UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

EURICO DE PAULA ARRUDA

Detecção e caracterização moleculares do Vírus da Viremia Primaveril da Carpa em peixes de água doce das regiões nordeste e centro-leste do estado de São Paulo

Pirassununga
2015

EURICO DE PAULA ARRUDA

Detecção e caracterização moleculares do Vírus da Viremia Primaveril da carpa em peixes de água doce das regiões nordeste e centro-leste do estado de São Paulo

(Versão Corrigida)

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

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Serviço de Biblioteca e Informação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo

Arruda, Eurico de Paula
A778d Detecção e caracterização moleculares do vírus da Viremia Primaveril da Carpa em peixes de água doce das regiões nordeste e centro-leste do estado de São Paulo / Eurico de Paula Arruda. -- Pirassununga, 2015.
83 f.
Dissertação (Mestrado) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo.
Departamento de Medicina Veterinária.
Área de Concentração: Biociência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Luiz Moro de Sousa.

1. Piscicultura 2. rhabdovírus 3. Diagnóstico molecular. I. Título.

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

FOLHA DE APROVAÇÃO

Eurico de Paula Arruda

Detecção e caracterização moleculares do Vírus da Viremia Primaveril da carpa em peixes de água doce das regiões nordeste e centro-leste do estado de São Paulo.

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

Data de Aprovação: __/__/____

Banca Examinadora:

Prof(a). Dr(a)._____Instituição:_____
Julgamento:_____Assinatura:_____

Prof(a). Dr(a)._____Instituição:_____
Julgamento:_____Assinatura:_____

Prof(a). Dr(a)._____Instituição:_____
Julgamento:_____Assinatura:_____

DEDICATÓRIA

Ao Ilmo. Carlos Franch, ou como o conheci, Vovô Ferinha, que, quando ainda vivo, me apresentou ao mundo dos animais de seu sítio, no Ceará, e por causa dele, creio eu, segui no rumo da Medicina Veterinária.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer aqueles que me apoiaram desde o início da minha vida e que estiveram comigo em todos os momentos, bons ou ruins. Sempre estiveram ao meu lado para dar sugestões, opiniões, e acima de tudo, me dizendo para seguir no caminho que me fizesse feliz. Pai e mãe, obrigado por tudo, por me salvarem quando precisei e por me estimular a correr atrás da minha felicidade. Obrigado também por me deixarem utilizar o laboratório de vocês durante o segundo ano do projeto, quando tive de voltar a Ribeirão Preto. Me salvaram mesmo! Amo vocês! Agradeço também à minha irmã Olivia, por sempre me apoiar e me incentivar em tudo.

Agradeço neste momento a quem possibilitou o meu ingresso na Pós-Graduação da FZEA-USP, meu orientador, Prof. Dr. Ricardo Luiz Moro de Sousa, que durante esses dois anos me apoiou e me ensinou muito. Sem suas orientações e suas correções este trabalho não seria o mesmo.

Preciso dizer que devo grande parte do meu projeto a uma pessoa maravilhosa, que sempre esteve presente para desabafar dos problemas e dar dicas de experimentos, acompanhou nos *happy-hours* e sempre me ajudou quando precisei: Juliana de Oliveira Navarro (Jú). Obrigado por tudo!

Agradeço à minha namorada Joyce por me dar total apoio nesses dois anos, por sempre estar presente no sufoco e nas alegrias. E por me aguentar e suportar o estresse de final de Mestrado. Obrigado meu amor.

Agradeço também ao pessoal do Laboratório de Higiene Zootécnico da FZEA-USP, Anna Alencar, Marina Pinheiro, Euder, Ju Baldin, Marcela, Mel Gomes, Marcelo, Marisa, Andrea, Silvia, Marina Massocco, Flávia Munin, Samara, Sabrina, Profa. Andrezza, Erika Felix, Maria Fernanda, Carol, e Rocio, pelas conversas, pelos momentos, pela ajuda sempre. Obrigado.

Quero agradecer imensamente ao pessoal do Laboratório de Pesquisa em Virologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, que sempre me acolheu, quando precisei ou mesmo quando só estava de passagem no lab. Um grande abraço para Ricardo, Ronaldo, Mirela, Bruna, Talita, Marcus Vinicius, Luiz, Ítalo, Gustavo, Miriã, Pity, Aline, Taline, Gilberto, Analu, Marjorie, Bruno, Danillo, Willian, Flavia, Michelle, Flavio e Felipe.

Finalmente, e com certeza de maior importância para a finalização do projeto, gostaria de agradecer a duas pessoas que me ajudaram imensamente nesse último ano: Luciano K. de S. Luna e Anibal S. Oliveira. Encontrei alguns problemas no decorrer do projeto, e ambos me auxiliaram muito, em especial o Luciano. Obrigado por me ensinar tanto e por se disponibilizar a me ajudar em vários momentos. E muito obrigado Aníbal por sempre me ajudar também.

RESUMO

Arruda, E. P. **Detecção e caracterização moleculares do Vírus da Viremia Primaveril da Carpa em peixes de água doce das regiões nordeste e centro-leste do estado de São Paulo.** 2015. 83f. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.

Piscicultura de água doce consiste na maior produção da aquicultura mundial e o cultivo de peixes tem crescido, devido a investimento, desenvolvimento de tecnologias e à contínua expansão de espécies cultivadas. Esse aumento gerou novas possibilidades de transmissão de vírus aquáticos, fatores limitantes à produção da aquicultura. Dentre as centenas de vírus conhecidos de peixes, um dos principais, que atualmente é de preocupação internacional, é o vírus da Viremia Primaveril da Carpa (SVCV), devido a sua importância socioeconômica considerando os países afetados e o comércio internacional de animais aquáticos e seus derivados, com base na saúde e medidas preventivas. SVC é uma doença aguda causada por um rhabdovírus do gênero *Vesiculovirus*, que é um vírus de ácido ribonucleico (RNA) fita simples linear de aproximadamente 11 quilobases (kb) com polaridade negativa e envelopado. Diversos ensaios diagnósticos podem ser utilizados para detectar SVCV, porém, consomem tempo e não são adaptados para diagnóstico a campo. A prevenção da disseminação do vírus é crucial; portanto, maior entendimento do vírus e de sua transmissão é necessário. No presente estudo, a padronização de uma RT-*nested*PCR foi realizada, cujo limite de detecção foi de $8{,}62 \times 10^{-2}$ cópias/reação, observado após o *spiking* de tecidos de peixes com diluições seriadas de um controle positivo sintético. O ensaio foi aplicado a 150 amostras teciduais provenientes de 146 peixes distintos. As amostras consistiam de fragmentos de fígado, rim e baço e foram submetidas à transcrição reversa (RT), seguida pela reação em cadeia de polimerase (PCR), em configuração *nested*. Duas (2) amostras foram positivas para o gene G de SVCV pela RT-*nested*PCR e a identidade dos produtos obtidos foi confirmada por sequenciamento direto utilizando-se o método de Sanger. Na reconstrução filogenética, as sequências obtidas formaram clado único, separado dos demais genogrupos e mesmo de sequências derivadas de outros vesiculovírus encontrados no Brasil. Esses resultados determinam a primeira detecção e caracterização moleculares de SVCV no Brasil por RT-*nested*PCR e sequenciamento nucleotídico, indicando a necessidade de adoção de medidas de biosseguridade mais restritivas na produção pesqueira nacional.

Palavras-chave: piscicultura, rhabdovírus, diagnóstico molecular.

ABSTRACT

Arruda, E. P. **Molecular detection and characterization of the Spring Viremia of Carpa Virus in fresh fish from the northeast and central west regions of the state of São Paulo.** 2015. 83p. M.Sc. Dissertation – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.

Fresh-water fish farming forms the largest portion of the world aquaculture production, and the harvest of these warm-water fish is increasing, due to investment, improvement of technologies and continued expansion of cultivated species. This increase has rendered new possibilities for the transmission of aquatic viruses, which remain limiting factors for aquaculture production. Among the hundreds of known viruses of fish, one of the main viruses that are currently of international concern is the Spring Viremia of Carp virus (SVCV) due to its socio-economic importance regarding affected countries and international trade of aquatic animals and their products, on the basis of health control and preventive measures. SVC is an acute disease, caused by a rhabdovirus, belonging to the *Vesiculovirus* genus, and is an enveloped virus, with a linear single-strained negative-sense ribonucleic acid (RNA) of approximately 11 kilobases (kb). Several diagnostic assays are available for the detection of SVCV, but they are time-consuming and not well adapted for field diagnosis. Prevention of spreading of the virus is crucial; therefore, more understanding of the virus and its transmission is required. In this study, standardization of a RT-*nested*PCR was performed, and its detection limit was of 8.62×10^{-2} copies/reaction, observed after spiking fish tissue with serial dilutions of a synthetic positive control. The assay was applied to 150 tissue samples from 146 different fish. Samples consisted of liver, kidney and spleen fragments, and underwent reverse transcription (RT) followed by the polymerase chain reaction (PCR) of a nested configuration. Two (2) tissue samples were found positive for the G gene of SVCV by RT-*nested*PCR and the identity of products was confirmed by direct sequencing using the Sanger method. By phylogenetic reconstruction, the obtained sequences formed a unique clade, separating them from the other known genogroups, and even from sequences derived from other vesiculoviruses found in Brazil. These results represent the first molecular detection and characterization of SVCV in Brazil by RT-*nested*PCR and nucleotide sequencing, indicating the need to adopt more stringent biosecurity measures in national fish farming production.

Keywords: fish farming, rhabdovirus, molecular diagnostics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Tendência mundial de crescimento da pesca de captura e produção aquícola (aquicultura), em milhões de toneladas, entre 1950 e 2012 (FAO, 2014). 2
Figura 2. Tendência mundial e por continente de crescimento da produção aquícola comparada à pesca de captura, entre 1990 e 2012, em milhões de toneladas (FAO, 2014). 3
Figura 3. Tendência de crescimento da produção mundial da aquicultura continental e da maricultura, em milhões de toneladas, entre 1980 e 2012 (FAO, 2014). 5
Figura 4. Distribuição das principais espécies cultivadas de peixes e crustáceos por região no Brasil (MPA, 2014). 7
Figura 5. Carpa comum (A) e sua variante ornamental, carpa Koi (B). 9
Figura 6. *Pimephales promelas* experimentalmente infectado com SVC, apresentando exoftalmia e hemorragia abdominal (setas brancas) (USGS, 2013). 10
Figura 7. Microscopia eletrônica de SVCV, mostrando vírion em forma de projétil (FIJAN, 2008). 12
Figura 8. Genoma e transcritos de rhabdovírus (SIB, 2015). 14
Figura 9. Componentes da estrutura viral dos rhabdovírus (FLORES, 2007). 14
Figura 10. Ciclo replicativo da família *Rhabdoviridae*, com base no Vírus da Estomatite Vesicular (VSV) (FLORES, 2007). 16
Figura 11. Achados macroscópicos externos em peixes submetidos a diagnóstico molecular 22
Figura 12. Achados macroscópicos em necropsia de peixes submetidos ao diagnóstico molecular. 23
Figura 13. Mapa do vetor pGEM-T®. 26
Figura 14. Cálculo do número de moléculas do clone, por reação. 27
Figura 15. Gel de agarose de PCRs, utilizando combinações de *primers* exibidas na tabela 6. 30
Figura 16. Gel de agarose de PCRs com *primers* externos, da diluição 10^{-10} do controle positivo, utilizando diferentes temperaturas de anelamento 30
Figura 17. Gel de agarose (1,5%) de *nested*PCRs com *primers* da combinação I-I, da diluição 10^{-10} do controle positivo, utilizando diferentes temperaturas de anelamento 31
Figura 18. Quantidade de animais coletados por Estado, relacionado à presença ou ausência de sinais clínicos. 35
Figura 19. Géis de agarose (1,5%) 37
Figura 20. (A) Distribuição das 100 concordâncias (*matches*) no BLAST quando comparadas com a sequência consultada; (B) primeiras seis sequências com alinhamentos significantes. 38
Figura 21. Gel de agarose de PCR1 de diluições seriadas do controle positivo 39
Figura 22. Gel de agarose 1,5% da *nested*PCR de diluições seriadas do controle positivo 40
Figura 23. Géis de agarose (1,5%) 41
Figura 24. Gel de agarose de *nested*PCR de amostras do PP após *spiking* 42
Figura 25. Géis de agarose (1,5%) de PCRs para o controle endógeno, em amostras de peixes coletados 43

Figura 26. Géis de agarose (1,5%) da primeira PCR em *pools* de amostras testados 44
Figura 27. Gel de *nested*PCR realizada em 41 amostras 45
Figura 28. Gel de *nested*PCR realizada em 20 amostras 45
Figura 29. Gel de *nested*PCR realizadao em 17 amostras 46
Figura 30. Cromatogramas de amostras 183P e 302P, A e B, respectivamente, e da nona diluição do controle positivo (10^{-9}), em C 47
Figura 31. Cromatogramas de amostras 183P e 302P, A e B, respectivamente, e da nona diluição do controle positivo (10^{-9}), em C 48
Figura 32. Sequências similares à da amostra 183P (FOR), incluindo porcentagem de identidade (Ident.) e número de acesso (Accession) no GenBank. 49
Figura 33. Sequências similares à da amostra 183P (REV), incluindo porcentagem de identidade e número de acesso no GenBank. 49
Figura 34. Sequências similares à da amostra 302P (FOR), incluindo porcentagem de identidade e número de acesso no GenBank. 49
Figura 35. Sequências similares à da amostra 302P (REV), incluindo porcentagem de identidade e número de acesso no GenBank. 50
Figura 36. Sequências similares à do controle positivo (FOR), incluindo porcentagem de identidade e número de acesso no GenBank. 50
Figura 37. Sequências similares à do controle positivo (REV), incluindo porcentagem de identidade e número de acesso no GenBank. 50
Figura 38. Alinhamento múltiplo de sequências nucleotídicas parciais do gene G de SVCV incluindo aquelas detectadas em *Astyanax bimaculatus* (lambari) e *Oreochromis niloticus* (tilápia do Nilo), em destaque (retângulo vermelho), e outras sequências homólogas depositadas no GenBank, utilizando os programas BioEdit e Jalview 52
Figura 39. Cladograma representando reconstrução filogenética baseada no alinhamento múltiplo de sequências nucleotídicas referentes à amplificação parcial de 170pb do gene G de SVCV, referente à região compreendida entre os nucleotídeos 217 e 377 do gene G de isolado de referência de SVCV presente no GenBank (KF983467) 53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Produção aquícola por região: quantidade em toneladas e porcentagem da produção em relação ao total mundial (exceto plantas aquáticas e produtos não alimentícios) (FAO, 2014). 4
Tabela 2. Taxonomia dos Rhabdovirus, com espécies hospedeiras e doenças associadas (FLORES, 2007). 13
Tabela 3. Principais rhabdovírus de peixes, com distribuição geográfica e espécies suscetíveis (FLORES, 2007). 13
Tabela 4. Isolados de rhabdovírus incluídos nos estudo de Stone et al. (2003), demonstrando os 4 genogrupos distintos. SVCV: Vírus da Viremia Primaveril da Carpa; PFR: Rhabdovirus Pike Fry (STONE et al., 2003). 17
Tabela 5. *Primers* desenhados e sintetizados para detecção do gene G de SVCV, contendo sequência de nucleotídeos no senso positivo, tamanho dos oligonucleotídeos e nomenclatura. 25
Tabela 6. Combinações de *primers* utilizados na *nested*PCR. 29
Tabela 7. *Primers* de actina de peixe utilizados na detecção do controle endógeno. 32
Tabela 8. Caracterização de animais quanto à espécie e presença ou ausência de sintomatologia específica. 36
Tabela 9. Quantificação e grau de pureza de amostras positivas. 47

LISTA DE ABREVIATURAS

CEPTA	Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais
cDNA	*Complementary Deoxyribonucleic Acid*
DNA	*Deoxyribonucleic Acid*
dNTP	*Deoxyribonucleotide Triphosphate*
DEPC	*Diethyl Pyrocarbonate*
DMSO	*Dimethyl Sulfoxide*
ELISA	*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*
EDTA	*Ethylenediaminetetraacetic Acid*
FZEA	Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
FAO	*Food and Agriculture Organization*
FOR	*Forward*
HIRRV	*Hirame Rhabdovirus*
IHNV	*Infectious Hematopoietic Necrosis Virus*
ICMBio	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
IDT	*Integrated DNA Technologies*
IPTG	*Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside*
KHV	*Koi Herpes Virus*
LB	*Luria Bertani* (tipo de meio de crescimento bacteriano)
mRNA	*Messenger Ribonucleic Acid*
MPA	Ministério da Pesca e Aquicultura
OIE	*Office International des Epizooties*
PP	Peixe da Padronização
PFR	*Pike Fry Rhabdovirus*
PCR	*Polymerase Chain Reaction*
PF	*Primer Forward* (de sentido senso)
PR	*Primer Reverse* (de sentido antissenso)
RHV	*Rainbow Trout Herpesvirus*

REV	*Reverse*
RT	*Reverse Transcription*
RT-PCR	*Reverse Transcription-Polimerase Chain Reaction*
RNA	*Ribonucleic Acid*
SP	São Paulo
SVC	*Spring Viremia of Carp*
SVCV	*Spring Viremia of Carp Virus*
UV	Ultravioleta
USP	Universidade de São Paulo
USGS	*United States Geological Survey*
VSV	*Vesicular Stomatitis Virus*
VHSV	*Viral Haemorrhagic Septicemia Virus*

LISTA DE SÍMBOLOS

cm	Centímetros
g	Gramas
°C	Graus Centígrados ou Graus Celsius
∞	Infinito
µL	Microlitros
µm	Micrômetros
mg	Miligramas
mL	Mililitros
mM	Milimolar
min	Minutos
M	Molar
ng	Nanogramas
nm	Nanômetros
-	Negativo
nt	Nucleotídeos
pb	Pares de Bases
pmol	Picomol(es)
+	Positivo
pH	Potencial de Hidrogênio
seg	Segundos

SUMÁRIO

RESUMO i
ABSTRACT ii
LISTA DE FIGURAS iii
LISTA DE TABELAS v
LISTA DE ABREVIATURAS vi
LISTA DE SÍMBOLOS viii
1. INTRODUÇÃO 1
1.1. Piscicultura no Brasil 6
1.2. O Vírus da Viremia Primaveril da Carpa 8
1.3. Estrutura e Genoma Viral 11
1.4. Ciclo Replicativo 15
1.5. Grupos filogenéticos 16
1.6. Métodos Profiláticos e Diagnóstico 18
2. JUSTIFICATIVA 20
3. OBJETIVOS 20
4. MATERIAIS E MÉTODOS 21
4.1. Coleta de peixes e amostras 21
4.2. Extração de RNA 23
4.3. Transcrição Reversa (RT) 24
4.4. Padronização de reagentes moleculares 24
4.4.1. Síntese de controle positivo e desenho de *primers* 24
4.4.2. Clonagem do fragmento sintético para estoque 25
4.4.3. Sequenciamento do clone 26
4.4.4. Determinação do limite de detecção do controle 27
4.4.5. *Spiking* de tecidos com o controle positivo 28
4.4.6. Padronização dos *primers* utilizados nas PCRs 29
4.5. Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) 31
4.5.1. Detecção do controle endógeno 31
4.5.2 Detecção de SVCV 32
4.6. Sequenciamento Nucleotídico 33
4.7. Análise Filogenética 34
5. RESULTADOS 35
5.1. Caracterização dos animais do presente estudo 35

5.2. Padronização da RT-PCR 37
5.2.1. Confirmação de amplificação do controle positivo 37
5.2.2. Clonagem do fragmento sintético e escolha do clone 37
5.2.3. Sequenciamento do fragmento clonado 38
5.2.4. Limite de detecção das PCRs 39
5.2.5. *Spiking* de tecidos com o controle positivo 40
5.3. Detecção do controle endógeno 42
5.4. Detecção do vírus SVCV 43
5.5. Sequenciamento nucleotídico 46
5.6. Análise Filogenética 48
6. DISCUSSÃO 54
7. CONCLUSÕES 58
8. REFERÊNCIAS 59
9. ANEXO 67

1. INTRODUÇÃO

Mais de 800 milhões de pessoas no mundo sofrem de má nutrição crônica, de acordo com a Organização da Agricultura e Alimentação das Nações Unidas (*Food and Agriculture Organization of the United Nations* - FAO). Estima-se que a população mundial cresça até 9,6 bilhões (2 bilhões a mais que 2014) até 2050 (FAO, 2014). É de grande importância a alimentação da população mundial e, ao mesmo tempo, a proteção do meio ambiente para futuras gerações. As atividades de pesca são provavelmente mais antigas que as práticas de agricultura e pecuária, e desempenham papel socioeconômico fundamental em todo o mundo. Ultimamente, a atividade vem se desenvolvendo muito rapidamente em resposta à crescente demanda por pescado e derivados, atingindo um nível elevado de desenvolvimento (NOMURA, 2010).

A crescente demanda mundial de alimentos tem causado o desenvolvimento de tecnologias no setor agropecuário, e a aquicultura tem ocupado lugar de destaque neste segmento produtivo. A atividade consiste nas seguintes especialidades (MPA, 2014):

- Piscicultura – criação de peixes em água doce e marinha;
- Malacocultura – produção de moluscos;
- Carcinicultura – criação de camarões;
- Algicultura – produção de macro ou microalgas;
- Ranicultura – criação de rãs;
- Criação de jacarés.

A piscicultura tem uma parte fundamental na eliminação da fome, promovendo saúde e reduzindo a pobreza. O consumo de peixe e o crescimento do setor pesqueiro têm aumentado drasticamente até os dias de hoje. A carne do pescado é altamente nutritiva e uma fonte vital de proteínas e nutrientes essenciais, especialmente para muitos dos membros mais pobres da comunidade mundial (FAO, 2014). Dentre estes nutrientes, temos vitaminas (A, C, D e do complexo B), minerais (cálcio, fósforo, sódio, potássio, magnésio, etc.) carboidratos (glicogênio e mucopolissacarídeos), lipídeos (ácidos graxos da família Ômega-3) e proteínas (FIB, 2009).

A carne de peixe apresenta a mesma proporção de proteínas que a carne de bovinos, aves e suínos, porém de qualidade superior, por conter menos teor de tecido conjuntivo (constituído de proteínas de baixa qualidade), além de ser altamente digerível e rica em metionina e lisina, considerados aminoácidos essenciais. Os teores de aminoácidos essenciais variam em função de espécie, tamanho, gênero, habitat e estação do ano (FIB, 2009).

A atividade é fonte não somente de saúde, mas de renda, gerando milhões de empregos, especialmente em países em desenvolvimento (FAO, 2014). Esta produção tem crescido gradualmente nas últimas décadas devido ao crescimento populacional combinado ao aumento da renda, à urbanização, e à forte expansão da produção de peixes. Em 2012, segundo a FAO (2014), a produção de pescado apresentou diferença expressiva em relação à pesca extrativa ou de captura, fornecendo atualmente quase metade de todos os peixes utilizados para alimentação humana (Figura 1). Projeta-se que este percentual alcance 62% em 2030 (FAO, 2014).

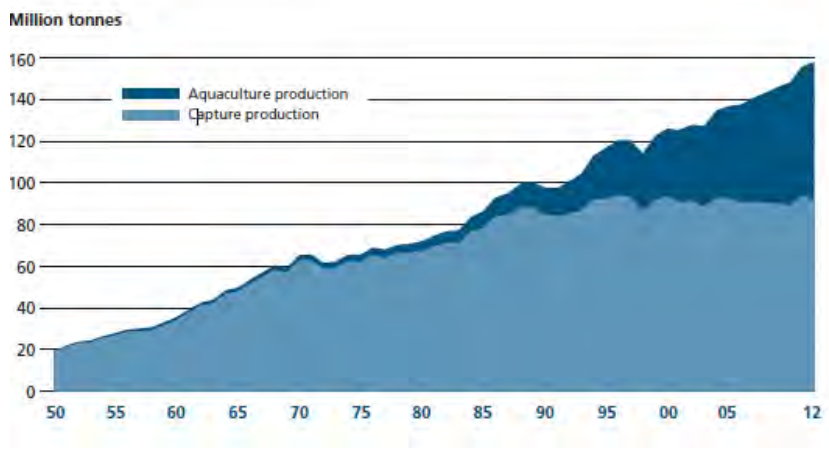

Figura 1. Tendência mundial de crescimento da pesca de captura e produção aquícola (aquicultura), em milhões de toneladas, entre 1950 e 2012 (FAO, 2014).

As vantagens da aquicultura sobre a pesca extrativa são muitas, podendo-se controlar as condições ambientais e manipular características genéticas para incremento na produção (NOMURA, 2010).

Apesar do aumento anual per capita observado no consumo de peixes em regiões em desenvolvimento e países com déficit alimentar, regiões desenvolvidas ainda mantêm maiores índices de consumo, mas grande parte dos peixes consumidos nessas regiões é importada. Já nos países em desenvolvimento, o consumo desses animais baseia-se na disponibilidade local

e sazonal. Porém, como consequência do aumento de renda doméstico em economias emergentes, verifica-se uma crescente diversificação de espécimes disponíveis para consumo dado o aumento da importação desses animais (FAO, 2014).

A China é a maior exportadora de peixes e derivados do pescado. Porém, desde 2011, tem se tornado o terceiro maior país importador do mundo, após os Estados Unidos da América (EUA) e o Japão, sendo a União Europeia o maior mercado consumidor para peixes importados e derivados, com dependência crescente da importação (FAO, 2014).

A produção mundial da aquicultura continua a crescer, embora lentamente. De acordo com as últimas estatísticas disponíveis coletadas pela FAO, esta produção mundial atingiu 90,4 milhões de toneladas em 2012, incluindo 66,6 milhões de toneladas de pescado para alimentação e 23,8 milhões de toneladas de algas aquáticas. Nesta análise, o termo "pescado" compõe-se de peixes, crustáceos, moluscos, anfíbios, tartarugas de água doce e outros animais aquáticos, produzidos no intuito de serem utilizados como alimentos para consumo humano.

O crescimento da importância mundial da aquicultura permanece ininterrupto, mesmo considerando os perfis de produção por continente (Figura 2). A piscicultura contribuiu com 42,2% dos 158 milhões de toneladas de peixe obtidos em 2012 (FAO, 2014).

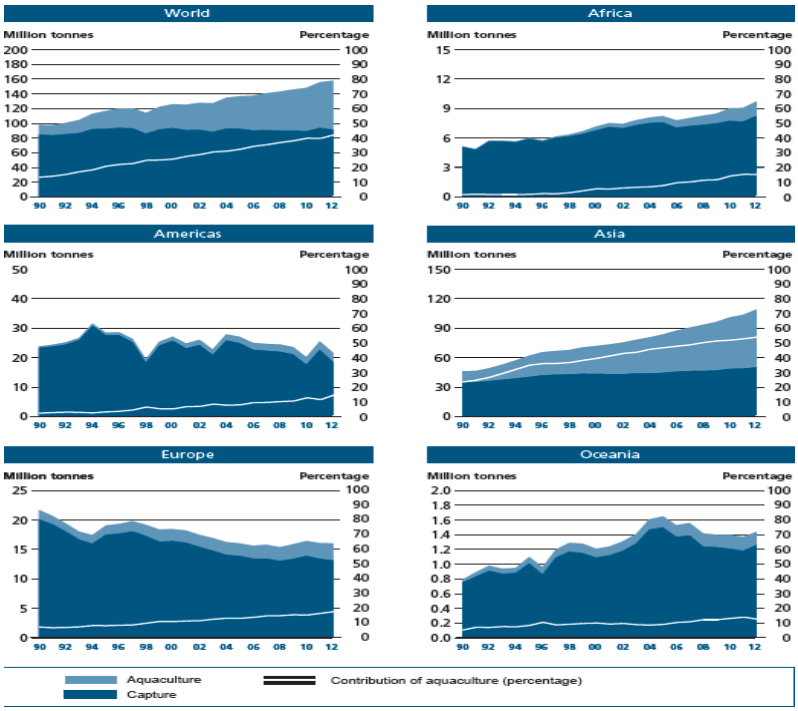

Figura 2. Tendência mundial e por continente de crescimento da produção aquícola comparada à pesca de captura, entre 1990 e 2012, em milhões de toneladas (FAO, 2014).

O crescimento geral na produção da aquicultura permanece relativamente alto devido à demanda de peixes para alimentação em países produtores (Tabela 1), porém, em alguns países industrializados, principalmente EUA, Espanha, França, Itália, República Tcheca e Japão, esta produção tem decaído nos últimos anos. Uma das maiores causas dessa queda é a disponibilidade de pescado importado de outros países, onde os custos são relativamente mais baixos (FAO, 2014).

Tabela 1. Produção aquícola por região: quantidade em toneladas e porcentagem da produção em relação ao total mundial (exceto plantas aquáticas e produtos não alimentícios) (FAO, 2014).

Selected groups and countries		1990	1995	2000	2005	2010	2012
Africa	(tonnes)	**81 015**	**110 292**	**399 688**	**646 182**	**1 286 591**	**1 485 367**
	(percentage)	***0.62***	***0.45***	***1.23***	***1.46***	***2.18***	***2.23***
North Africa	(tonnes)	63 831	75 316	343 986	545 217	928 530	1 030 675
	(percentage)	*0.49*	*0.31*	*1.06*	*1.23*	*1.57*	*1.55*
Sub-Saharan Africa	(tonnes)	17 184	34 976	55 702	100 965	358 062	454 691
	(percentage)	*0.13*	*0.14*	*0.17*	*0.23*	*0.61*	*0.68*
Americas	(tonnes)	**548 479**	**919 571**	**1 423 433**	**2 176 740**	**2 581 089**	**3 187 319**
	(percentage)	***4.19***	***3.77***	***4.39***	***4.91***	***4.37***	***4.78***
Caribbean	(tonnes)	12 169	28 260	39 704	29 790	37 301	28 736
	(percentage)	*0.09*	*0.12*	*0.12*	*0.07*	*0.06*	*0.04*
Latin America	(tonnes)	179 367	412 650	799 234	1 478 443	1 885 965	2 565 107
	(percentage)	*1.37*	*1.69*	*2.47*	*3.34*	*3.19*	*3.85*
North America	(tonnes)	356 943	478 661	584 495	668 507	657 823	593 476
	(percentage)	*2.73*	*1.96*	*1.80*	*1.51*	*1.11*	*0.89*
Asia	(tonnes)	**10 801 531**	**21 677 062**	**28 420 611**	**39 185 417**	**52 436 025**	**58 895 736**
	(percentage)	***82.61***	***88.90***	***87.67***	***88.46***	***88.82***	***88.39***
China	(tonnes)	6 482 402	15 855 653	21 522 095	28 120 690	36 734 215	41 108 306
	(percentage)	*49.58*	*65.03*	*66.39*	*63.48*	*62.22*	*61.69*
Central and Western Asia	(tonnes)	72 164	65 602	122 828	190 654	259 781	311 133
	(percentage)	*0.55*	*0.27*	*0.38*	*0.43*	*0.44*	*0.47*
Southern and Eastern Asia (excluding China)	(tonnes)	4 246 965	5 755 807	6 775 688	10 874 073	15 442 028	17 476 296
	(percentage)	*32.48*	*23.61*	*20.90*	*24.55*	*26.16*	*26.23*
Europe	(tonnes)	**1 601 649**	**1 581 359**	**2 052 567**	**2 137 340**	**2 548 094**	**2 880 641**
	(percentage)	***12.25***	***6.49***	***6.33***	***4.83***	***4.32***	***4.32***
European Union (Member Organization) (28)	(tonnes)	1 033 857	1 182 098	1 400 667	1 269 958	1 280 236	1 259 971
	(percentage)	*7.91*	*4.85*	*4.32*	*2.87*	*2.17*	*1.89*
Other European countries	(tonnes)	567 792	399 261	651 900	867 382	1 267 858	1 620 670
	(percentage)	*4.34*	*1.64*	*2.01*	*1.96*	*2.15*	*2.43*
Oceania	(tonnes)	**42 005**	**94 238**	**121 482**	**151 466**	**185 617**	**184 191**
	(percentage)	***0.32***	***0.39***	***0.37***	***0.34***	***0.31***	***0.28***
World	(tonnes)	**13 074 679**	**24 382 522**	**32 417 781**	**44 297 145**	**59 037 416**	**66 633 253**

A aquicultura mundial pode ser categorizada em aquicultura continental e maricultura. A primeira forma geralmente utiliza água doce, mas algumas produções utilizam água salina (Egito) e álcali-salina (China). A maricultura baseia-se na produção em águas salinas, no oceano e em zonas próximas ao mar.

Em 1980, as produções da aquicultura continental e da maricultura estavam situadas no mesmo nível, cada uma contribuindo com cerca de 2,35 milhões de toneladas/ano. No entanto, o crescimento da aquicultura continental, desde então, tem ultrapassado o da maricultura em aproximadamente 1,6%, aumentando sua contribuição de 50% em 1980 para 63% em 2012, em relação ao total da produção de pescado (Figura 3) (FAO, 2014). A crescente demanda mundial de alimentos tem causado o desenvolvimento de tecnologias no setor, impulsionando-o de rudimentar a uma atividade altamente tecnificada (BARROSO et al., 2002).

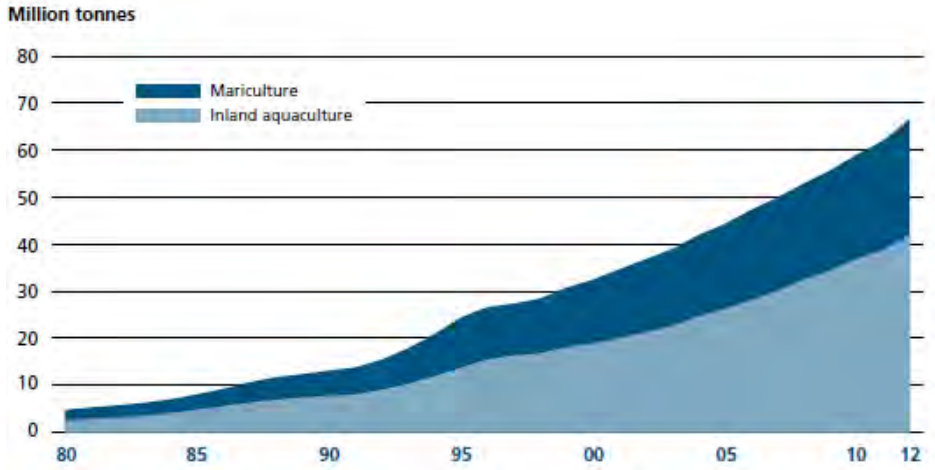

Figura 3. Tendência de crescimento da produção mundial da aquicultura continental e da maricultura, em milhões de toneladas, entre 1980 e 2012 (FAO, 2014).

Dos 66,6 milhões de toneladas produzidos pela aquicultura em 2012, dois terços, ou 44,2 milhões de toneladas, representaram peixes provenientes de pisciculturas continentais (38,6 milhões de toneladas) e da maricultura (5,6 milhões de toneladas) (FAO, 2014).

O rápido crescimento da piscicultura continental pode ser explicado por ser um tipo de aquicultura mais fácil de realizar em países em desenvolvimento, quando comparado à maricultura. Atualmente, o setor é responsável por 57,9% da produção mundial de peixes (FAO, 2014).

1.1. Piscicultura no Brasil

O Brasil possui enorme potencial para a aquicultura. O país possui 12% da água doce do planeta, uma grande diversidade de espécies que habitam seu território e um litoral de mais de oito mil quilômetros. Além da produção litorânea, a piscicultura é realizada em extensivas bacias hidrográficas e numa grande quantidade de reservatórios. Estima-se que aproximadamente 3,5 milhões de pessoas estão envolvidas direta ou indiretamente com a aquicultura no Brasil (FAO, 2014).

Conforme o Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA), desde 2003, o consumo nacional por habitante/ano de pescado aumentou, atingindo, em 2013, 14,5 kg (comparando ao consumo de 2003, que foi inferior a 12 kg) (MPA, 2014). Além disso, em 2011 o país produziu aproximadamente 1,25 milhões de toneladas de peixe, sendo 38% cultivados (MPA, 2014). Segundo a FAO, o país pode chegar a ser um dos maiores produtores do mundo até 2030, tendo condições de atingir 20 milhões de toneladas (FAO, 2014).

O Brasil é o segundo maior produtor de aquicultura na América Latina e Caribe, com crescimento rápido na piscicultura, de 172,000 toneladas em 2000, a 629,300 toneladas em 2011. A piscicultura de água doce (tilápias, carpas e algumas espécies nativas) contribuiu com 87% (545,300 toneladas) do total da produção da piscicultura brasileira em 2011, e a maricultura, 13%. Mesmo assim, o Brasil é o maior importador de peixe na América Latina (FAO, 2014).

Durante os últimos dez anos, a piscicultura vem mantendo um crescimento acima do esperado no Brasil, superando o da produção de outras atividades, como suinocultura, avicultura, etc. No entanto, como o pescado produzido não supre a demanda da população, o país vem importando cada vez mais, principalmente de países da Ásia, como a China e o Vietnã (KUBITZA et al., 2013).

Em comparação com as outras regiões geográficas do país, o Nordeste e o Sul são as maiores produtoras de peixes, correspondendo a 61% da produção aquícola nacional (KUBITZA et al., 2013). De acordo com a FAO (2014), as regiões Sudeste e Centro-oeste, juntas, produziram 31%, enquanto a região Norte foi responsável por somente 9% da produção nacional (FAO, 2014).

A região sudeste acompanha o perfil do setor no Brasil, resultado do trabalho de um grande número de universidades e institutos de pesquisa e fomento por sua capacitação tecnológica, além da ação de empresas privadas que encontraram, na aquicultura, uma atividade lucrativa.

Atualmente, mais de 64 espécies de organismos aquáticos estão sendo cultivados no Brasil, incluindo uma enorme variedade de peixes de água doce, nativos da bacia do Amazonas e de regiões pantanosas do Centro-oeste, moluscos (mexilhões e ostras), crustáceos (camarões), tartarugas, jacarés e algas marinhas. As principais espécies de peixes cultivadas em água doce são: tilápia do Nilo, carpa comum, carpa cabeçuda, carpa prateada, pacú, tambaqui, cachara, pintado, pirarucu, matrinxã e Piracanjuba (Figura 4). As trutas arco-íris foram introduzidas no país em 1949, e atualmente são produzidas nas regiões Sudeste e Sul (FAO, 2014).

Figura 4. Distribuição das principais espécies cultivadas de peixes e crustáceos por região no Brasil (MPA, 2014).

Com a expansão da piscicultura no Brasil, observou-se um crescente interesse de criadores por possíveis causas de prejuízos econômicos devido à mortalidade decorrente de problemas de ordem nutricional e sanitária. Em tempo, a produção intensiva de organismos aquáticos está diretamente relacionada com o aumento da frequência de surtos de doenças.

Portanto, cuidados quanto ao manejo e mesmo transporte dos espécimes são necessários, minimizando as perdas econômicas na criação (MARTINS, 1997).

A aquicultura cresceu bastante desde os anos 1980, mas seu potencial para contribuir para o bem-estar nutricional, segurança alimentar e desenvolvimento econômico está ameaçado pelas doenças transfronteiriças da fauna aquática. Movimentos globais não regulamentados da fauna aquática são fonte de graves epidemias. Uma vez que um agente patogênico é introduzido e se instala no meio ambiente, o seu controle e/ou erradicação tornam-se difíceis. A prevenção é a melhor estratégia (FAO, 2014).

A etiologia das doenças infecciosas em peixes abrange uma diversidade de agentes: bacterianos, fúngicos, parasitários e virais (MOELLER Jr., 2013). Devido ao alto risco de propagação destas doenças através do comércio da fauna aquática, muitas das enfermidades de peixes são listadas como notificáveis pela Organização Mundial da Saúde Animal (*Office International des Epizooties* - OIE). As doenças de peixes de notificação obrigatória pela OIE são: Necrose Hematopoiética Epizoótica, Síndrome Ulcerativa Epizoótica, infecção por *Gyrodactylus salaris*, Anemia Infeciosa do Salmão, infecção por Alphavírus dos Salmonídeos, Necrose Hematopoiética Infeciosa, doença pelo Herpesvírus de Carpa Koi (KHV), doença do Iridovírus do Robalo Vermelho, Septicemia Hemorrágica Viral e Viremia Primaveril da Carpa.

Dentre as doenças listadas anteriormente, a maioria possui, como agente etiológico, um vírus. Estas doenças são altamente preocupantes e muito difíceis de serem controladas, uma vez instaladas na população. Além disso, a epidemiologia de muitas dessas doenças virais é pouco conhecida, sendo necessários estudos que aprofundem esse aspecto.

1.2. O Vírus da Viremia Primaveril da Carpa

O Vírus da Viremia Primaveril da Carpa (*Spring Viremia of Carp Vírus*, SVCV) é um agente altamente contagioso e patogênico, que causa perdas econômicas e ecológicas consideráveis a uma variedade de peixes de cultivo e de vida livre, além de camarões Penaeid (*Penaeus stylirostris* e *P. vannamei*) (GARVER et al. 2007; JOHNSON et al., 1999), principalmente durante a primavera. Como sugere o nome, a carpa comum *Cyprinus carpio* (incluindo seu variante ornamental, a carpa koi) e outras espécies de carpa representam os hospedeiros primários (Figura 5), apesar de outros peixes de água doce serem naturalmente suscetíveis ao vírus, como os peixes dourados (*Carassius auratus*), a tenca (*Tinca tinca*), o

escalo prateado (*Leuciscus idus*), e o siluro europeu (*Silurus glanis*). Peixes jovens de espécies de lagos como o Lúcio e a Perca são também suscetíveis (FIJAN, 1999; AHNE et al., 2002; PADHI et al., 2012).

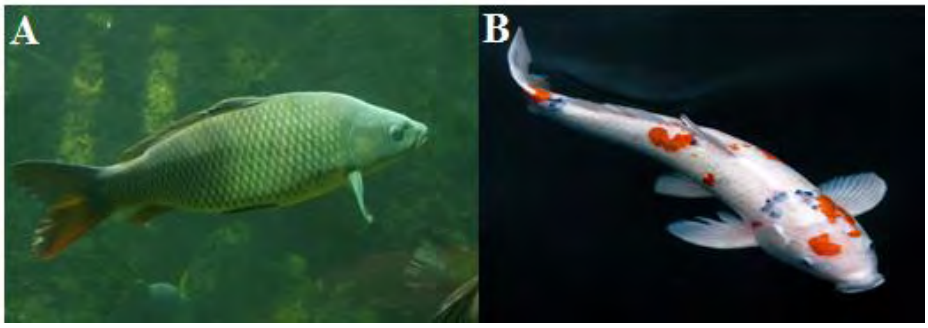

Figura 5. Carpa comum (**A**) e sua variante ornamental, carpa Koi (**B**).

O vírus causa uma doença aguda hemorrágica e contagiosa, o que incluiu a infecção por SVCV na lista de doenças notificáveis no Código Internacional de Saúde dos Animais Aquáticos (*International Aquatic Animal Health Code*) do OIE (ROWLEY et al., 2001).

Anteriormente conhecido como *Rhabdovirus carpio*, o SVCV tem sido detectado e/ou isolado durante surtos da doença em mais de 30 países, incluindo países europeus como Áustria, Bulgária, França, Alemanha, Grã-Bretanha, Hungria, Itália, Espanha, partes da antiga Tchecoslováquia e da ex-União Soviética (ex-U.S.S.R.) e Iugoslávia (TOMASEC et al., 1964; FIJAN et al., 1971; BAUDOUY, 1975; AHNE, 1973; KÖLBL, 1975; TESARCIK et al., 1977; BUCKE, FINLAY, 1979; GHITTINO et al., 1971; MARCOTEGUI et al. 1992; ROUDIKOV, 1980; BÉKÉSI, CSONTOS, 1985; SHCHELKUNOV, SHCHELKUNOVA, 1989; WALKER, WINTON, 2010; WOLF, 1988); países da América do Norte, como os EUA (GOODWIN, 2002; DIKKEBOOM et al., 2004; GARVER et al., 2007; MILLER et al., 2007; PHELPS et al., 2012) e o Canadá (GARVER et al., 2007); na Ásia (LIU et al. 2004; ZHANG, 2002; LIU et al. 2005; TENG et al. 2007); e na América do Sul (ALEXANDRINO et al. 1998).

A doença (SVC) é endêmica em partes da Europa continental, Rússia e países da ex-U.S.S.R. Estimativas sugerem que cerca de 4.000 toneladas de peixes em perdas anuais são atribuíveis à SVCV, somente na Europa (ZHANG, 2002).

Surtos do vírus acometem todas as fases da vida dos peixes (KOUTNÁ et al., 2003), mas os mais suscetíveis são geralmente peixes jovens. As taxas de mortalidade de carpas jovens podem chegar a 70% durante surtos na primavera, época em que a temperatura da água

encontra-se entre 10 e 17ºC. Em peixes adultos, as perdas geralmente são abaixo de 30% (AHNE et al., 2002). Surtos de SVCV dependem da temperatura da água, idade e condições dos peixes, densidade populacional dos animais e fatores de estresse (AHNE et al., 2002).

SVCV é o agente etiológico da inflamação letal hemorrágica da bexiga natatória e peritonite em carpas e diversas outras espécies de peixes (WOLF, 1988). Animais afetados apresentam destruição tecidual em rim, baço e fígado, levando a hemorragias, perda do equilíbrio osmótico e deficiência da resposta imune (AHNE et al., 2002).

Os sinais externos mais comuns, em carpas, são hemorragias petequiais e/ou focais da pele e nadadeiras, exoftalmia (Figura 6), distensão abdominal (ascite peritoneal), fezes mucoides de coloração clara, e guelras inflamadas ou edemaciadas (FIJAN et al. 1971; AHNE, WOLF, 1977; NEGELE, 1977; AHNE et al. 2002; FLORES, 2007). No entanto, muito dos animais morrem sem a apresentação de sinais clínicos externos visíveis. Portanto, frequentemente, a primeira indicação de uma epidemia é o aumento súbito na mortalidade de peixes (FLORES, 2007).

Figura 6. *Pimephales promelas* experimentalmente infectado com SVC, apresentando exoftalmia e hemorragia abdominal (setas brancas) (USGS, 2013).

Os sinais internos são peritonite, ascite catarral, enterite hemorrágica, vísceras edematosas e hemorragias petequiais na parede interna da bexiga natatória, de outros órgãos internos, e de músculos esqueléticos (FIJAN et al., 1971; AHNE, WOLF, 1977; NEGELE, 1977; PHELPS et al., 2012). De acordo com JOHNSON et al. (1999), o vírus causa mudanças histológicas e mortalidade significante em camarões (LU et al., 1991; JOHNSON et al., 1999; LU, LOH, 1994).

Na infecção experimental por inoculação viral na água, o vírus é detectado inicialmente nas guelras (NEGELE, 1977), brânquias, pele ou na cavidade oral (FLORES, 2007). Em seguida, se replica de forma transitória em células endoteliais e dissemina-se pelo sangue até os órgãos internos. Posteriormente, ocorre a excreção pelo trato digestório, através

das fezes ou da mucosa do intestino e pela urina. Os primeiros sinais, como vísceras edematosas, peritonite, enterite e hemorragias em diferentes órgãos podem ser visualizados em 8 a 11 dias pós-infecção (AHNE et al., 2002; NEGELE, 1977).

De acordo com Negele (1977), algumas alterações principais são observadas nos estágios finais da doença, em fígado, baço e rim. No fígado, foram observados vasos sanguíneos e parênquima hepático necrosados, degeneração adiposa, e hiperemia. No baço, além de hiperemia, observou-se hiperplasia do endotélio. E no rim, os túbulos encontram-se congestionados, e apresentavam degeneração hialina.

Infecções bacterianas e/ou parasitárias secundárias e concomitantes podem afetar a taxa de mortalidade e sintomas (FIJAN, 1972). A doença clínica predomina a temperaturas entre 5 e 10ºC, onde a resposta imune do hospedeiro está geralmente suprimida ou lenta. No entanto, o desfecho letal é mais rápido a temperaturas entre 10 e 17ºC (AHNE et al., 2002).

A disseminação do vírus ocorre principalmente através das fezes e urina de peixes clinicamente infectados e através de animais portadores. O vírus excretado pode permanecer infeccioso na água por mais de quatro semanas e na lama por aproximadamente seis semanas, a uma temperatura de 4 a 10ºC (AHNE et al., 2002). Acredita-se que a transmissão horizontal (pela água) seja a rota primária de infecção, mas também pode ocorrer a transmissão mecânica através de ectoparasitas vetores de SVCV (AHNE et al., 2002). Possíveis vetores biológicos incluem piolhos das carpas (*Argulus foliaceus*) e sanguessugas (*Piscicola geometra*), assim como aves que se alimentam de peixes, como garças (AHNE et al., 2002). Uma fonte adicional de infecção pode ser por equipamentos contaminados. Diversos estudos também apontam a transmissão vertical como possibilidade (fluidos ovarianos em contato com ovas), além da transmissão por fômites (AHNE et al., 2002; FLORES, 2007).

Animais infectados tendem a apresentar progressiva deficiência de reações a estímulos sensoriais, velocidade de natação reduzida e diminuição da frequência respiratória. Os peixes infectados podem ainda apresentar letargia e anorexia, comportamento natatório anormal e incapacidade de manter a posição vertical de seu eixo menor, sinais que marcam o estágio final da doença (FLORES, 2007).

1.3. Estrutura e Genoma Viral

O Vírus da Viremia Primaveril da Carpa pertence ao gênero *Vesiculovirus*, família *Rhabdoviridae*, ordem *Mononegavirales*, e exibe estrutura genômica semelhante à de outros

rhabdovírus de vertebrados (WUNNER et al., 1995). Consiste de uma partícula com formato característico de projétil, de aproximadamente 80 a 180 nanômetros (nm) de comprimento e 60 a 90 nm de diâmetro (Figura 7). Seu genoma encontra-se em um nucleocapsídeo alongado e com simetria helicoidal, contornado por uma camada lipoproteica com projeções glicoproteicas, e é formado por uma fita simples de ácido ribonucleico (RNA), de polaridade negativa, de 11.019 pares de bases (pb) (AHNE et al., 2002; GARVER et al., 2007; KNIPE et al., 2007; FIJAN, 2008).

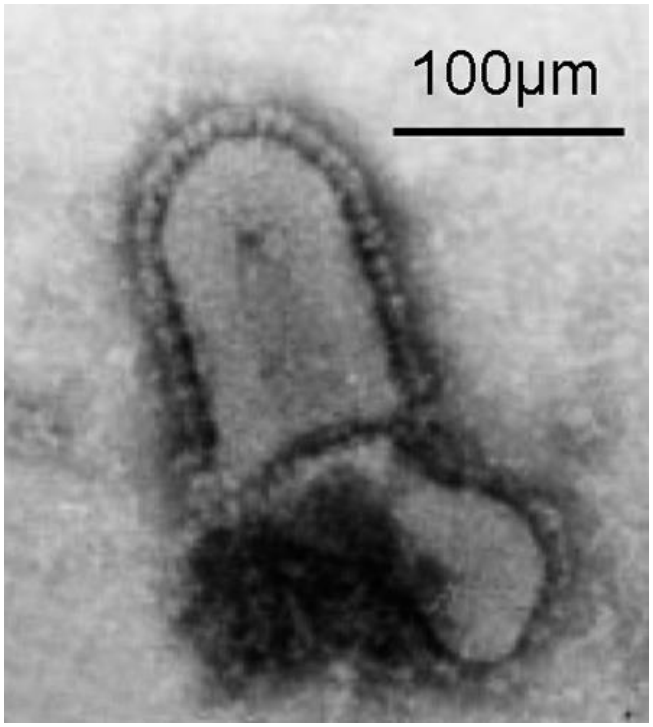

Figura 7. Microscopia eletrônica de SVCV, mostrando vírion em forma de projétil (FIJAN, 2008).

Os vírus da família *Rhabdoviridae* são classificados quanto à taxonomia em seis gêneros: *Vesiculovirus*, *Lyssavirus*, *Ephemerovirus*, *Novirhabdovirus*, *Cytorhabdovirus* e *Nucleorhabdovirus*. Os rhabdovírus infectam uma grande variedade de espécies, incluindo artrópodes, plantas e vertebrados. Dentre os vírus de vertebrados, existem os que infectam mamíferos, aves e peixes, e alguns destes são de grande importância para a saúde humana e animal (Tabela 2) (FLORES, 2007).

Tabela 2. Taxonomia dos Rhabdovirus, com espécies hospedeiras e doenças associadas (FLORES, 2007).

Gênero	Espécie/tipo	Hospedeiro(s)	Doença de importância veterinária
Vesiculovirus	Vírus da estomatite vesicular (VSV)	Mamíferos, peixes, insetos	Estomatite vesicular, viremia primaveril das carpas etc.
Lyssavirus	Vírus da raiva (RabV)	Mamíferos, insetos	Raiva, lissavírus dos morcegos australianos.
Ephemerovirus	Vírus da febre efêmera dos bovinos (BEFV)	Mamíferos, insetos	Febre efêmera de bovinos, doença do rio Adelaide.
Novirhabdovirus	Vírus da necrose hematopoiética (IHNV)	Peixes	Necrose hematopoiética, septicemia hemorrágica.
Cytorhabdovirus	Vírus da necrose amarela da alface	Plantas	Nenhuma.
Nucleorhabdovirus	Vírus do tomate anão	Plantas	Nenhuma.

Os rhabdovírus de peixes são classificados em dois grupos antigênicos, baseados nas propriedades das proteínas e em análises filogenéticas de sequências de genes. O gênero *Novirhabdovirus* abriga o vírus da necrose hematopoiética infecciosa (IHNV) e o vírus da septicemia hemorrágica (VHSV), além de outros; e o *Vesiculovirus* inclui o SVCV e vários rhabdovírus emergentes de peixes que são muito relacionados aos rhabdovírus de mamíferos (Tabela 3) (FLORES, 2007).

Tabela 3. Principais rhabdovírus de peixes, com distribuição geográfica e espécies suscetíveis (FLORES, 2007).

Gênero *Novirhabdovirus*		
Vírus	**Local**	**Hospedeiros**
IHNV	América do Norte, Europa e Ásia	Vários gêneros da família *Salmonidae*
VHSV	América do Norte, Europa e Japão	*Salmonidae* (trutas) *Gadidae* (bacalhaus) *Clupeidae* (arengues) *Esocidae* (lúcios) *Pluronectidae*
HIRRV	Japão	*Plecoglossidae* (ayus) *Pleuronectidae* *Bothidae* (flounders)
Vírus semelhantes aos do gênero *Vesiculovirus*		
SVCV e vírus emergentes semelhantes aos vesiculo-vírus	América do Norte, Europa e Ásia	*Cyprinidae* (carpas) *Esocidae* (lúcios) *Salmonidae* (trutas) *Percidae* (perches)

O RNA genômico dos rhabdovírus possui cinco genes na ordem 3'–N–P–M–G–L–5', que codificam cinco proteínas virais, incluindo a nucleoproteína (N), a fosfoproteína associada à polimerase (P), a proteína de matriz (M), a glicoproteína transmembrana de envelope (G), e a RNA polimerase RNA-dependente (L) (Figura 8) (KOUTNÁ et al. 2003; PADHI et al., 2012).

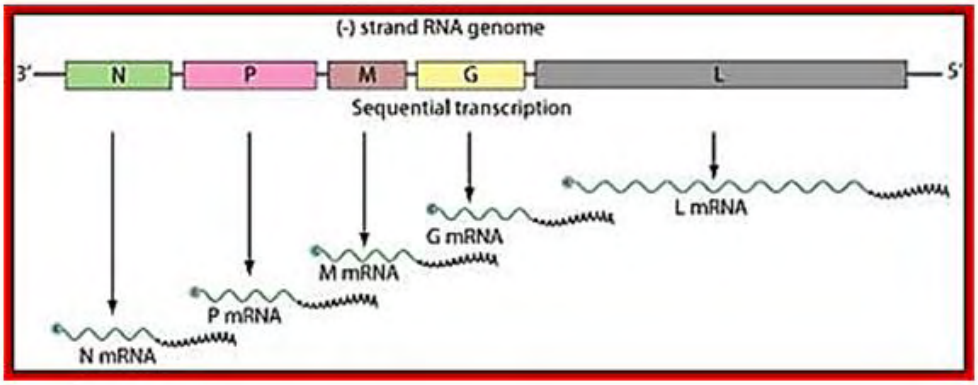

Figura 8. Genoma e transcritos de rhabdovírus (SIB, 2015).

A transcrição e a replicação virais são realizadas quando a proteína L interage com as proteínas P e N do nucleocapsídeo. A glicoproteína (proteína G) de SVCV forma peplômeros triméricos na superfície viral que se ligam a receptores celulares para induzir a endocitose viral. A glicoproteína de superfície atua como o antígeno viral de maior importância, determinando as propriedades sorológicas dos rhabdovírus (HILL et al., 1975; JORGENSEN et al., 1989). A nucleoproteína N é a proteína mais abundante do vírion e interage com o RNA viral para formar a estrutura helicoidal do nucleocapsídeo, além de ter a função de modular a transcrição. A fosfoproteína P é um componente do nucleocapsídeo dos rhabdovírus que, associada às proteínas L e N, é necessária para a transcrição (WUNNER et al., 1995; ROY, 1981). Semelhante aos outros vesiculovírus, SVCV possui uma proteína de matriz M, cujas funções são formar a estrutura do vírion e ligar o nucleocapsídeo com os domínios citoplasmáticos da proteína G, integrada no envelope lipídico viral (Figura 9) (WALKER et.al., 2000; FLORES, 2007).

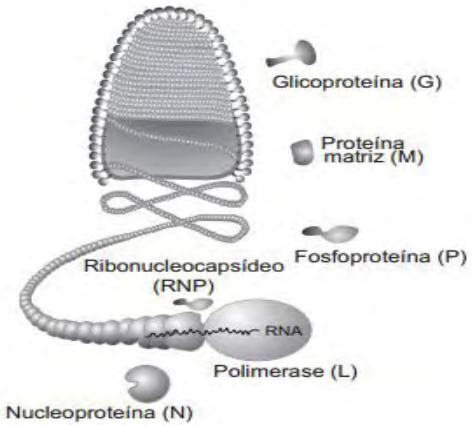

Figura 9. Componentes da estrutura viral dos rhabdovírus (FLORES, 2007).

1.4. Ciclo Replicativo

O ciclo replicativo da família *Rhabdoviridae* inicia-se com a interação da glicoproteína G do envelope viral com receptores na superfície celular do hospedeiro. Ocorre, em seguida, a adsorção e penetração dos vírions por endocitose. No interior do endossomo, sob pH ácido, a proteína G promove a fusão do envelope viral com a membrana da vesícula endocítica, liberando assim o complexo ribonucleoproteína no citoplasma e a fita simples de RNA negativa é transcrita pelo complexo polimerase que está presente no vírion (FLORES, 2007).

A tradução dos RNAs mensageiros (mRNA) está associada com o processo de transcrição, e a quantidade de cada proteína reflete a abundância relativa de cada mRNA. Após a tradução das proteínas virais pelos ribossomos, o complexo polimerase realiza a transição do modo de transcrição para o modo de replicação do genoma, sintetizando cadeias completas do RNA com sentido positivo (que se conjugarão com a proteína N para servir de molde para a síntese de cópias de RNA de sentido genômico) (FLORES, 2007).

Após a síntese de cópias negativas de RNA, estas podem servir para transcrição e replicação, ou podem ser encapsidadas nas partículas virais pela interação da proteína N com a proteína de matriz (M). O brotamento subsequente na membrana plasmática é mediado pela interação da proteína M com a glicoproteína G (Figura 10) (FLORES, 2007).

De acordo com BJORKLUND et al. (1997), SVCV causa a morte celular por indução de apoptose. Ocorrem mudanças morfológicas nas células, como redução de volume celular, *blebbing* de membrana e formação de corpúsculos apoptóticos, 36 horas após infecção. Após 40 horas, mais de 70% de células infectadas por SVCV encontram-se apoptóticas (BJORKLUND et al. 1997).

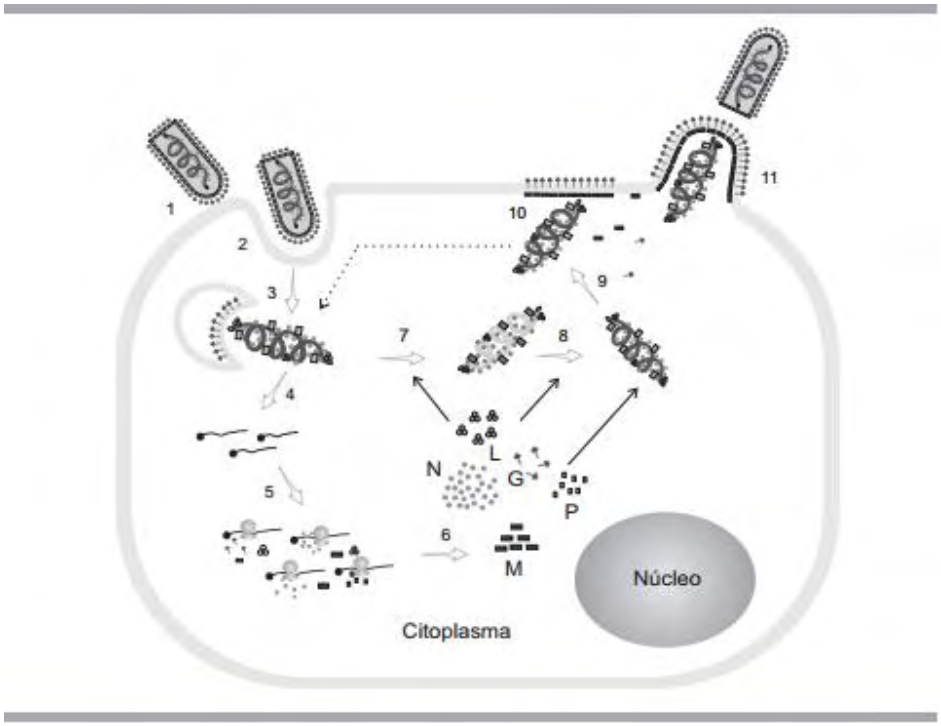

Figura 10. Ciclo replicativo da família *Rhabdoviridae*, com base no Vírus da Estomatite Vesicular (VSV). 1- Adsorção; 2- Endocitose; 3- Fusão do endossomo com o envelope viral e liberação do nucleocapsídeo no citosol; 4- Transcrição gênica; 5- Tradução; 6- Produção de proteínas virais (N, P, M, G, e L); 7- Síntese de RNA complementar; 8- Síntese de cópias genômicas; 9- Transporte até membrana; 10- Interação com proteínas M e G; 11- Brotamento e saída da proteína viral (FLORES, 2007).

1.5. Grupos filogenéticos

Estudos conduzidos com base em análises filogenéticas utilizando uma região de 550 nucleotídeos (nt) do gene da glicoproteína (G) (WARG et al., 2007) têm sido realizados para a caracterização de SVCV (JOHNSON et al. 1999; ORESHKOVA et al. 1999; JOHANSSON et al. 2001; AHNE et al. 2002; KOUTNÁ et al. 2003; STONE et al. 2003; LIU et al. 2004; DIKKEBOOM et al. 2004). Desta forma, o vírus possui quatro subtipos distintos. Todos os isolados de SVCV pertencem a um único grupo gênico (I) que compreende quatro subgrupos, ou genogrupos (Ia-Id). Estes subgrupos diferenciam-se geograficamente em Ásia (genogrupo Ia), Leste Europeu (Ib), Estados da ex-U.S.S.R. (Ic) e do Oeste Europeu (Id) (Tabela 4) (STONE et al. 2003).

Tabela 4. Isolados de rhabdovírus incluídos nos estudo de Stone et al. (2003), demonstrando os 4 genogrupos distintos. SVCV: Vírus da Viremia Primaveril da Carpa; PFR: Rhabdovirus Pike Fry (STONE et al., 2003).

Group[a]	Isolate	Host and geographic origin	Source/Donor
Ia	E232	Isolated in England from koi carp *Cyprinus carpio*, but with a connection to Asia	This laboratory
	980528 1.1	Isolated in England from koi carp imported from China	This laboratory
	D120	Isolated in England from koi carp, but with a connection to Asia	This laboratory
	NC02-46	Koi carp, USA	Goodwin (2002), Dikkeboom et al. (2004)
	WI02-131	Common carp *C. carpio*, USA	Dikkeboom et al. (2004)
Ib	E134	Common carp, illegally imported into England	This laboratory
	RHV	Rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, Ukraine	I. Shchelkunov, Russia
	2/90	Common carp, Moldova	I. Shchelkunov, Russia
Ic	NI-5	Bighead carp *Aristichthys nobilis*, Ukraine	I. Shchelkunov, Russia
	P4	Common carp, Russia	I. Shchelkunov, Russia
Id	770346	Common carp, England	This laboratory
	880163	Common carp, England	This laboratory
	940626 1.10	Golden tench *Tinca tinca*, England	This laboratory
	950255 3.1	Rudd *Scardinius erythrophthalmus*, England	This laboratory
	M2-78	Silver carp *Hypophthalmichthys molitrix*, Moldova	Shchelkunov & Shchelkunova (1989)
	N3-14	Grass carp *Ctenopharyngodon idella*, Ukraine	I. Shchelkunov, Russia
	S30	Common carp, Yugoslavia	Fijan et al. (1971)
II	V76	Grass carp, Germany	Ahne (1975)
III	PFR F4	Pike *Esox lucius*, France	de Kinkelin et al. (1973)
IV	994663 1.1	Bream *Abramis brama*, England	This laboratory
	S64	Tench *T. tinca*, Germany	Ahne et al. (1982)
	950237	Tench, England	This laboratory
	994602 3.1	Crucian carp *Carassius carassius*, England	This laboratory
	84-4	Brown trout *Salmo trutta*, Northern Ireland	Adair & McLoughlin (1986)

[a]Genogroup and subgroup according to Stone et al. (2003)

Os vírus do subgrupo Ia foram isolados na Inglaterra, China, EUA e Canadá (GARVER et al., 2007; MILLER et al., 2007; SHEPPARD et al.,2007; TENG et al., 2007; ZHANG et al., 2009). Os do subgrupo Ib e Ic consistem de vírus isolados de Moldova, Ucrânia e Rússia (STONE et.al., 2003). E o subgrupo Id consiste de isolados virais do Reino Unido, Alemanha e Áustria (ROWLEY et al., 2001; HOFFMANN et al., 2005; BASIC et al., 2009; PADHI et al., 2012).

A partir desta descrição, SVCV tem sido relatado em carpas comuns de vida livre e cultivadas, em diversos Estados dos EUA e no Canadá (GARVER et al., 2007). Análise filogenética destes isolados revelou que todos os isolados de SVCV na América do Norte agrupam-se no genogrupo Ia, que inclui isolados da Ásia. Isto sugere que os isolados dos EUA e do Canadá podem ter suas origens na Ásia (STONE et al. 2003; DIKKEBOOM et al., 2004).

Essa identificação conferida pelo sequenciamento dos genes dos isolados nos permite investigar as trajetórias migratórias, as fontes de vírus em surtos e seu padrão de evolução ao longo do tempo (STONE et al. 2003).

1.6. Métodos Profiláticos e Diagnóstico

Medidas de profilaxia e controle de SVCV por meio da vacinação estão em desenvolvimento. Carpas vacinadas intraperitonialmente ou via oral, com vírus vivo, podem desenvolver resistência à reinfecção, que pode durar vários meses, inclusive durante o inverno (FIJAN et al. 1977; FIJAN, 1988; FIJAN, 1999). Uma preparação comercial de SVCV inativado para aplicação intraperintoneal obteve resultados positivos em vacinações de carpas na Europa ocidental (TESARCIK et al. 1981). No entanto, mais pesquisas são necessárias.

Diversos testes diagnósticos estão disponíveis para a detecção do SVCV, incluindo ensaios de Transcrição Reversa – Reação em Cadeia de Polimerase (*Reverse Transcription-Polimerase Chain Reaction* - RT-PCR) e sequenciamento, isolamento viral em culturas de células, microscopia eletrônica, testes de neutralização viral, ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), entre outros. No entanto, a maioria consome tempo e não são adaptados para diagnóstico a campo. A prevenção da disseminação do vírus é crucial, portanto, deve-se conhecer mais sobre o SVCV e como ocorre sua transmissão (SHIVAPPA, 2008).

Uma maneira eficaz de se evitar perdas econômicas devido ao SVCV é o uso de medidas de biosseguridade nos criatórios, evitando-se a introdução do agente. Algumas dessas medidas são: treinamento especializado de funcionários; registro de entrada de novos animais; quarentena; avaliação da água e dos equipamentos utilizados no criatório; uso de ovas ou estoques de peixes certificados como livres de patógenos; criação de peixes jovens em água livre de contaminação por vírus como água de poços, água tratada com luz ultravioleta, clorada/desclorada ou tratada com ozônio (tratamentos inativadores de rhabdovírus de peixes); tratamento de equipamentos com compostos contendo iodo (iodóforos) ou hipoclorito; evitar mistura de ovas de várias fêmeas durante a postura; e inspeção sanitária de peixes cultivados e ornamentais.

Os rhabdovírus possuem infectividade razoavelmente estável sob condições ambientais, especialmente em pH alcalino (FLORES, 2007). No entanto, os vírions tornam-se ineficazes sob pH 3, em solventes lipídicos e à temperatura de 56ºC. O vírus é inativado quando exposto a formalina (3%), cloro (500 partes por milhão - ppm), iodo (0,01%), NaOH (2%), radiação ultravioleta - UV (254 nm) e radiação por raios gamma (103 krads), durante 10 minutos. Ciclos de congelamento-descongelamento inativam parcialmente o vírus (AHNE et al., 2002).

Surtos de SVCV causam perdas econômicas significantes a indústrias aquícolas ao redor do mundo (WALKER, WINTON, 2010; MILLER et.al. 2007; AHNE et.al., 2002). Relatos recentes da doença SVC em peixes de vida livre e a expansão de seu alcance geográfico e de hospedeiros, representam uma grande ameaça, não somente à indústria aquícola e de peixes ornamentais, mas também para as populações endêmicas de peixes de vida livre (DIKKEBOOM et. al., 2004).

Diante da importância econômica da piscicultura no Brasil e da falta de conhecimentos sobre a ocorrência de SVCV no país, empreendeu-se o presente projeto envolvendo um estudo sobre a possível circulação de SVCV em peixes no interior do estado de São Paulo (regiões nordeste e centro-leste) e em outras regiões, enfocando-se o diagnóstico laboratorial através de técnicas moleculares. Espera-se que os resultados obtidos possam ser utilizados como subsídios para o desenvolvimento e estabelecimento de potenciais estratégias de controle dessa doença na aquicultura brasileira.

2. JUSTIFICATIVA

O vírus da Viremia Primaveril da Carpa (SVCV) causa graves problemas econômicos e ecológicos ao redor do mundo, sendo transmitido para diversas espécies de peixes e camarões, através de excretas, pela água, por contato e por vetores. O vírus induz taxas de letalidade de até 70% aos animais infectados, podendo estes ser jovens ou mesmo adultos. O vírus já foi isolado e ou detectado em países europeus, na Ásia e nas Américas, incluindo no Brasil, porém, até o presente momento, sem qualquer tipo de caracterização molecular, tema no qual a presente investigação pretende contribuir.

3. OBJETIVOS

O objetivo geral do presente estudo foi investigar a presença de SVCV em peixes de pisciculturas e rios das regiões nordeste e centro-oeste do estado de São Paulo, e de criações do Ceará, Bahia e Minas Gerais, no período de 2013 a 2015, mediante diagnóstico laboratorial por técnicas moleculares. Para tanto, os seguintes objetivos específicos foram estabelecidos:

- Caracterizar os peixes coletados de acordo com a espécie e quanto à presença ou ausência de sinais clínicos de doença infecciosa, dentro da região compreendida pelas bacias hidrográficas dos rios Mogi-Guaçu e Pardo, e de outras regiões produtoras do país, situadas nos estados do Ceará, Bahia e Minas Gerais, incluindo coleta em criações comerciais e de espécimes de vida livre;

- Realizar o diagnóstico molecular de infecções causadas por SVCV pelas técnicas de RT-PCR (*Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*) e RT-*nested* PCR, incluindo a padronização dessa última, a partir de amostras clínicas dos espécimes coletados;

- Realizar a caracterização molecular dos fragmentos genômicos obtidos, por sequenciamento nucleotídico e análise filogenética envolvendo sequências de estirpes descritas na literatura e/ou depositadas em bancos de dados pertinentes.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Coleta de peixes e amostras

Os peixes caracterizados no presente estudo foram adquiridos em pisciculturas e em rios, através de coletas realizadas pela equipe do Laboratório de Higiene Zootécnica, Departamento de Medicina Veterinária, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA-USP), Pirassununga-SP, bem como pela colaboração de pesquisadores de outras instituições como o Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais (CEPTA/ICMBio), Pirassununga-SP, e Aquivet Saúde Aquática, São José do Rio Preto-SP, que gentilmente cederam espécimes coletados para atenderem a programas de monitoramento sanitário ou que vieram a óbito por causas não diagnosticadas.

Um total de 306 peixes foi coletado durante o período do projeto, entre 2013 e 2015, provindos de pesqueiros e rios das regiões nordeste e centro-leste do estado de São Paulo, além de alguns provenientes de criações do Ceará, Bahia e Minas Gerais. O material foi recebido de três formas: animais vivos doentes (eutanasiados posteriormente), espécimes mortos por motivo desconhecido e amostras previamente coletadas, dignosticadas como livres de outras doenças infecciosas, e enviadas para o diagnóstico molecular de doenças virais. Os animais recebidos foram caracterizados quanto à espécie, região de origem, e se eram de vida-livre ou de criações comerciais. Em seguida, foram examinados para a presença ou ausência de lesões clínicas, detalhes os quais eram registrados por escrito e fotografados, e eutanasiados (Figura 11). Os peixes então eram acondicionados em sacos Ziploc® e armazenados a -20ºC em freezer até a coleta de tecidos para diagnóstico molecular. Os procedimentos de coleta e eutanásia dos espécimes, bem como o processamento das amostras teciduais, foram realizados de acordo com o protocolo nº 13.1.542.74.6, aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FZEA-USP (no item 9. ANEXO).

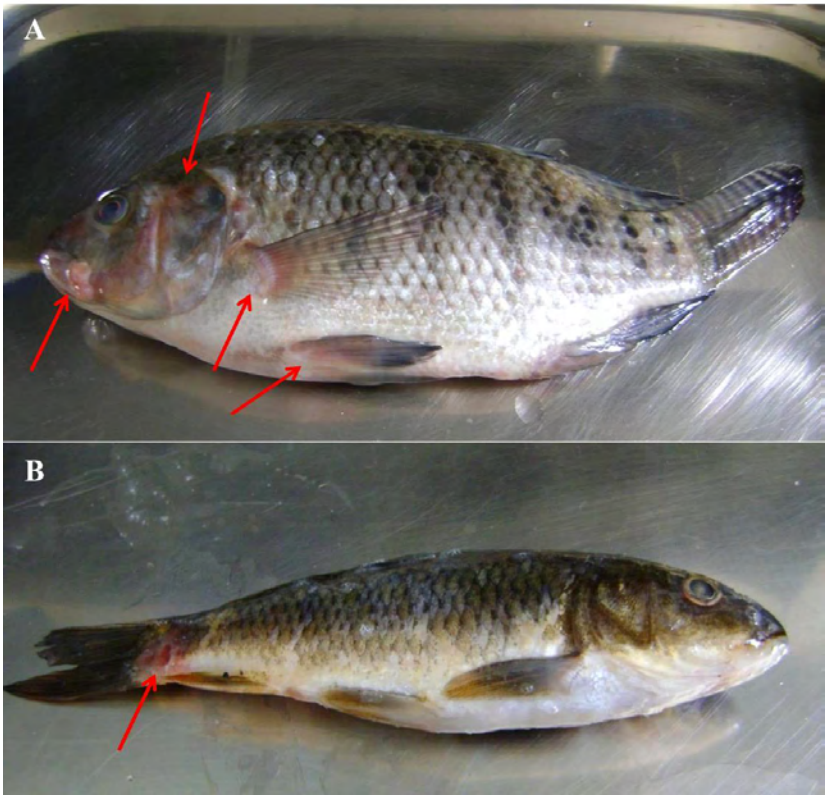

Figura 11. Achados macroscópicos externos em peixes submetidos a diagnóstico molecular. (**A**) Tilápia (peixe nº 166) preparado para autópsia. Observam-se pontos hemorrágicos na boca, guelras e nadadeiras (setas); (**B**) Carpa (peixe nº168). Observa-se lesão em nadadeira caudal (seta).

A retirada dos órgãos foi realizada no Laboratório de Higiene Zootécnica da FZEA-USP, utilizando-se material cirúrgico estéril e tubos Eppendorf 1,5 mL (Figura 12). Os órgãos colhidos foram: fígado, baço, rim e, ocasionalmente, cérebro (abreviados por F, B, R, e C, respectivamente). O material coletado era de aproximadamente 0,5 cm de diâmetro. Para cada peixe examinado foi composto um *pool* (mistura) de tecidos, de aproximadamente 50mg. Caso ocorresse alguma positividade do *pool* (P), tínhamos tubos contendo fragmentos separados dos órgãos descritos, para sabermos qual órgão estaria infectado. Os fragmentos foram pesados, misturados a 1,0 mL de Trizol® e macerados com o uso de pistilos descartáveis autoclaváveis. Após maceração, os tubos foram então centrifugados e armazenados em freezer a -80ºC (80ºC negativos) para ensaios posteriores, ou seguia-se à extração de RNA.

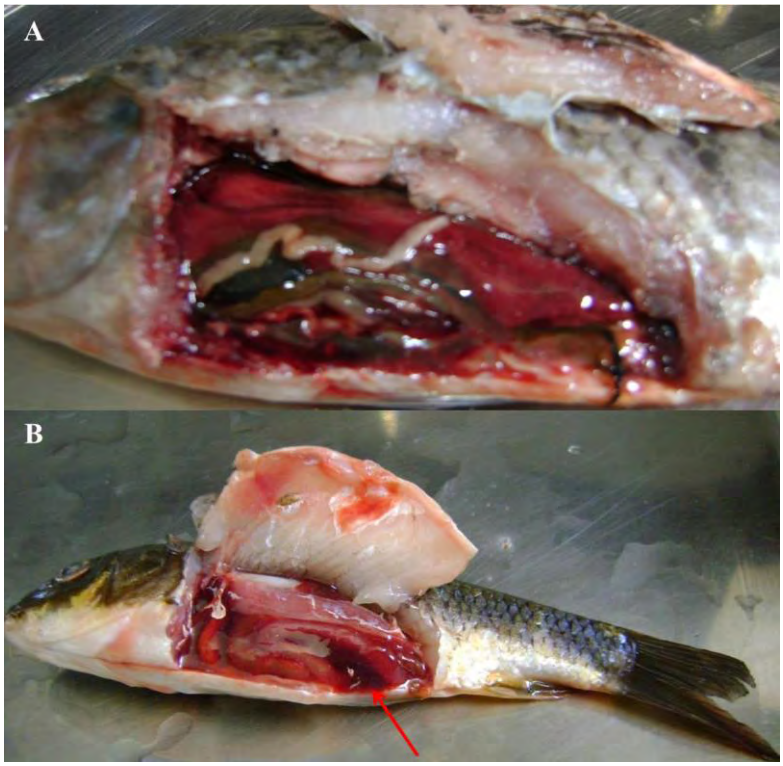

Figura 12. Achados macroscópicos em necropsia de peixes submetidos ao diagnóstico molecular. (**A**) Tilápia (peixe nº 166) após abertura ventral, com tesoura anatômica e bisturi estéreis; (**B**) Carpa (peixe nº 168) após abertura ventral. Observa-se hemorragia abdominal (seta).

4.2. Extração de RNA

A extração de RNA dos tecidos foi realizada pelo método de Trizol® (Life Technologies, EUA) de acordo com instruções do fabricante. Resumidamente, 250 µL de amostra clínica foram homogeneizadas em 750 µL de Trizol® e centrifugadas a 12.000 × *g* por 15 minutos (min) para separação das frações ricas em RNA e DNA/proteínas. A fração superior, rica em RNA, foi lavada com clorofórmio e precipitada com isopropanol (Merck, EUA). O RNA precipitado em isopropanol foi lavado com álcool 70%, secado e ressuspendido em H_2O tratada com DEPC (Pirocarbonato de dietilo) (Promega, EUA). A concentração de RNA extraído foi mensurada utilizando espectrofotômetro (DS-11/DS-11+ Spectrophotometer, DeNovix, EUA).

4.3. Transcrição Reversa (RT)

A transcrição reversa (RT) foi realizada logo após a extração, evitando assim a degradação do RNA extraído. O kit utilizado foi a ImProm II™ Reverse Transcription System (Promega, EUA). As condições da reação foram: 4 µL de RNA (até 1,0 µg/reação) acrescido de 1 µL de *primer* randômico (Promega, EUA) na concentração de 10 µM (micromolar) foram pipetados em tubo Eppendorf de 0,2 mL, identificados quanto ao número da amostra e data de processamento, e acondicionados em termociclador a 70ºC durante 5 min. Em seguida, foram incubados em gelo durante 5 min. Após uma breve centrifugação (*spin*), foram adicionados os seguintes reagentes à reação: 3,2 µL de água DEPC (Promega, EUA); 4,0 µL de Reaction Buffer (ImProm II™ 5X); 4,8 µL de $MgCl_2$ a 25 mM; 1,0 µL de dNTP Mix (5 mM); e 1,0 µL ImProm II™ Reverse Transcriptase. Os tubos, então, foram incubados em termociclador nas seguintes condições: 25ºC/5 min, 42ºC/60 min, 70ºC/15 min e 4º C/∞ (tempo indeterminado).

Finalizada a reação, os cDNAs (DNAs complementares) foram quantificados em espectrofotômetro para posteriores reações de PCR.

4.4. Padronização de reagentes moleculares

4.4.1. Síntese de controle positivo e desenho de *primers*

Realizou-se a padronização das reações em cadeia de polimerase (PCRs) subsequentes utilizando um controle sintético de 489 pb (pares de bases) do gene G de SVCV. O fragmento do gene foi sintetizado pela IDT (Integrated DNA Technologies, EUA), após alinhamentos e análises de sequências de SVCV presentes no GenBank. Com os alinhamentos, foi possível determinar uma região de alta conservação entre as sequências, e, assim, foram desenhados três pares de *primers*. O par externo, denominado Outer-Outer (O-O) (3946F e 4370R) objetivava um fragmento de 425 pb do gene G de SVCV, enquanto os outros dois pares visavam amplificação de fragmentos internos e intermediários (Inner-I; e Middle-M, respectivamente) (Tabela 5).

Tabela 5. *Primers* desenhados e sintetizados para detecção do gene G de SVCV, contendo sequência de nucleotídeos no senso positivo, tamanho dos oligonucleotídeos e nomenclatura.

Primers	**Tamanho** (nt)	**Sequência** (+)	**Nomenclatura**
3946-F	24	GGATTAGACTTGATTGACACAGTC	Outer F
4004-F	25	GTGAAGGGACTAAAAGGAAAATCAA	Middle F
4121-F	27	TAGAGAGAGGGAGCACTACTTATATCA	Inner F
4290-R	23	AAAGGGAAAGATGGGAAGATCCA	Inner R
4336-R	23	GATAGAATCAGGAATCATAGATG	Middle R
4370-R	24	ACATGCTTTCCAAGCCGATATTAT	Outer R

4.4.2. Clonagem do fragmento sintético para estoque

Após verificação da viabilidade do controle por meio de PCR objetivando um fragmento de 425 pb do gene G de SVCV, foi realizada a clonagem do controle positivo, utilizando-se vetor pGEM-T® (Promega, EUA) (Figura 13). Após visualização de colônias contendo o inserto, utilizando protocolo com X-Gal (20mg de XGal/1mL de dimetilformamida) e IPTG (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside) (0,8M), um total de 17 colônias foram identificadas, das quais uma foi escolhida (clone 7) para utilizar durante a otimização das PCRs.

O produto das reações de ligação entre o vetor e o fragmento do PCR foi transformado por eletroporação em bactérias *Escherichia coli* DH10-β. As colônias selecionadas foram então incubadas *overnight* em caldo LB (*Luria Bertani*) (Gibco, EUA), para crescimento (BERTANI, 2004). Esse material foi posteriormente centrifugado e o sedimento resultante foi submetido a extração plasmidial (Miniprep), utilizando kit da Macherey Nagel®. A entrada do inserto de interesse no vetor pGEM-T® (Promega, EUA) foi confirmada por PCR com os *primers* M13F/M13R.

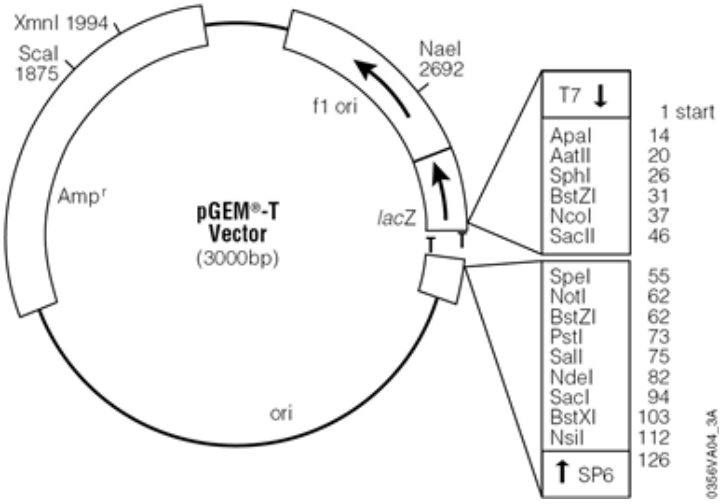

Figura 13. Mapa do vetor pGEM-T®.

Todos os clones foram quantificados utilizando NanoDrop (Thermo Fisher, EUA) e, baseado na concentração (ng/µL) e leitura de absorbância a 260/280, foi escolhido o clone 7, por apresentar maior grau de pureza (1,85). Em seguida, foi realizada eletroforese do produto de PCR do clone, usando os *primers* M13 (10 mM). Após visualização do clone em gel de agarose (1,5%), foi realizada a purificação, a partir do produto de PCR, utlizando o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, EUA). Em seguida, foi realizado o sequenciamento nucleotídico.

4.4.3. Sequenciamento do clone

A partir da quantificação do produto de PCR (66 ng/µL) e da observação de sua intensidade no gel de agarose, foi determinada a quantidade de produto a ser utilizada na reação de sequenciamento bidirecional (*primers* em sentido senso e antissenso). O kit de sequenciamento utilizado foi o BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction (Life Technologies, EUA). Na reação, foram colocados os seguintes reagentes em tubos Eppendorf de 0,2 mL: 11,2 µL de H_2O DEPC (Promega, EUA); 4,0 µL de Ready React Mix (BigDye™ Terminator v3.1); 2,0 µL de Big Dye™ Sequencing Buffer; 1,6 µL (10pmol/µL) de *primer*; e 1,2 µL (10 ng) de DNA, para um total de 20 µL por reação. Foram preparados 4 tubos, para cada *primer*: M13F; M13R; 3946F; e 4370R. Após o sequenciamento do clone, foi observado que o produto tinha 709 pb (inserto e plasmídeo).

O cálculo do número de cópias de plásmídeo por µL foi determinado conforme a fórmula expressa na Figura 14, associado a um software online (URI Genomics & Sequencing

Center). A partir desse cálculo, foi possível saber a quantidade de moléculas ou cópias de vírus que havia por µL de reação. A partir do cálculo abaixo, pudemos confirmar que, em nosso controle, havia $8{,}62 \times 10^{10}$ moléculas de nosso fragmento/µL de reação.

$$\text{Nº de moléculas} = \frac{\text{massa da amostra [quantificação espectrofotométrica (g)} \times 6{,}02.10^{23}]}{\text{massa do clone [massa de 1 mol do total de pb (g)]}}$$

Figura 14. Cálculo do número de moléculas do clone, por reação.

4.4.4. Determinação do limite de detecção do controle

Para otimizar a reação de PCR, inicialmente foram feitas diluições do controle em água livre de RNAses. A partir do tubo Eppendorf contendo o clone 7, foram pipetados 5,0 µL e então colocados em outro tubo contendo 45,0 µL de água DEPC, obtendo-se uma diluição de 10^{-1}, a partir da qual procedeu-se a diluição serial de base 10 até a diluição 10^{-15}. A partir destas diluições, foram realizadas PCRs para SVCV (PCR e *nested*PCR), seguidas por eletroforeses para observar o limite de detecção do fragmento clonado.

Primeiramente, foi realizada a PCR utilizando-se *primers* com o objetivo de se amplificar 425 pb do gene G de SVCV (externos). Cada tubo foi numerado quanto ao número de diluição do controle, data e *primers* utilizados. Em cada tubo de 0,2 mL foram colocados os seguintes reagentes: 8,5 µL de H_2O DEPC; 1,0 µL (10 µM) de 3946F; 1,0 µL (10 µM) de 4370R; 12,5 µL de GoTaq® Colorless MasterMix 2X (Promega, EUA); 1,25 µL de dimetilsulfóxido - DMSO (0,1%) e 1,0 µL (< 250 ng) de DNA. A PCR seguiu as condições descritas, a seguir, em "1º *round* de PCR" ou PCR1 (item 4.5.2).

Depois de realizada a primeira PCR, usando *primers* externos que objetivaram a amplificação de um fragmento de 425 pb do gene G de SVCV, foi realizada a segunda PCR, ou *nested*PCR, para amplificação de fragmento interno de 170 pb do gene G (combinação de *primers* internos I-I, descrito posteriormente, em 4.4.6.). A reação de *nested*PCR foi realizada utilizando-se 1,0 µL de produto da primeira PCR, colocado num tubo Eppendorf, contendo os mesmos reagentes (exceto o DNA e *primers*) da primeira reação. Os *primers* utilizados nesta reação foram o 4121F e o 4290R, e ambos estavam na concentração de 10 µM. Esta segunda PCR seguiu as condições apresentadas no item 4.5.2, em "*nested*PCR".

Realizadas as duas PCRs (PCR1 e *nested*PCR) do controle, foram então visualizadas as amplificações através de eletroforese em gel de agarose a 1,5%.

4.4.5. *Spiking* de tecidos com o controle positivo

Posteriormente à padronização das diluições do controle, foi realizado experimento com inoculação proposital (*spiking*) de vírus em tecidos provenientes de um peixe sabidamente não infectado, denominado Peixe da Padronização (PP), adquirido de estabelecimento comercial (supermercado). O ensaio de *spiking* trata-se de um experimento importante na padronização do diagnóstico molecular, pois mimetiza as condições reais dos processos realizados na detecção viral em tecidos, desde a extração de ácidos nucleicos à amplificação do agente em ensaios de PCR. Com relação aos resultados obtidos, pode-se determinar a sensibilidade do ensaio através do limite de detecção do vírus.

A remoção dos órgãos (fígado e rim) do peixe foi realizada de maneira idêntica a dos peixes utilizados no estudo, com materiais cirúrgicos autoclavados e em ambiente estéril, além da extração de RNA e RT-PCR. Foram aliquotados 25 fragmentos, de aproximadamente 50 mg cada, de ambos os órgãos, sendo 10 fragmentos de rim e 15 de fígado, e colocados em tubos Eppendorf de 2,0 mL, contendo aproximadamente 750 µL de Trizol® e uma esférula metálica. Em seguida, foram colocados em equipamento para preparar macerados e homogeneizar tecidos (TissueLyser LT, Qiagen, EUA). A extração de RNA dos tecidos e a transcrição reversa seguiram protocolos iguais aos realizados nos peixes do estudo, descritos nos itens 4.2 e 4.3, respectivamente.

Após a RT, verificou-se primeiramente se a extração e a RT obtiveram êxito, através da realização de PCR visando amplificação de fragmento de actina de peixe (*fish actin*), seguindo o protocolo descrito no item 4.5.1.

Na sequência, foi feita a inoculação das diluições do controle positivo em preparações de cDNA no espécime de peixe utilizado para a padronização (PP). Do total de 25 fragmentos colhidos, foram utilizados 9 provenientes do rim do animal. Tubos de 0,2 mL foram identificados quanto ao número da amostra (1 a 9), à diluição inoculada e à reação de PCR (PCR1 ou *nested*PCR). Optou-se por se utilizar os pontos de diluições de 10^{-4} até 10^{-12}, para se evitar desperdício de controle e devido a intensidade da banda no gel do controle diluído.

Em cada tubo foram colocados os seguintes reagentes: 7,25 µL de H_2O DEPC (Promega, EUA); 1,0 µL (10 µM) de PF; 1,0 µL (10 µM) de PR; 12,5 µL de GoTaq® Master Mix 2X (Promega, EUA); 1,25 µL de DMSO (0,1%) e 1,0 µL de cDNA (< 250 ng) do PP com 1,0 µL de controle diluído, para um final de 25 µL de reação. Para as *nested*PCRs, os reagentes usados foram os mesmos, porém, utilizando-se 2,0 µL do produto proveniente da

primeira reação (volume final de 25 µL de reação). Em seguida, foram realizadas eletroforeses das PCRs dos ensaios de *spiking*.

4.4.6. Padronização dos *primers* utilizados nas PCRs

Com a confirmação da funcionalidade do controle positivo frente à PCR, foi realizada a padronização quanto à combinação de *primers* utilizados nas PCRs para detecção do vírus nas amostras, além da temperatura ideal de anelamento. Nesta etapa, foi utilizada a diluição de 10^{-10} do controle positivo, por ter sido o limite de detecção da primeira PCR.

Inicialmente, foram realizadas *nested*PCRs do controle positivo, utilizando diferentes combinações de *primers*. Os *primers* da PCR1 continuaram sendo 3496 FOR e 4370 REV (O-O). As combinações dos *primers* internos seguem na Tabela 6. As PCRs utilizando as combinações de *primers* da tabela resultavam em produtos de tamanhos diferentes. Quando realizada a PCR com *primers* M-I, o produto foi de 287 pb; com *primers* M-M, 333 pb; com *primers* I-I, 170 pb; e com *primers* I-M, 215 pb.

Tabela 6. Combinações de *primers* utilizados na *nested*PCR.

Primers	4290 REV (*Inner*-I)	4336 REV (*Middle*-M)
4004 FOR (*Middle*-M)	10^{-10}; 10^{-11}; 10^{-12} (M-I)	10^{-10}; 10^{-11}; 10^{-12} (M-M)
4121 FOR (*Inner*-I)	10^{-10}; 10^{-11}; 10^{-12} (I-I)	10^{-10}; 10^{-11}; 10^{-12} (I-M)

A partir das combinações indicadas na tabela acima, foram realizadas PCRs utilizando três diluições do controle positivo: 10^{-10}, 10^{-11} e 10^{-12}. Após as PCRs, foi feita eletroforese em gel de agarose (1,5%) para observar amplificação (Figura 15). Foi observada maior sensibilidade de detecção quando utilizada a combinação I-I, que permitiu detectar o controle até a diluição 10^{-12} (amplificação de 170 pb).

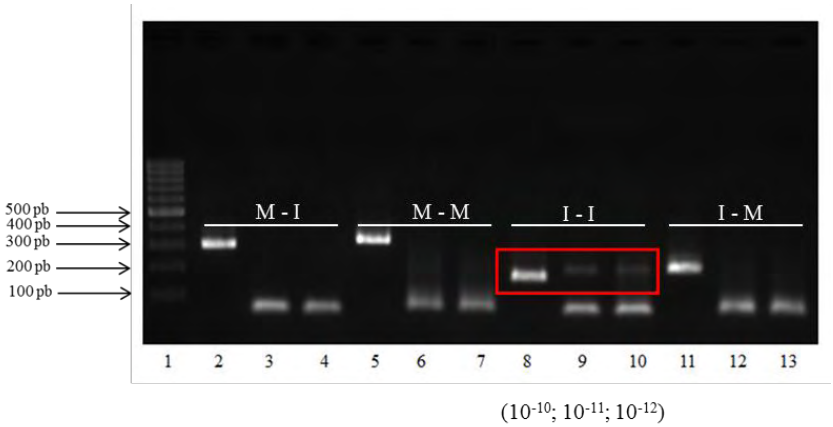

Figura 15. Gel de agarose de PCRs, utilizando combinações de *primers* exibidas na tabela 6. Canaleta 1: marcador de 100 pb (Thermo Fisher Scientific, EUA); canaletas 2 a 4: combinação M-I; canaletas 5 a 7: combinação M-M; canaletas 8 a 10: combinação I-I (retângulo vermelho); canaletas 11 a 13: combinação I-M.

Em seguida, foram testadas as diferentes temperaturas de anelamento da primeira reação de PCR (PCR1) e da *nested*PCR. Na PCR1, para cada temperatura estabelecida, foram preparados quatro (4) tubos de PCR, contendo os reagentes descritos no item 6.5.2, e 1,0 µL da diluição 10^{-10} do controle positivo. As temperaturas foram: 52, 54, 56, 58, 60 e 62ºC. Após as PCRs, foi feito gel de agarose 1,5% para visualização da amplificação (Figura 16). Observou-se melhor amplificação utilizando temperatura de anelamento a 58ºC. Desta forma, optou-se por utilizar a temperatura de 56ºC como de anelamento para a primeira PCR (PCR1). A temperatura inferior foi estabelecida para garantir a probabilidade de anelamento e geração de produto.

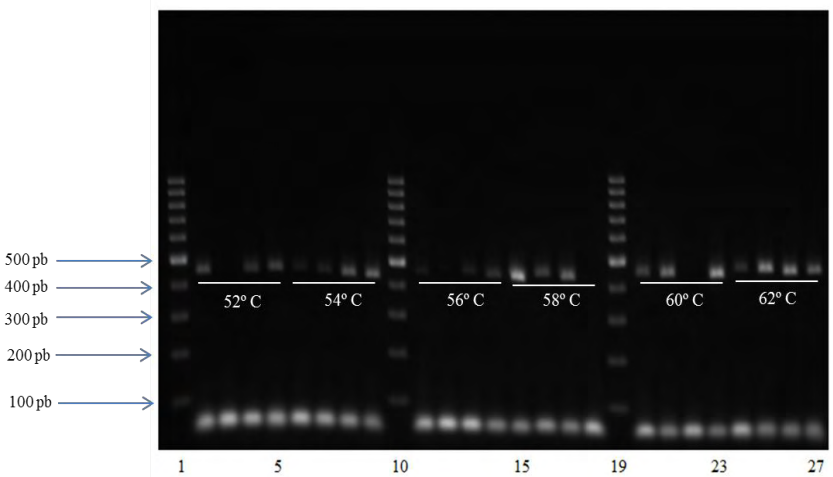

Figura 16. Gel de agarose de PCRs com *primers* externos, da diluição 10^{-10} do controle positivo, utilizando diferentes temperaturas de anelamento. Canaletas 1, 10 e 19: marcador de 100 pb (Thermo Fisher Scientific, EUA); canaletas 2-5: 52ºC; canaletas 6-9: 54ºC; canaletas 11-14: 56ºC; canaletas 15-18: 58ºC; canaletas 20-23: 60ºC; e canaletas 24-27: 62ºC.

Na padronização da temperatura de anelamento da *nested*PCR foram utilizados dois (2) tubos de PCR para cada temperatura estabelecida, contendo os reagentes descritos no item 6.5.2, e 1,0 µL da diluição 10^{-10} do controle positivo. As temperaturas foram: 54, 56, 58, 60 e 62ºC. Após as PCRs, foi feito gel de agarose 1,5% para visualização da amplificação (Figura 17). Observou-se amplificação idêntica de 54 a 60ºC e uma banda com intensidade inferior em 62ºC. Desta forma, como na PCR1, optou-se pela temperatura de 58ºC como temperatura de anelamento da *nested*PCR, e não de 60ºC, garantindo assim a sensibilidade do ensaio.

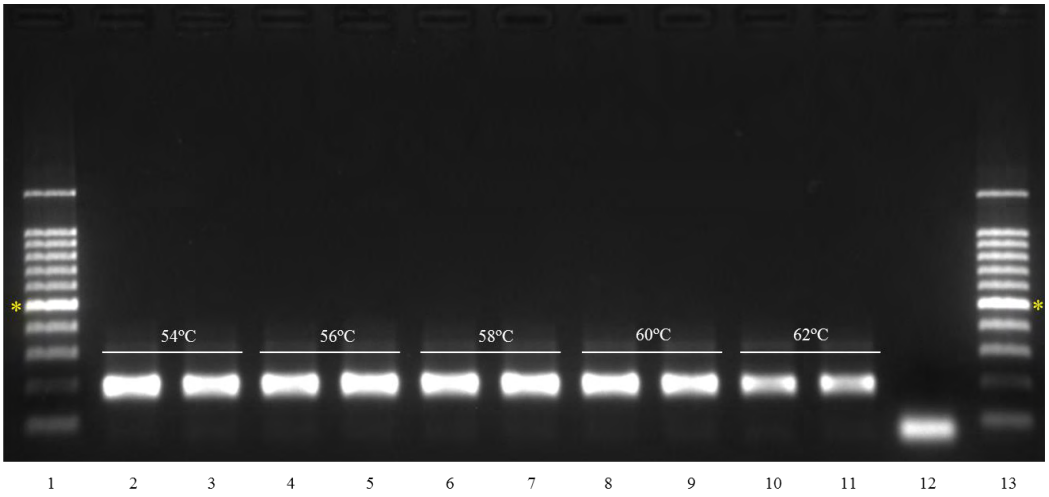

Figura 17. Gel de agarose (1,5%) de *nested*PCRs com *primers* da combinação I-I, da diluição 10^{-10} do controle positivo, utilizando diferentes temperaturas de anelamento. Canaletas 1 e 13: marcador de 100 pb (Thermo Fisher Scientific, EUA); canaletas 2 e 3: 54ºC; canaletas 4 e 5: 56ºC; canaletas 6 e 7: 58ºC; canaletas 8 e 9: 60ºC; canaletas 10 e 11: 62ºC; e canaleta 12: controle negativo da *nested*PCR. (Asteriscos amarelos – bandas de 500 pb do marcador).

A partir da padronização da combinação de *primers* e da temperatura de anelamento, foram determinadas as condições das PCRs a serem desenvolvidas no estudo.

4.5. Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)

4.5.1. Detecção do controle endógeno

A PCR do controle endógeno é de grande importância, pois prova que as etapas de extração e RT tiveram êxito, além de assegurar a funcionalidade dos reagentes da própria PCR. O ensaio seguiu protocolo semelhante ao das PCRs para SVCV, utilizando o mesmo kit (GoTaq® Colorless MasterMix 2X – Promega, EUA), porém, com outros parâmetros de temperatura e tempos de ciclagem no termociclador, além de *primers* (FishActin-For e FishActin-Rev) direcionados à amplificação de fragmento de 139 pb do gene da actina de

peixe (Tabela 7). Tubos Eppendorf de 0,2 µL foram identificados quanto à data e amostra, colocando-se os seguintes reagentes: 8,25 µL de H_2O DEPC (Promega, EUA); 1,0 µL (10 µM) de *primer* FishActin-For; 1,0 µL (10 µM) de *primer* FishActin-Rev; 12,5 µL de GoTaq® MasterMix 2X (Promega, EUA); 1,25 µL de DMSO (0,1%); e 1,0 µL (< 250 ng) de cDNA de amostra, para um final de 25 µL de reação de PCR. As condições de ciclagem desta PCR foram: 95ºC/2 min; 30 ciclos a 95ºC/30 seg, 55ºC/30 seg, e 72ºC/15 seg; 72ºC/5 min; e 4ºC/∞. Após identificação de amplificação por eletroforese utilizando esses *primers*, foram realizadas as próximas etapas da detecção do SVCV.

Tabela 7. *Primers* de actina de peixe utilizados na detecção do controle endógeno.

Primers	Tamanho (nt)	Sequência	Produto
FishActin-For	20	GGAGAAGATCTGGCATCACA	139 pb
FishActin-Rev	21	GTTGAAGGTCTCGAACATGAT	

4.5.2 Detecção de SVCV

Com a padronização do controle positivo e verificação de amplificação do controle endógeno, iniciou-se a detecção do vírus nas amostras. A PCR e a *nested*PCR das amostras foram realizadas utilizando o protocolo GoTaq® Colorless Master Mix (Promega, EUA), como na PCR do controle endógeno. Os *primers* das PCRs objetivaram amplificação de fragmentos de 425 pb (PCR1, ou, Outer-Outer) e de 170 pb (*nested*PCR, ou Inner-Inner) (Tabela 5), respectivamente, do gene G de SVCV. Como controles negativo e positivo, foram utilizados, respectivamente, água livre de nucleases e a diluição 10^{-10} do fragmento sintético de 489 pb do gene G do vírus.

Em cada tubo Eppendorf de 0,2 mL, foram adicionados os seguintes reagentes, de PCR, com volume final de 25,0 µL: 8,25 µL de H_2O DEPC (Promega, EUA); 1,0 µL de PF (10 µM); 1,0 µL de PR (10 µM); 12,5 µL de GoTaq® MasterMix 2X (Promega, EUA); 1,25 µL de DMSO (0,1%); 1,0 µL de cDNA ou água (controle negativo).

A amplificação de cDNA foi realizada sob as seguintes condições, em termociclador:

- 1º round de PCR (PCR1 ou O-O): desnaturação a 95ºC por 2 min; 45 ciclos de desnaturação, anelamento e extensão a 94ºC/40 seg, 56ºC/40 seg, e 72ºC/40 seg, respectivamente; extensão final de 72ºC por 5 min; e 4ºC/∞.
- *nested*PCR (I-I): desnaturação inicial a 95ºC por 2 min; 45 ciclos de amplificação a 94ºC/40 seg, 58ºC/40 seg, 72ºC/40 seg; 72ºC/5 min; 4ºC/∞.

Os amplicons obtidos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (1,5%) em tampão Tris-Acetato/EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) (TAE 1X), incluindo-se marcador (*ladder*) de tamanho molecular 100 pb (GE Healthcare, EUA). Posteriormente, os géis foram corados em solução de SYBR® Gold nucleic acid gel stain (Life Technologies, EUA), e observados à luz UV, utilizando-se sistema de fotodocumentação L-Pix ST e *software* L-Pix Image (Loccus Biotecnologia, Brasil). Além desta forma de observação de amplificação em gel de agarose à luz UV, alguns géis foram corados com SYBR® Gold (Invitrogen, EUA) (corante aplicado juntamente com a amostra) e visualizados utilizando sistema de fotodocumentação (Alpha Imager® EC – Muilti Image™ Light Cabinet, acoplada a câmera Alpha Innotech e impressora térmica de géis Mitsubishi P91D).

Todos os procedimentos que envolveram a amplificação de DNA foram submetidos a rígidos procedimentos para evitar contaminação, incluindo a realização de controles negativos, e acréscimo de DNA realizado em sala diferente da utilizada para a preparação das misturas das reações. Após visualização de amplificação de amostras por sistema fotodocumentador, foi observado se o amplicon era único, ou se havia múltiplas amplificações. Se fosse somente uma banda, o produto da PCR era purificado direto do tubo de PCR. Caso aparecessem múltiplas bandas, era realizada uma nova PCR com volume final de 50 µL por reação, feita nova eletroforese, e as bandas localizadas na altura desejada eram excisadas do gel, para sequenciamento posterior.

4.6. Sequenciamento Nucleotídico

As bandas de tamanho esperado foram excisadas de gel de agarose e purificadas com a utilização do kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, EUA), segundo instruções do fabricante, ou purificadas direto do produto da PCR. Este sistema baseia-se na habilidade do DNA se ligar a membranas de sílica. Após a eletroforese, a banda de altura esperada é excisada e dissolvida na presença de uma solução de guanidina isotiocianato. Alternativamente, após amplificação, uma alíquota da PCR é adicionada a esta solução e

purificada diretamente. O DNA pode ser isolado por microcentrifugação, que força o fragmento de gel ou o produto de PCR através de uma membrana enquanto liga simultaneamente o DNA à superfície da sílica. Após a lavagem do fragmento isolado de DNA ou produto de PCR, o DNA é eludo em água.

As reações de sequenciamento (duas por amostra - *primers* senso e antissenso) foram realizadas com a utilização do BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Life Technologies, EUA), pelo método de Sanger, de acordo com as especificações do fabricante. Nas reações, foram colocados os seguintes reagentes em tubos Eppendorf de 0,2 mL, para um total de 10 µL por reação: 2,0 µL de Ready React Mix; 2,0 µL de Big Dye® Sequencing Buffer; 1,0 µL de *primer* (10 pmol/µL); e volumes de DNA (1,0 - 3,0 µL) e H_2O variáveis, dependendo da concentração de DNA e intensidade em gel de agarose. Após o preparo das reações de BigDye®, os mesmos foram colocados em termociclador (Eppendorf Mastercycler – Nexus, ou Applied Biosystems Thermal Cycler – Veriti) com as seguintes condições de ciclagem: 96ºC/1 min; 35 ciclos de 96ºC/15 seg, 50ºC/15 seg, e 60ºC/4 min; e 4ºC/∞. Após retirar as amostras do termociclador, os mesmos foram submetidos à precipitação manual do DNA e submetidos ao sequenciamento.

4.7. Análise Filogenética

A busca de similaridade das sequências 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 sequências nucleotídicas obtidas, juntamente com outras depositadas no GenBank foram realizadas com o programa ClustalW versão 1.4 (THOMPSON et al., 1994), implementado no programa BioEdit Sequence Alignment Editor versão 7.0.9 (HALL et al., 1999), utilizando-se, para tanto, dos parâmetros em '*default*'. Matrizes de distâncias, dadas em porcentagens de similaridade/identidade, entre as sequências nucleotídicas foram calculadas através do programa MatGAT versão 2.0 (CAMPANELLA et al., 2003), utilizando algoritmo de alinhamento global. A visualização do alinhamento foi realizada através do programa Jalview versão 2.8.1 (WATERHOUSE et al., 2009). Reconstrução filogenética para sequências de 170 nucleotídeos, relativas ao gene G, foram realizadas através do método Neighbor-Joining (NJ), utilizando-se para tanto dos modelos de substituição distância P *(P distance*) com suporte nodal de *bootstrap* para 1000 pseudo-réplicas através do programa MEGA 6.0 (KUMAR et al., 1994). Para a reconstrução foram

utilizadas outras sequências de SVCV depositadas no GenBank, conforme indicado no cladograma no item 5.6. de RESULTADOS.

5. RESULTADOS

5.1. Caracterização dos animais do presente estudo

Os peixes utilizados no presente estudo foram caracterizados quanto à sua espécie e se foram observados sinais clínicos macroscópicos no momento de sua coleta e/ou eutanásia. Os nomes comuns dos animais e de suas espécies respectivas estão representados na Tabela 8, abaixo, além da quantidade de cada espécie coletada e a relação do número de animais sintomáticos e assintomáticos. Além desta forma de caracterização, realizou-se um gráfico que mostra o número de animais coletados por estado, apresentando sinais clínicos ou não (Figura 18). O número total de animais sintomáticos foi 90, enquanto os assintomáticos foram 216. Em São Paulo, 71 animais apresentavam alguma sintomatologia, enquanto 149 não apresentavam sintomas macroscópicos visíveis. No Ceará observou-se 7 animais sintomáticos, enquanto 59 não apresentavam sinais clínicos. Todos os animais coletados em Minas Gerais apresentavam sintomatologia, enquanto nenhum dos animais coletados, tanto na Bahia ou no Rio de Janeiro, apresentava algum sinal clínico específico.

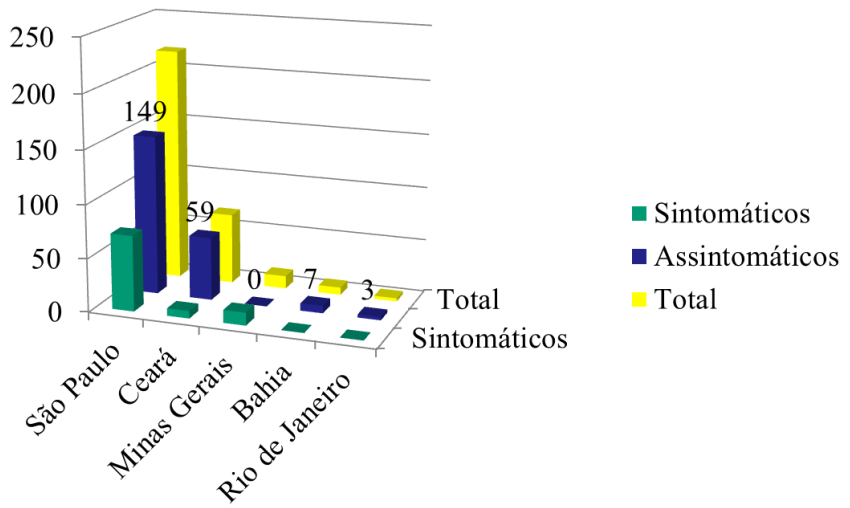

Figura 18. Quantidade de animais coletados por Estado, relacionado à presença ou ausência de sinais clínicos.

Tabela 8. Caracterização de animais quanto à espécie e presença ou ausência de sintomatologia específica.

Nome comum	Espécie	Quant.	Sintom	Assintom
Acará	*Geophagus brasiliensis*	12	01	11
Bagre	*Siluriformes spp*	02	00	02
Bijubirá	*Rachycentron canadum*	01	01	00
Caborja	*Hoplosternum littorale*	01	00	01
Carpa comum	*Cyprinus carpio*	02	02	00
Carpa cabeçuda	*Cyprinus carpio*	01	01	00
Carpa colorida	*Cyprinus carpio*	09	04	05
Cascudo comum	*Hypostomus plecostomus*	02	02	00
Carpa de aquário	*Cyprinus carpio*	03	03	00
Catfish	*Siluriformes spp*	08	04	04
Curimba	*Prochilodus spp*	31	00	31
Dourado	*Salminus brazilienses*	03	00	03
Lambari	*Astyanax spp*	17	00	17
Mandi	*Pimelodus maculatus*	01	00	01
Matrinxã	*Brycon amazonicus*	07	01	06
Pacú comum	*Mylossoma spp*	25	20	05
Piapara	*Leporinus elongatus*	01	00	01
Piavuçu	*Leporinus macrocephalus*	08	00	08
Pintado	*Pseudoplatystoma corruscans*	05	05	00
Piracanjuba	*Triurobrycon lundii*	14	09	05
Pirapatinga	*Piaractus brachypomus*	11	00	11
Piraputanga	*Brycon hilarii*	02	00	02
Pirarara	*Phractocephalus hemioliopterus*	01	01	00
Surubim do P. S.	*Steindachneridion parahybae*	06	06	00
Tilápia do Nilo	*Oreochromis niloticus*	121	18	103
Truta	*Salmoniformes spp*	12	12	00
		306	**90**	**216**

5.2. Padronização da RT-PCR

5.2.1. Confirmação de amplificação do controle positivo

Inicialmente, foi realizada PCR com os *primers* externos utilizados na PCR1 de SVCV, que amplificavam um fragmento de 425 pb do gene G do vírus, para se comprovar a viabilidade do controle positivo. Após a reação, foi feita a eletroforese em gel de agarose (1,5%) do produto e sua visualização (Figura 19A). Observou-se amplificação do controle, na altura esperada de 425 pb (seta vermelha).

5.2.2. Clonagem do fragmento sintético e escolha do clone

Posteriormente, foi realizada a clonagem em vetor pGEM-T do produto de PCR. Após a clonagem, realizou-se PCR com *primers* dirigidos à sequência de M13 do plasmídeo, a partir de 17 colônias selecionadas. Somente uma (figura 19B) das dezessete colônias (1/17) não apresentou amplificação (seta vermelha).

O clone 7 foi escolhido (retângulo vermelho) para ser usado na otimização da PCR (Figura 19B), pois sua quantificação em espectrofotômetro mostrou maior grau de pureza (1,85). Assim, foi realizada uma PCR com *primers* para M13 e eletroforese do clone para obter material para o sequenciamento.

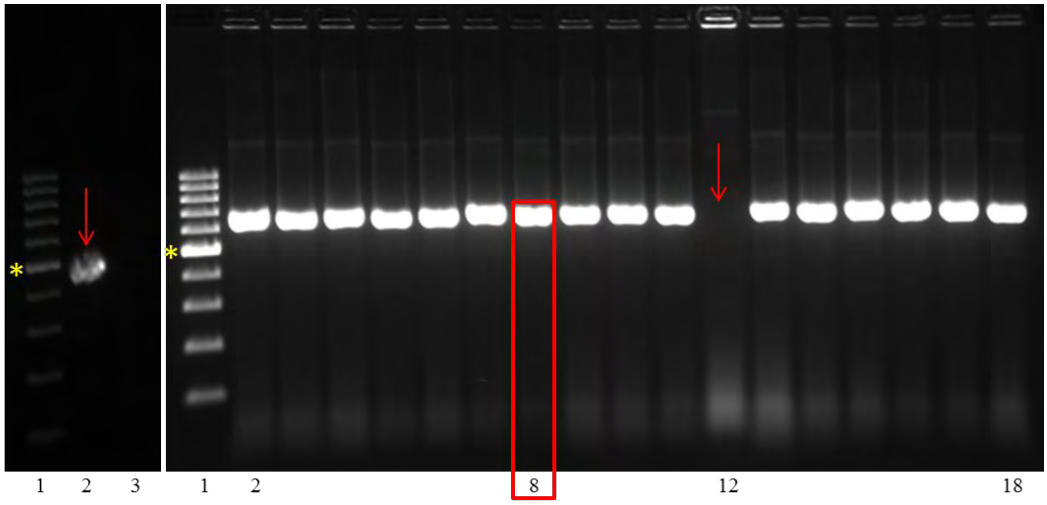

Figura 19. Géis de agarose (1,5%). (**A**) PCR1 do controle positivo. Canaleta 1: marcador de 100 pb (Thermo Fisher Scientific, EUA); canaleta 2: controle positivo; canaleta 3: controle negativo; (**B**) PCR com *primers* para M13 de colônias selecionadas após clonagem do controle positivo em pGEM-T (Promega, EUA). Canaleta 1: marcador de 100 pb; canaletas 2 a 18: colônias selecionadas. (Asterisco amarelo - banda 500 pb do marcador).

5.2.3. Sequenciamento do fragmento clonado

Após visualizar a amplificação no gel de PCR a partir do clone 7 (Figura 19B), foi realizada a purificação da banda e sequenciamento do produto da PCR do mesmo. Utilizando BioEdit 7.0.9 e BLAST, o controle positivo apresentou 100% de identidade com gene G de SVCV (BJORKLUND et al., 1996) (Figura 20A). Observou-se que o controle positivo obteve 100% de identidade quando comparado à sequência de referência depositada por Bjorklund e colaboradores, cujo n^{o} de acesso é U18101.2 (1996) (Figura 20B).

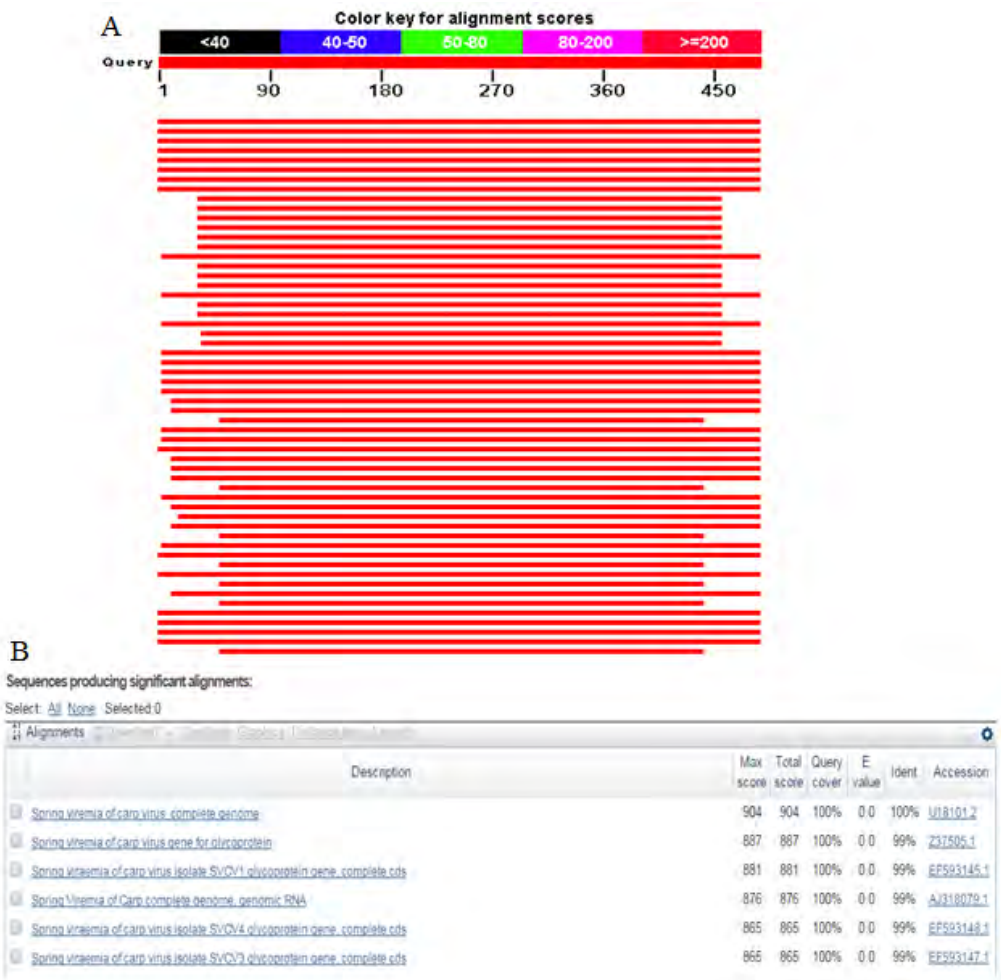

Figura 20. (**A**) Distribuição das 100 concordâncias (*matches*) no BLAST quando comparadas com a sequência consultada; (**B**) primeiras seis sequências com alinhamentos significantes.

5.2.4. Limite de detecção das PCRs

A partir da fórmula descrita no item 4.4.3, foi possível saber que o controle positivo inicial continha 8,62 × 10^{10} moléculas/µL. Para continuar a otimização das PCRs, foi necessário identificar o limite de detecção da primeira PCR (O-O) e da *nested*PCR (I-I), com o uso de diluições seriadas do controle. Primeiramente, foi realizado o ensaio usando *primers* externos (O-O), para gerar o fragmento de 425 pb do gene G de SVCV (Figura 21). Observa-se que foi possível a detecção do controle até na décima diluição (10^{-10}).

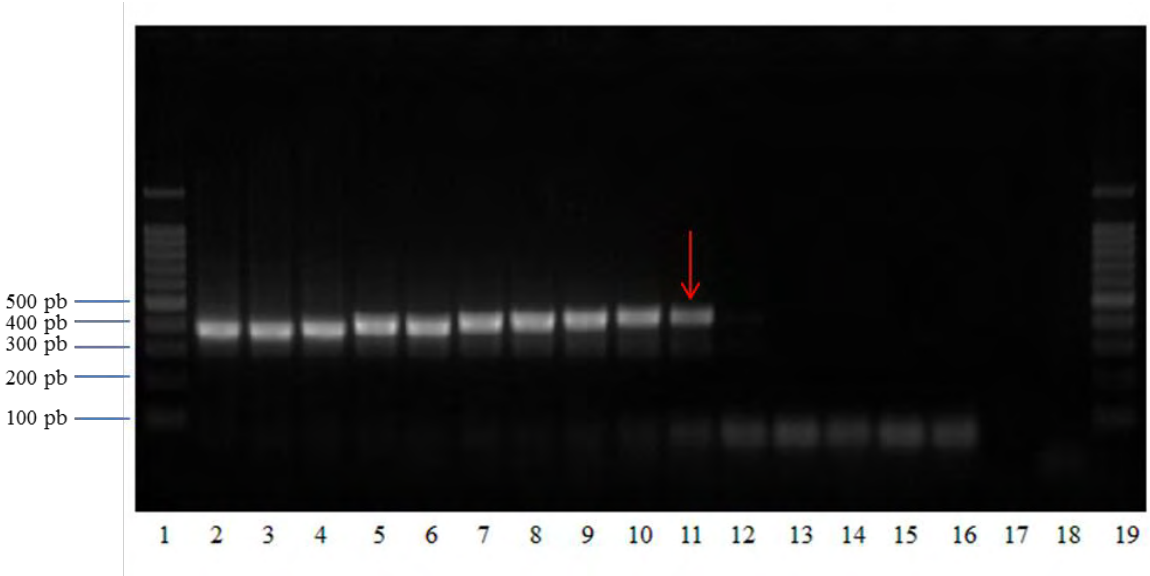

Figura 21. Gel de agarose de PCR1 de diluições seriadas do controle positivo. Canaletas 1 e 19: marcador de 100 pb (Thermo Fisher Scientific, EUA); canaletas 2-16: diluições seriadas do controle, desde 10^{-1}, até 10^{-15}; canaleta 17: controle negativo; canaleta 18: espaço.

Após identificar-se o limite de detecção das diluições do controle na primeira PCR, foi realizada a *nested*PCR (I-I), utilizando *primers* internos, objetivando amplificação de fragmento do gene G de SVCV de 170 pb (Figura 22). Observou-se amplificação até a décima segunda diluição (10^{-12}) (seta vermelha).

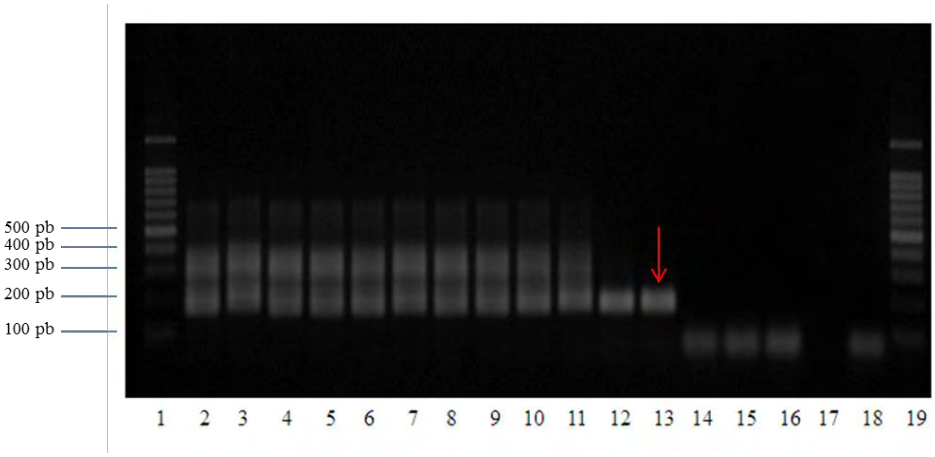

Figura 22. Gel de agarose 1,5% da *nested*PCR de diluições seriadas do controle positivo. Canaletas 1 e 19: marcador de 100 pb (Thermo Fisher Scientific, EUA); canaletas 2-16: diluições seriadas do controle, desde 10^{-1}, até 10^{-15}; canaleta 18: controle negativo da *nested*PCR.

Observa-se no gel ilustrado na Figura 22 que foi possível se detectar o controle positivo até a diluição 10^{-12}. Isto significa que com o ensaio utilizado, foram detectadas $8{,}62 \times 10^{0}$ moléculas do controle/µL de reação quando realizada a PCR1, e $8{,}62 \times 10^{-2}$ moléculas/µL de reação, quando realizada a *nested*PCR.

5.2.5. *Spiking* de tecidos com o controle positivo

Inicialmente, foi realizada uma PCR com *primers* direcionados à amplificação de fragmento de 139 pb do gene da actina de peixe para mostrar que a extração de RNA e a RT dos tecidos do peixe da padronização (PP) tiveram êxito. Após a reação, foi feita uma eletroforese em gel de agarose 1,5% para observar amplificação (Figura 23A).

Posteriormente à confirmação da funcionalidade da extração de RNA e de RT, foi realizada a inoculação de diluições do controle positivo em tecidos colhidos do PP. Diluições seriadas de 10^{-4} a 10^{-12} foram inoculadas em nove tubos contendo cDNAs do PP, provenientes do rim do animal. Em seguida, foi realizada uma PCR usando *primers* externos (O-O) de SVCV e eletroforese objetivando amplificação de fragmentos de 425 pb (Figura 23B). Observou-se a detecção do controle até a décima diluição (10^{-10}), demonstrado por seta vermelha.

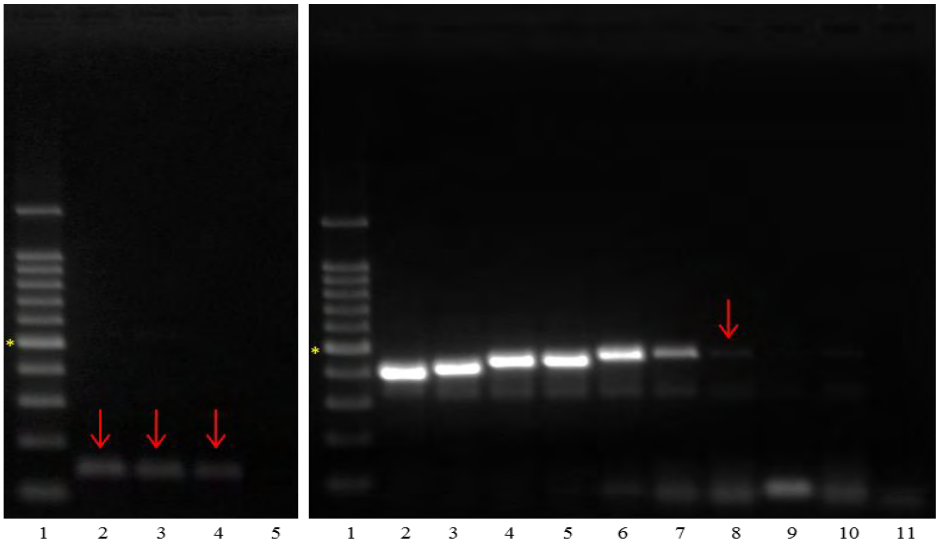

Figura 23. Géis de agarose (1,5%). (**A**) PCR de três fragmentos de rim do PP, com *primers* para actina de peixe. Canaleta 1: marcador de 100 pb (Thermo Fisher Scientific, EUA); canaletas 2-4: amostras de rim de PP (setas vermelhas); canaleta 5: controle negativo. (**B**) PCR1 de *spiking* de amostras de rim do PP com diluições do controle positivo. Canaleta 1: marcador de 100 pb; canaletas 2 a 10: tecidos do PP contendo diluições seriadas do controle (10^{-4} a 10^{-12}); canaleta 11: controle negativo da PCR1. (Asterisco amarelo - banda de 500 pb do marcador).

Com a visualização da amplificação dos tecidos submetidos ao experimento de *spiking* (Figura 23B), foi então realizada a *nested*PCR, utilizando *primers* objetivando a amplificação de fragmento interno ao amplificado pela primeira PCR, seguida de eletroforese em gel de agarose (1,5%). Observou-se que houve amplificação intensa das diluições do controle positivo na *nested*PCR. Por isso, decidiu-se realizar uma nova reação utilizando diluições até 10^{-14}. Desta forma, foram pipetados novamente 1,0 µL dos produtos da PCR1 em tubos contendo os reagentes da *nested*PCR e colocados em termociclador. Em seguida, foi realizada nova eletroforese em gel de agarose a 1,5% (Figura 24). Foi observada amplificação da *nested*PCR do tecido submetido a *spiking* com a décima segunda diluição (10^{-12}) do controle positivo (seta vermelha).

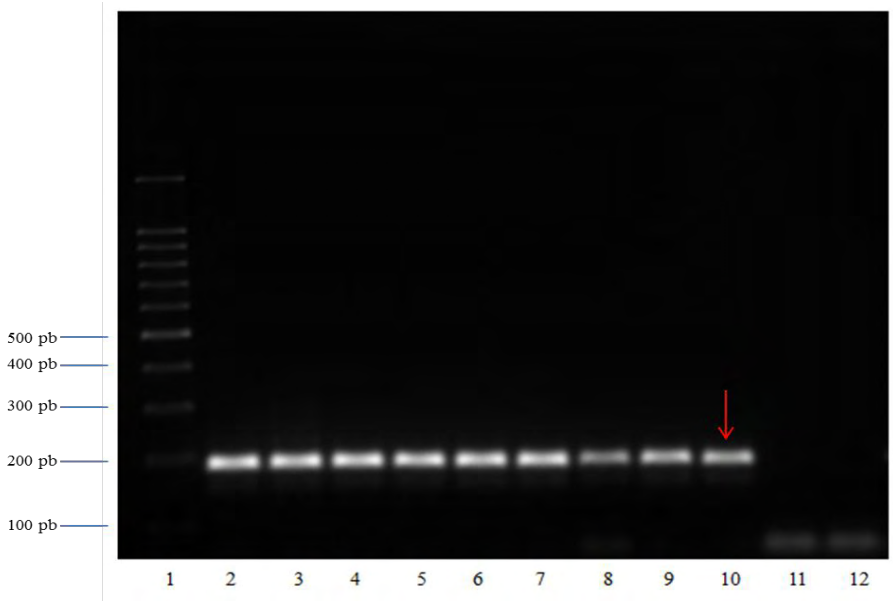

Figura 24. Gel de agarose de *nested*PCR de amostras do PP após *spiking*. Canaleta 1: marcador de 100 pb (Thermo Fisher Scientific, EUA); canaletas 2 a 12: tecidos do PP contendo diluições do controle positivo a partir de 10^{-4} até 10^{-14}.

Portanto, de acordo com os resultados das duas PCRs, foi possível se detectar o controle positivo na décima diluição (10^{-10}) após a primeira PCR, e na décima segunda (10^{-12}), quando submetido à *nested*PCR. Além disso, foi possível detectá-lo nas mesmas diluições, quando inoculado em tecidos do PP, em ambas as PCRs.

5.3. Detecção do controle endógeno

Após as PCRs feitas com *primers* objetivando a sequência de 139 pb da actina de peixe, foram realizadas eletroforeses de géis de agarose das amostras testadas, e sua visualização em sistema fotodocumentador. As figuras abaixo mostram a amplificação de produto de PCR de peso molecular esperado em alguns tecidos de peixes, após PCR para o controle endógeno (Figura 25). Somente uma amostra do total não apresentou amplificação do controle endógeno.

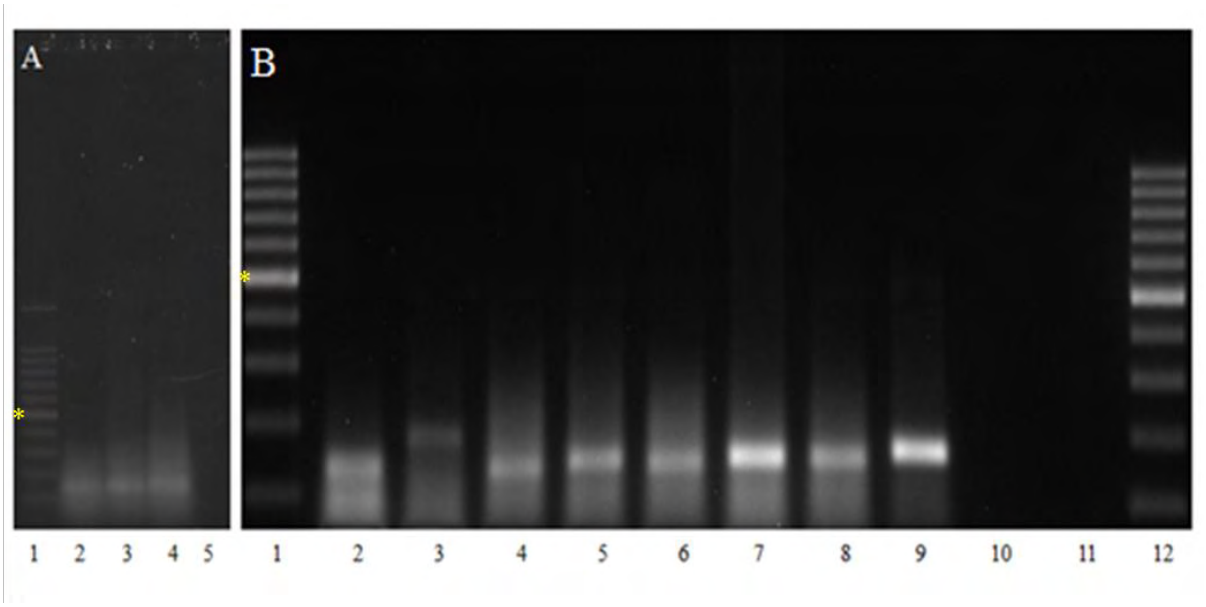

Figura 25. Géis de agarose (1,5%) de PCRs para o controle endógeno, em amostras de peixes coletados. (**A**) Canaleta 1: marcador de 100 pb (Thermo Fisher Scientific, EUA); canaletas 2-4: amostras de 44P, 63P e 73P; canaleta 5: controle negativo da PCR. (**B**) Canaleta 1 e 12: marcador de 100 pb; canaletas 2-9: amostras 21P, 23P, 24P, 26P, 31P, 33P, 37P e 121P de peixes testados; canaleta 10: controle negativo da RT; canaleta 11: controle negativo da PCR. Observa-se amplificação de todas as amostras com altura esperada de 139 pb. (Asterisco amarelo – banda de 500 pb do marcador).

5.4. Detecção do vírus SVCV

Com a padronização do controle, o estabelecimento das condições das PCRs a serem desenvolvidas no presente estudo e a confirmação de amplificação do gene da actina de peixe, foi iniciada a prospecção do vírus nas amostras de peixes coletadas.

Após as PCRs visando um amplicon de 425 pb, do gene G de SVCV, foram realizadas eletroforeses de géis de agarose a 1,5% visualizados em equipamento fotodocumentador (Alpha Imager®). A seguir, estão imagens ilustrativas de dois géis mostrando a primeira PCR de 70 *pools* de amostras de peixes testadas, além do controle positivo (Figura 26). Observou-se a amplificação dos controles positivos em ambos os géis, mas não das amostras.

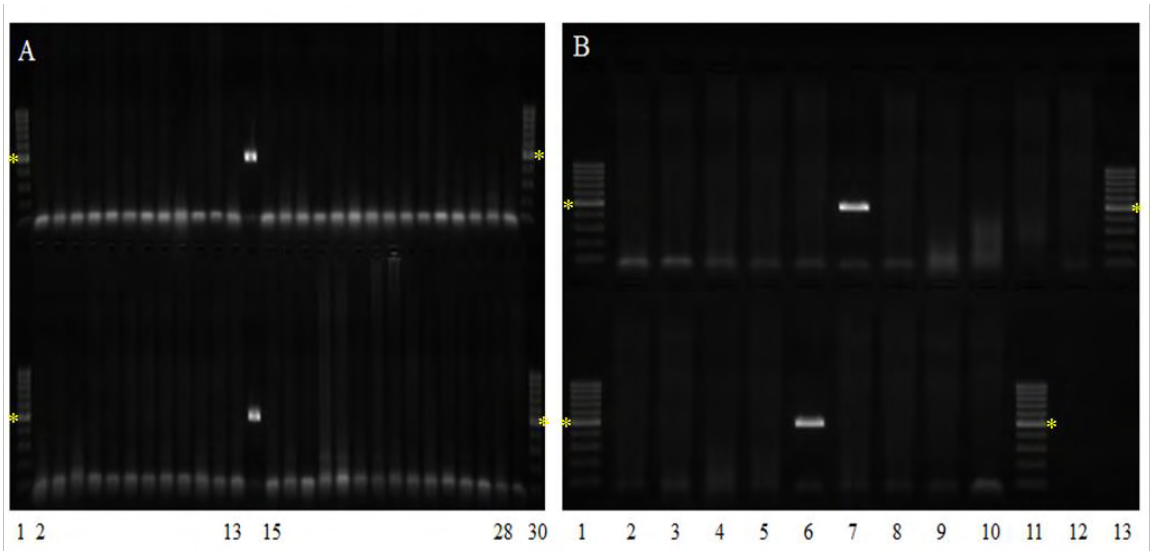

Figura 26. Géis de agarose (1,5%) da primeira PCR em *pools* de amostras testados. (**A**) Canaletas 1 e 30 (acima e abaixo): marcador de 100 pb (Thermo Fisher Scientific, EUA); canaleta 14 (acima e abaixo): diluição 10^{-10} do controle positivo; canaletas 2-13 e 15-29 (acima): *pools* de amostras testadas ; canaletas 2-13 e 15-28 (abaixo): *pools* de amostras testadas; canaleta 29 (abaixo): controle negativo da PCR1. (**B**) Canaletas 1 e 13 (acima) e canaletas 1 e 11 (abaixo): marcador de 100 pb; canaletas 7 (acima) e 6 (abaixo): diluição 10^{-10} do controle positivo; canaletas 2-6 e 8-12 (acima) e canaletas 2-5 e 7-9 (abaixo): *pools* de amostras testadas; canaleta 10 (abaixo): controle negativo da PCR1. (Asteriscos amarelos – banda de 500 pb do marcador).

As PCRs, utilizando *primers* externos, foram realizadas em 150 *pools* de tecido de 146 peixes diferentes. No entanto, nenhuma amostra apresentou amplificação na primeira reação de PCR. Foram então realizadas as *nested*PCRs de todas as amostras. A seguir, géis de agarose a 1,5% ilustram os resultados de 91 amostras de peixes testadas (Figuras 27-29). Houve degradação visível na décima diluição (10^{-10}) do controle positivo nas Figuras 27 (canaleta 13, abaixo) e 29 (canaleta 13). No entanto, foi observada amplificação de duas das amostras de peixes testadas (183P e 302P) (apresentadas em retângulos vermelhos). Os peixes que apresentaram amplificação nos géis são um lambari (*Astyanax bimaculatus*), proveniente de São Paulo, e uma tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), proveniente do Ceará. Ambos foram retirados de pisciculturas, e ambos eram assintomáticos.

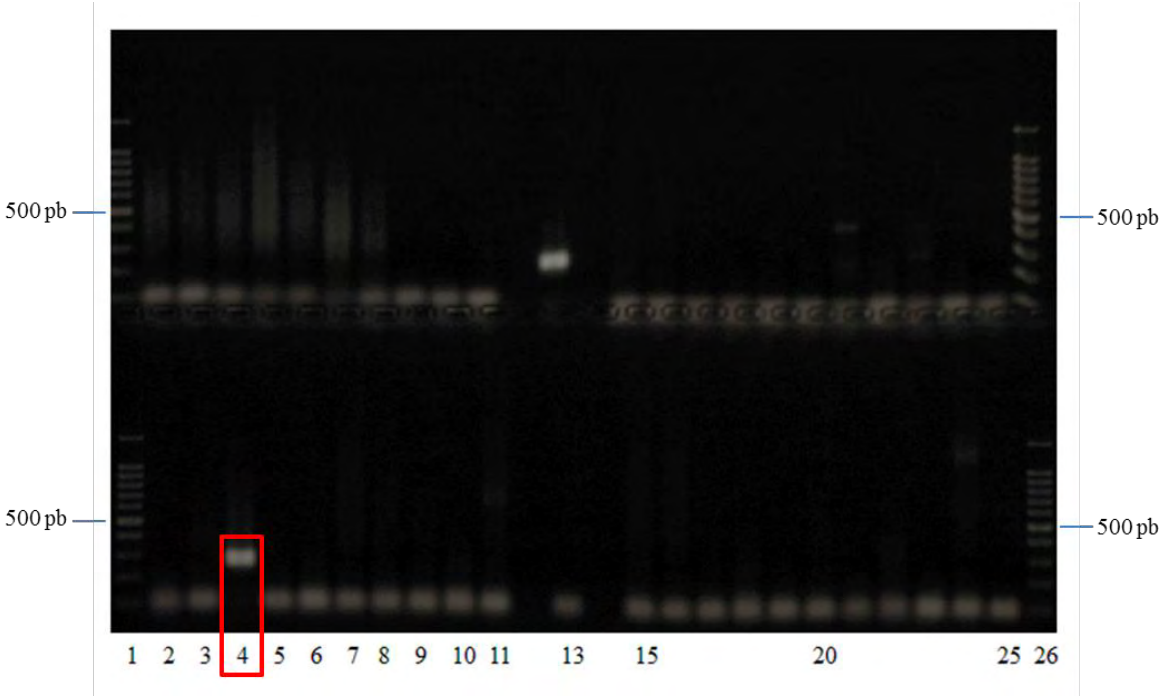

Figura 27. Gel de *nested*PCR realizada em 41 amostras. Canaletas 1 e 26 (acima e abaixo): marcador de 100 pb (Thermo Fisher Scientific, EUA); canaletas 2-11 e 15-25 (acima): amostras de peixe testadas; canaletas 2-11 e 15-24 (abaixo): amostras de peixes testados; canaletas 13 (acima): controle positivo na diluição 10^{-9}; canaleta 13 (abaixo): controle positivo na diluição 10^{-10}; canaletas 12 e 14 (acima e abaixo): espaços; canaleta 25 (abaixo): controle negativo da *nested*PCR. Observa-se amplificação de tamanho esperado (170 pb) indicado no retângulo vermelho.

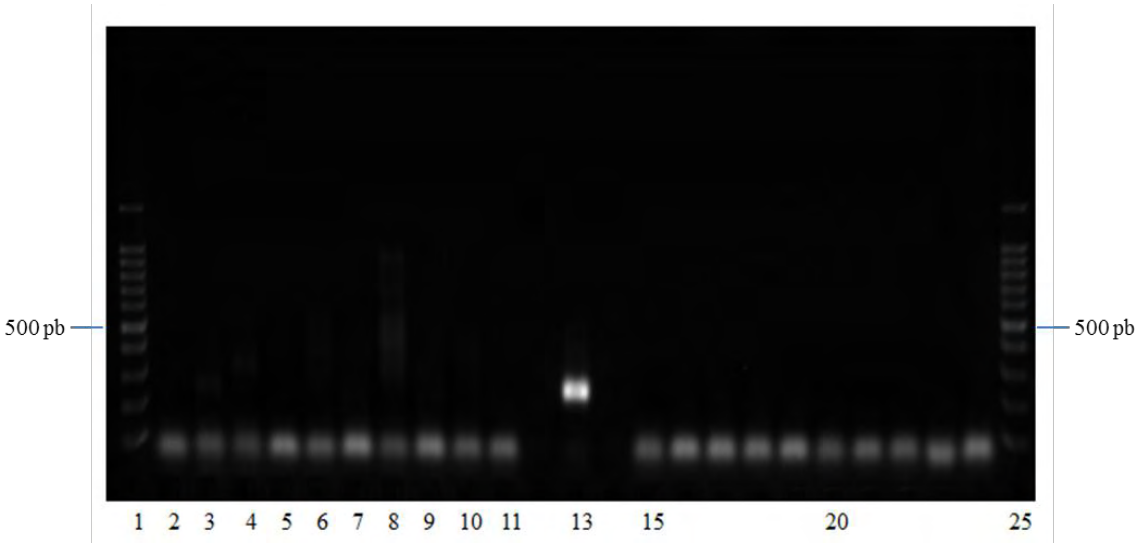

Figura 28. Gel de *nested*PCR realizada em 20 amostras. Canaletas 1 e 25: marcador de 100 pb (Thermo Fisher Scientific, EUA); canaletas 2-11 e 15-24: amostras de peixe testadas; canaleta 13: diluição 10^{-9} do controle positivo; canaletas 12 e 14: espaços.

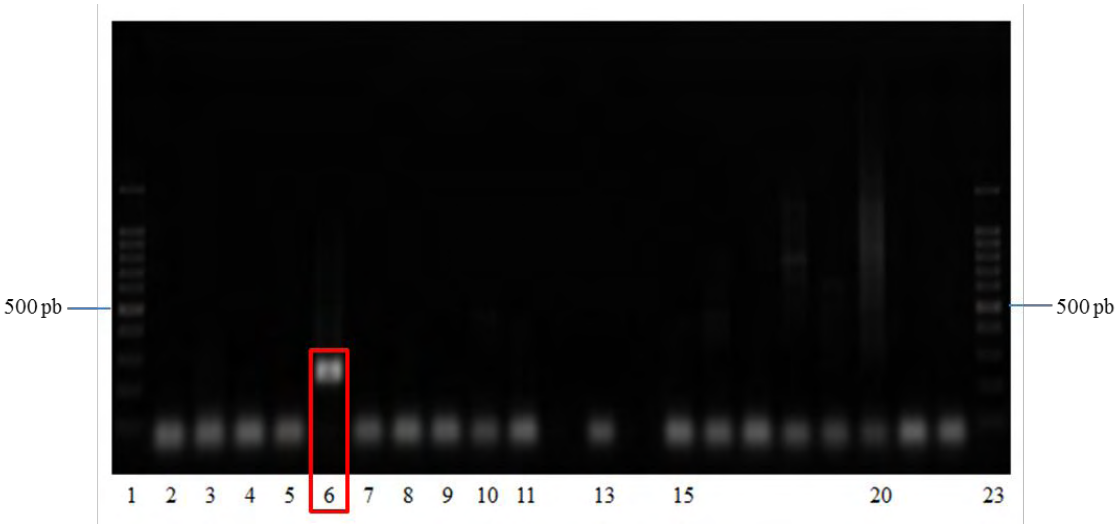

Figura 29. Gel de *nested*PCR realizadao em 17 amostras. Canaletas 1 e 23: marcador de 100 pb pb (Thermo Fisher Scientific, EUA); canaleta 13: diluição 10^{-10} do controle positivo; canaletas 2-11 e 15-21: amostras de peixes testados; canaletas 12 e 14: espaços; canaleta 22: controle negativo da *nested*PCR. Observa-se amplificação de tamanho esperado (170 pb) indicado no retângulo vermelho.

5.5. Sequenciamento nucleotídico

A partir da prospecção de produto de PCR de tamanho compatível ao fragmento do gene G de SVCV nas amostras testadas (Item 5.3.), foram identificadas duas amostras (183P e 302P) com amplificação, após *nested*PCR, de tamanho aproximado a 170 pb. Como especificado no Item 4.5.2, em MATERIAL E MÉTODOS, se houvesse amplificação de produto esperado na detecção do vírus, o protocolo a seguir dependeria da quantidade de bandas visualizadas no gel de agarose. Caso fossem visíveis múltiplas amplificações, seguia-se com a excisão do fragmento na altura esperada e purificação de DNA do gel. No entanto, as amplificações observadas das duas amostras foram únicas. Deste modo, após visualização no gel de agarose, seguiu-se com a purificação do DNA a partir do produto de PCR.

Após purificação do DNA, utilizando kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System, ambas as amostras foram quantificadas em NanoDrop (Thermo Fisher, EUA) (Tabela 9), além do controle positivo utilizado na *nested*PCR (10^{-9}). Foi utilizado controle positivo na nona diluição, pois houve degradação visível da décima.

Tabela 9. Quantificação e grau de pureza de amostras positivas.

Amostras	Quantificação (ng/µL)	Absorbância (260/280)
183P	45,8	1,93
302P	51,7	1,91
C+ (10^{-9})	39,1	1,84

Posteriormente à quantificação, a quantidade de produto a ser colocada na reação de sequenciamento foi determinada, sendo: 1,75 µL DNA e 3,25 µL de H_2O (183P); 1,55 µL DNA e 3,45 µL H_2O (302P); 2,05 µL DNA e 2,95 H_2O (C+). No final, haviam seis (6) tubos, um para cada amostra com cada um dos *primers*: 4121 FOR/4290 REV.

Após o sequenciamento, foram analisados os cromatogramas obtidos das amostras 183P e 302P, além do obtido do controle positivo (10^{-9}), no programa BioEdit Sequence Alignment Editor (Figura 30 e 31).

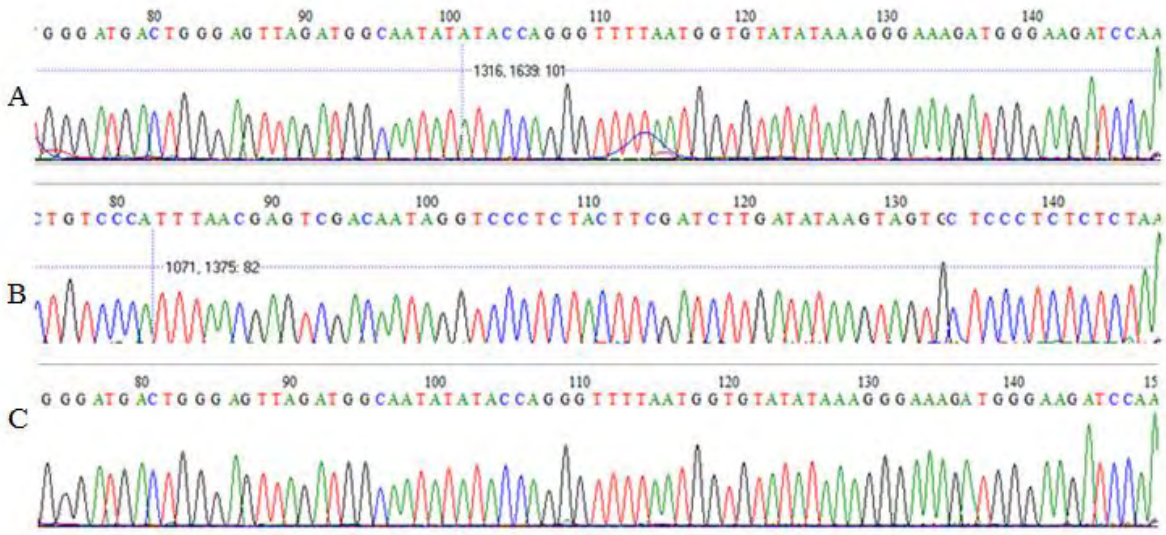

Figura 30. Cromatogramas de amostras 183P e 302P, A e B, respectivamente, e da nona diluição do controle positivo (10^{-9}), em C. Estas reações foram realizadas utilizando *primers* no sentido senso (*forward*).

Figura 31. Cromatogramas de amostras 183P e 302P, A e B, respectivamente, e da nona diluição do controle positivo (10^{-9}), em C. Estas reações foram realizadas utilizando *primers* no sentido antissenso (*reverse*).

5.6. Análise Filogenética

Após editar e alinhar as sequências nucleotídicas, foi realizado a busca de similaridade pelo programa BLAST versão 2.0 (Figuras 32 a 37). A sequência obtida da amostra 183P (FOR) contém 149 nucleotídeos (nt), e apresentou similaridade com as sequências presentes na Figura 32, quando usado o BLAST 2.0. Observou-se que o grau de identidade da sequência 183P (lambari - *Astyanax bimaculatus*) com aquelas do banco de dados não ultrapassou 99%. Já na sequência obtida da mesma amostra, no sentido antissenso (REV), que contém 147 nt (Figura 33), foi observada uma única sequência do banco de dados apresentando 100% de identidade com a amostra.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Spring viraemia of carp virus isolate 14_2001 glycoprotein gene, partial cds	246	246	92%	7e-62	99%	KF983467.1
Spring viraemia of carp virus isolate 3_2010 glycoprotein gene, partial cds	246	246	92%	7e-62	99%	KF983456.1
Spring viraemia of carp virus isolate 7_2010 glycoprotein gene, partial cds	246	246	92%	7e-62	99%	KF983460.1
Spring viraemia of carp virus isolate SVCV1 glycoprotein gene, complete cds	246	246	92%	7e-62	99%	EF593145.1
Spring viremia of carp virus isolate 42-97 glycoprotein gene, partial cds	246	246	92%	7e-62	99%	AY540076.1
Spring viremia of carp virus isolate 556 glycoprotein (G) gene, partial cds	246	246	92%	7e-62	99%	AY196202.1
Spring viremia of carp virus isolate 555 glycoprotein (G) gene, partial cds	246	246	92%	7e-62	99%	AY196201.1
Spring viremia of carp virus isolate 613 glycoprotein (G) gene, partial cds	246	246	92%	7e-62	99%	AY196200.1
Spring viremia of carp virus, complete genome	246	246	92%	7e-62	99%	U18101.2
Spring viraemia of carp virus isolate 2_2010 glycoprotein gene, partial cds	243	243	92%	9e-61	98%	KF983455.1

Figura 32. Sequências similares à da amostra 183P (FOR), incluindo porcentagem de identidade (Ident.) e número de acesso (Accession) no GenBank.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Spring viremia of carp virus, complete genome	263	263	96%	6e-67	100%	U18101.2
Spring viraemia of carp virus isolate 19_2011 glycoprotein gene, partial cds	257	257	96%	3e-65	99%	KF983472.1
Spring viraemia of carp virus isolate 14_2001 glycoprotein gene, partial cds	257	257	96%	3e-65	99%	KF983467.1
Spring viraemia of carp virus isolate 3_2010 glycoprotein gene, partial cds	257	257	96%	3e-65	99%	KF983456.1
Spring viraemia of carp virus isolate 7_2010 glycoprotein gene, partial cds	257	257	96%	3e-65	99%	KF983460.1
Spring viraemia of carp virus isolate 1_2010 glycoprotein gene, partial cds	257	257	96%	3e-65	99%	KF983454.1
Spring viraemia of carp virus isolate 2_2010 glycoprotein gene, partial cds	257	257	96%	3e-65	99%	KF983455.1
Spring viraemia of carp virus isolate SVCV1 glycoprotein gene, complete cds	257	257	96%	3e-65	99%	EF593145.1
Spring viremia of carp virus isolate 42-97 glycoprotein gene, partial cds	257	257	96%	3e-65	99%	AY540076.1
Spring viremia of carp virus isolate 556 glycoprotein (G) gene, partial cds	257	257	96%	3e-65	99%	AY196202.1
Spring viremia of carp virus isolate 555 glycoprotein (G) gene, partial cds	257	257	96%	3e-65	99%	AY196201.1

Figura 33. Sequências similares à da amostra 183P (REV), incluindo porcentagem de identidade e número de acesso no GenBank.

As sequências obtidas da amostra 302P (FOR-150 nt; REV-147 nt) apresentaram similaridade com as sequências presentes nas Figuras 34 e 35. Nota-se que o grau de identidade das sequências, em comparação com a amostra 302P (FOR), não ultrapassa 98%. No entanto, quando realizado o BLAST na amostra 302P (tilápia do Nilo - *Oreochromis niloticus*) no sentido antissenso (REV), observa-se maior grau de identidade.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Spring viraemia of carp virus isolate 14_2001 glycoprotein gene, partial cds	255	255	99%	1e-64	97%	KF983467.1
Spring viraemia of carp virus isolate 3_2010 glycoprotein gene, partial cds	255	255	99%	1e-64	97%	KF983456.1
Spring viraemia of carp virus isolate 7_2010 glycoprotein gene, partial cds	255	255	99%	1e-64	97%	KF983460.1
Spring viraemia of carp virus isolate SVCV1 glycoprotein gene, complete cds	255	255	99%	1e-64	97%	EF593145.1
Spring viremia of carp virus isolate 42-97 glycoprotein gene, partial cds	255	255	99%	1e-64	97%	AY540076.1
Spring viremia of carp virus isolate 556 glycoprotein (G) gene, partial cds	255	255	99%	1e-64	97%	AY196202.1
Spring viremia of carp virus isolate 555 glycoprotein (G) gene, partial cds	255	255	99%	1e-64	97%	AY196201.1
Spring viremia of carp virus isolate 613 glycoprotein (G) gene, partial cds	255	255	99%	1e-64	97%	AY196200.1
Spring viremia of carp virus, complete genome	254	254	96%	4e-64	98%	U18101.2
Spring viraemia of carp virus isolate 2_2010 glycoprotein gene, partial cds	252	252	99%	1e-63	97%	KF983455.1
Spring viraemia of carp virus isolate 19_2011 glycoprotein gene, partial cds	250	250	99%	5e-63	97%	KF983472.1

Figura 34. Sequências similares à da amostra 302P (FOR), incluindo porcentagem de identidade e número de acesso no GenBank.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Spring viremia of carp virus, complete genome	261	261	100%	2e-66	99%	U18101.2
Spring viraemia of carp virus isolate 19_2011 glycoprotein gene, partial cds	255	255	100%	1e-64	98%	KF983472.1
Spring viraemia of carp virus isolate 14_2001 glycoprotein gene, partial cds	255	255	100%	1e-64	98%	KF983467.1
Spring viraemia of carp virus isolate 3_2010 glycoprotein gene, partial cds	255	255	100%	1e-64	98%	KF983456.1
Spring viraemia of carp virus isolate 7_2010 glycoprotein gene, partial cds	255	255	100%	1e-64	98%	KF983460.1
Spring viraemia of carp virus isolate 1_2010 glycoprotein gene, partial cds	255	255	100%	1e-64	98%	KF983454.1
Spring viraemia of carp virus isolate 2_2010 glycoprotein gene, partial cds	255	255	100%	1e-64	98%	KF983455.1
Spring viraemia of carp virus isolate SVCV1 glycoprotein gene, complete cds	255	255	100%	1e-64	98%	EF593145.1
Spring viremia of carp virus isolate 42-97 glycoprotein gene, partial cds	255	255	100%	1e-64	98%	AY540076.1
Spring viremia of carp virus isolate 556 glycoprotein (G) gene, partial cds	255	255	100%	1e-64	98%	AY196202.1

Figura 35. Sequências similares à da amostra 302P (REV), incluindo porcentagem de identidade e número de acesso no GenBank.

Finalmente, após observar as similaridades das sequências das amostras com sequências presentes em banco de dados, realizou-se o mesmo procedimento com o controle positivo. A sequência de sentido senso, do controle positivo (FOR-148 nt), apresentou similaridade com as sequências presentes na Figura 36, enquanto a de sentido antissenso (REV-147 nt) apresentou similaridade com as sequências presentes na Figura 37.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Spring viraemia of carp virus isolate 14_2001 glycoprotein gene, partial cds	252	252	93%	1e-63	99%	KF983467.1
Spring viraemia of carp virus isolate 3_2010 glycoprotein gene, partial cds	252	252	93%	1e-63	99%	KF983456.1
Spring viraemia of carp virus isolate 7_2010 glycoprotein gene, partial cds	252	252	93%	1e-63	99%	KF983460.1
Spring viraemia of carp virus isolate SVCV1 glycoprotein gene, complete cds	252	252	93%	1e-63	99%	EF593145.1
Spring viremia of carp virus isolate 42-97 glycoprotein gene, partial cds	252	252	93%	1e-63	99%	AY540076.1
Spring viremia of carp virus isolate 556 glycoprotein (G) gene, partial cds	252	252	93%	1e-63	99%	AY196202.1
Spring viremia of carp virus isolate 555 glycoprotein (G) gene, partial cds	252	252	93%	1e-63	99%	AY196201.1
Spring viremia of carp virus isolate 613 glycoprotein (G) gene, partial cds	252	252	93%	1e-63	99%	AY196200.1
Spring viremia of carp virus, complete genome	252	252	93%	1e-63	99%	U18101.2
Spring viraemia of carp virus isolate 2_2010 glycoprotein gene, partial cds	248	248	93%	2e-62	99%	KF983455.1

Figura 36. Sequências similares à do controle positivo (FOR), incluindo porcentagem de identidade e número de acesso no GenBank.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Spring viremia of carp virus, complete genome	255	255	100%	1e-64	98%	U18101.2
Spring viraemia of carp virus isolate 19_2011 glycoprotein gene, partial cds	250	250	100%	5e-63	97%	KF983472.1
Spring viraemia of carp virus isolate 14_2001 glycoprotein gene, partial cds	250	250	100%	5e-63	97%	KF983467.1
Spring viraemia of carp virus isolate 3_2010 glycoprotein gene, partial cds	250	250	100%	5e-63	97%	KF983456.1
Spring viraemia of carp virus isolate 7_2010 glycoprotein gene, partial cds	250	250	100%	5e-63	97%	KF983460.1
Spring viraemia of carp virus isolate 1_2010 glycoprotein gene, partial cds	250	250	100%	5e-63	97%	KF983454.1
Spring viraemia of carp virus isolate 2_2010 glycoprotein gene, partial cds	250	250	100%	5e-63	97%	KF983455.1
Spring viraemia of carp virus isolate SVCV1 glycoprotein gene, complete cds	250	250	100%	5e-63	97%	EF593145.1

Figura 37. Sequências similares à do controle positivo (REV), incluindo porcentagem de identidade e número de acesso no GenBank.

A Figura 38, a seguir, ilustra o alinhamento múltiplo das sequências utilizadas para as análises de similaridade e filogenética, com a exibição da sequência consenso, sendo os nucleotídeos identificados por cores diferentes.

Quando realizada a comparação múltipla de porcentagens de identidade, através do programa MatGat, utilizando algoritmo de alinhamento global de matrizes, os valores encontrados para as sequências 183P e 302P foram maiores (variando entre 74,5 a 75,6%) para grupo de sequências oriundas de variantes de SVCV, recuperadas do GenBank, ainda não classificadas genotipicamente, e provenientes de países diferentes. Quando comparadas com sequências correspondentes de variantes de SVCV já tradicionalmente classificadas dentro dos grupos I, II, II e IV, além de amostras de outros vesiculovírus encontrados no Brasil incluindo representantes do grupo do vírus da estomatite vesicular (VSV), as amostras 183P e 302P apresentaram valores de identidade bem menores, entre 33,2 a 38,0. Tais diferenças foram confirmadas pelo perfil de agrupamento verificado na reconstrução filogenética (Figura 39), onde as sequências 183P e 302P formaram um subclado distinto do agrupamento de variantes de SVCV ainda não classificadas segundo a nomenclatura usual para grupo/genogrupo.

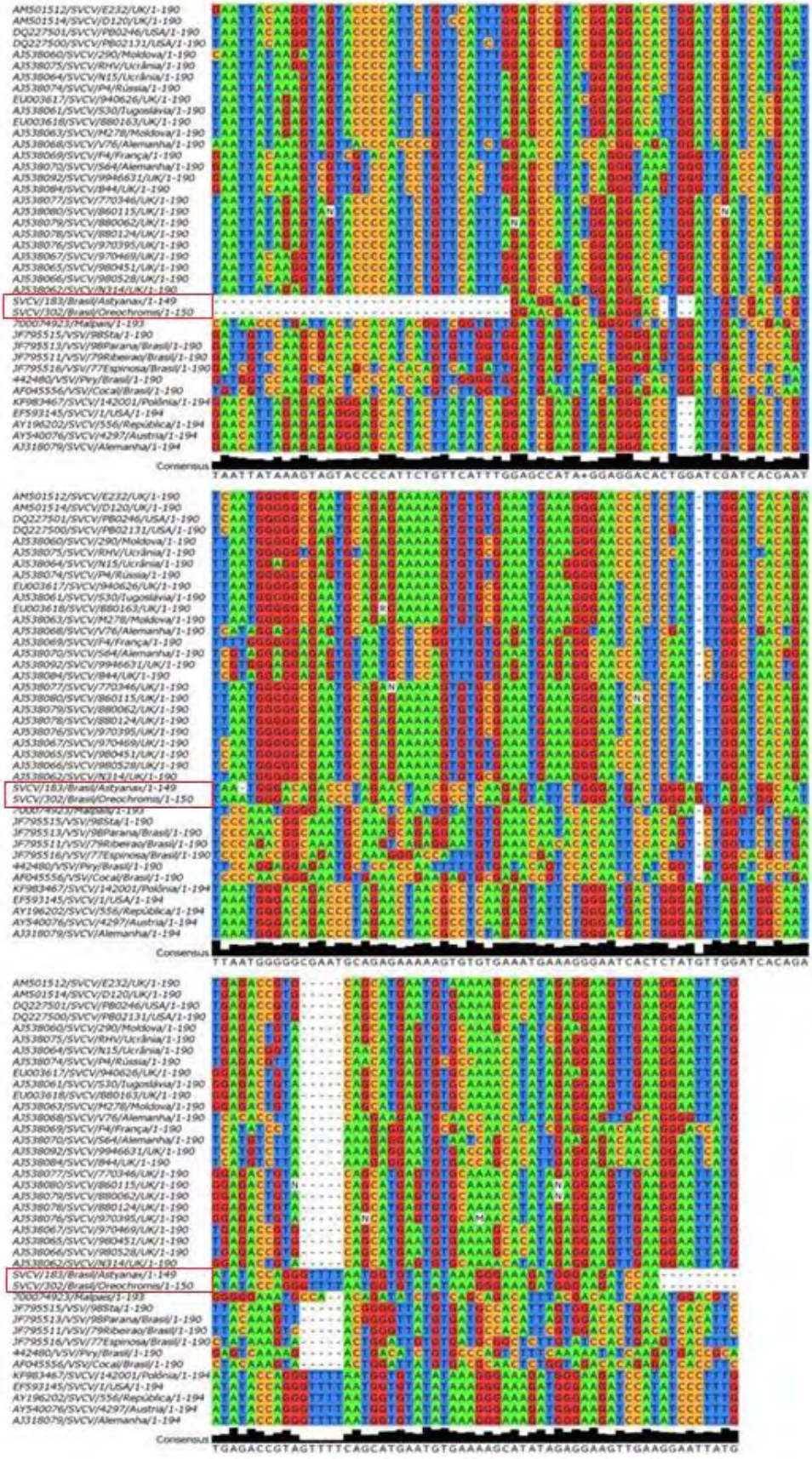

Figura 38. Alinhamento múltiplo de sequências nucleotídicas parciais do gene G de SVCV incluindo aquelas detectadas em *Astyanax bimaculatus* (lambari) e *Oreochromis niloticus* (tilápia do Nilo), em destaque (retângulo vermelho), e outras sequências homólogas depositadas no GenBank, utilizando os programas BioEdit e Jalview.

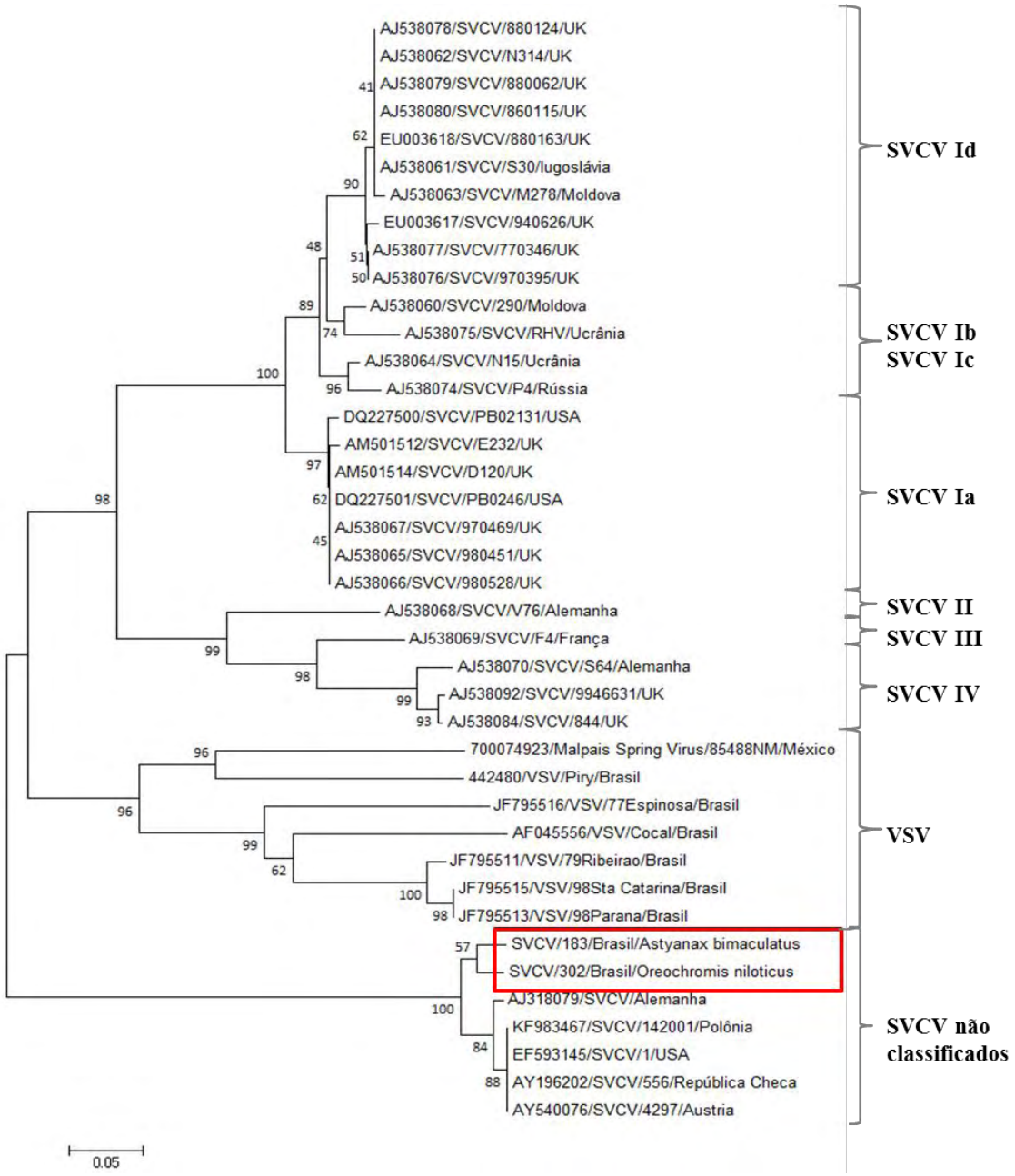

Figura 39. Cladograma representando reconstrução filogenética baseada no alinhamento múltiplo de sequências nucleotídicas referentes à amplificação parcial de 170pb do gene G de SVCV, referente à região compreendida entre os nucleotídeos 217 e 377 do gene G de isolado de referência de SVCV presente no GenBank (KF983467). A análise foi realizada utilizando-se o algoritmo *Neighbor-Joining* e modelo P (*P distance)*, com o programa MEGA 6.0. Valores de *bootstrap* para 1000 pseudo-réplicas estão indicados juntos aos nós. As sequências SVCV-Brasil obtidas no presente estudo estão em destaque (vermelho). A barra de escala estima a distância filogenética das sequencias nucleotídicas.

6. DISCUSSÃO

Conhecimentos sobre mecanismos de transmissão e epidemiologia do vírus da Viremia Primaveril da Carpa (SVCV) ainda são restritos. O vírus tem sido detectado desde antes de seu isolamento, quando era conhecido como edema (*dropsy*) infeccioso da carpa, causa de inflamação letal hemorrágica da bexiga natatória e ascite (FIJAN, 1972; WOLF, 1988; AHNE et al., 2002). SVCV infecta peixes em todos os estágios de vida, desde ovas, larvas e alevinos, a peixes adultos (KOUTNÁ et al., 2003), e tem sido isolado durante surtos em mais de 30 países (GARVER et al., 2007; JOHNSON et al., 1999; FIJAN, 1999; AHNE et al., 2002; PADHI et al. 2012). Dentre os continentes onde alguma forma de detecção viral foi realizada, está a América do Sul; mais especificamente, o Brasil (ALEXANDRINO et al. 1998).

Em estudo restrito a oito carpas sintomáticas do lago Nabuco, São Paulo, publicado em 1998, Alexandrino et al. (1998) descreveram a detecção de antígeno de SVCV por um ensaio de ELISA *in house* (ALEXANDRINO, et al., 1998). O artigo não traz descrição detalhada dos métodos de produção do anticorpo de captura, nem da fonte de antígeno usado para imunizar os coelhos que foram a espécie usada para produção do anticorpo primário. Como não houve isolamento do vírus, nem foram usados métodos moleculares de confirmação, não é possível afastar a possibilidade de reação cruzada com outros rhabdovírus. Além disso, diferentemente do nosso estudo, aquele foi realizado em animais de um lago, e não de rios, cujo fluxo de água pode levar à transmissão do vírus a peixes susceptíveis em pontos distantes. No presente estudo, os peixes coletados foram provenientes de pisciculturas e de rios nas regiões nordeste e centro-leste do estado de São Paulo, além de criações do Ceará, Bahia e Minas Gerais. O método utilizado no presente estudo foi de RT-*nested*PCR, seguida de sequenciamento, assim permitindo a identificação correta do alvo.

O SVCV, até o presente, ainda não foi isolado no Brasil. Desta forma, não existe controle positivo natural para utilizar nas reações de detecção por RT-PCR. Além disso, a legislação nacional é rígida quanto à importação de um vírus exótico isolado a ser usado como controle positivo por receio de introduzir tal agente no país. Portanto, foi necessário sintetizar um controle positivo para a padronização do ensaio no presente estudo. Sabe-se que o uso de controles sintéticos plasmidiais em ensaios moleculares acarreta diversos problemas, o mais preocupante sendo a contaminação. Por esta razão, a preparação de reagentes para PCR, a

pipetagem de cDNA, a aplicação de produtos da primeira reação de PCR em experimentos de *nested*PCR, e o uso de controle positivo oriundo de plasmídeo foram realizados em ambientes separados, utilizando material de paramentação específico, e seguindo rigorosos protocolos de limpeza do ambiente de trabalho.

A padronização de um ensaio de PCR é de fundamental importância, pois evita gastos desnecessários de reagentes e de tempo. No presente estudo, na etapa de padronização, foi utilizada como controle positivo, a última diluição visível do gene sintético em gel de agarose. O mesmo foi submetido a ensaios com variações de temperatura, concentrações de reagentes inclusive de *primers*, tempos e quantidade de ciclos. Ao final desta etapa, observaram-se as temperaturas de anelamento ideais, o limite de detecção da PCR, importante fator que mostra a sensibilidade do teste, e outros dados que asseguram a acurácia e eficácia do teste. Além da padronização do controle positivo, foi realizado ensaio de *spiking* do gene sintético em tecidos do peixe utilizado na padronização (PP). Trata-se de um experimento importante, pois recria o microambiente no qual se processa a bioquímica de extração de ácidos nucleicos, mimetizando condições reais de extração em presença de tecido. Este experimento revelou que o limite de detecção era indicativo de alta sensibilidade, da ordem de 10^{-1} molécula do controle positivo por reação, inferior ao encontrado por Shimahara et al. (2015), em que o limite de detecção foi de $7{,}1 \times 10^{2}$ cópias/reação, embora a natureza dos controles utilizados na padronização dos referidos testes tenha sido diferente. Desta forma, este ensaio mostrou-se adequado, quanto à sensibilidade, para detecção do vírus em amostras coletadas na natureza, onde existe a possibilidade da concentração não ser elevada.

Precedendo a aplicação do ensaio de RT-PCR para a detecção do vírus, foi verificada a capacidade de detecção de um gene de peixe, neste caso a actina, como controle endógeno. Esse alvo foi escolhido pela sua abundância e expressão constitutiva, já que se trata de proteína do citoesqueleto (TORGERSON e McNIVEN, 1998). De todas as 306 amostras de tecidos de peixe testadas por PCR com os *primers* para actina, em somente uma (1) amostra não houve amplificação, provavelmente por algum problema na qualidade da extração de ácidos nucleicos, ou por degradação do material na amostra.

O SVCV causa doença hemorrágica aguda severa altamente contagiosa em animais susceptíveis. No entanto, animais podem morrer sem que tenham sido notados os sinais clínicos mais comuns (FLORES, 2007). Como relatado por Fijan (1999) e Garver (2007),

grande parte das infecções de peixes pelo vírus da SVC são assintomáticas (FIJAN, 1999; GARVER, 2007).

A existência de portadores assintomáticos é importantíssima do ponto de vista epidemiológico, pois esses animais podem servir como fonte de infecção para outros. No presente estudo, 2 dos 146 peixes testados foram positivos: um lambari (*Astyanax bimaculatus*) de São Paulo e uma tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) do Ceará, ambos de piscicultura e assintomáticos.

A detecção de SVCV em peixes de cultivo é muito importante do ponto de vista industrial, visto que este agente pode causar grandes perdas econômicas. Considerando o momento ascendente na produção pesqueira no Brasil, este é um importante dado que indica a necessidade de vigilância de SVCV em pisciculturas.

O presente estudo foi realizado em *pools* de amostras, mas foram mantidas alíquotas separadas dos tecidos individuais que entraram na composição dos *pools*. Assim, será importante testar cada uma das alíquotas que entraram na composição dos dois *pools* que foram positivos para SVCV, para entender quais tecidos dos animais estavam infectados, visando a contribuir para o entendimento da patogênese deste agente.

No presente estudo, foi utilizada RT-PCR convencional, que gera produtos prontamente identificáveis por sequenciamento pelo método de Sanger. Trata-se de estratégia apropriada a estudo de pesquisa epidemiológica. Porém, caso seja necessário estabelecer rotinas de processamento de largas quantidades de amostras, o mesmo ensaio pode ser realizado usando estratégias de PCR em tempo real, por SybrGreen ou TaqMan, que permitem testar muitas amostras em pouco tempo, e evitar a manipulação de produtos de PCR, assim minimizando chances para contaminação cruzada.

O ensaio de PCR convencional usado só evidenciou amplicons de SVCV após realização da etapa de *nested*PCR, que além de aumentar sensibilidade também acrescenta especificidade, pois inclui dois *primers* adicionais, internos aos utilizados no primeiro *round*. Em contrapartida, a falta de detecção de produtos de PCR no primeiro *round* de amplificação, requerendo um segundo *round* para sua visualização, sugere que o genoma de SVCV não está distribuído em grande abundância nos tecidos dos peixes infectados.

De acordo com estudos de caracterização de SVCV, baseados em análises filogenéticas, utilizando o gene da glicoproteína (G) (WARG et al., 2007), é possível

determinar a origem de um surto do vírus, com sua classificação em subgrupos, ou genogrupos (STONE et al., 2003). Os resultados obtidos no presente estudo, porém, ainda não permitem tal classificação. Observa-se no cladograma da Figura 39 que o clado formado pelas amostras positivas no estudo distancia-se dos demais, incluindo grupo parafilético com o qual formou clado dos SVCV não classificados genotipicamente em grupo/genogrupo, indicando a possibilidade de que as variantes 183P e 302P possam constituir um potencial novo grupo dentro dos vesiculovírus, fato corroborado pelas diferenças nas porcentagens de identidade encontradas com relação aos demais SVCV já identificados e mesmo outros vesiculovírus detectados no Brasil.

Este trabalho relata o desenvolvimento de um ensaio molecular para detecção de SVCV, cuja utilização permitiu confirmar a presença desse agente no Brasil, em peixes de criação. Trata-se de um importante e inédito achado, que deve ser levado em conta no estabelecimento de medidas de biosseguridade na produção pesqueira no nosso país. Além disso, a presença de SVCV em território nacional mostra que este não é um agente exótico, e assim altera a percepção da própria biodiversidade do viroma aquático no Brasil.

7. CONCLUSÕES

- Caracterizou-se os peixes coletados no presente estudo quanto à espécie e presença ou ausência de sinais clínicos.

- Padronizou-se um ensaio de RT-PCR convencional sensível para a detecção de fragmento do gene G do Vírus da Viremia Primaveril da Carpa, utilizando gene sintético como controle positivo.

- O SVCV foi detectado nas espécies *Astyanax bimaculatus* (lambari) e *Oreochromis niloticus* (tilápia do Nilo), ambos de criação, mostrando que este agente está presente no Brasil e indicando necessidade de medidas de biosseguridade na produção pesqueira.

- As sequências nucleotídicas para fragmento parcial do gene G do Vírus da Viremia Primaveril da Carpa obtidas na presente investigação apresentaram elevada identidade com sequências homólogas depositadas no GenBank, confirmando a circulação do vírus no país.

- As variantes de SVCV detectadas no Brasil formaram clado distinto dos demais SVCV já identificados dentro dos quatro grupos genéticos conhecidos, bem como de outros vesiculovírus detectados no país.

8. REFERÊNCIAS

AHNE W. Zellkulturen aus verschiedenen Süsswasserteleosteergeweben und Untersuchungen über die Ätiologie der Schwimmblasenentzündung der Karpfen. Ludwig-Maximilians Universität, Munich. PhD thesis. 1973.

AHNE W., BJORKLUND H.V., ESSBAUER S., FIJAN N., KURATH G., WINTON Jr R. Spring viraemia of carp (SVC). **Diseases of Aquatic Organisms** 52: 261-272. 2002.

AHNE W., WOLF K. Spring viremia of carp. **Fish Wildl Serv** 51: 1-11. 1977.

ALEXANDRINO A. C., TANZANI-PAIVA T., ROMANO L. A**.** Identification of spring viraemia of common carp *Carassius auratus* in São Paulo, Brazil. **Revista Ceres** 45: 125-137. 1998.

BARROSO M.V., CASTRO J.C., AOKI P.C.M., HELMER J.L. Valor nutritivo de alguns ingredientes para o robalo (Centropomus parallelus). **Revista Brasileira de Zootecnia.** 31(6): 2157-2164. 2002.

BASIC A., SCHACHNER O., BILIC I., HESS M. Phylogenetic analysis of spring viraemia of carp virus isolates from Austria indicates the existence of at least two subgroups within genogroup Id. **Dis Aquat Organ** 85(1): 31-40. 2009.

BAUDOUY A. M. Virémie printanière de la carpe: premiers isolements du virus en France. **Bull Off Int Épizoot** 83: 717-722. 1975.

BÉKÉSI C. L., CSONTOS L. Isolation of spring viraemia of carp virus from asymtomatic broodstock carp, Cyprinus carpio L. **Journal of Fish Diseases** 8:471-472. 1985.

BJORKLUND H. V., HIGMAN K. H., KURATH G. The glycoprotein genes and gene junctions of the fish rhabdoviruses spring viremia of carp virus and hirame rhabdovirus: analysis of relationships with other rhabdoviruses. **Virus Res** 42(1-2): 65-80. 1996.

BJORKLUND H. V., JOHANSSON T. R., RINNE A. Rhabdovirus-induced apoptosis in a fish cell line is inhibited by a human endogenous acid cysteine proteinase inhibitor. **J Virol** 71(7): 5658-5662. 1997.

BLAST. Basic Local Alignment Search Tool. National Center for Biotechnology Information (NCBI). U.S. National Library of Medicine. Bethesda, USA. Disponível em: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Acesso em: 09/11/2015.

BRASIL, 2014. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). The State of World Fisheries and Aquaculture. Rome. 223 págs. 2014. Disponível em: <http://www.fao.org/3/d1eaa9a1-5a71-4e42-86c0-f2111f07de16/i3720e.pdf>. Acesso em: 03/11/2015.

BRASIL, 2014. Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA). Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura. 60 págs. 2014.

BRASIL, 2014. Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA). Significado e Especialidades da Aquicultura. 2014. Disponível em: < http://www.mpa.gov.br/?Itemid=245>. Acesso 10/11/2015.

BUCKE D., FINLAY J. Identification of spring viraemia in carp (Cyprinus carpio L) in Great Britain. **Vet Rec** 104(4): 69-71. 1979.

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

COMO PESCAR 2010. Como pescar carpa. Word Press. Disponível em: <http://www.comopescar.org/como-pescar/como-pescar-carpa>. Acesso em: 03/11/2015.

DIKKEBOOM A. L., RADI K., TOOHEY-KURTH S., MARCQUENSKI M., ENGEL A.E., GOODWIN K., STONE D.M., LONGSHAW C. First report of spring viremia of carp virus (SVCV) in wild common carp in North America. **Journal of Aquatic Animal Health** 16: 169-178. 2004.

ESTANQUES.NET 2014. Kois, carpas para estanques. 30/08/2009. Disponível em: <http://www.estanques.net/peces-y-demas-fauna-del-estanque/kois-carpas- para-estanques/>. Acesso em: 05/11/2015.

FIB - FOOD INGREDIENTS BRASIL 2009. Propriedades Funcionais das Proteínas do Peixe. Disponível em: <http://www.revista-fi.com/materias/100.pdf>. Acesso em 19/01/2016.

FIJAN N. Infectious dropsy in carp – a disease complex. **Diseases of fish**. M.T.LE**:** 39-51. 1972.

FIJAN N. Vaccination against SVCV. **Fish vaccination.** Academic Press, London**:** 204-215. 1988.

FIJAN N. Spring viremia of carp and other viral diseases of warm-water fish. **Fish diseases and disorders**. 3: 177-244. 1999.

FIJAN N., PETRINEC Z., SULIMANOVI'C D., ZWILLENBERG L.O. Isolation of the viral causative agent from the acute form of infectious dropsy of carp. **Vet Arh** 41: 125-138. 1971

FLORES E. F. **Virologia Veterinária**. Santa Maria, Editora UFSM. 2007.

GARVER K. A., DWILOW A.G., RICHARD J., BOOTH D.R., BENIAC D.R., SOUTER B.W. First detection and confirmation of spring viraemia of carp virus in common carp, Cyprinus carpio L., from Hamilton Harbour, Lake Ontario, Canada. **J Fish Dis** 30 (11): 665-671. 2007.

GHITTINO P., BECCARIA E., FERRARI A. Caso die ascite infectiva della carpa modernamente diagnosticato anche in Italia. **Riv Ital Piscicolt Ittiopatol** 15:1-4. 1971.

GOODWIN A. E. First report of spring viraemia of carp virus (SVCV) in North America. **Journal of Aquatic Animal Health** 14: 161-164. 2002.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symp. Ser.**, 41:95–98, 1999.

HILL B. J. Physico-chemical and serological characterization of five rhabdoviruses infecting fish. **J Gen Virol** 27 (3): 369-378. 1975.

HOFFMANN B., BEER M., SCHUTZE H., METTENLEITER T.C. Fish rhabdoviruses: molecular epidemiology and evolution. **Curr Top Microbiol Immunol** 292: 81-117. 2005.

JOHANSSON T., NYLUND S., OLESEN N.J., BJORKLUND H. Molecular characterisation of the nucleocapsid protein gene, glycoprotein gene and gene junctions of

rhabdovirus 903/87, a novel fish pathogenic rhabdovirus. **Virus Res** 80 (1-2): 11-22. 2001.

JOHNSON M. C., MAXWELL J.M., LOH P.C., LEONG J.A. Molecular characterization of the glycoproteins from two warm water rhabdoviruses: snakehead rhabdovirus (SHRV) and rhabdovirus of penaeid shrimp (RPS)/spring viremia of carp virus (SVCV). **Virus Res** 64 (2): 95-106. 1999.

JØRGENSEN P.E.V., OLESEN N.J., AHNE W., LORENZEN N. SVCV and PFR viruses: serological examination of 22 isolates indicates close relationship between the two fish rhabdoviruses. **Viruses of lower vertebrates.** K. E. Ahne W.Heidelberg, Springer Verlag**:** 349-366. 1989.

KNIPE D. M., HOWLEY P. M. **Fields Virology**. Cap. 8. 5 Ed. Lippincott Williams & Wilkins. 2007.

KÖLBL O. Neue Erkenntnisse über die Bauchwassersucht bei Karpfen. **Oesterr Fisch** 28: 69-72. 1975.

KOUTNÁ M., VESELY T., PSIKAL I., HULOVA J. Identification of springviraemia of carp virus (SVCV) by combined RT-PCR and nested PCR. **Dis Aquat Organ** 55 (3): 229-235. 2003.

KUBITZA F. et al., Panorama da Piscicultura no Brasil. Parte I. Estatísticas, espécies, pólos de produção e fatores limitantes à expansão da atividade. Jundiaí, São Paulo. 2013. Disponível em: <http://www.panoramadaaquicultura.com.br/novosite/?p=1982>. Acesso em: 05/11/2015.

KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software for microcomputers. **Comput. Appl. Biosci.**, v.10, p.189–191, 1994.

LANDES FISCHEREIVERBAND. Projekt Fischparasiten. Fischparasitenmonitoring der Lippe (NRW). 2015. Disponível em: <http://www.lfv-westfalen.de/content/projekte/pro_fischparasiten.php>. Acesso em: 03/11/2015.

LIU H.,FENG F., HUANG J., SHI X., GAO L., YANG J., JIANG Y. Amino acid sequence of a Chinese isolate of Spring Viraemia Virus of carp and preliminary analysis of the glycoprotein gene. **Virol Sin** 20: 647-651, 2005.

LIU H., GAO L., SHI X., GU T., JIANG Y., CHEN H. Isolation of spring viraemia of carp virus from cultured koi (Cyprinus carpio koi) and common carp (Cyprinus carpio carpio) in P.R. China. **Bull Eur Assoc Fish Pathol** 24: 194- 202, 2004.

LU Y., LOH P. G. Infectivity studies of rhabdovirus in the penaeid blue shrimp. **Aquacult Int** 2: 123-127, 1994.

LU Y.A., NADALA E.C. Jr., BROCK J.A., LOH P.C. A new virus isolate from infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV)-infected penaeid shrimps. **J Virol Methods** 31 (2-3): 189-195. 1991.

MARCOTEGUI M.A., ESTEPA A., FRIAS D., COLL J.M. First report of a rhabdovirus affecting carp in Spain. **Bull Eur Assoc Fish Pathol** 12: 50-53.1992.

MARTINS, M. L. Doenças Infecciosas e Parasitárias de Peixes. **Boletim Técnico do CAUNESP.** Nº 03. São Paulo. 1997. Disponível em: <http://www.caunesp.unesp.br>. Acesso em: 04 maio 2013.

MILLER O., FULLER F.J., GEBREYES W.A., LEWBART G.A., SHCHELKUNOV I.S., SHIVAPPA R.B., JOINER C., WOOLFORD G., STONE D.N., DIXON P.F., RALEY M.E. LEVINE J.F. Phylogenetic analysis of spring virema of carp virus reveals distinct subgroups with common origins for recent isolates in North America and the UK. **Dis Aquat Organ** 76 (3): 193- 204. 2007.

MOELLER, R. B. "Viral Diseases of Fish." California Animal Health and Food Safety Laboratory System. California, USA. 2013. Disponível em: <http://www.cichlid-forum.com/articles/diseases_viral.php>. Acesso em 08 maio 2015.

NEGELE, R. D. Histopathological changes in some organs of experimentally infected carp fingerlings with Rhabdovirus carpio. **Bull Off Int Épizoot** 87: 449-450. 1977.

NOMURA, I. O Futuro da Pesca e da Aquicultura Marinha no Mundo. **Ciência e Cultura.** 3. São Paulo. 2010. Disponível em: <http://cienciaecultura.bvs.br>. Acesso em: 05 maio 2013.

OIE 2015. OIE-Listed diseases, infections and infestations in force in 2015. Disponível em: <http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2015/>. Acesso em: 04 novembro, 2015.

ORESHKOVA S. F., SHCHELKUNOV I.S., TIKUNOVA N.V., SHCHELKUNOVA T.I., PUZYREV A.T., ILYCHEY A.A. Detection of spring viremia of carp virus

isolates by hybridization with non-radioactive probes and amplification by polymerase chain reaction. **Virus Res** 63 (1-2): 3-10. 1999.

PADHI, A., VERGHESE B. Molecular evolutionary and epidemiological dynamics of a highly pathogenic fish rhabdovirus, the spring viremia of carp virus (SVCV). **Vet Microbiol** 156 (1-2): 54-63. 2012.

PHELPS N.B.D., ARMIÉN A.G., MOR S.K., GOYAL S.M., WARG J.V.BHAGYAM R., MONAHAN T. Spring Viremia of Carp Virus in Minnehaha Creek, Minnesota. **Journal of Aquatic Animal Health** 24: 232-237. 2012.

PROMEGA CORPORATION. pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector System. Technical Manual. 2015. Disponível em: <https://www.promega.com.br.>. Acesso em: 08 novembro, 2015.

ROUDIKOV, N. I. La virose printaniere des poissons en URSS. **Bull Off Int Épizoot** 92: 1069-1077. 1980.

ROWLEY H., GRAHAM D.A., CAMPBELL S., WAY K., STONE D.M., CURRAN W.L., BRYSON D.G. Isolation and characterisation of rhabdovirus from wild common bream Abramis brama, roach Rutilus rutilus, farmed brown trout Salmo trutta and rainbow trout Oncorhynchus mykiss in Northern Ireland. **Dis Aquat Organ** 48 (1): 7-15. 2001.

ROY, P. Phosphoproteins of spring viremia of carp virus. **Virology** 112 (1): 274- 281. 1981.

SHCHELKUNOV I. S., SKURAT E.K., SIVOLOTSKAIA V.A., SAPOT'KO K.V., SHIMKO V.V. [Rhabdovirus anguilla in eels in the USSR and its pathogenicity for fish.] **Vopr Virusol** 34 (1): 81-84. 1989.

SHEPPARD A. M., LE DEUFF R.M., MARTIN P.D., WOOLFORD G., WAY K., STONE D.M. Genotyping spring viraemia of carp virus and other piscine vesiculo-like viruses using reverse hybridisation. **Dis Aquat Organ** 76 (2): 163- 168. 2007.

SHIMAHARA Y., KURITA J., NISHIOKA T., YUASA K., SAKAI T., OSEKO N., SANO M., DIXON P. Development of an improved RT-PCR for specific detection of spring viraemia of carp virus. **Journal of Fish Diseases**. doi:10.1111/jfd.12357. 1-7. 2015.

SHIVAPPA R. B.,SAVAN R., KONO T., SAKAI M., EMMENEGGER E., KURATH G., LEVINE J.F. Detection of spring viraemia of carp virus (SVCV) by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) in koi carp, Cyprinus carpio L. **J Fish Dis** 31 (4): 249-258. 2008.

STONE, D. M., AHNE W., DENHAM K.L., DIXON P.F., LIU C.T., SHEPPARD A.M., TAYLOR G.R., WAY K. Nucleotide sequence analysis of the glycoprotein gene of putative spring viraemia of carp virus and pike fry rhabdovirus isolates reveals four genogroups. **Dis Aquat Organ** 53 (3): 203-210. 2003.

TENG Y., LIU H., LY J.Q., FAN W.H., ZHANG Q.Y., QIN Q.W. Characterization of complete genome sequence of the spring viremia of carp virus isolated from common carp (Cyprinus carpio) in China. **Arch Virol** 152 (8): 1457-1465. 2007.

TESARCIK J., MACURA B. Field carp vaccination against spring viremia on the fish farms of the State Fishery. **Pr VURH Vodnany** (em Tcheco) 17:3-11. 1981.

TESARCIK J., MACURA B., DEDEK L., VALICEK L., SMID B. Isolation and electron microscopy of a rhabdovirus from the acute form of infectious dropsy of carp (spring viremia of carp). **Zentralbl Veterinärmed** 24: 340-343. 1977.

THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D. G. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Res.**, 25:4876–4882, 1994.

TOMASEC I., FIJAN N.N. Weiterer Beitrag zur Ätiologie der infektiösen Bauchwassersucht des Karpfens. **Bull Int Jugoslavenska Akademija Znanosti Umjetnosti Zagreb** 16: 35-44. 1964.

TORGERSON R.R., McNIVEN M.A. The actin-myosin cytoskeleton mediates reversible agonist-induced membrane blebbing. **Journal of Cell Science**. 111 (19): 2911-2922. 1998.

URI Genomics & Sequencing Center. Calculator for determining the number of copies of a template. 20/01/2004. Disponível em: <http://cels.uri.edu/gsc/cndna.html>. Acesso em 2014.

USGS. Fish Disease. Spring Viremia of Carp. U. S. Department of the Interior. 09/01/2013. Disponível em: <http://wfrc.usgs.gov/fieldstations/hq/svc.html>. Acesso em: 03 novembro 2015.

VIRAL ZONE. Rhabdoviridae. Swiss Institue of Bioinformatics (SIB). Disponível em: <http://viralzone.expasy.org/all_by_species/2.html>. Acesso em: 09 novembro 2015.

WALKER P.J., BENMANSOUR A., CALISHER C.H., DIETZGEN R., et al. Family Rhabdoviridae. The Seventh Report of the International Committee for Taxonomy of Viruses. F. C. M. van Regenmortel M.H.V., Bishop D.H.L., Carstens E.B. and 7 others. San Diego, CA, Academic Press**:** 563-583. 2000.

WALKER, P. J., WINTON J. R. Emerging viral diseases of fish and shrimp. **Vet Res** 41 (6): 51. 2010.

WARG J. V., DIKKEBOOM A.L., GOODWIN A.E., SNEKVIK K., WHITNEY J. Comparison of multiple genes of spring viremia of carp viruses isolated in the United States. **Virus Genes** 35 (1): 87-95. 2007.

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.** 25:1189–1191, 2009.

WOLF K. Viral hemorrhagic septicemia. **Fish Viruses and Fish Viral Diseases**. Ithaca, NY, Cornell University Press. 1988.

WUNNER W.H., CALISHER C.H., DIETZGEN R.G., JACKSON A.O., et al. Rhabdoviridae. **Arch Virol** 10: 275-288. 1995.

ZHANG N. Z., ZHANG L.F., JIANG Y.N., ZHANG T., XIA C. Molecular analysis of spring viraemia of carp virus in China: a fatal aquatic viral disease that might spread in East Asian. **PLoS One** 4 (7): e6337. 2009.

ZHANG Q. A review of viral diseases of aquatic animals in China. **Acta Hydrobiol Sin** 26: 89-101. 2002.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
Seção de Apoio Acadêmico

Ofício SCAPACAD/CEP/FZEA/026/2015
DSM/aas

Pirassununga, 26 de outubro de 2015.

Senhor Pesquisador,

De acordo com documento encaminhado na data de 29 de setembro de 2015, esta Comissão de Ética no Uso de Animais aprova a emenda, porém solicita que seja informada a vigência (início e término) do projeto intitulado: **"Detecção e caracterização moleculares do Vírus da Viremia Primaveril da Carpa em peixes das regiões nordeste e centro-leste do Estado de São Paulo."**, sob responsabilidade do Prof. Dr. Ricardo Luiz Moro de Sousa, baseando-se nos pareceres anteriormente emitidos e aprovados por esta mesma Comissão, a saber: Projeto intitulado "Detecção e caracterização de vírus da Família Iridoviridae em peixes e anfíbios das regiões nordeste e centro-leste do Estado de São Paulo.", processo **13.1.542.74.6**, considerando que não haverá alterações no manejo e no protocolo previamente submetidos.

Respeitosamente,

Profa. Dra. Daniele dos Santos Martins
Presidente do CEP FZEA/USP
junho/15 – junho/17

Professor Doutor Ricardo Luiz Moro de Sousa
MD Representante Docente do ZMV - FZEA

Av. Duque de Caxias Norte, 225 - 13635-900 – Pirassununga, SP
Fone: 19-3565.4254 - E-mail: cepfzea@usp.br