido analisando-se as sequências de *Megalocytivirus* obtidas, sendo que o valor de D foi de -0,67817 com P>0,10, indicando a ocorrência de seleção negativa. Já o gráfico obtido no programa SNAP (Figura 15) revelou o predomínio de mutações não sinônimas nas sequências de nucleotídeos estudadas, indicando o predomínio de seleção positiva. Desse modo podemos igualmente concluir que as mutações estão ocorrendo de forma relaxada e, portanto, em curto prazo, não estão promovendo eventos de especiação.

O *likelihood mapping* obtido através do programa TreePuzzle para *Megalocytivirus* forneceu um valor de somatória dos quartetos igual a 78,3% (Figura 18), que está próximo ao valor mínimo considerado satisfatório pelo método que é 80%. Adicionalmente, não foi detectada saturação significante no conjunto das sequências analisadas (Figura 12); assim, podemos concluir que as sequências obtidas apresentam conteúdo filogenético que justifica a elaboração da reconstrução filogenética apresentada neste estudo.

Para *Cyprinid herpesvirus 3*, foram obtidas 6 amostras positivas entre as 306 amostras analisadas o que revela um índice de positividade de 2%, sendo que 4 dessas amostras foram confirmadas através da realização do sequenciamento de nucleotídeos. As amostras positivas eram de peixes ornamentais das espécies *Pygocentrus nattereri*, *Cyprinus carpio*, *Misgurnos anguillicaudatus*, *Carassius auratus*, *Xiphophorus maculatus* e *Hyphessobrycon eque*. As espécies *Carassius auratus* e *Hyphessobrycon eque* mostravam-se assintomáticas. Já espécimes de *Xiphophorus maculatus*, *Misgurnus anguillicaudatus* e *Cyprinis carpio* apresentavam como sintomatologia única a apatia, que apesar de ser um dos sinais clínicos descritos na infecção por *Cyprinid herpesvirus 3*, é bastante inespecífico, podendo ser decorrente de várias infecções virais e bacterianas. Um espécime de *Pygocentrus nattereri* apresentava letargia e natação errática; entretanto, esse espécime estava co-infectado por *Megalocytivirus* e essa sintomatologia é característica das infecções causadas por membros desse gênero.

A ocorrência de CyHV-3 em peixes da espécie *Cyprinus carpio* é uma realidade visto que esta espécie é a principal atingida por esse vírus, em consonância com outros estudos como o realizado por Rahmati-Holasoo et al. (2016) que também descreveu a ocorrência de infecção por *Cyprinid herpesvirus 3* em peixes desta espécie. Apesar de infectar predominantemente carpas, neste estudo foi relatado, de maneira inédita no Brasil, a ocorrência do *Cyprinid herpesvirus 3* em outras espécies de peixes ornamentais. Estes resultados estão em consonância com os estudos de Bergmann et al. (2009) que também reportaram a ocorrência de infecção pelo vírus em outras espécies de peixes ornamentais, entre elas, a espécie *Carassius auratus*; além disso, estes peixes analisados mostravam-se assintomáticos e, portanto, aparentemente sadios, da mesma forma que os peixes analisados por este trabalho. Segundo estudos de Bergmann et al. (2010a), a espécie *Carassius auratus* é susceptível a infecção pelo *Cyprinid herpesvirus 3* mas, após a ocorrência da infecção, *C. auratus* não desenvolve a doença, tornando-se portador assintomático do vírus e, portanto, uma fonte de infecção em potencial do vírus para outras espécies de peixes. Uma das principais explicações para a ocorrência do *Cyprinid herpesvirus 3* em outras espécies é a coabitação destas espécies em tanques que contém peixes da espécie *Cyprinus carpio* infectados pelo CyHV-3 (EL-MATBOULI; SALEH; SOLIMAN, 2007; GOSTEMAN et al., 2014).

Com relação à análise de identidade e de similaridade das sequências de nucleotídeos para *Cyprinid herpesvirus 3*, foram obtidos valores de similaridade superior a 97,4% quando comparadas entre as 4 amostras sequenciadas e valores superiores a 97,0% quando comparadas às amostras obtidas neste estudo com outras sequências de nucleotídeos depositadas no GenBank. A identidade entre as sequências deste estudo foi superior a 97,7% e quando comparadas com as outras sequências de referência depositadas no GenBank foi superior a 97,4%.

De acordo com a análise do valor de D obtido no teste de Tajima para *Cyprinid herpesvirus 3* (D=-1,25769 com P>0,10) e comparando o valor com o padrão de valores para o teste, concluímos que D foi menor que 0 o que indica que nas sequências estudadas está ocorrendo seleção negativa no gene TK analisado, sendo que o resultado indica a ocorrência de mutações que, no entanto, permanecem silenciosas. Entretanto, quando analisamos o gráfico contendo a relação de mutações sinônimas e não sinônimas (Figura 16), nas sequências analisadas, verificamos que houve um predomínio na ocorrência de mutações não sinônimas nas sequências de nucleotídeos, o que revela a ocorrência de seleção positiva; muito embora numa taxa constante ao longo da sequência de códons e numa magnitude

relativamente menor quando comparada àquelas verificadas para LCDV e MV. Desse modo podemos concluir que as mutações estão também ocorrendo de forma relaxada, e, portanto, não implicando no surgimento de novas estirpes virais.

Quanto à análise de *likelihood mapping* para CyHV-3, as sequências apresentaram sinal filogenético ou conteúdo informativo muito baixo (4,3%) (Figura 19), limitando possível inferência filogenética. Contudo, não foi detectada saturação significante no conjunto das sequências analisadas (Figura 13), sendo que curva de transversões apresentou-se praticamente paralela ao eixo da distância genética, indicando a mais baixa frequência de tranversões entre os vírus analisados no presente estudo. Nesse sentido, procedeu-se à reconstrução filogenética. Por outro lado, associando-se os dados de dS/Dn, *likelihood mapping* e mesmo distância genética na árvore filogenética obtida (Figura 10) para CyHV-3, verifica-se que o gene alvo TK é altamente conservado entre as variantes de CyHV-3.

A reconstrução filogenética com base no gene TK do *Cyprinid herpesvirus 3* utilizando sequências de 349pb revelou a existência de 2 clados distintos, sendo que um clado contém 1 amostra brasileira em associação com amostras pertencentes aos genótipos europeus e asiáticos de CyHV-3 e o segundo clado continha apenas as amostras brasileiras sequênciadas neste estudo. Dong et al. (2013), ao realizarem análise filogenética contendo parte das sequências obtidas no GenBank descritas neste estudo, também observaram a formação de 2 clados, nos quais as sequências de CyHV-3 pertencentes ao genótipo asiático e ao genótipo europeu formaram clados separados; entretanto, salienta-se que as sequências utilizadas para a reconstrução filogenética eram bem maiores (651pb), permitindo-se um maior poder discriminatório do que aquele verificado no presente estudo. Rahmati-Holasoo et al. (2016) também revelaram a existência de dois clados (genótipos asiático e europeu) dentro da resconstrução filogenética para CyHV-3, utilizando fragmentos de 409pb do gene TK. Não obstante, a formação de um clado contendo apenas amostras brasileiras evindecia o possível surgimento de um genótipo americano de CyHV-3.

Todas as amostras processadas foram negativas para *Cyprinid herpesvirus 1* e *Cyprinid herpesvirus 2*, o que não exclui a possibilidade destes agentes causadores de doença estarem circulando entre os peixes brasileiros. A principal explicação para esse resultado é que as cepas circulantes no Brasil podem ter sofrido modificações genéticas para se adaptarem e, portanto, os primers utilizados não foram capazes de se anelarem adequadamente nos sítios específicos do DNA viral, impedindo a amplificação pela PCR. Nesse caso, *primers* específicos com base em região de dissimilaridade do genoma entre CyHV-1 e CyHV-2 pode ser estratégia a ser considerada. Waltzek et al. (2009a) obtiveram

uma positividade elevada (31 amostras positivas entre 37 processadas) para *Cyprinid herpesvirus 2*, ao utilizarem *primers* específicos baseado na DNA helicase dessa espécie viral.

Em síntese, o presente trabalho procurou contribuir para a melhor compreensão da possível circulação no Brasil de agentes virais de importância em sanidade piscícola, trazendo subsídios inéditos para a elucidação da epidemiologia molecular de representantes das famílias *Alloherpesviridae* e *Iridoviridae* em espécimes ornamentais comercializados no país. Notoriamente, os resultados obtidos sugerem estudos posteriores relativos ao isolamento e caracterização genômica mais completa, além de ensaios de infectivade *in vitro* e *in vivo*, bem como a prospecção com primers específicos para CyHV-1 e CyHV-2, a fim se de conhecer melhor as variantes detectadas, potencialmente colaborando com a implementação de protocolos de biosseguridade, prevenção e controle mais eficazes contra as viroses associadas.

8. CONCLUSÕES

1. Através da utilização da técnica molecular de PCR, foram processadas 306 amostras para *Cyprinid herpesvirus 3* e 81 amostras para *Cyprinid herpesvirus 1*, *Cyprinid herpesvirus* 2, *Megalocytivirus* e *Lymphocystivirus*, sendo que o valor de positividade foi de 2% (6 amostras positivas entre 306 analisadas) para *Cyprinid herpesvirus 3*, 1,2% (1 amostra entre 81 analisadas) para *Lymphocystivirus* e 47% (38 amostras positivas entre 81 analisadas) para *Megalocystivirus*.

2. Entre as amostras positivas foram obtidas, de maneira inédita no país: 1 sequência nucleotídica para *Lymphocystivirus,* 12 sequências nucleotídicas para *Megalocyitivirus* e 4 sequências nucleotídicas para *Cyprinid herpesvirus 3*, sendo que as mesmas apresentaram valores de similaridade e identidade variáveis quando comparadas com outras sequências de nucleotídeos disponíveis no GenBank.

3. Na reconstrução filogenética do gênero *Lymphocystivirus*, a amostra brasileira foi mais próxima filogeneticamente de sequência representativa do genotipo VII. Já a árvore filogenética do gênero *Megalocytivirus* revelou a existência de clado praticamente único de MV-BRA, enquanto que a reconstrução filogenética de *Cyprinid herpesvirus 3*, revelou a existência de 2 clados, sendo que 3 amostras brasileiras agruparam-se em clado isolado, sugerindo o possível surgimento de um genótipo americano de CyHV-3.

4. As análises de evolução e polimorfismos revelaram que em todas as amostras analisadas houve um predomínio de seleção negativa, embora estatisticamente não significante. Já pela análise gráfica, verificou-se a ocorrência de seleção positiva, de modo que podemos concluir que as mutações estão ocorrendo de forma relaxada e, portanto, não estão levando ao surgimento de novas espécies.

5. O sinal filogenético dos 3 conjuntos de sequências analisados, respectivamente para LCDV, MV e CyHV-3, foi próximo (LCDV e MV) ou inferior (CyHV-3) ao limite mínimo recomendado para a reconstrução filogenética. No entanto, não foi detectado nível de saturação nesses conjuntos capaz de comprometer a elaboração e análise dos respectivos cladogramas obtidos.

6. A ausência de resultados positivos para CyHV-1 e CyHV-2 entre as amostras processadas no presente trabalho não exclui a possibilidade dessas espécies virais estarem circulando entre peixes no país, requerendo-se maiores estudos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMEK, M. et al. Biology and host response to Cyprinid herpesvirus 3 infection in common carp. **Developmental and Comparative Immunology**, Kidlington, v. 43, p. 151-159, 2014.

AHNE, W.; SCHLOTFELDT, H. J.; THOMSEN, I. Fish viruses: isolation of an icosahedral cytoplasmic deoxyribovirus from sheatfish (*Silurus glanis*). **Journal of veterinary Medicine, Series B**, Berlin, v. 36, p. 333-336, 1989.

ALAVANDI, S. V.; POORNIMA, M. Viral metagenomics: a tool for virus discovery and diversity in aquaculture. **Indian Journal of Virology**, New Delhi, v. 23, n. 2, p. 88-98, 2012.

ALONSO, M. C. et al. Isolation of lymphocystis disease virus from sole, *Solea senegalensis* Kaup, and blackspot sea bream, *Pagellus bogaraveo* (Brünnich). **Journal of Fish Diseases**, Chichester, v. 28, p. 221-228, 2005.

ALTSCHUL, S. F. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.

AMAL, M. N. A.; ZAMRI-SAAD, M. Streptococcosis in tilapia (*Oreochromis niloticus*): a review. **Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science**, Serdang, v. 34, n. 2, p. 195-206, 2011.

AO, J. Q.; CHEN, X. H. Identification and characterization of a novel gene encoding an RGD-containing protein in large yellow croaker iridovirus. **Virology**, Waltham, v. 355, p. 213-222, 2006.

AOKI, T. et al. Genome sequences of three koi herpesvirus isolates representing the expanding distribution of an emerging disease threatening koi and common carp worldwide. **Journal of Virology**, Washington, v. 81, p. 5058-5065, 2007.

BAUMER, A. et al. Epidemiology of cyprinid herpesvirus-3 infection in latently infected carp from aquaculture. **Disease of Aquatic Organisms**, Oldendorf, v. 105, p. 101-108, 2013.

BARBOUR, K. W. et al. Characterization of the bipartite degron that regulates ubiquitin-independent degradation of thymidylate synthase. **Bioscience Reports**, London, v. 33, n. 1, p. 165-183, 2013.

BERCOVIER, H. et al. Cloning of the *koi herpesvirus* (KHV) gene encoding thymidine kinase and its use for a highly sensitive PCR based diagnosis. **BMC Microbiology**, London, v. 5, n. 13, p. 1-9, 2005.

BERGMANN, S. M. et al. Goldfish (*Carassius auratus auratus*) is a susceptible species for koi herpesvirus (KHV) but not for KHV disease (KHVD). **Bulletin of the European Association of Fish Pathology**, Aberdeen, v. 29, p. 145-152, 2010a.

BERGMANN, S. M. et al. Investigation on the diagnostic sensitivy of molecular tools used for detection of koi herpesvirus. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 163, p. 229-233, 2010b.

BERGMANN, S. M. et al. Detection of koi herpes-virus (KHV) genome in apparently healthy fish. **Bulletin of the European Association of Fish Pathology**, Aberdeen, v. 29, p. 145-152, 2009.

BOISON, J. O.; TURNIPSEED, S. B. A review of aquaculture practices and their impacts on chemical food safety from a regulatory perspective. **Journal of AOAC International**, Rockville, v. 98, n. 3, p. 541-549, 2015.

BRASIL. Ministério de Pesca e Aquicultura. **Potencial brasileiro.** 2014a**.** Disponível em: <http://www.mpa.gov.br/index.php/aquicultura/potencial-brasileiro>. Acesso em: 16 fev. 2016.

_____. **Espécies cultivadas.** 2014b**.** Disponível em:<http://www.mpa.gov.br/index.php/aquiculturampa/informacoes/especies-cultivadas>. Acesso em: 16 fev. 2016.

_____. **Emprego e renda.** 2011**.** Disponível em:< http://www.mpa.gov.br/index.php/aquiculturampa/informacoes/emprego-e-renda>. Acesso em: 22 fev. 2014.

CAMPANELLA, J. J.; BITINCKA, L.; SMALLEY, J. MatGAT: an application that generates similarity/identity matrices using protein or DNA sequences. **BMC Bioinformatics**, London, v. 4, art. 29, 2003.

CANO, I. et al. A new genotype of *Lymphocystivirus* isolated from cultured gilthead seabream, *Sparus aurata* L., and Senegalese sole, *Solea senegalensis* (Kaup). **Journal of Fish Diseases**, Chichester, v. 33, p. 695-700, 2010.

CANO, I. et al. Development of molecular techniques for detection of lymphocystis disease virus (LCDV) in different marine fish species. **Journal of Applied Microbiology**, Chichester, v. 102, p. 32-40, 2007.

CAVALLI, R. O.; DOMINGUES, E. de C.; HAMILTON, S. Desenvolvimento da produção de peixes em mar aberto no Brasil: possibilidades e desafios. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 40, p. 155-164, 2011. Suplemento especial.

CHANG, P. H. et al. Epizootic of herpes-like virus infection in goldfish, *Carassius auratus* in Taiwan. **Fish Pathology**, Tokyo, v. 34, n. 4, p. 209-210, 1999.

CHAO, C. B. et al. Histological, ultrastructural, and in situ hybridization study on enlarged cells in grouper *Epinephelus hybrids* infected by grouper iridovirus in Taiwan (TGIV). **Disease of Aquatic Organisms**, Oldendorf, v. 58, p. 127-142, 2004.

CHEN, X. H.; LIN, K. B.; WANG, X. W. Outbreaks of an iridovirus disease in maricultured large yellow croaker, *Larimichthys crocea* (Richardson), in China. **Journal of Fish Diseases**, Chichester, v. 26, p. 615-619, 2003.

CHINCHAR, V. Ranaviruses (family Iridoviridae): emerging cold-bloodedkillers. **Archives of Virology**, Wien, v. 147, p. 447-470, 2002.

CHO, M. Y. et al. Detection of koi herpesvirus (KHV) in healthy cyprinid seed stock. **Disease of Aquatic Organisms**, Oldendorf, v. 112, p. 29-36, 2014.

CHOI, S. K. et al. Organ distribution of red sea bream iridovirus (RSIV), DNA in asymptomatic yearling and fingerling rock bream (*Oplegnathus fasciatus*) and effects of water temperature on transmition of RSIV into acute phase. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 256, p. 23-26, 2006.

CHOU, H. Y.; HSU, C. C.; PENG, T. Y. Isolation and characterization of a pathogenic iridovirus from cultured grouper (*Epinephelus* sp.) in Taiwan. **Fish Pathology**, Tokyo, v. 33, p. 201-206, 1998.

CIULLI, S. et al. Development and application of a real-time PCR assay for the detection and quantitation of lymphocystis disease virus. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 213, p. 164-173, 2015.

COLLINS, J. P.; STORFER, A. Global amphibian declines: sorting the hypotheses. **Diversity and Distributions**, Chichester, v. 9, p. 89-98, 2003.

COLORNI, A.; DIAMANT, A. Splenic and cardiac lymphocystis in the red drum, Scaenops ocellatus (L.). **Journal of Fish Diseases**, Chichester, v. 18, p. 467-471, 1995.

COSCELLI, G. A. et al. Vaccination against *Aeromonas salmonicida* in turbot (*Scophthalmus maximus* L.): study of the efficacy, morphological changes and antigen distribution. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 445, p. 22-32, 2015.

COSTES, B. et al. The major portal of entry of koi herpesvirus in *Cyprinus carpio* is the skin**.** **Journal of Virology**, Washington, v. 83, p. 2819-2830, 2009.

DARAI, G. et al. Analysis of the genome of fish lymphocystis disease virus isolated directly from epidermal tumours of pleuronectes. **Virology**, Waltham, v. 126, p. 466-479, 1983.

DASZAK, P. et al. Emerging infectious diseases and amphibian population declines. **Emerging Infectious Disease**, Atlanta, v. 5, p. 735-748, 1999.

DASZAK, P.; CUNNINGHAM, A. A.; HYATT, A. D. Infectious disease and amphibian population declines. **Diversity and Distributions**, Chichester, v. 9, p. 141-150, 2003.

DAVISON, A. J. et al. comparative genomics of carp herpesviruses. **Journal of Virology**, Washington, v. 87, n. 5, p. 2908-2922, 2013.

DAVISON, A. J. et al. The order herpesvirales. **Archives of Virology**, Wien, v. 154, p. 171-177, 2009.

DAWOOD, M. A. O.; KOSHIO, S. Recent advances in the role of probiotics and prebiotics in carp aquaculture: A review. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 454, p. 243-251, 2016.

DING, Z. et al. HIstopathological characterization and fluorescence in situhybridization of Cyprinid herpesvirus 2 in cultured Prussian carp, Carassius auratus gibelio in China. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 206, p. 76-83, 2014.

DISHON, A. et al. Detection of carp interstitial nephritis and gill necrosis virus infish droppings. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 7285-7291, 2005.

DO, J. W. et al. Phylogenetic analysis of the major capsid protein gene of iridovirus isolates from cultured flounders *Paralichthys olivaceus* in Korea. **Disease of Aquatic Organisms**, Oldendorf, v. 64, p. 193-200, 2005.

DO, J. W. et al. Complete genomic DNA sequence of rock bream iridovirus. **Virology**, Waltham, v. 325, p. 351-363, 2004.

DONG, C. et al. Phylogeny and evolution of multiple common carp (*Cyprinus carpio* L.) populations clarified by phylogenetic analysis based on complete mitochondrial genomes. **Marine Biotechnology**, New York, v. 17, p. 565-575, 2015.

DONG, C. et al. Emergence of fatal European genotype CyHV-3/KHV in mailand China. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 162, p. 239-244, 2013.

DONOHOE, O. H. et al. Identification and characterization of Cyprinid Herpesvirus-3 (CyHV-3) encoded MicroRNAs. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 10, n. 4, p. 1-36, 2015.

EATON, H. E.; RING, B. A.; BRUNETTI, C. R. The genomic diversity and phylogenetic relationship in the family *Iridoviridae.* **Viruses**, Basel, v. 2, p. 1458-1475, 2010.

EIDE, K. E. et al. Investigation of Koi Herpesvirus latency in Koi. **Journal of Virology**, Washington, v. 85, p. 4954-4962, 2011.

ENGELSMA, M. Y. et al. Detection of novel strains of cyprinid herpesvirus closely related to koi herpesvirus. **Disease of Aquatic Organisms**, Oldendorf, v. 107, p. 113-120, 2013.

EL-MATBOULI, M.; RUCKER, U.; SOLIMAN, H. Detection of *Cyprinid herpesvirus-3* (CyHV-3) DNA in infected fish tissues by nested polymerase chain reaction. **Disease of Aquatic Organisms,** Oldendorf, v. 78, p. 23-28, 2007.

EL-MATBOULI, M.; SALEH, M.; SOLIMAN, H. Detection of cyprinid herpesvirus type 3 in goldfish cohabiting with CyHV-3-infected koi carp (*Cyprinus carpio koi*). **The Veterinary Record**, London, v. 161, p. 792-793, 2007.

FABIAN, M.; BAUMER, A.; STEINHAGEN, D. Do wild fish species contribute to the transmission of koi herpesvirus to carp in hatchery ponds? **Journal of Fish Diseases,** Chichester, v. 36, p. 505-514, 2013.

FABIAN, M. et al. Transmission of Cyprinid herpesvirus 3 by wild fish species - results from infection experiments. **Journal of Fish Diseases**, Chichester, v. 39, n. 5, p. 625-628, 2016.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO. **The State of world fisheries and aquaculture**. Rome: FAO, 2014.

_____. The State of world fisheries and aquaculture. Rome: FAO, 2012.
_____. The State of world fisheries and aquaculture. Rome: FAO, 2010.

_____. The State of world fisheries and aquaculture. Rome: FAO, 2008.
_____. The State of world fisheries and aquaculture. Rome: FAO, 2006.

FIGUEIREDO, H. C. P.; LEAL, C. A. G. Tecnologias aplicadas em sanidade de peixes. **Revista Brasileira de Zootecnia,** Viçosa, v. 37, p. 8-14, 2008.

FORZÁN, M. J. et al. Clinical signs, pathology and dose-dependent survival of adult wood frogs, *Rana sylvatica*, inoculated orally with frog virus 3 (*Ranavirus* sp., *Iridoviridae*). **Journal of General Virology**, London, v. 96, p. 1138-1149, 2015.

GARVER, K. H. et al. Mass mortality associated with koi herpesvirus in wild common carp in Canada. **Journal of Wildlife Diseases**, Lawrence, v. 46, n. 4, p. 1242-1251, 2010.

GILAD, O. et al. Concentrations of a Koi herpesvirus (KHV) in tissues of experimentally infected *Cyprinos carpio koi* as assessed by real-time TaqMan PCR. **Disease of Aquatic Organisms**, Oldendorf, v. 60, p. 179-187, 2004.

GILAD, O. et al. Molecular comparison of isolates of an emerging fish pathogen, the koi herpesvirus, and the effect of water temperature on mortality of experimentally infected koi. **Journal of General Virology**, London, v. 84, p. 2661-2667, 2003.

GILAD, O. et al. Initial characteristics of koi herpesvirus and development of a polymerase chain reaction assay to detect the virus in koi, *Cyprinus carpio koi*. **Disease of Aquatic Organisms**, Oldendorf, v. 48, p. 101-108, 2002.

GO, J. et al. The molecular epidemiology of iridovirus in murray cod (*Maccullochella peelii peelii*) and dwarf gourami (*Colisa lalia*) from distant biogeographical regions suggests a link between trade in ornamental fish and emerging iridoviral diseases. **Molecular and Cellular Probes**, London, v. 20, p. 212-222, 2006.

GOODWIN, A. E.; MERRY, G. E.; SADLER, J. Detection of the herpesviral hematopoietic necrosis disease agent (*Cyprinid herpesvirus 2*) in moribund and healthy goldfish: validation of a quantitative PCR diagnostic method. **Disease of Aquatic Organisms**, Oldendorf, v. 69, p. 137-143, 2006.

GOSTESMAN, M. et al. CyHV-3: the third cyprinid herpesvirus. **Disease of Aquatic Organisms**, Oldendorf, v. 105, p. 163-174, 2013.

GRANOFF, A.; CAME, P. E.; BREEZE, D. C. Viruses and renal carcinoma of Rana pipiens. I. - the isolation and properties of virus from normal and tumor tissue. **Virology**, Waltham, v. 29, p. 133-148, 1966.

GRAY, W. et al. Detection of koi herpesvirus DNA in tissue of infected fish. **Journal of Fish Diseases**, Chichester, v. 25, p. 171-178, 2002.

GROFF, J. M. et al. A viral epizootic in cultured populations of juvenile goldfish due to a putative herpesvirus etiology. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Thousand Oaks, v. 10, p. 375-378, 1998.

GUO, F. C.; WOO, P. T. K. Selected parasitosis in cultured and wild fish. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 163, p. 207-216, 2009.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series,** Oxford, n. 41, p. 95-98, 1999.

HASEGAWA, M.; KISHINO, H.; YANO, T. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. **Journal of Molecular Evolution**, New York, v. 22, n. 2, p. 160-74, 1985.

HE, J. G. et al. Complete genome analysis of the mandarin fish infectious spleen and kidney necrosis iridovirus. **Virology**, Waltham, v. 291, p. 126-139, 2001.

HE, J. G. et al. Systemic disease caused by an iridovirus-like agent in cultured mandarin fish, *Siniperca chuatsi* (Basilewsky), in China. **Journal of Fish Diseases**, Chichester, v. 23, p. 219-222, 2000.

HEDRICK, R. P. Movement of pathogens with the international trade of live fish: problems and solutions. **Revue Scientifique et Techinique**, Paris, v. 15, n. 2, p. 523-531, 1996.

HEDRICK, R. P. et al. A herpesvirus associated with mass mortality of juvenile and adult koi, a strain of common carp. **Journal of Aquatic Animal Health,** New York, v. 12, p. 44-55, 2000.

HEDRICK, R. P. et al. Properties of three iridovirus-like agents associated with systemic infections of fish. **Disease of Aquatic Organisms**, Oldendorf, v. 13, p. 203-209, 1992.

HEDRICK, R. P.; MCDOWELL, T. S. Properties of iridoviruses from ornamental fish. **Veterinary Research**, London, v. 26, p. 423-427, 1995.

HOSSAIN, M. et al. Phylogenetic analysis of lymphocystis disease virus from tropical ornamental fish species based on a major capsid protein gene. **Journal of Fish Diseases,** Chichester, v. 31, p. 473-479, 2008.

INOUYE, K. et al. Iridovirus infection of cultured red sea bream, *Pagrus major*. **Fish Pathology**, Tokyo, v. 27, p. 19-27, 1992.

ITO, T.; MAENO, Y. Effects of experimentally induced infections of goldfish *Carassius auratus* with cyprinid herpesvirus 2 (CyHV-2) at various water temperatures. **Diseases of Aquatic Organisms**, Oldendorf, v. 110, p. 193-200, 2014a.

ITO, T.; MAENO, Y. Susceptibility of Japanese cyprininae fish species to Cyprinid herpesvirus 2 (CyHV-2). **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 169, p. 128-134, 2014b.

IWAMOTO, R. et al. Isolation and characterization of the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) lymphocystis disease virus. **Journal of Aquatic Animal Health**, New York, v. 14, p. 114-123, 2002.

JANCOVICH, J. K. et al. Evidence for emergence of an amphibian iridoviral disease because of human-enhanced spread. **Molecular Ecology**, Chichester, v. 14, p. 213-224, 2005.

JAGRUTHI, C. et al. Effect of dietary astaxanthin against *Aeromonas hydrophila* infection in common carp, *Cyprinus carpio*. **Fish and Shellfish Immunology**, London, v**.** 41, p. 674-680, 2014.

JEONG, J. B. et al. Outbreaks and risks of infectious spleen and kidney necrosis virus disease in freshwater ornamental fishes. **Diseases of Aquatic Organisms**, Oldendorf, v. 78, p. 209-215, 2008.

JEONG, J. B. et al. Molecular comparison of iridoviruses isolated from marine fish cultured in Korea and imported from China. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 255, p. 105-116, 2006a.

JEONG, J. B. et al. Asymptomatic iridovirus infection in various marine fishes detected by a 2-step PCR method. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 255, p. 30-38, 2006b.

JEONG, J. B. et al. Characterization of the DNA nucleotide sequences in the genome of red sea bream iridoviruses isolated in Korea. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 220, p.119-133, 2003.

JOHRI, A. K. et al. Group B Streptococcus: global incidence and vaccine development. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 4, p. 932-942, 2006.

JUNG, S. J.; MIYAZAKI, T. Herpesviral haematopoietic necrosis of goldfish, *Carassius auratus* (L.). **Journal of Fish Diseases**, Chichester, v. 18, p. 211-220, 1995.

JUNG, S. J.; OH, M. J. Iridovirus-like infection associated with high mortalities of striped beak perch, *Oplegnathus fasciatus* (Temmincker Schlegel), in southern coastal areas of the Korea peninsula. **Journal of Fish Diseases**, Chichester, v. 23, p. 223-236, 2000.

JUNG, M. H. et al. Effects of water temperature on mortality in *Megalocytivirus*-infected rock bream *Oplegnathus fasciatus* (Temminck et Schlegel) and development of protective immunity. **Journal of Fish Diseases**, Chichester, v. 38, p. 729-737, 2015.

KAWAKAMI, H.; NAKAJIMA, K. Cultured fish species affected by red sea bream iridoviral disease from 1996 to 2000. **Fish Pathology**, Tokyo, v. 37, p. 45-47, 2002.

KIELPINSKI, M. et al. Detection of KHV in freshwater mussels and crustaceans from ponds with KHV history in common carp (*Cyprinus carpio*). **Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh**, Ashrat, v. 62, p. 28-37, 2010.

KIM, Y. R. et al. Development of an immunochromatography assay kit for rapid detection of ranavirus. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 223, p. 33-39, 2015.

KIM, W. S. et al. Characterization of an iridovirus detected from cultured turbot Scophthalmus maximus in Korea. **Disease of Aquatic Organisms**, Oldendorf, v. 64, p. 175-180, 2005.

KITAMURA, S.; JUNG, S. J.; OH, M. J. Differentiation of lymphocystis disease virus genotype by multiplex PCR. **The Journal of Microbiology**, Seoul, v. 44, p. 248-253, 2006.

KORBER B. T. M. **SNAP**: Synonymous non-synonymous analysis program. 2000a. Disponível em:<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/SNAP/SNAP.html>. Acesso em: 30 maio 2016.

KORBER, B. T. M. HIV signature and sequence variation analysis. In: RODRIGO, A. G.; LEARN, G. H. (Ed.). **Computational analysis of HIV molecular sequences**. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2000b. p. 55-72.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA 7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular Biology and Evolution**, Cary, Mar. 2016.

KURITA, J. et al. Molecular epidemiology of Koi herpesvirus. **Fish Pathology**, Tokyo, v. 44, p. 59-66, 2009.

KURITA, J.; NAKAJIMA, K. Megalocytiviruses. **Viruses**, Basel, v. 4, p. 521-538, 2012.

KVITT, H.; HEINISCH, G.; DIAMANT, A. Detection and phylogeny of Lymphocystivirus in sea bream Sparus aurata based on the DNA polymerase gene and major capsid protein sequences. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 275, p. 58-63, 2008.

LANGDON, J. S. et al. First virus isolation from Australian fish: an iridovirus-like pathogen from redfin perch *Perca fluviatillis*. **Journal of Fish Diseases**, Chichester, v. 9, p. 263-268, 1986.

LEBARRERÈS, D. et al. Ranavirus: past, presente and future. **Biology Letters**, London, v. 8, p. 481-483, 2012.

LEE, N. S. et al. Characterization of virus distribution in rock bream (*Oplegnathus fasciatus*; Temminck and Schlegel) infected with megalocytivirus. **Journal of Comparative Pathology**, London, v. 141, p. 63-69, 2009.

LEU, J. H; WU, M. H; CHOU, H. Y. A comparative study between Ranavirus and Megalocytivirus infections in Orange-spotted grouper (*Epienphelus coioides*). **Journal of Marine Science and Technology**, Tokyo, v. 21, p. 58-64, 2013.

LI, W. et al. Whole-genome sequence of a novel Chinese cyprinid herpesvirus 3 isolate reveals the existence of a distinct European genotype in East Asia. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 175, p. 185-194, 2015.

LIMA, L. C. Doenças de importância econômica em psicultura. In: III SEMINÁRIO DE AQUICULTURA, MARICULTURA E PESCA, 3., 2007, Belo Horizonte. **Anais...** Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2007.

LING, F. et al. Antibacterial efficacy and pharmacokinetic evaluation of sanguinarine in common carp (*Cyprinus carpio*) following a single intraperitoneal administration. **Journal of Fish Diseases**, Oxford, v. 39, n. 8, p. 993-1000, 2016.

LILLEY, J. H. et al. Molecular characterization of the fish-pathogenic fungus *Aphanomyces invadans*. **Journal of Fish Diseases**, Oxford, v. 26, n. 5, p. 263-775, 2003.

LIU, Y. et al. Diversity of aquatic *Pseudomonas* species and their activity against the fish pathogenic oomycete *Saprolegnia*. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 10, n. 8, p. 1-17, 2015.

LIU, Y. et al. Elucidating the diversity of aquatic *Microdochium* and *Trichoderma* species and their activity against the fish pathogen *Saprolegnia diclina*. **International Journal of Molecular Science**, Basel, v. 17, p. 1-15, 2016.

LÜ, L. et al. Complete genome sequence analysis of an iridovirus isolated from the orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*. **Virology**, Waltham, v. 339, p. 81-100, 2005.

MA, J. et al. Establishment of a novel and highly permissive cell line for the efficient replication of cyprinid herpesvirus 2 (CyHV-2). **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 177, p. 315-325, 2015.

MAO, J. et al. Molecular characterisation of iridoviruses isolated from sympatric amphibians and fish. **Virus Research**, Amsterdam, v. 63, p. 45-52, 1999.

MARSH, I. B. et al. Rapid differentiation of Australian, European and American ranaviruses based on variation in major capsid protein gene sequence. **Molecular and Cellular Probes**, London, v. 16, p. 137-151, 2002.

MATSUI, K. et al. Detection and significance of koi herpesvirus (KHV) in freshwater environments. **Freshwater Biology**, Chichester, v. 53, p. 1262-1272, 2008.

MICHEL, B. et al. Cyprinid herpesvirus 3. **Emerging Infectious Diseases,** Atlanta, v. 16, n. 12, p. 1835-1843, 2010.

MILLER, D. L. et al. Pathologic findings in larval and juvenile anurans inhabiting farmponds in Tennessee, USA. **Journal of Wildlife Diseases**, Lawrence, v. 45, p. 314-324, 2009.

MINAMOTO, T. et al. Detection of cyprinid herpesvirus-3 DNA in lake plankton. **Research in Veterinary Science**, London, v. 90, p. 530-532, 2011.

MIWA, S. et al. Pathogenesis of acute and chronic diseases caused by cyprinid herpesvirus-3. **Journal of Fish Diseases**, Chichester, v. 38, n. 8, p. 695-712, 2015.

MIYAZAKI, T. et al. Histopathological and ultrastructural features of koi herpesvirus (KHV)-infected carp Cyprinus carpio, and the morphology and morphogenesis of KHV. **Diseases of Aquatic Organisms**, Oldendorf, v. 80, p. 1-11, 2008.

MONAGHAN, S. J. et al. Examination of the early infection stages of koi herpesvirus (KHV) in experimentally infected carp, *Cyprinus carpio* L. using in situ hybridization. **Journal of Fish Diseases**, Chichester, v. 38, p. 477-489, 2015.

MUSA, N. et al. Surviliance of bacteria species in diseased freshwater ornamental fish from aquarium shop. **World Applied Science Journal**, Dubai, v. 3, p. 903-905, 2008.

MUSTHAFA, M. S. et al. Protective efficacy of Azomite enriched diet in *Oreochromis mossambicus* against *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 451, p. 310-315, 2016.

NEGENBORN, J. et al. Cyprinid herpesvirus-3 (CyHV-3) disturbs osmotic balance in carp (*Cyprinus carpio* L.): a potential cause of mortality. **Veterinary Microbiology,** Amsterdam, v. 177, p. 280-288, 2015.

NEUKIRCH, M.; KUNZ, U. Isolation and preliminary characterization of several viruses from koi (*Cyprinus carpio*) suffering gill necrosis and mortality. **Bulletin of the European Association of Fish Pathologists**, Aberdeen, v. 21, p. 125-35, 2001.

NOLAN, D. et al. Detection and characterization of viruses of the genus *Megalocytivirus* in ornamental fish imported into an Australian border quarantine premises: an emerging risk to national biosecurity. **Journal of Fish Diseases,** Chichester, v. 38, p. 187-195, 2015.

WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH – OIE. (Ed.). Red sea bream iridoviridal disease. In: _____. **Manual of diagnostic tests for aquatic animals**. Paris: Office International des epizooties, 2012. Chapter 2.3.7, p. 345-356.

_____. **OIE-Listed diseases, infections and infestations in force in 2016.** 2016. Disponível em:<http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2016/>. Acesso em: 22 fev. 2016.

OH, M.; JUNG, S.; CHOI, T. A viral disease occurring in cultured carp *Cyprinus carpio* in Korea. **Fish Pathology**, Tokyo, v. 36, p. 147-151, 2001.

OLIVEIRA, R. F. de. O panorama da aquicultura no Brasil: a prática com foco na sustentabilidade. **Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, São Paulo, v. 2, n. 1, p. 71-89, 2009.

OTTINGER, M.; CLAUSS, K.; KUENZER, C. Aquaculture: relevance, distribution, impacts and spatial assessments: a review. **Ocean & Coastal Management**, Bromley, v. 119, p. 244-266, 2016.

PAHLOW, M. et al. Increasing pressure on freshwater resources due to terrestrial feed ingredients for aquaculture production. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 536, p. 847-857, 2015.

PALMER, L. J.; HOGAN, N. S.; VAN DEN HEUVEL, M. R. Phylogenetic analysis and molecular methods for the detection of lymphocystis disease virus from yellow perch. *Perca flavescens* (Mitchell). **Journal of Fish Diseases**, Chichester, v. 35, p. 661-667, 2012.

PEREZ-PRIETO, S. I. et al. Virus susceptibility of the fish cell line SAF-1 derived from gilt-head seabream. **Disease of Aquatic Organisms**, Oldendorf, v. 35, p. 149-153, 1999.

PERELBERG, A. et al. Epidemiological description of a new viral disease afflicting cultured Cyprinuscarpio in Israel. **Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgeh**, Ashrat, v. 55, p. 5-12, 2003.

PIRARAT, N. et al. Lymphocystis disease in cultured false clown anemonefish (*Amphiprion ocellaris*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 315, p. 414-416, 2011.

PIKARSKY, E. et al. Pathogenesis of acute viral disease induced in fish by carp interstitial nephritis and gill necrosis virus. **Journal of Virology**, Washington, v. 78, p. 9544-9551, 2004.

POKOROVA, D. et al. Detection of Cyprinid Herpesvirus-3 in field samples of common and koi carp by various single-round and nested PCR methods. **Journal of the World Aquaculture Society,** Hoboken, v. 41, n. 5, p. 773-779, 2010.

POSADA, D. J. ModelTest: phylogenetic model averaging. **Molecular Biology and Evolution**, Cary, v. 25, n. 7, p. 1253-6, 2008.

POZET, F. et al. Isolation and preliminar characterization of a pathogenic icosahedral deoxyribovirus from the catfish Ictalurus melas. **Disease of Aquatic Organisms**, Oldendorf, v. 14, p. 35-42, 1992.

PRADEEP, P. J. et al. Evidence of vertical transmission and tissue tropism of Streptococcosis from naturally infected red tilapia (*Oreochromis* spp.). **Aquaculture Reports**, Amsterdam, v. 3, p. 58-66, 2016.

QUESADA, S. P.; PASCHOAL, J. A. R.; REYES, F. G. R. Considerations on the aquaculture development and on the use of veterinary drugs: special issue for Fluoroquinolones-A review. **Journal of Food Science**, Hoboken, v. 78, n. 9, p. 1321-1333, 2013.

RAHMATI-HOLASOO, H. et al. First detection of koi herpesvirus from koi, *Cyprinus carpio* L. experiencing mass mortalities in Iran: clinical, histopathological and molecular study. **Journal of Fish Diseases**, Oxford, p. 1-11, Jan. 2016.

RAKUS, K. et al. Cyprinid herpesvirus 3: an interesting virus for applied and fundamental research**. Veterinary Research**, London, v. 44, n. 85, p. 1-16, 2013.

RIMMER, A. E. et al. Detection of dwarf gourami iridovirus (*Infectious spleen and kidney necrosis virus*) in populations of ornamental fish prior to and after importation into Australia, with the first evidence of infection in domestically farmed Platy (*Xiphophorus maculatus*). **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 122, p. 181-194, 2015.

ROBERTS, R. J.; BULLOCK, A. M. The skin surface ecossystem of teleost fishes. **Proceedings of the Royal Society of Edinburgh**, Edinburgh, v. 79, p. 87-91, 1980.

RONEN, A. et al. Efficient vaccine against the virus causing a lethal disease in cultured *Cyprinus carpio*. **Vaccine,** London, v. 21, p. 4677-4684, 2003.

SAFEENA, M. P.; RAI, P.; KARUNASAGAR, I. Molecular biology and epidemiology of hepatopancreatic parvovirus of penaeid shrimp. **Indian Journal of Virology**, New Delhi, v. 23, n. 2, p. 191-202, 2012.

SALEH, M.; EL-MATIBOULI, M. Rapid detection of Cyprinid herpesvirus-3 (CyHV-3) using a gold nanoparticle-based hybridization assay. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 217, p. 50-54, 2015.

SALEMI, M.; VANDAMME, A. M.; LEMEY, P. **The phylogenetic handbook:** a practical approach to phylogenetic analysis and hypothesis testing. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 2009.

SANO, T.; FUKUDA, H.; FURUKAWA, M. *Herpesvirus cyprini*: biological and oncogenic properties. **Fish Pathology**, Tokyo, v. 20, p. 381-388, 1985.

SANO, T. et al. A preliminary report on pathogenicity and oncogenicity of cyprinid herpesvirus. **European Association of Fish Pathologists**, Aberdeen, v. 10, p. 11-13, 1990.

SANO, N. et al. *Herpesvirus cyprini*: a search for viral genome in infected fish by *in situ* hybridization. **Journal of Fish Diseases**, Oxford, v.16, p. 495-499, 1993.

SARKAR, M. J. A.; RASHID, M. M. Pathogenicity of the bacterial isolate *Aeromonas hydrophila* to catfishes, carps and perch. **Journal of the Bangladesh Agrilcultural University**, Bangladesh, v. 10, p. 157-161, 2012.

SCHALCH, S. H. C. et al. Eficácia do diflubenzuron no controle de Dolops carvalhoi (Crustacea: Branchiura) em jovens pacus Piaractus mesopotamicus (Osteichthyes: Characidae) naturalmente infectados. **Acta Scientiarium Animal Sciences**, Maringá, v. 27, p. 297-302, 2005.

SCHMIDT, H. A. et al. TREE-PUZZLE: maximum likelihood phylogenetic analysis using quartets and parallel computing. **Bioinformatics**, Oxford, v. 18, p. 502-504, 2002.

SHENG, X. Z.; ZHAN, W. B.; WANG, Y. Whitespotted puffer Arothron hispidus, a new host for lymphocystis in Qingdao Aquarium of China. **Disease of Aquatic Organisms**, Oldendorf, v. 75, p. 23-28, 2007.

SHI, C.Y. et al. Complete genome sequence of a Megalocytivirus (family Iridoviridae) associated with turbot mortality in China. **Virology Journal**, London, v. 7, p. 1-9, 2010.

SHIMIZU, T. et al. Survival of koi herpesvirus (KHV) in environmental water. **Fish Pathology**, Tokyo, v. 41, n. 4, p. 153-157, 2006.

SHINMOTO, H. et al. Phenotypic diversity of infectious red sea bream iridovirus isolates from cultured fish in Japan. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, p. 3535-3541, 2009.

SHLAPOBERSKY, M. et al. Viral encephalitis of tilapia larvae: primary characterization of a novel herpes-like virus. **Virology**, Waltham, v. 399, p. 239-247, 2010.

SILVA, Y. L. et al. Biological control of Aeromonas salmonicida infection in juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*) with Phage AS-A. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 450, p. 225-233, 2016.

SRIWANAYOS, P. et al. Megalocytivirus infection in orbiculate batfish *Platax orbicularis*. **Disease of Aquatic Organisms**, Oldendorf, v. 105, p. 1-8, 2013.

SOLIMAN, H.; EL-MATBOULI, M. An inexpensive and rapid diagnostic method of Koi Herpesvirus (KHV) infection by loop-mediated isothermal amplification. **Virology Journal**, London, v. 2, n. 83, p. 1-8, 2005.

SONG, J. Y. et al. Genetic variation and geographic distribution of megalocytiviruses. **The Journal of Microbiology**, Seoul, v. 46, n. 1, p. 29-33, 2008.

SRIWANAYOS, P. et al. Megalocytivirus infection in orbiculate batfish *Platax orbicularis*. **Disease of Aquatic Organisms**, Oldendorf, v. 105, p. 1-8, 2013.

STEPHENS, F. J.; RAIDAL, S. R.; JONES, B. Haematopoietic necrosis in a goldfish (*Carassius auratus*) associated with an agent morphologically similar to herpesvirus. **Australian Veterinary Journal**, Chichester, v. 82, p. 167-169, 2004.

ST-HILAIRE, S. et al. Reactivation of koi herpesvirus infections in common carp *Cyprinus carpio*. **Disease of Aquatic Organisms**, Oldendorf, v. 67, p. 15-23, 2005.

STRIMMER, K.; VON HAESELER, A. Likelihood-mapping: a simple method to visualize phylogenetic content of a sequence alignment. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 94, n. 13, p. 6815-6819, 1997.

SUBASINGHE, R. P. Epidemiological approach to aquatic animal health management: opportunities and challenges for developing countries to increase aquatic production through aquaculture. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 67, p. 117-124, 2005.

SUBRAMANIAM, K. et al. Detection and molecular characterization of infectious spleen and kidney necrosis virus from major ornamental fish breeding states in Peninsular Malaysia. **Journal of Fish Diseases**, Chichester, v. 37, p. 609-618, 2014.

SUNARTO, A. et al. Characteristics of cyprinid herpesvirus 3 in different phases of infection: implications for disease transmission and control. **Virus Research**, Amsterdam, v. 188, p. 45-53, 2014.

SUNARTO, A. et al. Isolation and characterization of Koi herpesvirus (KHV) from Indonesia: identification of a new genetic lineage. **Journal of Fish Diseases**, Chichester, v. 34, n. 2, p. 87-101, 2011.

TAJIMA, F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. **Genetics**, Baltimore, v. 123, p. 585-595, 1989.

TAKAHARA, T. et al. Effects of daily temperature fluctuation on the survival of carp infected with *Cyprinid herpesvirus* 3. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 433, p. 208-213, 2014.

TAPIOVAARA, H. et al. Isolation of an iridovirus from pike-perch *Stizostedion lucioperca*. **Disease of Aquatic Organisms**, Oldendorf, v. 32, p. 185-193, 1998.

THOMPSON, J. D; HIGGINS, D. J.; GIBSON, T. J. ClustalW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 22, n. 22, p. 4673-4680, 1994.

TIDONA, C. A.; DARAI, G. The complete DNA sequence of lymphocystis disease virus. **Virology**, Waltham, v. 230, p. 207-216, 1997.

TIDONA, C. A. et al. Is the major capsid protein of iridoviruses a suitable target for the study of viral evolution? **Virus Genes**, New York, v. 16, p. 59-66, 1998.

UCHUII, K. et al. An emerging infectious pathogen endangers an ancient lineage of common carp by acting synergistically with conspecific exotic strains. **Animal Conservation**, Chichester, v. 16, p. 324-330, 2013.

VARSAMOS, S. et al. Husbandry stress during early life stages affects the stress response and health status of juvenile sea bass, *Dicentrarchus labrax*. **Fish and Shellfish Immunology**, London, v. 20, p. 83-96, 2006.

WALKER, P. J.; WINTON, J. R. Emerging viral diseases of fish and shrimp. **Veterinary Research**, London, v. 41, p. 1-24, 2010.

WALTZEK, T. B. et al. Systemic iridovirus from threespine stickleback *Gasterosteus aculeatus* represents a new megalocytivirus species (family *Iridoviridae*). **Disease of Aquatic Organisms**, Oldendorf, v. 98, p. 41-56, 2012.

WALTZEK, T. B. et al. Development of a polymerase chain reaction assay to detect Cyprinid Herpesvirus 2 in goldfish. **Journal of Aquatic Animal Health**, New York, v. 21, p. 60-67, 2009a.

WALTZEK, T. B. et al. Phylogenetic relationships in the family *Alloherpesviridae*. **Disease of Aquatic Organisms**, Oldendorf, v. 84, p. 179-194, 2009b.

WANG, C. S. et al. Studies on epizootic iridovirus infection among red sea bream, *Pagrus major* (Temminck & Schlegel), cultured in Taiwan. **Journal of Fish Diseases**, Chichester, v. 26, p. 127-133, 2003.

WANG, Y. Q. et al. Molecular epidemiology and phylogenetic analysis of a marine fish infectious spleen and kidney necrosis virus-like (ISKNV-like) virus. **Archives of Virology**, Wien, v. 152, p. 763-773, 2007.

WANG, Q. et al. Outbreaks of an iridovirus in marbled sleepy goby, *Oxyeleotris marmoratus* (Bleeker), cultured in southern China. **Journal of Fish Diseases**, Chichester, v. 34, p. 399-402, 2011.

WANG, Y. et al. Development and characterization of a cell line from the snout of koi (*Cyprinus carpio* L.) for detection of koi herpesvirus. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 435, p. 310-317, 2015.

WANG, H.; XU, L. J.; LU, L. Q. Detection of cyprinid herpesvirus 2 in peripheral blood cells of silver crucian carp, *Carassius auratus gibelio* (Bloch), suggests its potential in viral diagnosis. **Journal of Fish Diseases**, Chichester, v. 39, p. 155-162, 2016.

WATERHOUSE, A. M.; PROCTER, J. B.; MARTIN, D. M.; CLAMP, M.; BARTON, G. J. Jalview Version 2–amultiple sequence alignment editor and analysis workbench. **Bioinformatics**, London, v. 25, p. 1189–1191, 2009.

WEBER, E. S. et al. Systemic iridovirus infection in the Banggai cardinalfish (*Pterapogon kauderni* Koumans 1933). **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Thousand Oaks, v. 21, p. 306-320, 2009.

WEI, J. Z.; LI, H.; YU, H. Ichthyophthiriasis: emphases on the epizootiology. **Letters in Applied Microbiology**, Chichester, v. 57, p. 91-101, 2013.

WILLIAMS, T. The iridoviruses. **Advances in Virus Research**, Maryland Heights, v. 46, p. 345-412, 1996.

WILLIAMS, T.; BARBOSA-SOLOMIEU, V.; CHINCHAR, V. G. A decade of advances in iridovirus research. **Advances in Virus Research**, Maryland Heights, v. 65, p. 173-248, 2005.

WHITTINGTON, R. J.; BECKER, J. A.; DENNIS, M. M. Iridovirus infections in finfish – critical review with emphasis on ranaviruses. **Journal of Fish Diseases**, Chichester, v. 33, p. 95-122, 2010.

XIA, X.; XIE, Z. DAMBE: Software package for data analysis in molecular biology and evolution. **Journal of Heredity**, Oxford, v. 92, p. 371-373, 2001.

XIA, X. et al. An index of substitution saturation and its application. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Maryland Heights, v. 26, p. 1-7, 2003.

XU, J. et al. Cyprinid herpesvirus 2 infection emerged in cultured gibel carp, *Carassius auratus gibelio* in China. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 166, p.138-144, 2013.

XU, L.; FENG, J.; HUANG, Y. Identification of lymphocystis disease virus from paradise fish *Macropodus opercularis* (LCDV-PF). **Archives of Virology**, Wien, v. 159, p. 2445-2449, 2014.

YAN, X. Y. et al. Analysis of the genetic diversity of the lymphocystis virus and its evolutionary relationship with its hosts. **Virus Gene**, New York, v. 43, p. 358-366, 2011.

YE, Y. W. et al. Characterization of *Aeromonas hydrophila* from hemorrhagic diseased freshwater fishes in Anhui Province, China. **International Food Research Journal**, Selangor, v. 20, p. 1449-1452, 2012.

YUASA, K.; ITO, T.; SANO, M. Effect of water temperature on mortality and virus shedding in carp experimentally infected with Koi herpesvirus. **Fish Pathology**, Tokyo, v. 43, n. 2, p. 83-85, 2008.

ZHANG, M. et al. Characterization of a megalocytivirus from cultured rock bream, *Oplegnathus fasciatus* (Temminck & Schlege), in China. **Aquaculture Research**, Chichester, v. 43, p. 554-564, 2011.

ZHANG, M. et al. Construction and analysis of experimental DNA vaccines against megalocytivirus. **Fish and Shellfish Immunology**, London, v. 33, p.1192-1198, 2012.

ZHANG, B. C. et al. Complete genome sequence and transcription profiles of the rock bream iridovirus RBIV-C1. **Disease of Aquatic Organisms**, Oldendorf, v. 104, p. 203–214, 2013.

ZHANG, Q. Y.; GUI, J. F. Virus genomes and virus-host interactions in aquaculture animals. **Science China Life Science**, Beijing, v. 58, p. 156-169, 2015.

ZHAO, Y. et al. Inhibiting cyprinid herpesvirus-3 replication with CRISPR/Cas9. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, p. 1-6, 2015.

ZHENG, F. et al. Isolation and identification of a new isolate of lymphocystis disease vírus isolated from black rockfish (*Sebastes schlegelii*) in China. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 451, p. 340-344, 2016.

APÊNDICE

APÊNDICE A - Relação dos peixes amostrados segundo as características analisadas.

Amostra	Nome Popular	Nome Cientifíco	Manejo	Localização	Sinais Clínicos	Resultado para CyHV-1 e CyHV-2	Resultado para CyHV-3	Resultado para LCDV	Resultado para MV
1	Acará	*Geophagus brasiliensis*	Cativeiro	Pirassununga-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
2	Acará	*Geophagus brasiliensis*	Cativeiro	Pirassununga-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
3	Acará	*Geophagus brasiliensis*	Cativeiro	Pirassununga-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
4	Acará	*Geophagus brasiliensis*	Cativeiro	Pirassununga-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
5	Lambari	*Astyanax spp.*	Cativeiro	Pirassununga-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
6	Lambari	*Astyanax spp.*	Cativeiro	Pirassununga-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
7	Lambari	*Astyanax spp.*	Cativeiro	Pirassununga-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
8	Tilápia	*Oreochromis niloticus*	Cativeiro	Pirassununga-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
9	Tilápia	*Oreochromis niloticus*	Cativeiro	Pirassununga-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
10	Tilápia	*Oreochromis niloticus*	Cativeiro	Pirassununga-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
11	Tilápia	*Oreochromis niloticus*	Cativeiro	Pirassununga-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
12	Tilápia	*Oreochromis niloticus*	Cativeiro	Pirassununga-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
13	Curimba	*Prochilodus spp.*	Cativeiro	Pirassununga-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
14	Curimba	*Prochilodus spp.*	Cativeiro	Pirassununga-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
15	Curimba	*Prochilodus spp.*	Cativeiro	Pirassununga-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
16	Curimba	*Prochilodus spp.*	Cativeiro	Pirassununga-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
17	Mandi	*Pimelodus maculatus*	Cativeiro	Pirassununga-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
18	Pacu comum	*Mylossoma spp.*	Cativeiro	Pirassununga-SP	A e B	NP	Negativo	NP	NP
19	Pacu comum	*Mylossoma spp.*	Cativeiro	Pirassununga-SP	A e B	NP	Negativo	NP	NP
20	Pacu comum	*Mylossoma spp.*	Cativeiro	Pirassununga-SP	A e B	NP	Negativo	NP	NP

NP: Não Processado; A: Pele com colocaração escura; B: Letargia/ Fonte: Própria autoria.

APÊNDICE A - Relação dos peixes amostrados segundo as características analisadas.

Amostra	Nome Popular	Nome Cientifíco	Manejo	Localização	Sinais Clínicos	Resultados para CyHV-1 e CyHV-2	Resultado para CyHV-3	Resultado para LCDV	Resultado para MV
21	Pacu comum	*Mylossoma spp.*	Cativeiro	Pirassununga-SP	A e B	NP	Negativo	NP	NP
22	Pacu comum	*Mylossoma spp.*	Cativeiro	Pirassununga-SP	A e B	NP	Negativo	NP	NP
23	Pacu comum	*Mylossoma spp.*	Cativeiro	Pirassununga-SP	A e B	NP	Negativo	NP	NP
24	Pacu comum	*Mylossoma spp.*	Cativeiro	Pirassununga-SP	A e B	NP	Negativo	NP	NP
25	Pintado	*Pseudoplatystoma corruscans*	Cativeiro	Mogi-Guaçu - SP	C	NP	Negativo	NP	NP
26	Pintado	*Pseudoplatystoma corruscans*	Cativeiro	Mogi-Guaçu - SP	C	NP	Negativo	NP	NP
27	Pintado	*Pseudoplatystoma corruscans*	Cativeiro	Mogi-Guaçu - SP	C	NP	Negativo	NP	NP
28	Pintado	*Pseudoplatystoma corruscans*	Cativeiro	Mogi-Guaçu - SP	C	NP	Negativo	NP	NP
29	Pirarara	*Phractocephalus hemioliopterus*	Cativeiro	Mogi-Guaçu - SP	D	NP	Negativo	NP	NP
30	Bagre	*Siluriformes*	Cativeiro	Pirassununga-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
31	Tilápia	*Oreochromis niloticus*	Cativeiro	Pirassununga-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
32	Tilápia	*Oreochromis niloticus*	Cativeiro	Pirassununga-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
33	Tilápia	*Oreochromis niloticus*	Cativeiro	Pirassununga-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
34	Tilápia	*Oreochromis niloticus*	Cativeiro	Pirassununga-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
35	Tilápia	*Oreochromis niloticus*	Cativeiro	Pirassununga-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
36	Tilápia	*Oreochromis niloticus*	Cativeiro	Pirassununga-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
37	Tilápia	*Oreochromis niloticus*	Cativeiro	Pirassununga-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
38	Tilápia	*Oreochromis niloticus*	Cativeiro	Pirassununga-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
39	Pirapatinga	*Piaractus brachypomus*	Cativeiro	Porto Ferreira-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
40	Pirapatinga	*Piaractus brachypomus*	Cativeiro	Porto Ferreira-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
41	Pirapatinga	*Piaractus brachypomus*	Cativeiro	Porto Ferreira-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
42	Pirapatinga	*Piaractus brachypomus*	Cativeiro	Porto Ferreira-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP

NP: Não Processado; A: Pele com Coloração Escura; B: Letargia; C: Deformação de Cauda; D: Ascite/ Fonte: Própria autoria.

APÊNDICE A - Relação dos peixes amostrados segundo as características analisadas.

Amostra	Nome Popular	Nome Cientifíco	Manejo	Localização	Sinais Clínicos	Resultados para CyHV-1 e CyHV-2	Resultado para CyHV-3	Resultado para LCDV	Resultado para MV
43	Pirapatinga	*Piaractus brachypomus*	Cativeiro	Porto Ferreira-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
44	Pirapatinga	*Piaractus brachypomus*	Cativeiro	Porto Ferreira-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
45	Pirapatinga	*Piaractus brachypomus*	Cativeiro	Porto Ferreira-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
46	Pirapatinga	*Piaractus brachypomus*	Cativeiro	Porto Ferreira-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
47	Pirapatinga	*Piaractus brachypomus*	Cativeiro	Porto Ferreira-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
48	Pirapatinga	*Piaractus brachypomus*	Cativeiro	Porto Ferreira-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
49	Pirapatinga	*Piaractus brachypomus*	Cativeiro	Porto Ferreira-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
50	Curimba	*Prochilodus spp.*	Vida Livre	Rio Mogi Guaçu-SP*	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
51	Piapara	*Leporinus elongatus*	Vida Livre	Rio Mogi Guaçu-SP*	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
52	Curimba	*Prochilodus spp.*	Vida Livre	Rio Mogi Guaçu-SP*	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
53	Dourado	*Salminus brazilienses*	Vida Livre	Rio Mogi Guaçu-SP*	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
54	Curimba	*Prochilodus spp.*	Vida Livre	Rio Mogi Guaçu-SP*	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
55	Curimba	*Prochilodus spp.*	Vida Livre	Rio Mogi Guaçu-SP*	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
56	Curimba	*Prochilodus spp.*	Vida Livre	Rio Mogi Guaçu-SP*	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
57	Curimba	*Prochilodus spp.*	Vida Livre	Rio Mogi Guaçu-SP*	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
58	Dourado	*Salminus brazilienses*	Vida Livre	Rio Mogi Guaçu-SP*	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
59	Dourado	*Salminus brazilienses*	Vida Livre	Rio Mogi Guaçu-SP*	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
60	Tilápia	*Oreochromis niloticus*	Cativeiro	Pirassununga-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
61	Tilápia	*Oreochromis niloticus*	Cativeiro	Pirassununga-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
62	Tilápia	*Oreochromis niloticus*	Cativeiro	Pirassununga-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
63	Tilápia	*Oreochromis niloticus*	Cativeiro	Pirassununga-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
64	Curimba	*Prochilodus spp.*	Cativeiro	Pirassununga-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP

NP: Não Processado; *”Acima da Barragem”/ Fonte: Própria autoria.

APÊNDICE A - Relação dos peixes amostrados segundo as características analisadas.

Amostra	Nome Popular	Nome Cientifíco	Manejo	Localização	Sinais Clínicos	Resultados para CyHV-1 e CyHV-2	Resultado para CyHV-3	Resultado para LCDV	Resultado para MV
65	Piraputanga	*Brycon hilarii*	Cativeiro	Pirassunuga-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
66	Piraputanga	*Brycon hilarii*	Cativeiro	Pirassunuga-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
67	Curimba	*Prochilodus spp*	Cativeiro	Pirassunuga-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
68	Matrinxã	*Brycon amazonicus*	Cativeiro	Pirassunuga-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
69	Matrinxã	*Brycon amazonicus*	Cativeiro	Pirassunuga-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
70	Matrinxã	*Brycon amazonicus*	Cativeiro	Pirassunuga-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
71	Catfish	*Siluriformes*	Cativeiro	Cajamar-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
72	Tilápia	*Oreochromis niloticus*	Cativeiro	Cajamar-SP	E; F e G	NP	Negativo	NP	NP
73	Tilápia	*Oreochromis niloticus*	Cativeiro	Cajamar-SP	E; F e G	NP	Negativo	NP	NP
74	Tilápia	*Oreochromis niloticus*	Cativeiro	Cajamar-SP	E; F e G	NP	Negativo	NP	NP
75	Tilápia	*Oreochromis niloticus*	Cativeiro	Cajamar-SP	E; F e G	NP	Negativo	NP	NP
76	Tilápia	*Oreochromis niloticus*	Cativeiro	Cajamar-SP	E; F e G	NP	Negativo	NP	NP
77	Piracanjuba	*Brycon orbignyanus*	Cativeiro	Pirassunuga-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
78	Piavuçu	*Leporinus macrocephalus*	Cativeiro	Santa Cruz da Conceição-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
79	Piavuçu	*Leporinus macrocephalus*	Cativeiro	Santa Cruz da Conceição-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
80	Piavuçu	*Leporinus macrocephalus*	Cativeiro	Santa Cruz da Conceição-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
81	Piavuçu	*Leporinus macrocephalus*	Cativeiro	Santa Cruz da Conceição-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
82	Piavuçu	*Leporinus macrocephalus*	Cativeiro	Santa Cruz da Conceição-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
83	Piavuçu	*Leporinus macrocephalus*	Cativeiro	Santa Cruz da Conceição-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
84	Curimba	*Prochilodus spp.*	Cativeiro	Santa Cruz da Conceição-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
85	Curimba	*Prochilodus spp.*	Cativeiro	Santa Cruz da Conceição-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
86	Piavuçu	*Leporinus macrocephalus*	Cativeiro	Santa Cruz da Conceição-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP

NP: Não Processado; E: Natação Errática; F: Necrose de Nadadeira; G: Movimento Opercular Constante/ Fonte: Própria autoria.

APÊNDICE A - Relação dos peixes amostrados segundo as características analisadas.

Amostra	Nome Popular	Nome Cientifíco	Manejo	Localização	Sinais Clínicos	Resultados para CyHV-1 e CyHV-2	Resultado para CyHV-3	Resultado para LCDV	Resultado para MV
87	Curimba	*Prochilodus spp.*	Cativeiro	Santa Cruz da Conceição-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
88	Piavuçu	*Leporinus macrocephalus*	Cativeiro	Santa Cruz da Conceição-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
89	Curimba	*Prochilodus spp.*	Cativeiro	Santa Cruz da Conceição-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
90	Curimba	*Prochilodus spp.*	Cativeiro	Santa Cruz da Conceição-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
91	Curimba	*Prochilodus spp.*	Cativeiro	Santa Cruz da Conceição-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
92	Curimba	*Prochilodus spp.*	Cativeiro	Santa Cruz da Conceição-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
93	Curimba	*Prochilodus spp.*	Cativeiro	Santa Cruz da Conceição-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
94	Curimba	*Prochilodus spp.*	Cativeiro	Santa Cruz da Conceição-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
95	Curimba	*Prochilodus spp.*	Cativeiro	Santa Cruz da Conceição-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
96	Curimba	*Prochilodus spp.*	Cativeiro	Santa Cruz da Conceição-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
97	Curimba	*Prochilodus spp.*	Cativeiro	Santa Cruz da Conceição-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
98	Curimba	*Prochilodus spp.*	Cativeiro	Santa Cruz da Conceição-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
99	Curimba	*Prochilodus spp.*	Cativeiro	Santa Cruz da Conceição-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
100	Curimba	*Prochilodus spp.*	Cativeiro	Santa Cruz da Conceição-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
101	Curimba	*Prochilodus spp.*	Cativeiro	Santa Cruz da Conceição-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
102	Curimba	*Prochilodus spp.*	Cativeiro	Santa Cruz da Conceição-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
103	Catfish	*Siluriformes*	Cativeiro	Pirassununga-SP	H	NP	Negativo	NP	NP
104	Catfish	*Siluriformes*	Cativeiro	Pirassununga-SP	H	NP	Negativo	NP	NP
105	Catfish	*Siluriformes*	Cativeiro	Pirassununga-SP	H	NP	Negativo	NP	NP
106	Catfish	*Siluriformes*	Cativeiro	Pirassununga-SP	H	NP	Negativo	NP	NP
107	Piracanjuba	*Brycon orbignyanus*	Cativeiro	Pirassununga-SP	I	NP	Negativo	NP	NP
108	Piracanjuba	*Brycon orbignyanus*	Cativeiro	Pirassununga-SP	I	NP	Negativo	NP	NP

NP: Não Processado; H: Infestação por *Lernaea cyprinacea*; I: Pele com Aspecto Hemorrágico/ Fonte: Própria autoria.

APÊNDICE A - Relação dos peixes amostrados segundo as características analisadas.

Amostra	Nome Popular	Nome Cientifíco	Manejo	Localização	Sinais Clínicos	Resultados para CyHV-1 e CyHV-2	Resultado para CyHV-3	Resultado para LCDV	Resultado para MV
109	Surubim	*Steindachneridion parahybae*	Cativeiro	Pirassununga-SP	E e J	NP	Negativo	NP	NP
110	Surubim	*Steindachneridion parahybae*	Cativeiro	Pirassununga-SP	E e J	NP	Negativo	NP	NP
111	Surubim	*Steindachneridion parahybae*	Cativeiro	Pirassununga-SP	E e J	NP	Negativo	NP	NP
112	Piracanjuba	*Brycon orbignyanus*	Cativeiro	Pirassununga-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
113	Piracanjuba	*Brycon orbignyanus*	Cativeiro	Pirassununga-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
114	Piracanjuba	*Brycon orbignyanus*	Cativeiro	Pirassununga-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
115	Piracanjuba	*Brycon orbignyanus*	Cativeiro	Pirassununga-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
116	Piracanjuba	*Brycon orbignyanus*	Cativeiro	Pirassununga-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
117	Surubim	*Steindachneridion parahybae*	Cativeiro	Pirassununga-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
118	Surubim	*Steindachneridion parahybae*	Cativeiro	Pirassununga-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
119	Surubim	*Steindachneridion parahybae*	Cativeiro	Pirassununga-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
120	Catfish	*Ictalurus punctatus*	Cativeiro	Serra-RJ	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
121	Catfish	*Ictalurus punctatus*	Cativeiro	Serra-RJ	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
122	Truta	*Oncorhynchus mykiis*	Cativeiro	Bocaina de Minas-MG	E	NP	Negativo	NP	NP
123	Truta	*Oncorhynchus mykiis*	Cativeiro	Bocaina de Minas-MG	E	NP	Negativo	NP	NP
124	Truta	*Oncorhynchus mykiis*	Cativeiro	Bocaina de Minas-MG	E	NP	Negativo	NP	NP
125	Truta	*Oncorhynchus mykiis*	Cativeiro	Bocaina de Minas-MG	E	NP	Negativo	NP	NP
126	Truta	*Oncorhynchus mykiis*	Cativeiro	Bocaina de Minas-MG	E	NP	Negativo	NP	NP
127	Truta	*Oncorhynchus mykiis*	Cativeiro	Bocaina de Minas-MG	E	NP	Negativo	NP	NP
128	Truta	*Oncorhynchus mykiis*	Cativeiro	Bocaina de Minas-MG	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
129	Truta	*Oncorhynchus mykiis*	Cativeiro	Bocaina de Minas-MG	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
130	Truta	*Oncorhynchus mykiis*	Cativeiro	Bocaina de Minas-MG	Ausente	NP	Negativo	NP	NP

NP: Não Processado; E: Natação Errática; Brânquias com Aspecto Hemorrágico/ Fonte: Própria autoria.

APÊNDICE A - Relação dos peixes amostrados segundo as características analisadas.

Amostra	Nome Popular	Nome Cientifíco	Manejo	Localização	Sinais Clínicos	Resultados para CyHV-1 e CyHV-2	Resultado para CyHV-3	Resultado para LCDV	Resultado para MV
131	Truta	*Oncorhynchus mykiis*	Cativeiro	Bocaina de Minas-MG	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
132	Truta	*Oncorhynchus mykiis*	Cativeiro	Bocaina de Minas-MG	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
133	Truta	*Oncorhynchus mykiis*	Cativeiro	Bocaina de Minas-MG	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
134	Truta	*Oncorhynchus mykiis*	Cativeiro	Bocaina de Minas-MG	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
135	Pacu comum	*Mylossoma spp.*	Cativeiro	Pirassununga-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
136	Pacu comum	*Mylossoma spp.*	Cativeiro	Pirassununga-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
137	Pacu comum	*Mylossoma spp.*	Cativeiro	Pirassununga-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
138	Pacu comum	*Mylossoma spp.*	Cativeiro	Pirassununga-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
139	Pacu comum	*Mylossoma spp.*	Cativeiro	Pirassununga-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
140	Pacu comum	*Mylossoma spp.*	Cativeiro	Matão-SP	K	NP	Negativo	NP	NP
141	Pacu comum	*Mylossoma spp.*	Cativeiro	Matão-SP	K	NP	Negativo	NP	NP
142	Pacu comum	*Mylossoma spp.*	Cativeiro	Matão-SP	K	NP	Negativo	NP	NP
143	Pacu comum	*Mylossoma spp.*	Cativeiro	Matão-SP	K	NP	Negativo	NP	NP
144	Pacu comum	*Mylossoma spp.*	Cativeiro	Matão-SP	K	NP	Negativo	NP	NP
145	Pacu comum	*Mylossoma spp.*	Cativeiro	Matão-SP	K	NP	Negativo	NP	NP
146	Pacu comum	*Mylossoma spp.*	Cativeiro	Matão-SP	K	NP	Negativo	NP	NP
147	Pacu comum	*Mylossoma spp.*	Cativeiro	Matão-SP	K	NP	Negativo	NP	NP
148	Pacu comum	*Mylossoma spp.*	Cativeiro	Matão-SP	K	NP	Negativo	NP	NP
149	Pacu comum	*Mylossoma spp.*	Cativeiro	Matão-SP	K	NP	Negativo	NP	NP
150	Pacu comum	*Mylossoma spp.*	Cativeiro	Matão-SP	K	NP	Negativo	NP	NP
151	Pacu comum	*Mylossoma spp.*	Cativeiro	Matão-SP	K	NP	Negativo	NP	NP
152	Tilápia	*Oreochromis niloticus*	Cativeiro	Matão-SP	L	NP	Negativo	NP	NP

NP: Não Processado; K: Presença de Muco pelo Corpo, L: Apatia/ Fonte: Própria autoria.

APÊNDICE A - Relação dos peixes amostrados segundo as características analisadas.

Amostra	Nome Popular	Nome Cientifíco	Manejo	Localização	Sinais Clínicos	Resultados para CyHV-1 e CyHV-2	Resultado para CyHV-3	Resultado para LCDV	Resultado para MV
153	Tilápia	*Oreochromis niloticus*	Cativeiro	Matão-SP	L	NP	Negativo	NP	NP
154	Tilápia	*Oreochromis niloticus*	Cativeiro	Matão-SP	L	NP	Negativo	NP	NP
155	Tilápia	*Oreochromis niloticus*	Cativeiro	Matão-SP	L	NP	Negativo	NP	NP
156	Acará	*Geophagus brasiliensis*	Cativeiro	Matão-SP	L	NP	Negativo	NP	NP
157	Tilápia	*Oreochromis niloticus*	Cativeiro	Arcerburgo-SP	M e N	NP	Negativo	NP	NP
158	Tilápia	*Oreochromis niloticus*	Cativeiro	Arcerburgo-SP	O e P	NP	Negativo	NP	NP
159	Carpa	*Cyprinus carpio*	Ornamental	Campinas-SP	P e Q	NP	Negativo	NP	NP
160	Piracanjuba	*Triurobrycon lundii*	Cativeiro	Mogi Guaçu-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
161	Carpa	*Cyprinus carpio*	Ornamental	Mogi Guaçu-SP	P e R	NP	Negativo	NP	NP
162	Carpa	*Cyprinus carpio*	Ornamental	Mogi Guaçu-SP	P	NP	Negativo	NP	NP
163	Carpa	*Cyprinus carpio*	Ornamental	Mogi Guaçu-SP	P	NP	Negativo	NP	NP
164	Carpa	*Cyprinus carpio*	Ornamental	Mogi Guaçu-SP	P	NP	Negativo	NP	NP
165	Lambari	*Astyanax spp.*	Cativeiro	Mogi Guaçu-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
166	Lambari	*Astyanax spp.*	Cativeiro	Mogi Guaçu-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
167	Lambari	*Astyanax spp.*	Cativeiro	Mogi Guaçu-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
168	Lambari	*Astyanax spp.*	Cativeiro	Mogi Guaçu-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
169	Lambari	*Astyanax spp.*	Cativeiro	Mogi Guaçu-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
170	Lambari	*Astyanax spp.*	Cativeiro	Mogi Guaçu-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
171	Lambari	*Astyanax spp.*	Cativeiro	Mogi Guaçu-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
172	Carpa	*Cyprinus carpio*	Ornamental	Mogi Guaçu-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
173	Carpa	*Cyprinus carpio*	Ornamental	Mogi Guaçu-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
174	Carpa	*Cyprinus carpio*	Ornamental	Campinas-SP	Q	NP	Negativo	NP	NP

NP: Não Processado; K: Presença de Muco pelo Corpo; L: Apatia; M: Hepatomegalia; N: Lesão na Boca; O: Hesplenomegalia; P: Lesões corporais; Q: Presença de Hemorragia Interna/ Fonte: Própria autoria.

APÊNDICE A - Relação dos peixes amostrados segundo as características analisadas.

Amostra	Nome Popular	Nome Cientifíco	Manejo	Localização	Sinais Clínicos	Resultados para CyHV-1 e CyHV-2	Resultado para CyHV-3	Resultado para LCDV	Resultado para MV
175	Carpa	*Cyprinus carpio*	Ornamental	Campinas-SP	Q	NP	Negativo	NP	NP
176	Carpa	*Cyprinus carpio*	Ornamental	Campinas-SP	R	NP	Negativo	NP	NP
177	Carpa	*Cyprinus carpio*	Ornamental	Campinas-SP	Q	NP	Negativo	NP	NP
178	Curimba	*Prochilodus spp.*	Cativeiro	Matão-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
179	Curimba	*Prochilodus spp.*	Cativeiro	Matão-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
180	Tilápia	*Oreochromis niloticus*	Cativeiro	Matão-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
181	Tilápia	*Oreochromis niloticus*	Cativeiro	Matão-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
182	Caborja	*Hoplosternum littorale*	Cativeiro	Matão-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
183	Tilápia	*Oreochromis niloticus*	Cativeiro	Matão-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
184	Tilápia	*Oreochromis niloticus*	Cativeiro	Matão-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
185	Tilápia	*Oreochromis niloticus*	Cativeiro	Matão-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
186	Acará	*Geophagus brasiliensis*	Cativeiro	Matão-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
187	Acará	*Geophagus brasiliensis*	Cativeiro	Matão-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
188	Acará	*Geophagus brasiliensis*	Cativeiro	Matão-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
189	Acará	*Geophagus brasiliensis*	Cativeiro	Matão-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
190	Acará	*Geophagus brasiliensis*	Cativeiro	Matão-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
191	Acará	*Geophagus brasiliensis*	Cativeiro	Matão-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
192	Tilápia	*Oreochromis niloticus*	Cativeiro	Matão-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
193	Tilápia	*Oreochromis niloticus*	Cativeiro	Matão-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
194	Tilápia	*Oreochromis niloticus*	Cativeiro	Matão-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
195	Matrinxã	*Brycon amazonicus*	Cativeiro	Pirassununga-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
196	Matrinxã	*Brycon amazonicus*	Cativeiro	Pirassununga-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP

NP: Não Processado; Q: Presença de Hemorragia Interna; R: Brânquias Edemaciadas/ Fonte: Própria autoria.

APÊNDICE A - Relação dos peixes amostrados segundo as características analisadas.

Amostra	Nome Popular	Nome Cientifíco	Manejo	Localização	Sinais Clínicos	Resultados para CyHV-1 e CyHV-2	Resultado para CyHV-3	Resultado para LCDV	Resultado para MV
197	Matrinxã	*Brycon amazonicus*	Cativeiro	Pirassununga-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
198	Matrinxã	*Brycon amazonicus*	Cativeiro	Pirassununga-SP	S	NP	Negativo	NP	NP
199	Tilápia	*Oreochromis niloticus*	Cativeiro	Pirassununga-SP	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
200	Cascudo	*Hypostomus plecostomus*	Cativeiro	Pirassununga-SP	T	NP	Negativo	NP	NP
201	Cascudo	*Hypostomus plecostomus*	Cativeiro	Pirassununga-SP	T	NP	Negativo	NP	NP
202	Tilápia	*Oreochromis niloticus*	Cativeiro	Jaguaribara-CE	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
203	Tilápia	*Oreochromis niloticus*	Cativeiro	Horizonte-CE	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
204	Tilápia	*Oreochromis niloticus*	Cativeiro	Horizonte-CE	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
205	Tilápia	*Oreochromis niloticus*	Cativeiro	Horizonte-CE	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
206	Tilápia	*Oreochromis niloticus*	Cativeiro	Paulo Afonso-BA	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
207	Tilápia	*Oreochromis niloticus*	Cativeiro	Paulo Afonso-BA	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
208	Tilápia	*Oreochromis niloticus*	Cativeiro	Paulo Afonso-BA	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
209	Tilápia	*Oreochromis niloticus*	Cativeiro	Paulo Afonso-BA	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
210	Tilápia	*Oreochromis niloticus*	Cativeiro	Paulo Afonso-BA	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
211	Tilápia	*Oreochromis niloticus*	Cativeiro	Paulo Afonso-BA	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
212	Tilápia	*Oreochromis niloticus*	Cativeiro	Jaguaribara-CE	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
213	Tilápia	*Oreochromis niloticus*	Cativeiro	Jaguaribara-CE	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
214	Tilápia	*Oreochromis niloticus*	Cativeiro	Jaguaribara-CE	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
215	Tilápia	*Oreochromis niloticus*	Cativeiro	Jaguaribara-CE	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
216	Tilápia	*Oreochromis niloticus*	Cativeiro	Horizonte-CE	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
217	Tilápia	*Oreochromis niloticus*	Cativeiro	Horizonte-CE	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
218	Tilápia	*Oreochromis niloticus*	Cativeiro	Horizonte-CE	Ausente	NP	Negativo	NP	NP

NP: Não Processado; S: Esteatose Hepática; T: Autólise/ Fonte: Própria autoria.

APÊNDICE A - Relação dos peixes amostrados segundo as características analisadas.

Amostra	Nome Popular	Nome Cientifíco	Manejo	Localização	Sinais Clínicos	Resultados para CyHV-1 e CyHV-2	Resultado para CyHV-3	Resultado para LCDV	Resultado para MV
219	Tilápia	*Oreochromis niloticus*	Cativeiro	Horizonte-CE	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
220	Tilápia	*Oreochromis niloticus*	Cativeiro	Horizonte-CE	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
221	Tilápia	*Oreochromis niloticus*	Cativeiro	Horizonte-CE	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
222	Carpa	*Cyprinus carpio*	Cativeiro	Ceará	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
223	Carpa	*Cyprinus carpio*	Ornamental	-	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
224	Carpa	*Cyprinus carpio*	Ornamental	-	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
225	Paru	*Pomacanthus paru*	Cativeiro	-	Ausente	NP	Negativo	NP	NP
226	Carpa	*Cyprinus carpio*	Ornamental	Campinas-SP	Ausente	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
227	Carpa	*Cyprinus carpio*	Ornamental	Campinas-SP	Ausente	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
228	Carpa	*Cyprinus carpio*	Ornamental	Campinas-SP	P	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
229	Carpa	*Cyprinus carpio*	Ornamental	Campinas-SP	Ausente	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
230	Kinguio	*Carassius auratus*	Ornamental	Campinas-SP	Ausente	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
231	Carpa	*Cyprinus carpio*	Ornamental	Campinas-SP	Ausente	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
232	Carpa	*Cyprinus carpio*	Ornamental	Campinas-SP	Ausente	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
233	Carpa	*Cyprinus carpio*	Ornamental	Campinas-SP	Ausente	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
234	Carpa	*Cyprinus carpio*	Ornamental	Campinas-SP	Ausente	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
235	Carpa	*Cyprinus carpio*	Ornamental	Santa Cruz da Conceição-SP	Ausente	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
236	Carpa	*Cyprinus carpio*	Ornamental	Santa Cruz da Conceição-SP	Ausente	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
237	Carpa	*Cyprinus carpio*	Ornamental	Santa Cruz da Conceição-SP	Ausente	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
238	Carpa	*Cyprinus carpio*	Ornamental	Santa Cruz da Conceição-SP	Ausente	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
239	Carpa	*Cyprinus carpio*	Ornamental	Santa Cruz da Conceição-SP	Ausente	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
240	Carpa	*Cyprinus carpio*	Ornamental	Santa Cruz da Conceição-SP	Ausente	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

NP: Não Processado; P: Lesão Corporal/ Fonte: Própria autoria.

APÊNDICE A - Relação dos peixes amostrados segundo as características analisadas.

Amostra	Nome Popular	Nome Cientifíco	Manejo	Localização	Sinais Clínicos	Resultados para CyHV-1 e CyHV-2	Resultado para CyHV-3	Resultado para LCDV	Resultado para MV
241	Carpa	*Cyprinus carpio*	Ornamental	Santa Cruz da Conceição-SP	Ausente	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
242	Carpa	*Cyprinus carpio*	Ornamental	Santa Cruz da Conceição-SP	Ausente	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
243	Carpa	*Cyprinus carpio*	Ornamental	Santa Cruz da Conceição-SP	Ausente	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
244	Carpa	*Cyprinus carpio*	Ornamental	Santa Cruz da Conceição-SP	Ausente	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
245	Carpa	*Cyprinus carpio*	Ornamental	Santa Cruz da Conceição-SP	Ausente	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
246	Carpa	*Cyprinus carpio*	Ornamental	Holambra-SP	N e P	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
247	Lebiste	*Pœcilia reticulata*	Ornamental	São Paulo-SP	P	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
248	Piranha vermelha	*Pygocentrus nattereri*	Ornamental	São Paulo-SP	B e E	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
249	Piranha vermelha	*Pygocentrus nattereri*	Ornamental	São Paulo-SP	B e E	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
250	Piranha vermelha	*Pygocentrus nattereri*	Ornamental	São Paulo-SP	B e E	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo
251	Piranha vermelha	*Pygocentrus nattereri*	Ornamental	São Paulo-SP	B e E	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
252	Piranha vermelha	*Pygocentrus nattereri*	Ornamental	São Paulo-SP	B e E	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
253	Piranha vermelha	*Pygocentrus nattereri*	Ornamental	São Paulo-SP	B e E	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
254	Piranha vermelha	*Pygocentrus nattereri*	Ornamental	São Paulo-SP	B e E	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
255	Piranha vermelha	*Pygocentrus nattereri*	Ornamental	São Paulo-SP	B e E	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
256	Carpa	*Cyprinus carpio*	Ornamental	São Paulo-SP	L	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
257	Carpa	*Cyprinus carpio*	Ornamental	São Paulo-SP	L	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
258	Carpa	*Cyprinus carpio*	Ornamental	São Paulo-SP	L	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo
259	Tricoleri	*Trichogaster leeri*	Ornamental	São Paulo-SP	B	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
260	Tricoleri	*Trichogaster leeri*	Ornamental	São Paulo-SP	B	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
261	Peixe Anjo	*Pomacanthus imperator*	Ornamental	São Paulo-SP	P	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
262	Plati	*Xiphophorus maculatus*	Ornamental	São Paulo-SP	L	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo

B: Letargia; E: Natação Errática; L: Apatia; N: Lesão na Boca; P: Lesão corporal/ Fonte: Própria autoria.

APÊNDICE A - Relação dos peixes amostrados segundo as características analisadas.

Amostra	Nome Popular	Nome Cientifíco	Manejo	Llização	Sinais Clínicos	Resultados para CyHV-1 e CyHV-2	Resultado para CyHV-3	Resultado para LCDV	Resultado para MV
263	Melanotaenia Maçã	*Glossolepis incisus*	Ornamental	São Paulo-SP	P	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
264	Finger fish	*Monodactylus argentus*	Ornamental	São Paulo-SP	Ausente	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
265	Carpa	*Cyprinus carpio*	Ornamental	São Paulo-SP	P	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
266	Carpa	*Cyprinus carpio*	Ornamental	São Paulo-SP	P	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
267	Carpa	*Cyprinus carpio*	Ornamental	São Paulo-SP	P	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
268	Tricogaster amarelo	*Trichogaster trichopterus*	Ornamental	São Paulo-SP	P	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
269	Tricogaster amarelo	*Trichogaster trichopterus*	Ornamental	São Paulo-SP	P	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
270	Tricogaster amarelo	*Trichogaster trichopterus*	Ornamental	São Paulo-SP	P	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
271	Paraíso Albino	*Macropodus opercularis*	Ornamental	São Paulo-SP	B e L	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
272	Paraíso Albino	*Macropodus opercularis*	Ornamental	São Paulo-SP	B e L	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
273	Paraíso Albino	*Macropodus opercularis*	Ornamental	São Paulo-SP	B e L	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
274	Kinguio	*Carassius auratus*	Ornamental	São Paulo-SP	U	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
275	Kinguio	*Carassius auratus*	Ornamental	São Paulo-SP	U	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
276	Kinguio	*Carassius auratus*	Ornamental	São Paulo-SP	U	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
277	Tricogaster amarelo	*Trichogaster trichopterus*	Ornamental	São Paulo-SP	P	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
278	Tricogaster amarelo	*Trichogaster trichopterus*	Ornamental	São Paulo-SP	P	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
279	Tricogaster amarelo	*Trichogaster trichopterus*	Ornamental	São Paulo-SP	P	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
280	Tricogaster amarelo	*Trichogaster trichopterus*	Ornamental	São Paulo-SP	P	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
281	Carpa	*Cyprinus carpio*	Ornamental	São Paulo-SP	Ausente	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
282	Piranha diamante	*Serrasalmus gibbus*	Ornamental	São Paulo-SP	Ausente	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
283	Kinguio	*Carassius auratus*	Ornamental	São Paulo-SP	Ausente	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
284	Pangá	*Pangasius hypophthalmus*	Ornamental	São Paulo-SP	P	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

B: Letargia; L: Apatia; P: Lesão Corporal; U: Hidropsia/ Fonte: Própria autoria.

APÊNDICE A - Relação dos peixes amostrados segundo as características analisadas.

Amostra	Nome Popular	Nome Cientifíco	Manejo	Localização	Sinais Clínicos	Resultados para CyHV-1 e CyHV-2	Resultado para CyHV-3	Resultado para LCDV	Resultado para MV
285	Pangá	*Pangasius hypophthalmus*	Ornamental	São Paulo-SP	P	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
286	Acará Bandeira	*Pterophyllum scalare*	Ornamental	São Paulo-SP	Ausente	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
287	Acará Bandeira	*Pterophyllum scalare*	Ornamental	São Paulo-SP	Ausente	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
288	Tetra fortuna	*Moenkhausia costae*	Ornamental	São Paulo-SP	Ausente	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
289	Tetra fortuna	*Moenkhausia costae*	Ornamental	São Paulo-SP	Ausente	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
290	Tetra fortuna	*Moenkhausia costae*	Ornamental	São Paulo-SP	Ausente	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
291	Plati	*Xiphophorus maculatus*	Ornamental	São Paulo-SP	Ausente	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
292	Danio Pérola	*Brachdanio albolineatus*	Ornamental	São Paulo-SP	L	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
293	Dojô	*Misgurnos anguillicaudatus*	Ornamental	São Paulo-SP	L	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
294	Dojô	*Misgurnos anguillicaudatus*	Ornamental	São Paulo-SP	L	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
295	Cascudo	*Hypostomus plecostomus*	Ornamental	São Paulo-SP	K	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
296	Colisa laila	*Trichogaster lalius*	Ornamental	São Paulo-SP	L	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
297	Mato grosso	*Hyphessobrycon eques*	Ornamental	São Paulo-SP	Ausente	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
298	Lebiste	*Poecilia reticulata*	Ornamental	São Paulo-SP	Ausente	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
299	Dojô	*Misgurnos anguillicaudatus*	Ornamental	São Paulo-SP	Ausente	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
300	Pirarucu	*Araipama gigas*	Ornamental	São Paulo-SP	L	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
301	Acará Bandeira	*Pterophyllum scalare*	Ornamental	São Paulo-SP	Ausente	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
302	Kinguio	*Carassius auratus*	Ornamental	São Paulo-SP	Ausente	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
303	Cruzeiro do Sul	*Hemiodopsis gracilis*	Ornamental	São Paulo-SP	Ausente	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
304	Tetra fortuna	*Moenkhausia costae*	Ornamental	São Paulo-SP	Ausente	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
305	Kinguio	*Carassius auratus*	Ornamental	São Paulo-SP	Ausente	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
306	Kinguio	*Carassius auratus*	Ornamental	São Paulo-SP	Ausente	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

K: Presença de Muco pelo Corpo; L: Apatia; P: Lesão Corporal/ Fonte: Própria autoria.