

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

SAMARA RITA DE LUCCA MAGANHA

**Estudos *in vitro* com estirpe brasileira de *Megalocytivirus* e
Lymphocystivirus: isolamento e caracterização fenogenotípica**

Pirassununga

2022

SAMARA RITA DE LUCCA MAGANHA

**Estudos in vitro com estirpe brasileira de *Megalocytivirus* e
Lymphocystivirus: isolamento e caracterização fenogenotípica**

Versão corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Doutora em Ciências do programa de Pós-Graduação em Biociência Animal.

Área de Concentração: Biociência Animal

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Luiz Moro de Sousa

Pirassununga

2022

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

M188e Maganha, Samara Rita de Lucca
Estudos in vitro com estirpe brasileira de
Megalocytivirus e Lymphocystivirus: isolamento e
caracterização fenogenotípica / Samara Rita de Lucca
Maganha ; orientador Ricardo Luiz Moro de Sousa. --
Pirassununga, 2022.
118 f.

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

1. Iridoviridae. 2. Cultivo celular. 3.
Propriedades físico-químicas. I. de Sousa, Ricardo
Luiz Moro, orient. II. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Diagnóstico molecular de infecções causadas Cyprinid herpesvirus 3 em peixes das regiões nordeste e centro-leste do Estado de São Paulo", protocolado sob o CEUA nº 6782040416, sob a responsabilidade de **Ricardo Luiz Moro De Sousa e equipe; Samara Rita De Lucca Maganha** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo - FZEA/USP em reunião de 22/06/2016.

We certify that the proposal "Molecular diagnosis of infections caused by Cyprinid herpesvirus 3 in fish from northeastern and central-eastern regions of Sao Paulo State", utilizing 350 Fishes (males and females), protocol number CEUA 6782040416, under the responsibility of **Ricardo Luiz Moro De Sousa and team; Samara Rita De Lucca Maganha** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes (or teaching) - it's in accordance with Law 11.794, of October 8 2008, Decree 6899, of July 15, 2009, with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Animal Science and Food Engineering of São Paulo University in the meeting of 06/22/2016.

Vigência da Proposta: de 04/2014 a 10/2016

Área: **Medicina Veterinária**

Procedência: **Não aplicável**

Espécie: **Peixes**

Gênero: **Machos e Fêmeas**

idade: **Não se aplica** N: **350**

Linhagem: **Diversas**

Peso: **Não se aplica**

Nota: Com a expansão da aquicultura mundial nos últimos anos, foram identificadas várias espécies de vírus responsáveis por epizootias de grande impacto ecológico e econômico em peixes de importância na aquicultura de várias partes do mundo. Entretanto, há uma deficiência de dados epidemiológicos relacionados à sanidade das espécies envolvidas. Diante do exposto, esse projeto tem como objetivo principal a investigação da presença de infecções causadas pelo vírus Cyprinid herpesvirus 3 em espécies de peixes do interior do estado de São Paulo. Para tanto, serão coletados espécimes em municípios das bacias hidrográficas dos rios Mogi Guaçu e Pardo, tanto de criações comerciais como em populações de vida livre. Os espécimes coletados serão caracterizados de acordo com a espécie e aspectos clínicos, e submetidos ao diagnóstico laboratorial molecular para infecções por Cyprinid herpesvirus 3. Posteriormente, será realizada a caracterização molecular das sequências genômicas detectadas, através de sequenciamento nucleotídico e análise filogenética. Acredita-se que os resultados obtidos nesse estudo poderão contribuir para a melhor compreensão da etiologia e epidemiologia das doenças virais em peixes, e também fornecer dados necessários para o desenvolvimento e estabelecimento de potenciais estratégias de controle das enfermidades causadas por membros da família Alloherpesviridae.

Pirassununga, 22 de junho de 2016



Daniele dos Santos Martins
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
Universidade de São Paulo

SAMARA RITA DE LUCCA MAGANHA

**Estudos *in vitro* com estirpe brasileira de *Megalocytivirus* e
Lymphocystivirus: isolamento e caracterização fenogenotípica**

Tese apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Doutora em Ciências do programa de Pós-Graduação em Biociência Animal.

Área de Concentração: Biociência Animal

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Luiz Moro de Sousa

Data da aprovação: 01/07/2022

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Ricardo Luiz Moro de Sousa – Presidente da Banca Examinadora
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - FZEA-USP

Profa. Dra. Lara Borges Keid
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - FZEA-USP

Prof. Dr. Marcos Lazaro Moreli
Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde - Universidade Federal de Jataí-GO

Prof. Dr. Adriano de Oliveira Torres Carrasco
Universidade Estadual do Centro-Oeste do Paraná – UNICENTRO-Guarapuava-PR

Dr. José Rodrigo Cláudio Pandolfi
EMPRAPA Suínos e Aves – Concórdia-SC

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus amados pais, EDNO JOSÉ MAGANHA e MARIA EMILIA DE LUCCA MAGANHA, pelo amor incondicional, por cada palavra de incentivo, por serem os melhores exemplos de fé e perseverança, por me mostrarem qual o caminho certo a seguir e por sempre me apoiarem em todas as minhas decisões.

AGRADECIMENTOS

Agradeço...

Primeiramente a Deus, minha força maior, que me deu força, sabedoria e muita saúde para correr atrás dos meus objetivos e que sempre colocou pessoas maravilhosas no meu caminho.

Em segundo lugar, mas não menos importante, aos meus queridos e amados pais, Edno José Maganha e Maria Emilia de Lucca Maganha, por me amarem de forma incondicional, pela paciência diária, por todos os conselhos, por acreditarem que eu sou capaz quando eu mesmo pensava em desistir, por serem meu ombro amigo durante todas as dificuldades, por me ajudarem em todos os aspectos, sejam eles emocionais ou financeiros, durante a minha caminhada na pós-graduação e por sonharem mais esse sonho junto comigo. Vocês são um verdadeiro presente de Deus na minha vida e moram no meu coração!

À todos os meus filhos de patas, em especial Logan, Naythan e Wave (*in memoriam*) por me mostrarem o verdadeiro significado do amor incondicional!

Ao querido Professor Doutor Ricardo Luiz Moro de Sousa, por ter me aberto as portas do laboratório há cerca de nove anos atrás, pelas demonstrações de fé, amizade, carinho, coragem, paciência e sabedoria, por ter me ouvido e me aconselhado nos momentos de dificuldade e de desânimo e por todo o imenso conhecimento transmitido, me permitindo crescer enquanto pessoa e enquanto profissional! Muito obrigado!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de doutorado.

Ao Professor Doutor Antônio Augusto Mendes Maia, pela confiança, amizade e por todos os ensinamentos, obrigado por me acolher na FZEA – USP e me apresentar ao Professor Ricardo.

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

Ao Pedro Henrique Magalhães Cardoso por ter cedido as amostras para a realização deste estudo.

Ao Laboratório de Higiene Zootécnica e Multiusuário de Microbiologia por ter sido a minha segunda casa, um ambiente acolhedor e que deu todo o suporte para a realização desse trabalho,

um lugar aconchegante onde pude passar grande parte do meu tempo durante a caminhada no doutorado.

À minha amiga Thaís Corrêa pela amizade incondicional, amizade essa que levo pra vida, por sempre me ouvir e me incentivar durante os momentos de desânimo, pelos momentos de “desabafo”, por acreditar no meu potencial e por compartilhar um pouco do seu enorme conhecimento comigo.

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

A todos os funcionários da FZEA-USP que colaboraram para a realização desse trabalho, em especial, Erica C. M. Ferraz, Paula F. M. Carrasco e toda a equipe do serviço de Pós-Graduação pela atenção e dedicação. À Vanessa Rodrigues e aos demais membros da biblioteca pela correção da tese e oferecimento de cursos.

Aos meus colegas de Pós-Graduação do Laboratório de Higiene Zootécnica e Multiusuário de Microbiologia, Juliana Navarro, Loiane Sampaio, Marisa França, Waldelucy Félix, Talita Lázaro, Nycolas Pereira e Marcelo Reis pela amizade, pelos bons momentos vividos e pelas ajudas com os “PCR” da vida.

A todos que, de alguma forma, me ajudaram, mesmo que de longe, para que esse sonho pudesse se tornar realidade, deixo aqui o meu MUITO OBRIGADA!

“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problema causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo.”

(Albert Einstein)

RESUMO

MAGANHA, S. R. de L. **Estudos in vitro com estirpe brasileira de *Megalocytivirus* e *Lymphocystivirus***: isolamento e caracterização fenogenotípica. 2022. 118f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2022.

O gênero *Megalocytivirus* está associado a ocorrência de surtos com altas taxas de mortalidade em peixes ao redor do mundo, causando graves perdas econômicas na produção aquícola mundial e limitando a maior expansão do setor. Já o gênero *Lymphocystivirus*, embora não esteja associado a altas taxas de mortalidade, causa graves perdas econômicas para a aquicultura mundial ao prejudicar a aparência do animal, alterando assim o seu valor comercial. Desse modo, o presente estudo objetivou o isolamento e a caracterização fenogenotípica das estirpes brasileiras de *Megalocytivirus* e *Lymphocystivirus*. Para tanto, *pools* de tecidos de peixes ornamentais sabidamente positivos para os dois vírus foram inoculados em células BF-2, posteriormente foi realizada a reconstrução filogenética para ambos os isolados com base em um fragmento do gene MCP, caracterização viral através da realização dos testes de sensibilidade a solvente lipídico, pH, temperatura e descongelamento bem como a construção da curva de replicação viral e para *Megalocytivirus* incluiu-se a caracterização morfológica por microscopia eletrônica de transmissão. Os resultados indicaram que a estirpe brasileira de *Megalocytivirus* apresenta uma população de vírions majoritariamente envelopados, é sensível a temperatura de 56°C e aos valores de pHs de 2,0 e 10,0. A técnica de microscopia eletrônica de transmissão revelou a presença de partículas hexagonais no citoplasma celular compatíveis com o formato icosaédrico de *Megalocytivirus*. O isolado brasileiro de *Megalocytivirus* agrupou-se com outros isolados descritos como pertencentes ao genótipo I. Os resultados para a estirpe brasileira de *Lymphocystivirus* revelaram uma população de vírions majoritariamente envelopados, sensível a temperatura de 56°C, aos valores de pHs de 2,0 e 12,0, sendo susceptível a alterações no título viral quando descongelado por sucessivas vezes. O isolado brasileiro de *Lymphocystivirus* agrupou-se com outros isolados descritos como pertencentes ao genótipo V. A curva de replicação viral para os isolados demonstrou que o aumento no título viral acompanha a progressão do efeito citopático, alcançando o maior valor de TCID₅₀.ml⁻¹ para *Megalocytivirus* no quarto dia pós inoculação e, para *Lymphocystivirus*, no quinto dia pós inoculação. Os resultados obtidos fornecem subsídios importantes para estudos posteriores nas áreas de controle e prevenção das infecções causadas por vírus desses grupos.

Palavras-chave: *Iridoviridae*. Cultivo celular. Propriedades físico-químicas

ABSTRACT

MAGANHA, S. R. de L. *In vitro* studies with Brazilian strain of *Megalocytivirus* and *Lymphocystivirus*: isolation and phenogenotypic characterization. 2022. 118f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2022.

The genus *Megalocytivirus* is associated with the occurrence of outbreaks with high mortality rates in fish around the world, causing serious economic losses in the world aquaculture and limiting the greater expansion of the sector. Although the genus *Lymphocystivirus* isn't associated with high mortality rates, it causes great economic losses for the world aquaculture by impairing the animal's appearance and altering its commercial value. Thus, the present study aims the isolation and phenogenotypic characterization of the Brazilian strain of *Megalocytivirus* and *Lymphocystivirus*. For this purpose, pools of ornamental fish tissues known to be positive for *Megalocytivirus* and *Lymphocystivirus* were used for isolation in BF-2 cells. After confirmation of the isolation, viral characterization was carried out in the same cell line including morphological characterization by transmission electronic microscopy for *Megalocytivirus* and the tests of sensitivity to lipid solvent, pH, temperature and thawing as well as the construction of viral growth curve for *Megalocytivirus* and *Lymphocystivirus*. The results indicated that the Brazilian *Megalocytivirus* strain has a population of enveloped virions, is heat labile (56°C), sensible to pH values of 2,0 and 10,0 and clustered with other isolates described as belonging to the genotype I. Transmission electron microscopy revealed the presence of hexagonal particles in the cell cytoplasm designed with the icosahedral shape of *Megalocytivirus*. The results for Brazilian *Lymphocystivirus* strain revealed a population of enveloped virions, heat labile (56°C), sensible to pH values of 2.0 and 12.0, being susceptible to changes in viral titer when thawed successively, and clustered with other isolates described as belonging to the genotype V. The growth curve demonstrated that the increase in viral titres accompanies the progression of the cytopathic effect, reaching the highest value of TCID₅₀.ml⁻¹ for *Megalocytivirus* on the fourth day post inoculation and for *Lymphocystivirus* on the fifth day post inoculation. The results obtained provide important subsidies for further studies in the areas of control and prevention of infections caused by viruses from these groups.

Keywords: *Iridoviridae*. Cell culture. Physicochemical properties.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Efeito citopático obtido a partir da inoculação da primeira passagem do inóculo viral de *Megalocytivirus* oriundo do *pool* de tecidos de peixe ornamental *Poecilia reticulata*.....65
- Figura 2** – Controle negativo de células BF-2 obtido a partir da adição de meio de manutenção 2% SFB.....66
- Figura 3** – Efeito citopático obtido a partir da inoculação da quarta passagem do inóculo viral de *Megalocytivirus* oriundo do *pool* de tecidos de peixe ornamental *Poecilia reticulata*.....66
- Figura 4**–Efeito citopático obtido para a primeira passagem do inóculo viral de *Lymphocystivirus* oriundo da lesão de pele de peixe ornamental *Pomacanthus xanthometopon*.....67
- Figura 5** –Controle negativo de células BF-2 obtido a partir da adição de meio de manutenção 2% SFB.....68
- Figura 6** – Efeito citopático obtido para a segunda passagem do inóculo viral de *Lymphocystivirus* oriundo da lesão de pele de peixe ornamental *Pomacanthus xanthometopon* (aumento 200 X)69
- Figura 7** – Fotografia de gel de agarose a 1,5% corado com SYBR® Gold, sob luz UV, ilustrando resultados de amplificação de fragmento de 369pb, obtidos a partir do DNA extraído da terceira passagem do inóculo viral através da técnica de *nested-PCR*, relativo ao gene MCP do genoma de *Megalocytivirus*.....70

Figura 8 - Fotografia de gel de agarose a 1,5% corado com SYBR® Gold, sob luz UV, ilustrando resultados de amplificação de fragmento de 250pb relativo ao gene MCP de <i>Lymphocystivirus</i> obtido a partir do DNA extraído da terceira passagem do inóculo viral.....	71
Figura 9 - Fotografia de gel de agarose a 1,5% corado com SYBR® Gold, sob luz UV, ilustrando resultados da amplificação dos fragmentos de 542pb e 512pb relativos ao gene MCP de <i>Lymphocystivirus</i> obtidos a partir do DNA extraído da terceira passagem do inóculo viral.....	72
Figura 10 – Reconstrução filogenética para o isolado brasileiro e outras cepas de referência de <i>Megalocytivirus</i> , baseada no alinhamento de sequências nucleotídicas de 369pb do gene MCP.....	74
Figura 11 – Reconstrução filogenética para o isolado brasileiro e outras cepas de referência de <i>Lymphocystivirus</i> , baseada no alinhamento de sequências nucleotídicas de 512pb do gene MCP.....	76
Figura 12 – Fotomicrografia eletrônica de transmissão das células BF-2 inoculadas com a quinta passagem do inóculo viral de <i>Megalocytivirus</i> 24h após inoculação.....	78
Figura 13 – Fotomicrografia eletrônica de transmissão das células BF-2 inoculadas com a quinta passagem do inóculo viral 24h após inoculação.....	79
Figura 14 – Monocamada de células BF-2 inoculada com a quinta passagem do inóculo viral de <i>Megalocytivirus</i> nos tempos 12h, 24h e 36h após inoculação.....	87
Figura 15 – Monocamada de células BF-2 inoculada com a quinta passagem do inóculo viral de <i>Megalocytivirus</i> nos tempos 48h, 72h e 96h após inoculação.....	88
Figura 16 – Monocamada de células BF-2 inoculada com a quinta passagem do inóculo viral de <i>Megalocytivirus</i> no tempo 72h após inoculação (aumento 200X)	89

- Figura 17** – Monocamada de células BF-2 inoculada com a segunda passagem do inóculo viral de *Lymphocystivirus* nos tempos 24h, 48h e 72h após inoculação.....91
- Figura 18** – Monocamada de células BF-2 inoculada com a quinta passagem do inóculo viral de *Lymphocystivirus* nos tempos 96h e 120h após inoculação.....92
- Figura 19** – Monocamada de células BF-2 inoculada com a segunda passagem do inóculo viral de *Lymphocystivirus* no tempo 96h após inoculação (aumento 200X).....93

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1** – *Primers* utilizados na obtenção de produtos de PCR relativos ao gene MCP de *Megalocytivirus*.....50
- Quadro 2** – *Primers* utilizados na obtenção de produtos de PCR relativos ao gene MCP de *Lymphocystivirus*.....51
- Quadro 3** – *Primers* utilizados na obtenção de produtos de PCR relativos ao gene MCP de *Lymphocystivirus*.....51
- Quadro 4** – Sequências nucleotídicas de *Megalocytivirus* utilizadas para a reconstrução filogenética com indicação do genótipo, números de acesso no GenBank, isolado e país de origem.....55
- Quadro 5** – Sequências nucleotídicas de *Lymphocystivirus* utilizadas para reconstrução filogenética com indicação do genótipo, números de acesso no GenBank, isolado e país de origem.....56
- Quadro 6** – Valores de título viral (TCID₅₀.ml⁻¹) obtidos a partir da incubação da quinta passagem do inóculo viral de *Megalocytivirus* em diferentes temperaturas.....83
- Quadro 7** – Valores de título viral (TCID₅₀.ml⁻¹) obtidos a partir da incubação da segunda passagem do inóculo viral de *Lymphocystivirus* em diferentes temperaturas.....83
- Quadro 8** – Valores de título viral (TCID₅₀.ml⁻¹) obtidos a partir da incubação da quinta passagem do inóculo viral de *Megalocytivirus* em diferentes pHs.....84
- Quadro 9** – Valores de título viral (TCID₅₀.ml⁻¹) obtidos a partir da incubação da segunda passagem do inóculo viral de *Lymphocystivirus* em diferentes pHs.....85
- Quadro 10** – Valores de título viral (TCID₅₀.ml⁻¹) obtidos em função do tempo para a construção da curva de replicação viral para *Megalocytivirus*.....86

Quadro 11 – Valores de título viral ($\text{TCID}_{50}.\text{ml}^{-1}$) obtidos em função do tempo para a construção da curva de replicação viral para *Lymphocystivirus*.....90

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** – Curva de replicação viral obtida para o isolado brasileiro de *Megalocytivirus* nos diferentes tempos a partir da inoculação da quinta passagem do inóculo viral.....86
- Gráfico 2** – Curva de replicação viral obtida para o isolado brasileiro de *Lymphocystivirus* nos diferentes tempos a partir da inoculação da segunda passagem do inóculo viral...90

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALIV - African Lampeye Iridovirus

ATCC – American Type Culture Collection

BF-2 – Bluegill fry-2(Linhagem celular)

bmGF-1 – Brown-marbled Grouper fin (Linhagem celular)

bmGH – Brown-marbled Grouper heart (Linhagem celular)

CO₂ – Dióxido de carbono

COX – Cicloxigenase

CRF-1 – Clonal red sea bream fin (Linhagem celular)

CSEC – *Cynoglossus Semilaevis* Embryonic Cell (Linhagem celular)

CSGC – *Cynoglossus Semilaevis* Gonad Cell (Linhagem celular)

DGIV – Dwarf Gourami Iridovirus

DNA – Deoxyribonucleic Acid (Ácido Desoxirribonucleico)

dNTP –Deoxynucleotide triphosphate (Desoxirribonucleotídeo Fosfatado)

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

FLIV – Flounder Iridovirus

GCO – Grass carp ovary (Linhagem celular)

GCK – Grass carp kidney (Linhagem celular)

GF – Grunt Fin (Linhagem celular)

GSIV – Giant seaperch iridovirus

GSDIV –Grouper sleepy disease iridovirus

ICTV – International Committee on Taxonomy of Viruses (Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus)

ISKNV – Infectious Spleen and Kidney Necrosis Virus

JAK-1 – Janus Kinase-1

KRE-3 – Kelp and Red spotted grouper Embryo-3 (Linhagem celular)

LCDV – *Lymphocystis disease virus*

LYCIV – Large Yellow Croaker Iridovirus

MCIV – Murray Cod Iridovirus

MCP – Major Capsid Protein (Proteína principal do capsídeo)

MFF-1 – Mandarin Fish Fry-1 (Linhagem celular)

MEM - Minimum Essential Medium (Meio de Cultivo)

MgCl₂ – Cloreto de Magnésio

MV – *Megalocytivirus*

OFLIV – Olive Flounder Iridovirus

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

OSGIV – Orange-Spotted Grouper Iridovirus

pb – Par de bases

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

qPCR - Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction (PCR quantitativo em tempo real)

RNA – Ribonucleic Acid (Ácido Ribonucleico)

RSIV – Red Sea Bream Iridovirus

RBIV – Rock Bream Iridovirus

SAF-1 – *Sparus aurata* fibroblast (Linhagem celular)

SBIV – Sea Bass Iridovirus

SFB – Soro Fetal Bovino

SFL – Stone flounder liver cells (Linhagem celular)

TAE – Tampão Tris-Acetato-EDTA

TCID₅₀-50% Tissue Culture Infective Dose

TGIV – Taiwan Grouper Iridovirus

TRBIV – Turbot Reddish Body Iridovirus

TSHKC – Tong Sole Head Kidney Cell (Linhagem celular)

TSIV –Threespine Stickleback Iridovirus

UV - Ultravioleta

LISTA DE SÍMBOLOS

% - Por cento

°C – Grau Celsius

mg – Miligrama

mL - Mililitro

mM - Milimolar

ng – Nanograma

pH – Potencial hidrogeniônico

μL – Microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	24
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	27
2.1	Aquicultura Global	27
2.2	Aquicultura Brasileira	29
2.3	Peixes ornamentais	31
2.4	Família Iridoviridae	32
2.5	Gênero <i>Megalocytivirus</i>	33
2.6	Gênero <i>Lymphocystivirus</i>	37 36
2.7	Estudos <i>in vitro</i>	39
2.8	Linhagens Celulares para <i>Megalocytivirus</i>	41
2.9	Linhagens Celulares para <i>Lymphocystivirus</i>	42
3	JUSTIFICATIVA	43 42
4	OBJETIVOS	45 44
4.1	Objetivo geral	45 44
4.2	Objetivos específicos	45 44
5	MATERIAL E MÉTODOS	46 45
5.1	Amostras de tecido	46 45
5.1.1	<i>Megalocytivirus</i>	46 45
5.1.2	<i>Lymphocystivirus</i>	46
5.2	Isolamento viral	47 46
5.2.1	<i>Megalocytivirus</i>	47 46
5.2.1	<i>Lymphocystivirus</i>	48
5.3	Extração de DNA	49
5.3.1	<i>Megalocytivirus</i>	49
5.3.2	<i>Lymphocystivirus</i>	49
5.4	PCR para confirmação do isolamento e identificação do isolado	50 49
5.4.1	Primers	50 49
5.4.2	PCR e <i>nested</i> -PCR	51
5.4.3	Sequenciamento de nucleotídeos	53
5.5	Análise Filogenética	54
5.5.1	<i>Megalocytivirus</i>	54

5.5.2	<i>Lymphocystivirus</i>	55
5.6	Microscopia Eletrônica de Transmissão	57
5.6.1	<i>Megalocytivirus</i>	57
5.7	Determinação do título viral (TCID₅₀.ml⁻¹)	58
5.7.1	<i>Megalocytivirus</i>	58
5.7.2	<i>Lymphocystivirus</i>	59 58
5.8	Sensibilidade ao descongelamento	59
5.8.1	<i>Megalocytivirus</i>	59
5.8.2	<i>Lymphocystivirus</i>	60 59
5.9	Susceptibilidade ao éter	60 59
5.9.1	<i>Megalocytivirus</i>	60
5.9.2	<i>Lymphocystivirus</i>	60
5.10	Susceptibilidade ao clorofórmio	61 60
5.10.1	<i>Megalocytivirus</i>	61 60
5.10.2	<i>Lymphocystivirus</i>	61 60
5.11	Susceptibilidade a luz ultravioleta	61
5.11.1	<i>Megalocytivirus</i>	61
5.11.2	<i>Lymphocystivirus</i>	62 61
5.12	Sensibilidade ao calor	62 61
5.12.1	<i>Megalocytivirus</i>	62 61
5.12.2	<i>Lymphocystivirus</i>	62
5.13	Susceptibilidade a diferentes pHs	63 62
5.13.1	<i>Megalocytivirus</i>	63 62
5.13.2	<i>Lymphocystivirus</i>	63
5.14	Curva de Replicação	64 63
5.14.1	<i>Megalocytivirus</i>	64 63
5.14.2	<i>Lymphocystivirus</i>	64
6	RESULTADOS	65 64
6.1	Isolamento viral	65 64
6.1.1	<i>Megalocytivirus</i>	65 64
6.1.2	<i>Lymphocystivirus</i>	67 66
6.2	PCR para confirmação do isolamento	69
6.2.1	<i>Megalocytivirus</i>	69

6.2.2	<i>Lymphocystivirus</i>	70
6.3	Sequenciamento nucleotídico e alinhamento de seqüências	73
6.3.1	<i>Megalocytivirus</i>	73
6.3.2	<i>Lymphocystivirus</i>	73
6.4	Análise Filogenética e de Similaridade	73
6.4.1	<i>Megalocytivirus</i>	73
6.4.2	<i>Lymphocystivirus</i>	75
6.5	Microscopia eletrônica de transmissão	77
6.6	Determinação do título viral	80
6.6.1	<i>Megalocytivirus</i>	80
6.6.2	<i>Lymphocystivirus</i>	80
6.7	Sensibilidade ao descongelamento	80
6.7.1	<i>Megalocytivirus</i>	80
6.7.2	<i>Lymphocystivirus</i>	80
6.8	Sensibilidade ao éter	81
6.8.1	<i>Megalocytivirus</i>	81
6.8.2	<i>Lymphocystivirus</i>	81
6.9	Sensibilidade ao clorofórmio	81
6.9.1	<i>Megalocytivirus</i>	81
6.9.2	<i>Lymphocystivirus</i>	82
6.10	Sensibilidade a luz ultravioleta	82
6.10.1	<i>Megalocytivirus</i>	82
6.10.2	<i>Lymphocystivirus</i>	82
6.11	Sensibilidade ao calor	82
6.11.1	<i>Megalocytivirus</i>	82
6.11.2	<i>Lymphocystivirus</i>	83
6.12	Susceptibilidade a diferentes pHs	83
6.12.1	<i>Megalocytivirus</i>	83
6.12.2	<i>Lymphocystivirus</i>	84
6.13	Curva de Replicação	85
6.13.1	<i>Megalocytivirus</i>	85
6.12.1	<i>Lymphocystivirus</i>	89
7	DISCUSSÃO	94

7.1	<i>Megalocytivirus</i>	94
7.2	<i>Lymphocystivirus</i>	100
8	CONCLUSÕES	<u>104</u> 103

1 INTRODUÇÃO

A aquicultura é uma prática antiga e bem dinâmica que envolve o cultivo de mais de 600 espécies de organismos aquáticos, de modo que a garantia de qualidade dos produtos ofertados é um passo essencial para o crescimento do setor. É considerada o setor, dentro das principais áreas de produção de alimentos, com maior expansão mundial.

A aquicultura brasileira também é considerada um setor promissor devido ao seu rápido crescimento, sendo essa expansão favorecida pela grande disponibilidade de recursos hídricos existentes no país. O crescimento aquícola brasileiro é considerado satisfatório pois promove o desenvolvimento sustentável e melhora qualidade de vida da população.

Como qualquer setor com rápido crescimento, a aquicultura está susceptível a ocorrência de eventos desfavoráveis como o aparecimento de doenças, principalmente aquelas causadas por infecções virais. A ocorrência de doenças, associadas a condições climáticas desfavoráveis, gera graves perdas econômicas e representa um entrave para a maior expansão do setor.

Os vírus são seres abundantes no ambiente aquícola e nos últimos anos vem gerando intensa preocupação internacional devido a emergência de viroses associadas a ocorrência de altas taxas de mortalidade entre os animais infectados. Na maioria dos casos, o diagnóstico é tardio e deficiente, gerando graves perdas econômicas para os diversos setores da aquicultura mundial.

Além da questão econômica, destacam-se também as questões ambientais e sociais, pois a ocorrência de surtos pode promover a extinção de espécies selvagens, além de reduzir a oferta de alimentos a base de peixes, com consequente aumento do preço dos produtos comercializados.

Entre os principais vírus emergentes responsáveis por epizootias de grande impacto em diversas espécies de peixes na aquicultura mundial podemos destacar os vírus pertencentes à família *Iridoviridae*, subfamília *Alphairidovirinae*.

A família *Iridoviridae* compreende 5 gêneros virais denominados *Iridovirus*, *Ranavirus*, *Megalocytivirus*, *Lymphocystivirus* e *Chloriridovirus*, sendo os gêneros pertencentes a subfamília *Alphairidovirinae* (*Megalocytivirus*, *Lymphocystivirus* e *Ranavirus*) de grande impacto para a aquicultura mundial. Os gêneros *Megalocytivirus* e *Ranavirus* estão relacionados à ocorrência de infecções sistêmicas caracterizadas por uma inespecificidade de sinais clínicos, dificultando assim o diagnóstico precoce da doença. Em caso de surtos, as taxas de mortalidade em decorrência desses dois gêneros podem chegar a 100% dos animais. Já os

vírus pertencentes ao gênero *Lymphocystivirus*, embora não apresentem uma alta taxa de mortalidade, também estão associados a graves perdas econômicas na aquicultura, pois comprometem a aparência e o crescimento dos peixes, reduzindo assim o seu valor comercial.

O gênero *Megalocytivirus* apresenta uma ampla distribuição mundial e uma grande variedade de hospedeiros, podendo acometer tanto peixes de água doce como de água salgada levando à morte espécimes de peixes ornamentais, selvagens e de interesse zootécnico. A ocorrência de surtos é mais comum no verão, mas não é restrita a esta estação do ano, sendo a infecção relacionada principalmente à temperatura da água dos tanques e rios.

Dentro do gênero *Megalocytivirus* reconhece-se, com base na proteína principal do capsídeo, a existência de pelo menos 3 genótipos, sendo que existe uma relação estrita entre o isolado e a região geográfica de onde foram obtidas as amostras.

Os animais acometidos por *Megalocytivirus* apresentam sinais clínicos como natação irregular, anorexia, exoftalmia e letargia. Necrópsias dos animais infectados revelam a presença de focos de lesões hemorrágicas e hepatoesplenomegalia.

O gênero *Lymphocystivirus* também se encontra distribuído mundialmente, acometendo tanto peixes de água doce como de água salgada. Atualmente, com base na proteína principal do capsídeo, propõe-se a existência de pelo menos nove genótipos para o gênero.

Os animais acometidos apresentam o crescimento de nódulos hipertróficos semelhantes a tumores ao longo da sua superfície corporal, atingindo principalmente as brânquias e as nadadeiras do animal. Embora raro, em alguns casos pode ocorrer o acometimento de órgãos internos como coração, baço, fígado, intestino, estômago, cérebro e olhos.

Os surtos de *Lymphocystivirus* ocorrem predominantemente no mês de novembro, quando a temperatura da água permanece próxima a 20°C e geralmente está associado a condições estressantes para os animais, como alta densidade populacional, condições ambientais desfavoráveis, má qualidade da água e práticas de manejo incorretas.

A principal forma de transmissão do vírus é pela via horizontal, através do contato direto de animais sadios com portadores assintomáticos do vírus ou por meio do contato direto entre peixes sadios e doentes. Já foram descritas também a transmissão por via oral, através da ingestão de alimentos contaminados bem como a ocorrência de transmissão vertical.

Embora existam diversos relatos de isolados de *Megalocytivirus* e *Lymphocystivirus* descritos ao redor do mundo, inclusive em peixes ornamentais brasileiros, pouco ainda se conhece sobre as propriedades biológicas e físico-químicas dessas partículas virais, dificultando assim o estabelecimento de medidas efetivas de controle e prevenção da doença.

Para o gênero *Megalocytivirus* encontra-se disponível comercialmente apenas uma vacina específica para a prevenção do genótipo *Red seabream iridovirus*. Já para o gênero *Lymphocystivirus*, embora existam pesquisas relacionadas a vacinas de DNA por via oral entre outras, ainda não existe nenhuma vacina disponível comercialmente para a prevenção da infecção viral.

Na atualidade, a utilização de linhagens celulares como modelos biológicos para estudo das infecções virais é extremamente útil, devido a constante necessidade em se reduzir a utilização dos animais de experimentação. Além disso, a utilização de cultura de células apresenta diversas vantagens quando comparada com modelos animais, principalmente com relação ao custo, espaço físico, manipulação, reprodutibilidade e influência da composição genética dos indivíduos.

O isolamento viral em cultivo celular constitui uma ferramenta de diagnóstico extremamente relevante, confirmando a presença do vírus em animais assintomáticos. Entretanto, a obtenção de resultados satisfatórios depende essencialmente da escolha correta da linhagem celular a ser utilizada.

Entre os membros da família *Iridoviridae*, o gênero *Ranavirus* é considerado de fácil isolamento em cultivo celular; entretanto, os gêneros *Megalocytivirus* e *Lymphocystivirus* são classificados como de difícil isolamento, o que limita bastante a pesquisa relacionada a estes dois gêneros virais.

Dessa forma, torna-se necessária a realização de estudos mais detalhados envolvendo o isolamento e a caracterização fenogenotípica das estirpes brasileiras de *Megalocytivirus* e *Lymphocystivirus*, conforme proposto e desenvolvido no presente trabalho.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aquicultura Global

A aquicultura tradicional é uma prática antiga cujos relatos já existiam na China pré-Feudal há pelo menos 4.000 anos atrás (OLIVEIRA et al., 2009; WALKER; WINTON, 2010). Existem evidências históricas encontradas em documentos e manuscritos chineses que são datadas de séculos remotos (OLIVEIRA et al., 2009). Até no Antigo Testamento da Bíblia, existem relatos de lagoas rudimentares voltadas para a criação de peixes, revelando que se trata de uma prática antiga (WALKER; WINTON, 2010).

A aquicultura compreende o cultivo de mais de 600 espécies de organismos aquáticos incluindo peixes, anfíbios, crustáceos, moluscos e plantas aquáticas, de modo que a garantia de qualidade dos produtos ofertados é um passo essencial para o crescimento do setor e redução das perdas econômicas (OLIVEIRA et al., 2009; TROELL et al., 2014; OTTINGER; CLAUSS; KUENZER, 2016).

A aquicultura caracteriza-se por ser um sistema bem dinâmico com uma enorme diversidade de espécies, uma grande variedade de sistemas de produção e uma alta versatilidade quanto ao ambiente de produção incluindo cultivo de animais em água doce, salgada e salobra (WALKER; WINTON, 2010).

A aquicultura é considerada o setor, dentro das principais áreas de produção de alimentos, com maior expansão mundial (FAO, 2022). No ano de 2020, foram produzidos mundialmente 178 milhões de toneladas de animais aquáticos, movimentando um mercado da ordem de 151 bilhões de dólares e gerando emprego para mais de 58 milhões de pessoas (FAO, 2022). Nesse sentido, destaca-se o importante papel da aquicultura que foi responsável pela produção de 122 milhões de toneladas do total de organismos aquáticos produzidos, movimentando um capital da ordem de 281 bilhões de dólares (FAO, 2022)

No ano de 2020, a produção mundial de peixes atingiu a marca de 178 milhões de toneladas, dos quais 157 milhões de toneladas foram destinadas para o consumo humano. Neste contexto, destaca-se o papel importante da aquicultura que foi responsável pela produção de 49% do total que foi comercializado e de 56% dos peixes destinados ao consumo humano (FAO, 2022). Nesse ano, a aquicultura mundial foi responsável pela produção de mais de 88

milhões de toneladas de peixes em peso vivo, movimentando um capital da ordem de 265 bilhões de dólares (FAO, 2022).

Associado a rápida expansão da aquicultura, observou-se também um aumento no consumo de peixe pela população que passou de 9,0kg em 1961 para 20,5 kg por pessoa em 2019 (FAO, 2022). Além disso, apenas no ano de 2019, as proteínas de peixes representaram mais de 17% do total de proteínas de origem animal ingeridas pela população de baixa renda nos diversos países (FAO, 2022). Mundialmente, para mais de 3,3 bilhões de pessoas, as proteínas oriundas de organismos aquáticos representam 20% do total de proteínas animais ingeridas, sendo os peixes, portanto, importante fonte proteica para a população (FAO, 2022). Devemos ressaltar que, ao consumir 150g de peixe diariamente, um indivíduo adulto supre entre 50-60% de suas necessidades diárias de proteínas, além de estar ingerindo uma grande quantidade de micronutrientes essenciais para a saúde (FAO, 2014; BÉNÉ et al., 2015). Além da importância nutricional, a produção de peixes pela aquicultura está associada à redução da pobreza por meio da geração de empregos e aumento na participação dos lucros (GOSTESMAN et al., 2013; TOUFIQUE; BELTON, 2014).

A Ásia domina o cenário aquícola mundial, sendo que nas últimas 2 décadas este continente foi responsável por quase 90% de tudo o que foi produzido pela aquicultura mundial (FAO, 2022). Estima-se que a produção aquícola asiático alcance 165 milhões de toneladas em 2030, representando um crescimento de 35,8% quando comparada ao cenário atual (FAO, 2018). A China, embora apresente um declínio na sua produção aquícola, ainda permanece como o maior produtor de peixes para consumo humano (FAO, 2018). Apenas no ano de 2016, o país alcançou a marca de 71,5 milhões de toneladas de peixes produzidos, 89,4% do total de produtos oriundos da aquicultura mundial (FAO, 2018).

A rápida expansão da aquicultura é vista de maneira satisfatória já que está relacionada a vários benefícios sociais e econômicos como aumento na oferta global de proteína, redução na lacuna existente entre a oferta e a procura por alimentos à base de peixes, aumento na geração de empregos, redução da pobreza e garantia de qualidade dos produtos ofertados (BOISON; TURNIPSEED, 2015; OTTINGER; CLAUSS; KUENZER, 2016). Vale ressaltar também que o aumento na oferta de peixes está associado a uma redução no preço de mercado dos produtos ofertados, tornando esses produtos acessíveis a uma parcela maior da população (TOUFIQUE; BELTON, 2014).

Neste contexto, atualmente, a prática da aquicultura está se estabelecendo como atividade de relevância zootécnica cada vez mais, inclusive no Brasil, onde é exercida em todo o país (CAVALLI; DOMINGUES; HAMILTON, 2011).

2.2 Aquicultura Brasileira

No Brasil, a aquicultura é vista como um setor promissor baseado no elevado crescimento constatado (FAO, 2006; FIGUEIREDO; LEAL, 2008). Em 10 anos, no período de 2005 a 2015, a produção aquícola brasileira cresceu mais de 120% passando de 257 mil para 574 mil toneladas de pescado produzidas (EMBRAPA, 2016).

O rápido crescimento está associado à grande disponibilidade de recursos hídricos existentes no país que apresenta dimensões continentais e uma extensa costa marítima (8.400 Km), além de abrigar 12% do total de reservatórios de água doce do mundo (SAINT-PAUL, 2017; EMBRAPA, 2018). Vale ressaltar também que dos 26 estados brasileiros, pelo menos 15 deles fazem fronteira com o Oceano Atlântico (SAINT-PAUL, 2017) e todos os demais estados encontram-se banhados por rios.

O crescimento aquícola brasileiro é considerado satisfatório pois promove desenvolvimento sustentável, melhora a renda da população, gera mais empregos, amplia a oferta de produtos a base de peixes e permite a exploração de regiões ainda desconhecidas do território brasileiro (BRASIL, 2011; FAO, 2006; FIGUEIREDO; LEAL, 2008).

No início, a aquicultura brasileira era voltada para a produção de espécies de peixes internacionais como a carpa (*Cyprinus carpio*), espécie ornamental e a tilápia (*Oreochromis spp.*), espécie comercial, mas nos últimos anos vem intensificando a produção de espécies nativas de peixes voltadas para o consumo pelo mercado interno (PINCINATO; ASCHE, 2016; SAINT-PAUL, 2017).

Entretanto, como qualquer setor com rápida expansão, está susceptível ao aparecimento de doenças que, associadas a condições ambientais adversas, podem levar a graves perdas econômicas para o setor (BOISON; TURNIPSEED, 2015; QUESADA; PASCHOAL; REYES, 2013).

O surgimento das doenças nos tanques aquícolas está relacionado a condições estressantes para os animais como alterações bruscas na temperatura e no pH da água, práticas de manejo incorretas, deficiência nutricional, elevada população de animais por tanque, condições ambientais desfavoráveis e má qualidade da água dos tanques, favorecendo assim a infecção dos animais por microrganismos causadores de doenças (KUBITZA et al., 2013; MARTINS et al., 2000, 2001, 2002; QUESADA; PASCHOAL; REYES, 2013; ROBERTS; BULLOCK, 1980; SCHALCH et al., 2005; SANT´ANA et al., 2012; TAVARES-DIAS, 2011; TAVARES-DIAS; MARTINS, 2017).

Devido à grande dimensão do território brasileiro, existe uma escassez de dados sobre as perdas econômicas geradas por doenças na aquicultura; entretanto, estima-se que o país perca anualmente cerca de 84 milhões de dólares em decorrência de doenças. Dessa forma, as perdas econômicas geradas por enfermidades representam 15% do total de peixes cultivados (TAVARES-DIAS; MARTINS, 2017). Embora com o crescimento populacional a demanda por proteínas tenha se elevado significativamente nos últimos anos, as perdas econômicas representam um entrave para a maior expansão do setor aquícola brasileiro (TAVARES-DIAS; MARTINS, 2017).

Além do impacto econômico, o aparecimento de doenças tornou-se uma preocupação mundial visto que estão associadas a um aumento no risco de extinção de espécies selvagens bem como predadores naturais, causando graves desequilíbrios ambientais (UCHUII et al., 2013; WALKER; WINTON, 2010).

Os vírus são abundantes no planeta há milhões de anos e no ambiente aquático esta realidade não é diferente, sendo que os vírus representam a maior população, em termos de biomassa dos oceanos. Acredita-se que cada mililitro de água salgada da superfície do mar contenha da ordem de 10^7 partículas virais (ALAVANDI; POORNIMA, 2012; BREITBART, 2012).

A emergência de vírus causadores de enfermidades nos diversos ambientes, incluindo no ambiente aquático, é vista de maneira preocupante, pois as doenças associadas à maioria destes agentes apresentam diagnóstico difícil e tardio (ALAVANDI; POORNIMA, 2012). Os diagnósticos geralmente são realizados após a ocorrência de surtos com altas taxas de mortalidade e mesmo assim, em muitos casos, o agente causador da doença permanece desconhecido (ALAVANDI; POORNIMA, 2012).

Dessa forma, existe uma constante preocupação da comunidade científica internacional em conhecer as diversas espécies de vírus presentes no ambiente aquático e as doenças associadas, mesmo em condições de saúde aparente, destacando o papel importante de reservatórios naturais das espécies cultivadas na aquicultura (ALAVANDI; POORNIMA, 2012).

Entre as principais famílias virais responsáveis por mortes em organismos aquáticos, especialmente de peixes, está a família *Iridoviridae* e seus gêneros *Megalocytivirus* e *Ranavirus*.

2.3 Peixes ornamentais

A indústria de peixes ornamentais engloba o comércio de peixes, invertebrados e plantas do meio aquático. Trata-se do setor da piscicultura que envolve as mais diferentes espécies de peixes, empregando direta ou indiretamente uma grande quantidade de pessoas (KING, 2019).

Cerca de 90% dos peixes ornamentais de água doce comercializados anualmente são provenientes de produção em cativeiros; entretanto, para as espécies marinhas observa-se um predomínio da pesca de captura (WHITTINGTON; CHONG, 2007).

Este tipo de indústria tem gerado intensos debates na comunidade científica internacional (KING et al., 2019; RAGHAVAN et al., 2013). Alguns acreditam que a prática do comércio de peixes ornamentais está relacionada a uma cultura de exploração não sustentável podendo causar graves impactos na biodiversidade mundial (COHEN; VALENTI; CALADO, 2013; KING et al., 2019). Outros defendem a ideia de que se o comércio de peixes ornamentais for realizado com consciência de forma controlada e sustentável pode agregar muito em termos de economia e biodiversidade (KING et al., 2019; TLUSTY et al., 2002).

Cerca de 1,5 bilhões de peixes ornamentais são comercializados todos os anos entre os diferentes países, movimentando um mercado mundial da ordem de 15 a 30 bilhões de dólares. (JOHNSON et al., 2019; MACEDA-VEIGA; CABLE, 2019; RIMMER et al., 2015). Este comércio mundial de peixes ornamentais envolve aproximadamente 5.000 espécies de peixes de água doce e 1.800 espécies de peixes marinhos (RAGHAVAN et al., 2013).

Os peixes conhecidos popularmente como guppy (*Poecilia reticulata*) e neon (*Paracheirodon innesi*) dominam o comércio internacional de peixes ornamentais, representando aproximadamente 25% do volume de peixes comercializados anualmente, sendo responsáveis economicamente por 14% do valor movimentado pela indústria de peixes ornamentais (EVERS; PINNEGAR; TAYLOR, 2019).

A movimentação de uma grande quantidade de animais aquáticos associada a alta variedade favorece a disseminação das doenças para novas regiões geográficas e novas espécies de peixes, dificultando o controle dessas enfermidades (RIMMER et al., 2015).

Neste contexto, nos últimos 20 anos, a família *Iridoviridae*, subfamília *Alphairidovirinae*, surge como uma das principais famílias virais responsáveis por epizootias de grande impacto na aquicultura mundial, causando graves perdas econômicas para o setor (BERMUDÉZ et al., 2018; SUBRAMANIAM et al., 2012). As principais preocupações da aquicultura mundial com relação a essa família encontram-se no fato de algumas espécies de peixes atuarem como carreadores do vírus, permanecendo assintomático e transmitindo-os para

outras espécies de peixes susceptíveis, além do risco de extinção de várias espécies de peixes de vida livre (SUBRAMANIAM et al., 2012).

2.4 Família *Iridoviridae*

A família *Iridoviridae* compreende cinco gêneros virais, agrupados em duas subfamílias (*Alphairidovirinae* e *Betairidovirinae*), assim denominados: *Ranavirus*, *Megalocytivirus*, *Lymphocystivirus*, *Iridovirus*, e *Chloriridovirus* sendo os três primeiros com relevância na área de produção aquícola por infectarem animais vertebrados (WHITTINGTON; BECKER; DENNIS, 2010). Os membros dessa família caracterizam-se pela presença de uma molécula de DNA fita dupla envolta por um capsídeo icosaédrico de 120 a 200nm de diâmetro, sendo que sua replicação pode ocorrer no citoplasma ou ao nível nuclear (GO et al., 2006; KURITA; NAKAJIMA, 2012). A proteína principal do capsídeo, que representa 45% de todas as proteínas da partícula viral na célula infectada, constitui a proteína estrutural mais importante dentro dos iridovírus e atua como uma potente indutora de resposta imune nos animais infectados (BLACK et al., 1981; LIU et al., 2015; SOMMERSET et al., 2005; WILLIS et al., 1977).

Os membros da família *Iridoviridae* apresentam uma ampla variedade de hospedeiros, incluindo peixes, anfíbios, répteis e insetos, além de causar uma enorme diversidade de manifestações clínicas, sendo que os animais infectados podem ser assintomáticos ou sintomáticos com morte rápida (AHNE; SCHLOTFELDT; THOMSEN, 1989; EATON; RING; BRUNETTI, 2010; HEDRICK et al., 1992; HEDRICK; MCDOWELL, 1995; LANGDON et al., 1986; POZET et al., 1992). Desse modo, as altas taxas de morbidade e mortalidade nos animais infectados constituem uma preocupação mundial, pois estão associadas a prejuízos econômicos e ecológicos (COLLINS; STORFER, 2003; DASZAK et al., 1999; DASZAK; CUNNINGHAM; HYATT, 2003; EATON; RING; BRUNETTI, 2010; JANCOVICH et al., 2005).

O gênero *Lymphocystivirus* está associado ao aparecimento de nódulos dérmicos nos peixes acometidos, sendo a taxa de mortalidade entre os animais infectados bastante reduzida; já os membros dos gêneros *Megalocytivirus* e *Ranavirus* causam infecções sistêmicas bastante graves onde a taxa de mortalidade pode atingir 100% (LEU; WU; CHOU, 2013).

2.5 Gênero *Megalocytivirus*

O gênero *Megalocytivirus*, cuja primeira descrição ocorreu em peixes Pargo-Japonês (*Pagrus major*) no ano de 1990 no Japão, compreende vírus que apresentam como material genético uma molécula linear de DNA fita dupla, sendo o genoma envolto por um capsídeo icosaédrico com tamanho variável de 120 a 200nm de diâmetro (CHINCHAR et al., 2017; INOUE et al., 1992; KURITA; NAKAJIMA, 2012). Além disso, nos vírus pertencentes a esse gênero, o capsídeo viral pode ou não se encontrar envolto por envelope lipídico externo, além da presença de uma membrana lipídica interna localizada entre o núcleo e o capsídeo (BERMÚDEZ et al., 2018; KURITA; NAKAJIMA, 2012; SHI et al., 2004; SUBRAMANIAM et al., 2014).

O gênero *Megalocytivirus* encontra-se distribuído mundialmente, sendo descrito inclusive em território brasileiro (MAGANHA et al., 2018). Sua ampla distribuição mundial está associada ao elevado volume e a elevada diversidade de peixes comercializados mundialmente favorecendo assim a introdução do vírus em novas regiões geográficas e novos hospedeiros (RIMMER et al., 2015). Além do intenso comércio internacional de organismos aquáticos, devemos ressaltar que a maioria das transações comerciais de peixes acontecem na ausência de certificações de sanidade dos animais, facilitando assim a transmissão do vírus para outras espécies (GO et al., 2006; MAO et al., 1999; NOLAN et al., 2015).

Trata-se de um gênero viral de grande interesse na aquicultura mundial devido à alta taxa de letalidade entre os animais infectados, além de sua ampla variedade de hospedeiros podendo acometer peixes ornamentais, comerciais e de vida livre (GO et al., 2006; MAO et al., 1999; NOLAN et al., 2015; SHIU et al., 2018; ZHANG et al., 2012). Além disso, os membros do gênero *Megalocytivirus* apresentam inespecificidade de hospedeiro, podendo acometer peixes de água doce e salgada, o que gera uma intensa preocupação internacional com relação às questões de biossegurança (CHINCHAR et al., 2017; KODA et al., 2018; NOLAN et al., 2015; WALTZEK et al., 2012).

A infecção por *Megalocytivirus* pode ocorrer em animais de todas as idades, entretanto, é mais comum em peixes jovens (KURITA; NAKAJIMA, 2012; RIMMER et al., 2016). Os surtos por vírus desse gênero ocorrem predominantemente no verão, onde a temperatura do ambiente é mais elevada variando entre 23 e 27°C (JUNG; OH, 2000; JUNG et al., 2015; RIMMER et al., 2016). No entanto, o vírus é capaz de causar infecções sistêmicas nos animais em uma faixa de temperatura que varia de 7,5 a 32°C (CHEN; LIN; WANG, 2003; SRIWANAYOS et al., 2013; WANG et al., 2011; WALTZEK et al., 2012).

A temperatura de 25°C é considerada ótima tanto para a replicação viral quanto para a resposta imune na maioria dos peixes; entretanto, no verão onde a temperatura da água permanece próximo a 25°C, observa-se a ocorrência dos surtos com altas taxas de mortalidade por *Megalocytivirus*. Dessa forma, alguns autores consideram a temperatura da água como o fator crucial para a replicação viral (JUN et al., 20009; JUNG et al., 2015). Nas demais estações do ano onde as temperaturas permanecem mais baixas, as infecções por *Megalocytivirus* também ocorrem, entretanto, a carga viral do animal infectado é baixa. Em temperaturas baixas a resposta imune também é suprimida, impedindo a eliminação do vírus pelo animal o que torna o peixe um portador assintomático do vírus e, portanto, um importante transmissor (JUN et al., 20009; JUNG et al., 2015).

Atualmente, com base no gene da proteína principal do capsídeo (gene MCP), são propostos 3 genótipos dentro do gênero *Megalocytivirus*: *Infectious Spleen and Kidney Necrosis Virus* (ISKNV), *Red Sea Bream Iridovirus* (RSIV) e *Turbot Reddish Body Iridovirus* Turbot (TRBIV) (JUNG-SCHROERS et al., 2016; KURITA; NAKAJIMA, 2012; SRIWANAYOS et al. 2013; SHIU et al., 2018). Estudos recentes propõem a existência de 2 cladogramas dentro do genótipo *Infectious Spleen and Kidney Necrosis Virus* (ISKNV), sendo que o segundo clado contém o *Threespine stickleback iridovirus* (TSIV) (JUNG-SCHROERS et al., 2016; SRIWANAYOS et al., 2013).

Sabe-se também que existe uma inter-relação entre os genótipos de *Megalocytivirus* e a localização geográfica do isolado, bem como a espécie de peixe infectada pelo vírus (SONG et al., 2008; SHIU et al., 2018). Entretanto, existem dificuldades na classificação taxonômica dos isolados dentro dos genótipos, pois os isolados são descritos com base na espécie hospedeira e na localização geográfica do isolado (CHINCHAR et al., 2009; SUBRAMANIAM et al., 2012).

Embora estirpes de *Megalocytivirus* tenham sido isoladas a partir de uma ampla variedade de espécies ao redor do mundo, poucas delas tiveram seu genoma sequenciado completamente (SHIU et al., 2018). Alguns isolados com sequenciamento do genoma completo incluem: *Dwarf gourami Iridovirus* (GO et al., 2006; HE et al., 2000), *Infectious spleen and kidney necrosis virus* (ISKNV) (HE et al., 2001), *Red sea bream iridovirus* (RSIV) (JEONG et al., 2003), *Taiwan grouper Iridovirus* (TGIV) (CHAO et al., 2004; CHOU; HSU; PENG, 1998), *Rock bream iridovirus* (RBIV) (DO et al., 2004), *Orange-spotted grouper iridovirus* (OSGIV) (LÜ et al., 2005), *Large yellow croaker iridovirus* (LYCIV) (AO; CHEN, 2006), *Turbot reddish body iridovirus* (TRBIV) (SHI et al., 2010), *Rock bream iridovirus* isolado da China (ZHANG et al., 2013), *Giant sea perch iridovirus* isolado de Taiwan (GSIV)(WEN; HONG, 2016) e *Red seabream iridovirus* isolado de Taiwan (SHIU et al., 2018) e(KURITA; NAKAJIMA, 2012;

SHIU et al., 2018; ZHANG; GUI, 2015). Essa grande diversidade de isolados virais dentro de um mesmo gênero reforça a questão da ampla variedade de hospedeiros apresentada pelo *Megalocytivirus* (SONG et al., 2008).

Os animais acometidos por *Megalocytivirus* apresentam sinais clínicos inespecíficos como: anorexia, letargia, exoftalmia, presença de petéquias, redução na ingestão de alimentos, lesões na superfície da pele, anemia, natação irregular, excretas esbranquiçadas e coloração pálida dificultando assim o diagnóstico precoce dos animais infectados (CHEN; LIN; WANG, 2003; HE et al., 2002; INOUE et al., 1992; JUNG; OH, 2000; KURITA; NAKAJIMA, 2012; SRIWANAYOS et al., 2013; WANG et al., 2011; WALTZEK et al., 2012; WEBER et al., 2009).

Internamente, os principais achados nos animais infectados constituem hepatomegalia, esplenomegalia e presença de lesões hemorrágicas (CHEN; LIN; WANG, 2003; KURITA; NAKAJIMA, 2012; SRIWANAYOS et al., 2013; WALTZEK et al., 2012; WANG et al., 2011; WEBER et al., 2009; ZHANG et al., 2012).

Os achados histopatológicos descritos nos peixes infectados incluem a presença de células mesenquimais citomegálicas e de inclusões intracitoplasmáticas anfifílicas ou basofílicas em vários órgãos do animal como rim, fígado, baço, intestino, coração, gônadas e olhos (CHEN; LIN; WANG, 2003; SRIWANAYOS et al., 2013; WALTZEK et al., 2012; WANG et al., 2011; WEBER et al., 2009; ZHANG et al., 2012).

A principal forma de transmissão do vírus é por via horizontal por meio da coabitação entre animais sadios e animais assintomáticos (JUNG-SCHROERS et al., 2016; SRIWANAYOS et al., 2013). Outras formas de transmissão da doença incluem contato de animais sadios com águas e equipamentos contaminados e ingestão de pequenos animais infectados (GO; WHITTINGTON, 2006; HE et al., 2002; SRIWANAYOS et al., 2013). Também já foi proposta a ocorrência de transmissão vertical dentro do gênero (JEONG et al., 2008).

Trata-se de uma doença de difícil diagnóstico devido à presença de sinais clínicos gerais e inespecíficos; dessa forma, como métodos diagnósticos recomendam-se a realização de técnicas moleculares como o PCR para amplificação do DNA viral e posterior análises, como sequenciamento nucleotídico, de regiões do gene MCP, bem como a realização do isolamento viral em cultivo celular (NOLAN et al., 2015; OIE, 2018).

A infecção por *Megalocytivirus* já foi relatada em diversas espécies de peixes ao redor do mundo; entretanto, devido à dificuldade de isolamento do vírus em cultivo celular, pouco ainda é conhecido sobre as propriedades físico-químicas e biológicas do vírus bem como as

medidas efetivas de desinfecção, dificultando assim um melhor entendimento da etiologia das infecções por *Megalocytivirus* e, prospectivamente, o estabelecimento de medidas efetivas de controle e prevenção dessas doenças.

Alguns estudos realizados com isolados pertencentes aos genótipos ISKNV e RSIV demonstram que o vírus é sensível a tratamentos com temperaturas superiores a 50°C (HE et al., 2002; NAKAJIMA; SORIMACHI, 1994). Outro estudo já demonstra que partículas virais de ISKNV quando expostas a temperatura de 60°C por um curto período de tempo (5 minutos) não sofrem inativação (FUSIANTO et al., 2019).

Os estudos com relação aos valores de pH necessários para a desinfecção de ambientes após surtos em decorrência de infecção por *Megalocytivirus* ainda são controversos e demonstram uma possível diferença entre as propriedades físico-químicas dos diferentes genótipos. Um estudo realizado com um isolado pertencente ao genótipo RSIV revelou que o vírus não é sensível ao tratamento com solução no pH 11,0 (NAKAJIMA; SORIMACHI, 1994). Já estudos com diferentes isolados pertencentes ao genótipo ISKNV demonstraram uma inativação viral neste mesmo valor de pH (FUSIANTO et al., 2019; HE et al., 2002).

Resultados semelhantes foram descritos com relação ao pH 3,0. Um estudo realizado com um isolado de ISKNV revelou que o vírus mantém sua infectividade após ao tratamento com solução no pH 3,0 (HE et al., 2002). Entretanto, estudos realizados com isolados pertencentes aos genótipos ISKNV e RSIV revelaram que os isolados eram sensíveis ao tratamento em pH 3,0 (FUSIANTO et al., 2019; NAKAJIMA; SORIMACHI, 1994).

Com relação as medidas de desinfecção, alguns protocolos têm sido descritos como eficientes na eliminação do vírus *Infectious spleen and kidney necrosis iridovirus*, espécie tipo do gênero *Megalocytivirus*, como por exemplo, tratamentos com hipoclorito de sódio (1000 ppm) por 30 minutos, Virkon® 1% por 10 minutos e composto de quaternário de amônia (650 ppm) por 10 minutos (FUSIANTO et al., 2019).

Apesar da descrição de alguns candidatos a vacinas para *Megalocytivirus*, até o momento existe apenas uma vacina disponível comercialmente para prevenção da doença, sendo que esta vacina é específica para o genótipo RSIV (NAKAJIMA et al., 1997; NAKAJIMA et al., 1999). Para os demais genótipos ainda não existem vacinas comercialmente disponíveis (SUBRAMANIAM et al., 2012).

2.6 Gênero *Lymphocystivirus*

A doença de *Lymphocystis* é uma doença de ocorrência mundial que já foi descrita em mais de 150 espécies de peixes de água doce e salgada, incluindo peixes ornamentais brasileiros (LÓPEZ-BUENO et al, 2016; MAGANHA et al., 2019). Sua ocorrência está relacionada principalmente a condições estressantes para os animais como alta densidade populacional no tanque, condições ambientais desfavoráveis e alterações bruscas de temperatura, oxigênio e concentração de oxigênio (CIULLI et al, 2015; LEIVA-REBOLLO et al., 2020).

O agente causador da doença é o vírus da doença de *Lymphocystis* (*Lymphocystis disease virus* – LCDV). Trata-se de um vírus constituído por uma única molécula de DNA fita dupla e com diâmetro variável (120-340nm) dependendo da espécie hospedeira (BORREGO et al., 2015; PAPERNA et al., 2001; TIDONA; DARAI, 1997).

O Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) aceita a existência de três espécies de vírus dentro do gênero *Lymphocystivirus*: LCDV-1, que inclui isolados da espécie *Platichthys flesus* (TIDONA, DARAI, 1997); LCDV-2, que inclui isolados de peixes doentes da espécie *Paralichthys olivaceus* (ZHANG et al., 2004) e LCDV-3, que inclui isolados descritos para a espécie *Sparus aurata* (DOSZPOLY et al., 2020; LÓPEZ-BUENO et al., 2016).

Entretanto, com base no gene da proteína principal do capsídeo (gene MCP), um gene altamente conservado dentro da família *Iridoviridae*, é proposta a existência de 9 genótipos para o gênero *Lymphocystivirus* (BORREGO et al., 2015; CANO et al., 2010; CIULLI et al., 2015; PALMER; HOGAN; VAN DEN HEUVEL, 2012). Os genótipos de LCDV descritos são: genótipo I (LCDV-1), que inclui isolados da espécie *Platichthys flesus*; genótipo II (LCDV-C), que apresenta isolados da espécie *Paralichthys olivaceus*; genótipo III (LCDV-RF), que inclui isolados da espécie *Sebastes schlegeli* (KITAMURA; JUNG; OH, 2006); genótipo IV, que inclui isolados das espécies *Lateolabrax* sp e *Rachycentron canadum*; genótipo V, que inclui isolados da espécie *Pseudambassis baculis*; genótipo VI, que agrupa iolados oriundos das espécies *Trichogaster leeri* e *Trichogaster trichopterus*; genótipo VII, representado por membros isolados das espécies *Sparus aurata* e *S. senegalensis* (CANO et al., 2010); genótipo VIII, que inclui isolados da espécie *Micropterus salmoides* e genótipo IX, que inclui isolados de Perca Amarela (*Perca flavences* (Mitchell)) (BORREGO et al., 2015; CANO et al., 2010; CIULLI et al., 2015; HOSSAIN et al., 2008; KITAMURA; JUNG; OH, 2006; PALMER et al., 2012; YAN et al., 2011). Entretanto, estudos envolvendo relações evolutivas não mostraram a presença de coespeciação entre os 9 genótipos pertencentes ao gênero e a espécie de peixe hospedeira (YAN et al., 2011).

A doença causada pelo vírus caracteriza-se pela presença de nódulos hipertróficos isolados que se desenvolvem ao longo do corpo do peixe, principalmente na pele e nas nadadeiras do animal acometido (CIULLI et al., 2015). Com o passar do tempo, os nódulos podem acometer toda a superfície corporal do animal (ALONSO et al., 2005). Embora raro, em alguns animais, o vírus pode infectar órgãos internos como coração, baço, fígado, intestino, estômago, cérebro e olhos (CIULLI et al., 2015; COLORNI; DIAMANT, 1995; VALVERDE et al., 2017).

Para o gênero viral, admite-se a ocorrência de transmissão horizontal e vertical. A transmissão horizontal é a mais comum e ocorre através da água contaminada e do contato direto entre animais doentes e sadios. Essa forma de transmissão por meio da água contaminada é muito comum na coabitação entre animais sadios e portadores assintomáticos do vírus (KVITT; HEINISCH; DIAMANT, 2008; WOLF, 1988). Após algumas semanas, os nódulos hipertróficos presentes no corpo do peixe podem crescer e se romper, liberando partículas virais na água (KVITT; HEINISCH; DIAMANT, 2008). Essas partículas liberadas penetram pela pelas brânquias e pela pele de outros peixes, podendo infectar vários animais do tanque (KVITT; HEINISCH; DIAMANT, 2008; LEIVA-REBOLLO et al., 2020; WOLF, 1988).

Alguns estudos demonstram a possibilidade de transmissão viral por via oral, através da ingestão de alimentos contaminados (fornecimento de alimento vivo) (CANO et al., 2013; CARBALLO et al., 2019; LEIVA-REBOLLO et al., 2020). Além disso, destaca-se o papel da artemia como reservatório do vírus e potencial transmissor para os peixes (CANO et al., 2009)

Já a transmissão vertical ocorre por meio da presença de partículas virais na superfície do ovo proveniente de fêmeas portadoras do vírus da doença de Lymphocystis (CANO et al., 2013).

Os surtos de *Lymphocystivirus* estão associados a condições de estresse excessivo aos animais, como alta densidade populacional nos tanques, falhas técnicas no manejo dos peixes, má qualidade da água, baixas concentrações de oxigênio e alterações bruscas de temperatura e pH (KITAMURA et al., 2007; LEIVA-REBOLLO et al., 2020). A ocorrência da doença é mais comum no mês de novembro onde a temperatura da água permanece próxima aos 20°C, temperatura considerada como ótima para a replicação do vírus (HOSSAIN et al., 2009; KITAMURA et al., 2007). Em temperaturas mais baixas (10°C), o vírus pode persistir na epiderme dos peixes infectados, mas não causa a enfermidade (HOSSAIN et al., 2009).

A ocorrência do gênero não está associada a altas taxas de mortalidade; entretanto, os animais acometidos tornam-se imunocomprometidos e, portanto, mais susceptíveis a ocorrência de infecções secundárias por bactérias e parasitas, apresentam anemia com consequente redução

na taxa de crescimento e podem sofrer canibalismo, gerando graves perdas econômicas para o setor (ALONSO et al., 2005; BASURCO et al., 1990; BORREGO et al., 2015; CIULLI et al., 2015; IWAMOTO et al., 2002).

Além disso, quando as lesões virais se proliferam excessivamente e acometem uma grande área da superfície corporal do peixe, o animal pode apresentar dificuldade para nadar, realizar as trocas gasosas e se alimentar, o que pode levá-lo à óbito. Devemos ressaltar ainda que o comprometimento da aparência do animal causado pelo vírus da doença de Lymphocystis reduz significativamente o valor comercial dos animais (ALONSO et al., 2005; CIULLI et al., 2015).

Embora existam algumas pesquisas científicas relacionadas à produção de vacinas utilizando vírus inativados e vacinas orais de DNA para *Lymphocystivirus*, ainda não existem vacinas comerciais disponíveis no mercado para a prevenção da infecção por esse gênero viral (BORREGO et al., 2015). Além disso, devido à dificuldade do isolamento viral em cultivo celular, existe uma escassez de dados sobre as propriedades físico-químicas do vírus, limitando assim o estabelecimento de medidas de controle e desinfecção (BORREGO et al., 2015).

Os dados disponíveis sobre a caracterização das propriedades virais limitam-se a descrever o vírus da doença de Lymphocystis como sensível ao pH 3,0 e ao tratamento com éter (IWAMOTO et al., 2002); entretanto, o vírus não apresenta sensibilidade ao clorofórmio (ALONSO et al., 2005).

Dessa forma, enfatiza-se como métodos de prevenção da infecção, medidas como redução das condições estressantes para os animais como alta densidade populacional, garantia de bons parâmetros de qualidade da água, nutrição adequada e boas práticas de manejo (ANDERS, 1989; BORREGO et al., 2015; VALVERDE et al., 2016). Recomenda-se também a testagem em massa dos animais para detectar portadores assintomáticos do vírus e potenciais transmissores (ANDERS, 1989; VALVERDE et al., 2016).

2.7 Estudos *in vitro*

A utilização de linhagens celulares é extremamente útil para as diversas áreas do conhecimento, principalmente aquelas relacionadas à pesquisa por novos fármacos, vacinas e terapias inovadoras, virologia, imunologia, biologia, genética, oncologia e toxicologia (KAUR; DUFOUR, 2012; WANG et al., 2010)

Algumas vantagens da utilização de cultura de células em relação aos modelos animais para a realização de ensaios biológicos incluem: menor custo, necessitar de menos espaço, fácil manipulação (não necessita de pessoal treinado como para os animais de experimentação), boa reprodutibilidade de resultados, fornecimento de material para um número ilimitado de experimentos e não sofrer de influência do ambiente e da composição genética dos indivíduos (KAUR; DUFOUR, 2012).

Atualmente, estudos utilizando células como modelos biológicos para análise de alterações induzidas por infecções virais representam recursos de extrema importância pois existe uma constante preocupação em se reduzir a utilização de animais de experimentação (FRESHNEY, 2005). Além disso, o isolamento viral em cultivo celular representa a principal ferramenta de detecção da presença viral em portadores assintomáticos do vírus, constituindo, portanto, uma ferramenta muito útil para o diagnóstico de infecções virais (KANG et al., 2003; SUBRAMANIAM et al., 2012).

Entretanto, a obtenção de resultados satisfatórios no isolamento e na caracterização viral utilizando cultivo celular depende essencialmente da escolha correta da linhagem celular a ser utilizada, linhagem essa que permitirá a replicação viral, a purificação do vírus pós-isolamento e finalmente a determinação de suas características biológicas e físico-químicas (DONG et al., 2008; KANG et al., 2003; SUBRAMANIAM et al., 2012).

Atualmente, estima-se que existam disponíveis mais de cem linhagens celulares oriundas de peixes, incluindo células provenientes de peixes de água doce e salgada, sendo que as células de peixes de água doce representam a grande maioria (PARAMESWARAN et al., 2007; WANG et al., 2010). A utilização de células de peixes é comum principalmente em estudos relacionados a virologia e imunologia, representando uma importante ferramenta para diagnóstico do agente viral em caso de surtos (PARAMESWARAN et al., 2007; WANG et al., 2010).

Dessa forma, as linhagens celulares imortalizadas derivadas de diversas espécies de peixes mostram-se um recurso importante para isolamento, identificação, caracterização viral e realização de estudos *in vitro* visando investigar a resposta imune induzida por agentes virais (QIN et al., 2006).

Entre os membros da família *Iridoviridae*, subfamília *Alphairidovirinae*, o gênero *Ranavirus* é considerado de fácil isolamento em cultivo celular, já os outros dois gêneros, *Megalocytivirus* e *Lymphocystivirus*, são considerados de difícil isolamento em cultura de células (CHAO et al., 2004; CHEN et al., 2004; DONG et al., 2014; DONG et al., 2008; IMAJOH; IKAWA; OSHIMA, 2007; KODA et al., 2018).

2.8 Linhagens Celulares para *Megalocytivirus*

Para estudos envolvendo *Megalocytivirus*, as células fornecem as bases científicas para uma melhor compreensão entre a interação dos vírus com as células infectadas, além de permitirem a realização de estudos genômicos e proteômicos (DONG et al., 2011; DONG et al., 2008; SUBRAMANIAM et al., 2012).

Entretanto, há poucas linhagens celulares de peixes disponíveis que permitem o isolamento dos genótipos de *Megalocytivirus*, dificultando assim a realização de estudos sobre esse gênero viral (DONG et al., 2014; KWON et al., 2020). Além disso, existe uma dificuldade na replicação desse gênero viral em culturas de células já que a maioria das linhagens celulares disponíveis suportam a propagação do vírus por um número muito limitado de passagens (HE et al., 2013; HE et al., 2002; JUN et al., 2009; KODA et al., 2018).

Por mecanismos ainda desconhecidos, passagens sucessivas de *Megalocytivirus* em algumas linhagens celulares resultam em perda da infectividade viral com consequente redução nos valores dos títulos virais obtidos (JUN et al., 2009; WEN et al., 2008).

A primeira descrição do isolamento do gênero *Megalocytivirus* ocorreu em células da Bluegill fry-2 (BF-2) (NAKAJIMA; SORIMACHI, 1994; WOLF; QUIMBY, 1966). A linhagem de células BF-2 é oriunda da nadadeira caudal de peixes da espécie *Lepomis macrochirus*. As células dessa linhagem são aderentes e possuem morfologia de fibroblastos (WOLF; QUIMBY, 1966).

Outras linhagens celulares utilizadas para a realização de estudos *in vitro* com *Megalocytivirus* incluem *Grunt fin* (GF) (DONG et al., 2010), *Kelp and Red spotted grouper embryo* (KRE-3) (KURITA; NAKAJIMA, 2012), *Clonal red sea bream fin* (CRF-1) (IMAJOH et al., 2007) e *Mandarin fish fry-1* (MFF- 1) (DONG et al., 2008).

Dessa forma, até o momento não existe uma linhagem celular totalmente adequada para todos os genótipos do gênero *Megalocytivirus*. Para cada linhagem celular testada existem limitações com relação ao cultivo da célula, propagação do vírus ao longo das passagens e suscetibilidade da linhagem ao genótipo a ser isolado (DONG et al., 2014; JUN et al., 2009; KODA et al., 2018; KWON et al., 2020). As linhagens BF-2 e KRE-3, por exemplo, não suportam passagens sucessivas do vírus (NAKAJIMA; SORIMACHI, 1994), já a linhagem GF requer soro fetal humano para o cultivo, o que é de difícil aquisição (WEN et al., 2008).

2.9 Linhagens Celulares para *Lymphocystivirus*

Para o gênero *Lymphocystivirus*, a utilização de modelos de estudo *in vitro* é de extrema importância para a realização de pesquisas científicas voltadas para a caracterização viral e desenvolvimento de protocolos efetivos de desinfecção bem como para a produção de vacinas (IWAMOTO et al., 2002). Além disso, os estudos com linhagens celulares são necessários para a investigação dos mecanismos de infecção, replicação e patogênese viral que ainda permanecem obscuros para esse gênero viral (ZHANG et al., 2003).

Entretanto, o isolamento e a propagação do vírus em cultivo celular não apresentam bons índices de sucesso, pois o vírus aparentemente apresenta uma seletividade com relação as suas células hospedeiras (BORREGO et al., 2015; IWAMOTO et al., 2002).

O primeiro isolamento do vírus da doença de Lymphocystis foi descrito em células da linhagem BF-2 (WOLF et al., 1966). Outros isolamentos do vírus ocorreram em fibroblastos de peixes da espécie *Sparus aurata* (*Sparus aurata* fibroblast - SAF-1) (ALONSO, 2007; PEREZ-PIETRO et al., 1999). O efeito citopático observado nas células de ambas as linhagens foi semelhantes e caracterizou-se pela presença de células arredondadas e aumentadas e a presença de células refratárias (GARCIA-ROSADO et al., 1999; PEREZ-PRIETO et al., 1999).

Em um estudo realizado foram testadas 39 linhagens celulares com a relação a capacidade de propagação do LCDV; entretanto, apenas a linhagem celular HINAE (Hirame Natural Embryo), oriunda de células embrionárias de peixe da espécie *Paralichthys olivaceus* e com morfologia de fibroblastos, demonstrou-se eficiente na propagação do vírus (IWAMOTO et al., 2002). Isso demonstra que as células de origem fibroblásticas parecem ser a linhagem celular de escolha para replicação do LCDV em cultivo celular (ALONSO et al., 2005).

Outras linhagens celulares descritas como susceptíveis a infecção por *Lymphocystivirus* incluem *Grass carp ovary* (GCO) (ZHANG et al., 2003), *Grass carp kidney* (GCK) (ZHANG et al., 2003), *Brown-marbled Grouper fin* (bmGF-1) (WEI et al., 2009; WEI et al., 2010), *Cynoglossus Semilaevis Embryonic Cell* (CSEC) (SHA et al., 2010), *Brown-marbled Grouper heart* (bmGH) (WEI et al., 2009), *Stone flounder liver cells* (SFL cells) (XU et al., 2011), *Cynoglossus Semilaevis Gonad Cell* (CSGC) (ZHANG et al., 2011) e *Tong Sole Head Kidney Cell* (TSHKC) (ZHENG et al., 2012) (BORREGO et al., 2015).

3 JUSTIFICATIVA

Os vírus são seres abundantes no planeta Terra e, muitas vezes, as infecções associadas possuem um diagnóstico difícil; dessa forma, o surgimento de vírus causadores de doenças em peixes representa uma ameaça grave à aquicultura mundial e à pesca de organismos aquáticos, podendo causar grandes perdas econômicas e prejuízos ecológicos e sociais incalculáveis (ALAVANDI; POORNIMA, 2012; WALKER; WINTON, 2010).

Entre as principais famílias virais causadoras de enfermidades em peixes está a família *Iridoviridae* e seus gêneros *Megalocyctivirus*, *Ranavirus* e *Lymphocystivirus*. O gênero *Megalocyctivirus* encontra-se mundialmente distribuído e acomete uma ampla variedade de peixes de água doce e salgada causando uma doença de natureza sistêmica que, em caso de surtos, pode promover a morte de 100% dos animais infectados (GO et al., 2006; MAO et al., 1999; NOLAN et al., 2015). Por ser uma doença que se caracteriza pela presença de sinais clínicos gerais e inespecíficos e de difícil diagnóstico, sua disseminação está associada ao intenso comércio internacional de organismos aquáticos que, na maioria das vezes, acontece de forma descontrolada sem as devidas certificações de sanidade dos animais comercializados (GO et al., 2006; MAO et al., 1999; NOLAN et al., 2015).

O gênero *Lymphocystivirus* afeta mais de 150 espécies de peixes, incluindo animais de água doce e salgada e, embora não esteja associado a altas taxas de mortalidade, compromete a aparência do animal, reduzindo significativamente seu valor comercial principalmente quando nos referimos aos peixes ornamentais. Além disso, os animais infectados apresentam uma redução na taxa de crescimento e no ganho de peso e estão mais susceptíveis a ocorrência de infecções secundárias por organismos oportunistas.

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

Desse modo, é importante o conhecimento das diversas espécies virais presentes no mundo e suas enfermidades associadas, mesmo em condições de saúde, realçando o papel de reservatórios naturais das espécies cultivadas na aquicultura (ALAVANDI; POORNIMA, 2012).

Embora existam diversos isolados de *Megalocyctivirus* e *Lymphocystivirus* descritos na literatura, os dados sobre as propriedades físico-químicas e biológicas do vírus ainda são limitados, devido à dificuldade de isolamento dos vírus em cultivo celular, da demora na

obtenção de resultados e a baixa disponibilidade de linhagens celulares susceptíveis aos gêneros virais, dificultando assim a pesquisa e o desenvolvimento de formas efetivas de prevenção e controle (BORREGO et al., 2015; CIULLI et al., 2015; IWAMOTO et al., 2002; KAWATO et al., 2020; SUBRAMANIAM et al., 2012).

Além disso, a descrição da ocorrência de infecções causadas por *Megalocytivirus* e *Lymphocystivirus* em peixes brasileiros ainda é recente e está restrita ao diagnóstico molecular por PCR e a espécies de peixes ornamentais (MAGANHA et al., 2019; MAGANHA et al., 2018). Dessa forma, existe uma necessidade constante de estudos visando a caracterização das estirpes brasileiras circulantes, permitindo-se assim um maior entendimento sobre a dispersão desses agentes em território brasileiro

Neste contexto, fica claro a necessidade de maiores estudos para uma melhor caracterização fenotípica e genotípica dos gênero *Megalocytivirus* e *Lymphocystivirus*, contribuindo para o potencial desenvolvimento de métodos de diagnóstico mais rápidos e intervenções terapêuticas eficientes.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Contribuir para um maior conhecimento acerca das estirpes de *Megalocytivirus* e *Lymphocystivirus* que estão circulando em peixes ornamentais brasileiros e suas propriedades físico-químicas e morfológicas a fim de que futuramente possam ser propostas formas efetivas de controle e prevenção dessas viroses.

4.2 Objetivos específicos

- a. Realizar o isolamento das estirpes virais de *Megalocytivirus* e *Lymphocystivirus*, obtidas de peixes ornamentais do município de São Paulo, em linhagens de células BF-2 (Bluegillfry ATCC® CCL-91);
- b. Realizar a reconstrução filogenética para os isolados de *Megalocytivirus* e *Lymphocystivirus* com base em fragmento do gene MCP;
- c. Realizar a caracterização fenotípica e de cinética de replicação do *Megalocytivirus* em cultivo celular;
- d. Realizar a caracterização fenotípica e de cinética de replicação do *Lymphocystivirus* em cultivo celular.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Amostras de tecido

5.1.1 *Megalocytivirus*

Para a realização do isolamento viral de *Megalocytivirus* em cultivo celular foram utilizadas 4 amostras de *pool* de tecidos (fígado, baço e rins), provenientes de peixes ornamentais das espécies *Poecilia reticulata*, *Pygocentrus nattereri*, *Cyprinus carpio* e *Carassius auratus*. As amostras utilizadas nesse estudo eram positivas ao diagnóstico molecular para *Megalocytivirus*, sendo o resultado confirmado por sequenciamento de nucleotídeos (MAGANHA et al., 2018).

As amostras de peixes utilizadas para o isolamento eram provenientes de um estabelecimento comercial da cidade de São Paulo e permaneceram armazenadas em freezer -80°C até sua utilização. O projeto em questão foi aprovado Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – Universidade de São Paulo, sob o número de protocolo: 6782040416.

5.1.2 *Lymphocystivirus*

Para o isolamento viral do *Lymphocystivirus* em cultivo celular foi utilizada 1 amostra proveniente de uma lesão da nadadeira do peixe marinho da espécie *Pomacanthus xanthometopon*. A amostra era positiva ao diagnóstico molecular para esse gênero viral.

A amostra da lesão utilizada para o isolamento foi enviada por um estabelecimento comercial da cidade de São Paulo e permaneceu armazenada em freezer -80°C até sua utilização. O projeto em questão foi aprovado Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – Universidade de São Paulo, sob o número de protocolo: 6782040416.

5.2 Isolamento viral

5.2.1 *Megalocytivirus*

Para o isolamento viral de *Megalocytivirus*, utilizou-se o protocolo descrito pela OIE (OIE, 2012) com algumas modificações.

Inicialmente foram preparadas placas de 24 poços contendo 8×10^4 células BF-2/mL. As monocamadas foram mantidas em meio de cultivo composto por MEM (Gibco[®], Life Technologies, EUA) suplementado com 10% soro fetal bovino (SFB), 1% de L-Glutamina (Gibco[®], Life Technologies, EUA), 1% de PenStrep (Gibco[®], Life Technologies, EUA) e 2µg/mL de Fungizone[®] (Gibco[®], Life Technologies, EUA) e incubadas em estufa a 25°C e 5% CO₂ por 48h.

Após 48h do preparo das placas, 30mg do *pool* de tecidos oriundos de peixes ornamentais sabidamente positivos para *Megalocytivirus* foram macerados com um pistilo estéril até a completa dissolução em 500µL de meio de inóculo composto por MEM (Gibco[®], Life Technologies, EUA), 2% PenStrep (Gibco[®], Life Technologies, EUA) e 2µg/mL de Fungizone[®] (Gibco[®], Life Technologies, EUA). O conteúdo do cadinho foi então coletado com o auxílio de uma pipeta, armazenado em microtubo estéril e mantido em gelo até sua utilização. A partir do inóculo inicial, foram feitas diluições seriadas de 1:10 e 1:100 visando reduzir possíveis contaminações e minimizar os efeitos citotóxicos.

As cavidades da placa (poços) contendo as monocamadas de células foram inoculadas com 100µL do inóculo, sendo que para a inoculação de cada amostra foram utilizados 3 poços: um para a diluição 1:10 e dois para a diluição 1:100. As placas contendo o inóculo foram incubadas em estufa a 25°C e 5% de CO₂ durante uma hora para a fase de adsorção das partículas virais, sendo que a cada 15 minutos foram realizados movimentos circulares para facilitar a adsorção. Após esse período, 900µL de meio de manutenção composto por MEM (Gibco[®], Life Technologies, EUA) suplementado com 2% de SFB, 1% de L-Glutamina (Gibco[®], Life Technologies, EUA), 1% de PenStrep (Gibco[®], Life Technologies, EUA) e 2µg/mL de Fungizone[®] (Gibco[®], Life Technologies, EUA) foram adicionados às monocamadas. Como controle negativo, ao invés do inóculo foram adicionados 100µL de meio de manutenção.

Posteriormente, as placas inoculadas contendo a primeira passagem do inóculo viral (P1) foram incubadas a 25°C e 5% de CO₂, por sete dias, sendo as mesmas monitoradas diariamente para o aparecimento de efeito citopático. Foi realizada 1 passagem sucessiva, com

intervalo de sete dias, utilizando 500 µL da passagem anterior, até o aparecimento do efeito citopático para a amostra contendo *pool* de tecidos de peixe da espécie *Poecilia reticulata*, sendo, portanto, o efeito citopático observado na segunda passagem do inóculo viral (P2).

Após o aparecimento do efeito citopático, uma garrafa de cultivo de 25cm² com filtro (Corning®, Sigma-Aldrich Co., EUA) foi inoculada com 300µL da P2 do inóculo viral. Após 2 dias, observou-se o aparecimento de efeito citopático; assim as células foram removidas e congeladas a -80°C (Corning®, Sigma-Aldrich Co., EUA). Como controle negativo, uma garrafa de cultivo de 25cm² com filtro, contendo monocamada de BF-2, foi inoculada com 300µL de meio de manutenção. Foram realizadas 3 passagens sucessivas em garrafa de cultivo de 25cm² com filtro (Corning®, Sigma-Aldrich Co., EUA), visando a aumentar o título viral para a realização dos ensaios subsequentes. A partir dessas inoculações, foram obtidas a terceira passagem (P3), a quarta passagem (P4) e a quinta passagem (P5) do inóculo viral. Para a aquisição das imagens das culturas de células infectadas e do grupo controle, utilizou-se o sistema de fotodocumentação Moticam S6 (Motic®, Hong Kong).

5.2.1 *Lymphocystivirus*

Para o isolamento viral de *Lymphocystivirus*, também se utilizou o protocolo descrito pela (OIE, 2012) com algumas modificações.

Inicialmente foram preparadas placas de 24 poços contendo 8×10^4 células BF-2/mL. As monocamadas foram mantidas em meio de cultivo e incubadas em estufa a 25°C e 5% CO₂ por 48h.

Após 48h do preparo das placas, 30mg de uma lesão oriunda de peixe ornamental, sabidamente positivo para *Lymphocystivirus*, foram maceradas com um pistilo estéril até a completa dissolução em 500µL de meio de inóculo. O conteúdo do cadinho foi então coletado com o auxílio de uma pipeta, armazenado em microtubo estéril e mantido em gelo até sua utilização. A partir do inóculo inicial, foram feitas diluições seriadas de 1:10 e 1:100 visando reduzir possíveis contaminações e minimizar os efeitos citotóxicos.

Os poços contendo as monocamadas de células foram inoculados com 150µL do inóculo, sendo que para a inoculação de cada amostra foram utilizados 3 poços: um para a diluição 1:10 e dois para a diluição 1:100. As placas contendo o inóculo foram incubadas em estufa a 25°C e 5% de CO₂ durante uma hora para a fase de adsorção das partículas virais, sendo que a cada 15 minutos foram realizados movimentos circulares para facilitar a adsorção. Após

esse período, 850µL de meio de manutenção foram adicionados às monocamadas. Como controle negativo, no lugar do inóculo, foram adicionados 150µL de meio de manutenção.

Posteriormente, as placas inoculadas contendo a primeira passagem do inóculo viral (P1) foram incubadas a 25°C e 5% de CO₂, por cinco dias, sendo monitoradas diariamente para o aparecimento de efeito citopático. Após quatro dias, observou-se a presença a efeito citopático na diluição 1:10 e 1:100; dessa forma, o conteúdo dos poços foi coletado e armazenado à -80°C, sendo, portanto, o efeito citopático observado na primeira passagem do inóculo viral (P1).

Após o aparecimento do efeito citopático, uma garrafa de cultivo de 25cm² com filtro (Corning[®], Sigma-Aldrich Co., EUA) foi inoculada com 300µL da P1 do inóculo viral. Após 6 dias, observou-se o aparecimento de efeito citopático; dessa forma, as células foram removidas e congeladas a -80°C (Corning[®], Sigma-Aldrich Co., EUA). Como controle negativo, uma garrafa de cultivo de 25cm² com filtro contendo monocamada de BF-2 foi inoculada com 300µL de meio de manutenção.

5.3 Extração de DNA

5.3.1 Megalocytivirus

A extração de DNA foi realizada a partir da quinta passagem (P5) do inóculo viral utilizando o kit QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Alemanha), seguindo as instruções do fabricante. Ao final, o DNA foi eluído em 30µL de tampão AE e quantificado por espectrofotometria (DS-11, DeNovix, EUA).

5.3.2 Lymphocystivirus

A extração de DNA foi realizada a partir da segunda passagem (P2) do inóculo viral de *Lymphocystivirus* utilizando o kit QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Alemanha), seguindo as instruções do fabricante. Ao final, o DNA foi eluído em 40µL de tampão AE e quantificado por espectrofotometria (DS-11, DeNovix, EUA).

5.4 PCR para confirmação do isolamento e identificação do isolado

5.4.1 Primers

5.4.1.1 *Megalocytivirus*

Para a reação de PCR visando a amplificação do gene MCP de *Megalocytivirus* foram utilizados 2 pares de *primers* (MV-F/MV-R e nMV-F/nMV-R), de acordo com Choi et al. (2006). Os *primers* utilizados encontram-se descritos no quadro 1.

Quadro 1 -*Primers* utilizados na obtenção de produtos de PCR relativos ao gene MCP de *Megalocytivirus*

Nome	Orientação	Sequência (5'-3')	Produto (pb)
MV-F	Senso	ATGTCTGCAATCTCAGGTG	1.362 ^a
MV-R	Antissenso	TTACAGGATAGGGAAGCCTGC	
nMV-F	Senso	CACCGCAACGTGCAAAGCAA	369 ^a
nMV-R	Antissenso	TTGACTGCAATAACGACCAGTTCAAAC	

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

5.4.1.2 *Lymphocystivirus*

Para a reação de PCR visando à amplificação do gene MCP de *Lymphocystivirus* foram utilizados 4 *primers* sendo três senso (LCDVGI, LCDV GII e LCDV GIII) e um antissenso (LCDV R), de acordo com Choi et al. (2006) (Quadro 2).

Após a confirmação do isolamento, visando à amplificação de um fragmento maior do gene MCP para posterior realização do sequenciamento de nucleotídeos, outros 3 *primers*, sendo um senso (LCDV-F1) e dois antissenso (LCDV-R1 e LCDV-R2), foram desenhados no programa PrimerDesign-M (BRODIN et al., 2013; YOON; LEITNER, 2014). Os *primers* desenhados encontram-se descritos no Quadro 3.

Quadro 2 - *Primers* utilizados na obtenção de produtos de PCR relativos ao gene MCP de *Lymphocystivirus*

Nome	Orientação	Sequência (5' - 3')	Produto (bp)
LCDV GI	Senso	TTAGATTATTGGGCAGCGTT	341 ^b
LCDV GII	Senso	TYGATTCCAAYGGTCAATTA	250 ^b
LCDV GIII	Senso	AGGAAATAACAACCGTATGAATGCA	468 ^b
LCDV-R	Antissenso	GTAATCCATACTTGHACRTC	

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

Quadro 3 - *Primers* desenhados utilizados para a obtenção de produtos de PCR relativos ao gene MCP de *Lymphocystivirus*

Nome	Orientação	Sequência (5' - 3')	Produto (bp)
LCDV F1	Senso	CCHTTACCKTATTTCTTTTC	
LCDV R1	Antissenso	CCWCCAAAATAATAWGGTTG	542
LCDV R2	Antissenso	AATATTCRCTRCCCATTTC	512

Fonte: Primers desenhados na presente investigação de autoria de MAGANHA, S. R. L.

5.4.2 PCR e *nested*-PCR

5.4.2.2 *Megalocytivirus*

O kit GoTaq[®] Colorless Mastermix 2X (PROMEGA, EUA) foi utilizado para as reações de PCR, de acordo com as recomendações do fabricante. Em síntese, em tubos estéreis de 0,2mL foi adicionado um mix contendo 8,5µL de água livre de nucleases, 1µL do primer senso específico (MV-F ou nMV-F) a 10µM, 1µL do primer antissenso específico (MV-R ou nMV-R) a 10µM e 12,5µL de GoTaq[®] Colorless Mastermix 2X, totalizando 23µL em cada microtubo. Posteriormente, foram adicionados individualmente 2µL do DNA extraído a partir das células BF-2 contendo o isolado viral. Como controle negativo, foram adicionados 2µL de água livre de nucleases ao invés do DNA, além de controle com células não infectadas. Os microtubos foram homogeneizados individualmente e colocados no termociclador (Swift[™] MaxPro Thermal Cycler, Esco Technologies Inc., EUA). Para a primeira reação visando à amplificação do fragmento de 1.362pb, o protocolo de termociclagem utilizado incluiu: incubação inicial a 95°C por 1min, e, em seguida, 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, anelamento a 58°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto, com uma extensão final a 72°C por 5 minutos, conforme

recomendações da (OIE, 2012). O mesmo protocolo de termociclagem foi utilizado para a amplificação do fragmento de 369pb (*nested-PCR*), conforme recomendado por (OIE, 2012).

A partir do produto do *nested-PCR* para *Megalocytivirus* foi realizada a eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão Tris-Acetato/EDTA (TAE 1X), incluindo-se padrão de tamanho molecular de 100pb (GE Healthcare, EUA). Após o término da corrida eletroforética, o gel foi corado por imersão em solução de SYBR[®] *Gold nucleic acid gel stain* por 20 minutos (Life Technologies[™]/Thermo Fisher Scientific, EUA) e observado à luz UV, utilizando-se sistema de fotodocumentação L-Pix ST e *software* L-Pix Image (Loccus Biotecnologia, Brasil) para aquisição de fotos.

5.4.2.2 *Lymphocystivirus*

A reação de PCR visando à amplificação de um fragmento do gene MCP de *Lymphocystivirus* foi realizada utilizando o kit GoTaq[®] Colorless Mastermix 2X (PROMEGA, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. Em síntese, em tubos estéreis de 0,2mL foi adicionado um mix contendo 0,5μL de água livre de nucleases, 2μL do primer senso específico LCDV-GI, 2μL do primer senso específico LCDV-GII, 2μL do primer senso específico LCDV-GIII e 2μL do primer antissenso específico LCDV-R, todos a 10μM e 12,5μL de GoTaq[®] Colorless Mastermix 2X, totalizando 21μL em cada microtubo. Posteriormente, foram adicionados individualmente 4μL do DNA extraído a partir das células BF-2 contendo o isolado viral. Como controle negativo foram adicionados 2μL de DNA obtido a partir de controle de células (não infectadas). Os microtubos foram homogeneizados individualmente e colocados no termociclador (Swift[™] MaxPro Thermal Cycler, Esco Technologies Inc., EUA). O protocolo de termociclagem utilizado para amplificação dos fragmentos de 341pb, 250pb e 468pb incluiu: incubação inicial a 95°C por 3min, e, em seguida, 30 ciclos de 95°C por 1 minuto, anelamento a 58°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto, com uma extensão final a 72°C por 5 minutos conforme Kitamura, Jung e Oh (2006).

A reação de PCR visando a amplificação dos fragmentos de 542pb e 512pb relativos a ao gene MCP foi realizada utilizando o kit GoTaq[®] Colorless Mastermix 2X (PROMEGA, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. Em síntese, em tubos estéreis de 0,2mL foi adicionado um mix contendo 6,5μL de água livre de nucleases, 1μL do primer senso F1, 1μL do primer antissenso específico (LCDV R1 ou LCDV R2), todos a 10μM e 12,5μL de GoTaq[®] Colorless Mastermix 2X, totalizando 21μL em cada microtubo. Posteriormente, foram adicionados individualmente 4μL do DNA extraído a partir das células BF-2 contendo o isolado

viral. Como controle negativo, foram adicionados 2µL de DNA obtido a partir de controle de células (não infectadas). Os microtubos foram homogeneizados individualmente e colocados no termociclador (Swift™ MaxPro Thermal Cycler, Esco Technologies Inc., EUA). O protocolo de termociclagem utilizado para amplificação dos fragmentos de 542pb e 512pb incluiu: incubação inicial a 95°C por 1 minuto, e, em seguida, 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, anelamento a 45°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto, com uma extensão final a 72°C por 5 minutos.

A partir do produto de PCR para *Lymphocystivirus* foi realizada a eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão Tris-Acetato/EDTA (TAE 1X), incluindo-se padrão de tamanho molecular de 100pb (GE Healthcare, EUA). Após o término da corrida eletroforética, o gel foi corado por imersão em solução de SYBR®*Gold nucleic acid gel stain* por 20 minutos (Life Technologies™/Thermo Fisher Scientific, EUA) e observado à luz UV, utilizando-se sistema de fotodocumentação L-Pix ST e *software* L-Pix Image (Loccus Biotecnologia, Brasil) para aquisição de fotos.

5.4.3 Sequenciamento de nucleotídeos

Para o envio dos produtos de PCR obtidos para sequenciamento, foi realizada a extração dos fragmentos de DNA dos géis de agarose utilizando o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (PROMEGA, EUA), segundo as recomendações do fabricante. O fragmento do gel de agarose foi excisado do gel de agarose por meio de uma lâmina de vidro estéril e foi acondicionado em microtubo estéril de 1,5mL. Em seguida, o fragmento foi pesado em balança analítica, uma vez que, de acordo com o protocolo, para cada 10mg do gel de agarose deve-se acrescentar um volume de 10µL de *Membrane Binding Solution* (PROMEGA, EUA). A amostra foi então incubada na temperatura de 50°C, sendo submetida à homogeneização em vórtex a cada 5 minutos até a completa dissolução do fragmento de gel. Na sequência, a amostra foi transferida para uma coluna com membrana de sílica acoplada em tubo coletor e incubada por 1 minuto na temperatura ambiente. Posteriormente, a coluna acoplada ao tubo coletor foi submetida à centrifugação a $16.000 \times g$ por 1 minuto e o conteúdo do tubo coletor foi descartado. Procedeu-se então a lavagem da membrana de sílica; para tanto, foram adicionados 700µL de *Membrane Wash Solution* na coluna, submetendo-a novamente à centrifugação a $16.000 \times g$ durante 1 minuto; novamente o eluato foi descartado e a coluna colocada no tubo coletor. Procedeu-se então uma segunda lavagem da membrana de sílica; para tanto, foram adicionados 500µL de *Membrane Wash Solution* na coluna, submetendo-a novamente à

centrifugação a $16.000 \times g$ por 5 minutos; novamente o conteúdo do tubo coletor foi descartado. A coluna vazia foi submetida à centrifugação a $16.000 \times g$ por 1 minuto para evaporação do etanol residual. Por fim, o DNA foi eluído com 50 μ L de *Nuclease Free Water* em microtubo estéril de 1,5mL, deixando-se, inicialmente, a coluna em repouso, após a adição do eluente, em temperatura ambiente por 1 minuto, sendo, na sequência, submetida à centrifugação por $16.000 \times g$, durante 1 minuto, em temperatura ambiente. O DNA obtido após a extração foi quantificado, em nanograma/microlitro (ng/ μ L), por espectrofotometria (DS-11/DS-11 + Spectrophotometer, DeNovix, EUA), segundo a razão de absorbância A_{260}/A_{280} . O DNA purificado, juntamente com os *primers*, foi enviado para sequenciamento de nucleotídeos na empresa Helixxa localizada na cidade de Paulínia/SP, sendo utilizada a plataforma Applied Biosystems® 3500 Genetic Analyzer para realização do sequenciamento. O mesmo protocolo de sequenciamento descrito acima foi utilizado para ambos os isolados virais.

5.5 Análise Filogenética

5.5.1 *Megalocytivirus*

O programa BLAST versão 2.0 (ALTSCHUL et al., 1997) foi utilizado na pesquisa de similaridade entre as sequências obtidas neste estudo com outras sequências relativas ao gene MCP de *Megalocytivirus* descritas na literatura. O programa ClustalW versão 1.4 (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994), implementado no programa BioEdit Sequence Alignment Editor versão 7.0.2 (HALL, 1999) foi utilizado para a edição e o alinhamento múltiplo das sequências nucleotídicas obtidas utilizando-se, para tanto, dos parâmetros em *default*. O programa MEGA versão 7.0 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016) foi utilizado para a realização das reconstruções filogenéticas através do método *Maximum likelihood* (ML), aplicando suporte nodal de *bootstrap* para 1000 pseudo-réplicas (HILLS; BULL, 1993). Para a reconstrução filogenética, foram utilizadas outras sequências de *Megalocytivirus* depositadas no GenBank, conforme indicado no quadro 4.

Quadro 4 – Sequências nucleotídicas de *Megalocytivirus* utilizadas para reconstrução filogenética com indicação do genótipo, números de acesso no GenBank, isolado e país de origem.

Genótipo 1 - Infectious spleen and kidney necrosis iridovirus					
Nº de Acesso	Sigla	Origem	Hospedeiro	Genoma	Referência
AF371960	ISKNV	China	<i>Siniperca chuatsi</i>	Completo	He et al., 2001
AY285744	DGIV	Malásia	<i>Colisa lalia</i>	Parcial	Sudthongkong et al., 2002
AY989901	DGIV-2004	Japão	<i>Colisa lalia</i>	Parcial	Go et al., 2006
AY285745	ALIV	Indonésia	<i>Aplocheilichthys normani</i>	Parcial	Sudthongkong et al., 2002
AY936203	MCIV	Austrália	<i>Maccullochella peelii</i>	Parcial	Go et al., 2006
Genótipo 2 - Red seabream iridovirus (RSIV)					
Nº de Acesso	Sigla	Origem	Hospedeiro	Genoma	Referência
AY532606	RBIV-KOR-TY1	Coréia	<i>Oplegnathus fasciatus</i>	Completo	Do et al., 2004
AY532607	RBIV-KOR-TY3	Coréia	<i>Oplegnathus fasciatus</i>	Parcial	Do et al., 2004
AY532608	RBIV-KOR-TY4	Coréia	<i>Oplegnathus fasciatus</i>	Parcial	Do et al., 2004
AY532609	RBIV-KOR-GJ	Coréia	<i>Oplegnathus fasciatus</i>	Parcial	Do et al., 2004
AY532610	RBIV-KOR-IY	Coréia	<i>Oplegnathus fasciatus</i>	Parcial	Do et al., 2004
AY532612	RSIV-KOR-TY	Coréia	<i>Pagrus major</i>	Parcial	Do et al., 2004
AY532613	SBIV-KOR-TY	Coréia	<i>Lateolabrax japonicus</i>	Parcial	Do et al., 2004
AY532614	RBIV-KOR-TY	Coréia	<i>Oplegnathus fasciatus</i>	Parcial	Do et al., 2004
AY533035	RBIV-KOR-TY2	Coréia	<i>Oplegnathus fasciatus</i>	Parcial	Do et al., 2004
AY894343	OSGIV	China	<i>Epinephelus coioides</i>	Completo	Lü et al., 2005
AY285746	GSDIV	Tailândia	<i>Epinephelus tauvina</i>	Parcial	Sudthongkong et al., 2002
AY310918	RSIV	Japão	<i>Pagrus major</i>	Parcial	Sudthongkong et al., 2002
EU315313	GSIV	Taiwan	<i>Lates calcarifer</i>	Parcial	Wen et al., 2008
AB109371	RSIV	Japão	<i>Pagrus major</i>	Parcial	Sudthongkong et al., 2002
AB109372	SBIV	China	<i>Lateolabrax sp.</i>	Parcial	Sudthongkong et al., 2002
Genótipo 3 - Turbot reddish body iridovirus (TRBIV)					
Nº de Acesso	Sigla	Origem	Hospedeiro	Genoma	Referência
AY590687	TRBIV	China	<i>Scophthalmus maximus</i>	Parcial	Shi et al., 2010
AY532611	RBIV-KOR-CS	Coréia	<i>Oplegnathus fasciatus</i>	Parcial	Do et al., 2004
AY633987	FLIV-EJ	Coréia	<i>Paralichthys olivaceus</i>	Parcial	Do et al., 2005
AY633988	FLIV-JJ	Coréia	<i>Paralichthys olivaceus</i>	Parcial	Do et al., 2005
AY633991	FLIV-JHJ	Coréia	<i>Paralichthys olivaceus</i>	Parcial	Do et al., 2005
EU276417	OFLIV-1	Coréia	<i>Paralichthys olivaceus</i>	Parcial	Não publicado
GQ273492	TRBIV	China	<i>Scophthalmus maximus</i>	Completo	Shi et al., 2010

Fonte: Própria autoria.

5.5.2 *Lymphocystivirus*

A pesquisa de similaridade entre as sequências obtidas neste estudo com outras sequências relativas ao gene MCP de *Lymphocystivirus* descritas na literatura foi realizada no programa BLAST versão 2.0 (ALTSCHUL et al., 1997). A edição e o alinhamento múltiplo das sequências nucleotídicas obtidas foi realizada no programa BioEdit Sequence Alignment Editor

versão 7.0.2 (HALL, 1999) utilizando-se, para tanto, dos parâmetros em *default*. A reconstrução filogenética foi realizada no programa MEGA versão 7.0 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016) através do método *Maximum likelihood* (ML), aplicando suporte nodal de *bootstrap* para 1000 pseudo-réplicas (HILLS; BULL, 1993). Para a reconstrução filogenética, foram utilizadas outras sequências de *Megalocytivirus* depositadas no GenBank, conforme indicado no quadro 5.

Quadro 5 – Sequências nucleotídicas de *Lymphocystivirus* utilizadas para reconstrução filogenética com indicação do genótipo, números de acesso no GenBank, isolado e país de origem.

Genótipo 1					
N° de Acesso	Sigla	Origem	Hospedeiro	Genoma	Referência
L63545	LCDV-1	China	<i>Paralichthys flesus</i>	Completo	Tidona; Darai, 1997
Genótipo 2					
N° de Acesso	Sigla	Origem	Hospedeiro	Genoma	Referência
AY380826	LCDV-C	China	<i>Paralichthys olivaceus</i>	Completo	Zhang et al., 2004
AB213000	JF03ShinJi	Coréia	<i>Paralichthys olivaceus</i>	Parcial	Kitamura; Jung; Oh, 2006a
AB212998	JF03Yoshi	Japão	<i>Paralichthys olivaceus</i>	Parcial	Kitamura; Jung; Oh, 2006a
AB212997	JF00Kuma	Japão	<i>Paralichthys olivaceus</i>	Parcial	Kitamura; Jung; Oh, 2006a
AB213003	JF04JeJu	Coréia	<i>Paralichthys olivaceus</i>	Parcial	Kitamura; Jung; Oh, 2006a
AB213002	JF03GunNeB	Coréia	<i>Paralichthys olivaceus</i>	Parcial	Kitamura; Jung; Oh, 2006a
AB213001	JF03GunNeA	Coréia	<i>Paralichthys olivaceus</i>	Parcial	Kitamura; Jung; Oh, 2006a
AB212999	JF00Yosu	Coréia	<i>Paralichthys olivaceus</i>	Parcial	Kitamura; Jung; Oh, 2006a
AY849391	JF	Coréia	<i>Paralichthys olivaceus</i>	Parcial	Kim; Lee, 2007
AY297741	KLDV-1	Coréia	<i>Paralichthys olivaceus</i>	Completo	Kim; Lee, 2007
AY303804	LCDV-K1	Coréia	<i>Paralichthys olivaceus</i>	Parcial	Kim; Lee, 2007
Genótipo 3					
N° de Acesso	Sigla	Origem	Hospedeiro	Genoma	Referência
AB213004	RF03Yosu	Coréia	<i>Sebastes schlegeli</i>	Parcial	Kitamura; Jung; Oh, 2006
AB213005	RF04Yosu	Coréia	<i>Sebastes schlegeli</i>	Parcial	Kitamura; Jung; Oh, 2006
AB213006	RF04JinJu	Coréia	<i>Sebastes schlegeli</i>	Parcial	Kitamura; Jung; Oh, 2006
Genótipo 4					
N° de Acesso	Sigla	Origem	Hospedeiro	Genoma	Referência
EF103188	LCDV-RC	China	<i>Rachycentron canadum</i>	Parcial	Fu et al., 2007
AB247938	SB98Yosu	Coréia	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Parcial	Kitamura et al., 2006
EF059992	RC	China	<i>Rachycentron canadum</i>	Parcial	Não publicado
EF378607	RC-Taiwan	Taiwan	<i>Rachycentron canadum</i>	Parcial	Não publicado
Genótipo 5					
N° de Acesso	Sigla	Origem	Hospedeiro	Genoma	Referência
AB299163	PGF05	Coréia	<i>Parambassis ranga</i>	Parcial	Hossain et al., 2008
Genótipo 6					
N° de Acesso	Sigla	Origem	Hospedeiro	Genoma	Referência
AB299164	PG06	Coréia	<i>Trichogaster leeri</i>	Parcial	Hossain et al., 2008
Genótipo 7					
N° de Acesso	Sigla	Origem	Hospedeiro	Genoma	Referência
EF184306	LCDV-AS Eilat	Israel	<i>Sparus aurata</i>	Parcial	Kvitt et al., 2008

GU320736	SSE20	Espanha	<i>Solea senegalensis</i>	Parcial	Cano et al., 2010
GU320739	SA24	França	<i>Sparus aurata</i>	Parcial	Cano et al., 2010
GU320733	SA16	Espanha	<i>Sparus aurata</i>	Parcial	Cano et al., 2010
GU320737	SA22	França	<i>Sparus aurata</i>	Parcial	Cano et al., 2010
GU320732	SA14	Espanha	<i>Sparus aurata</i>	Parcial	Cano et al., 2010
GU320730	SA12	Espanha	<i>Sparus aurata</i>	Parcial	Cano et al., 2010
GU320725	SA5	Espanha	<i>Sparus aurata</i>	Parcial	Cano et al., 2010
GU320726	SA6	Espanha	<i>Sparus aurata</i>	Parcial	Cano et al., 2010
GU320735	SA19	Espanha	<i>Sparus aurata</i>	Parcial	Cano et al., 2010

Genótipo 8

N° de Acesso	Sigla	Origem	Hospedeiro	Genoma	Referência
GU290550	Leetown NFH	USA	<i>Micropterus salmoides</i>	Parcial	Cano et al., 2010

Genótipo 9

N° de Acesso	Sigla	Origem	Hospedeiro	Genoma	Referência
GU939626	YP1	Canadá	<i>Perca flavescens</i>	Parcial	Palmer et al., 2012

Fonte: Própria autoria.

5.6 Microscopia Eletrônica de Transmissão

5.6.1 *Megalocytivirus*

A amostra, após confirmação do isolamento viral por sequenciamento nucleotídico, foi enviada a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo para a realização da caracterização morfológica das partículas virais por meio da técnica de microscopia eletrônica de transmissão. Para isso, uma garrafa de cultivo de 25cm² com filtro (Corning®, Sigma-Aldrich Co., EUA), contendo monocamada de células BF-2, foi inoculada com 150µL da P5 do inóculo viral de *Megalocytivirus*, completando-se o volume para 5mL com meio de manutenção. Posteriormente, a garrafa foi incubada em estufa a 5% de CO₂ e 25°C e monitorada diariamente até o aparecimento do efeito citopático. Após 24h de incubação, observou-se o arredondamento celular e a morte de várias células caracterizando o início do efeito citopático; então, o meio juntamente com as células foram removidos, acondicionados em falcon estéril de 15mL e centrifugados a temperatura ambiente a 500 ×g por 5 minutos. Após a centrifugação, o *pellet* formado foi fixado à temperatura ambiente em 500µL de solução composta por glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato 0,1 M pH 7,4 por 2 horas. Posteriormente, a amostra foi centrifugada a 500×g por 5 minutos, à temperatura ambiente, e o sobrenadante foi desprezado. O *pellet* formado foi lavado com 500 µL em tampão cacodilato

0,1 M, pH 7.4 e novamente a amostra foi centrifugada, à temperatura ambiente, a $500 \times g$ por 5 minutos. Esse processo de lavagem foi repetido por mais 2 vezes, totalizando 3 lavagens.

A amostra refrigerada foi então enviada para a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo para o preparo das lâminas e leitura no microscópio eletrônico de transmissão (Jeol JEM- 100 CXII), equipado com câmera digital Hamamatsu ORCA-HR.

No Laboratório Multiusuário de Microscopia Eletrônica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, a amostra foi pós-fixada em tetróxido de ósmio 2% a 4°C, por 2 horas. Posteriormente, foram realizadas desidratações de 10 minutos cada em soluções contendo concentrações crescentes de acetona (30%, 50%, 70%, 90%, 95%). A desidratação final foi feita em acetona absoluta e foi constituída de 2 ciclos de 20 minutos de duração cada. As células foram então infiltradas, à temperatura ambiente, em resina epóxi e acetona 100% (proporção 1:1) por 24 horas. A inclusão foi realizada em estufa a 60°C, por 72 horas, em moldes de resina epóxi (Araldite®). Cortes ultrafinos foram realizados com micrótomo, montados em lâminas e contrastados. A lâmina preparada foi visualizada em microscópio eletrônico de transmissão (Jeol JEM- 100 CXII), utilizando a câmera digital Hamamatsu ORCA-HR para a aquisição das fotos.

5.7 Determinação do título viral (TCID₅₀.ml⁻¹)

5.7.1 Megalocytivirus

Para a determinação do título viral (TCID₅₀.ml⁻¹) foram preparadas 2 placas de 96 poços (Corning®, Sigma-Aldrich Co., EUA), contendo $1,5 \times 10^4$ células BF-2/ml. As placas preparadas foram mantidas em meio de cultivo e incubadas em estufa a 25°C e 5% por 24h. Após esse período, foram preparadas 8 diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-8}) em meio de manutenção, a partir da terceira passagem (P3) do inóculo viral de *Megalocytivirus*. As diluições foram mantidas em gelo até serem utilizadas. Após a retirada do meio de cultivo, cada coluna da placa (8 poços) foi inoculada com 50µL da diluição correspondente, sendo o procedimento descrito anteriormente realizado também para a segunda placa. Posteriormente, as placas contendo o inóculo viral foram incubadas em estufa a 25°C e 5% de CO₂ por uma hora visando a adsorção das partículas virais, sendo realizados movimentos circulares a cada 15 minutos. Após 1h, em cada poço da placa foram adicionados 50µL de meio de manutenção. Como controle negativo, foram adicionados 100µL de meio de manutenção em 2 colunas de cada uma das placas

totalizando 32 poços. As placas contendo o inóculo foram então incubadas a 25°C e 5% de CO₂ e a leitura realizada no sétimo dia de incubação. O cálculo proposto por Reed e Muench (1938) foi utilizado para determinar a TCID₅₀.ml⁻¹.

O mesmo procedimento descrito acima foi realizado para a obtenção do título viral da quinta passagem (P5) do inóculo viral de *Megalocytivirus*, pois nos ensaios de caracterização viral descritos a seguir foi utilizada esta passagem.

5.7.2 *Lymphocystivirus*

O mesmo procedimento descrito no item 5.7.1 foi realizado para a obtenção do título viral da primeira passagem (P1) e da segunda passagem (P2) do inóculo viral de *Lymphocystivirus*, sendo que para a realização dos ensaios de caracterização viral foi utilizada a segunda passagem (P2).

5.8 Sensibilidade ao descongelamento

5.8.1 *Megalocytivirus*

Foram estudadas alterações no título viral de *Megalocytivirus* após congelamento e descongelamento à -80°C e à -20°C. Para verificar a sensibilidade após congelamento à -80°C, uma alíquota de 1 ml da quinta passagem (P5) do inóculo viral de *Megalocytivirus* foi congelada a -80°C e descongelada por 3 vezes. Posteriormente a alíquota foi titulada em duplicata conforme protocolo descrito no item 5.7.1.

Para verificar se ocorrem alterações no título viral após o congelamento a -20°C uma alíquota de 1 ml da quinta passagem (P5) do inóculo viral de *Megalocytivirus* foi congelada a -20°C e descongelada por 3 vezes. Posteriormente a alíquota foi titulada em duplicata conforme protocolo descrito no item 5.7.1.

5.8.2 *Lymphocystivirus*

Foram estudadas alterações no título viral após congelamento e descongelamento à -80°C e à -20°C . Para verificar a sensibilidade após congelamento a -80°C , uma alíquota de $100\mu\text{L}$ da primeira passagem (P1) do inóculo viral de *Megalocytivirus* foi congelada a -80°C e descongelada por 3 vezes. Posteriormente a alíquota foi titulada em duplicata conforme protocolo descrito no item 5.7.1.

Para verificar se ocorreram alterações no título viral após o congelamento a -20°C , uma alíquota de $100\mu\text{L}$ da segunda passagem (P2) do inóculo viral de *Lymphocystivirus* foi congelada a -20°C e descongelada por 3 vezes. Posteriormente a alíquota foi titulada em duplicata conforme protocolo descrito no item 5.7.1.

5.9 Susceptibilidade ao éter

5.9.1 *Megalocytivirus*

Para a realização do teste de susceptibilidade a solvente lipídico, a fim de determinar a presença ou não de uma membrana lipídica na partícula viral, 1mL de éter etílico grau analítico foi adicionado a 2mL da quinta passagem do inóculo viral. Como controle negativo, 1mL de éter foi adicionado a 2mL de meio de manutenção. As soluções foram então homogeneizadas, incubadas a 4°C por 18h e posteriormente tituladas em duplicatas conforme protocolo descrito no item 5.7.1. O procedimento descrito acima foi realizado de acordo com o protocolo descrito por Speare e Smith (1992).

5.9.2 *Lymphocystivirus*

Para a realização do teste de susceptibilidade a solvente lipídico para o isolado brasileiro de *Lymphocystivirus*, foi utilizado o protocolo descrito por Speare e Smith (1992) com algumas modificações. Para isso, $50\mu\text{L}$ de éter etílico grau analítico foi adicionado a $100\mu\text{L}$ da segunda passagem (P2) do inóculo viral de *Lymphocystivirus*. Como controle negativo, $50\mu\text{L}$ de éter foi adicionado a $100\mu\text{L}$ de meio de manutenção. As soluções foram então homogeneizadas, incubadas a 4°C por 18h e posteriormente tituladas em duplicatas conforme protocolo descrito no item 5.7.1.

5.10 Susceptibilidade ao clorofórmio

5.10.1 *Megalocytivirus*

Para o teste de sensibilidade ao clorofórmio foi utilizado o protocolo descrito por Alonso et al. (2005), com algumas modificações. Para isso, 200µL de clorofórmio grau analítico foi misturado a 200µL da quinta passagem do inóculo viral de *Megalocytivirus*. Como controle negativo, 200µL de clorofórmio foi adicionado a 200µL de meio de manutenção. As soluções foram então incubadas a 25°C por 1 hora, centrifugadas a 100 × g por 10 minutos e a fase aquosa foi coletada. Posteriormente, a fase aquosa foi titulada em duplicata conforme protocolo descrito no item 5.7.1.

5.10.2 *Lymphocystivirus*

Para o teste de sensibilidade ao clorofórmio foi utilizado o protocolo descrito por Alonso et al. (2005), com algumas modificações. Para isso, 100µL de clorofórmio grau analítico foi misturado a 100µL da segunda passagem (P2) do inóculo viral de *Lymphocystivirus*. Como controle negativo, 100µL de clorofórmio foi adicionado a 100µL de meio de manutenção. As soluções foram então incubadas a 25°C por 1 hora, centrifugadas a 100 × g por 10 minutos e a fase aquosa foi coletada. Posteriormente, a fase aquosa foi titulada em duplicata conforme protocolo descrito no item 5.7.1.

5.11 Susceptibilidade a luz ultravioleta

5.11.1 *Megalocytivirus*

O teste de sensibilidade a luz ultravioleta foi realizado segundo o protocolo descrito por Iwamoto et al. (2002) com algumas modificações. Para isso, uma alíquota de 200µL da quinta passagem (P5) do inóculo viral de *Megalocytivirus* foi distribuída num poço (4 cm de diâmetro e 2 cm de profundidade) de uma placa de 6 poços (Corning®, Sigma-Aldrich Co., EUA). A suspensão viral foi irradiada com luz ultravioleta por 15 minutos. Posteriormente a alíquota foi titulada em duplicata conforme protocolo descrito no item 5.7.1.

5.11.2 *Lymphocystivirus*

O teste de sensibilidade a luz ultravioleta foi realizado segundo o protocolo descrito por Iwamoto et al. (2002) com algumas modificações. Para isso, uma alíquota de 200µL da segunda passagem (P2) do inóculo viral de *Lymphocystivirus* foi distribuída num poço (4 cm de diâmetro e 2 cm de profundidade) de uma placa de 6 poços (Corning®, Sigma-Aldrich Co., EUA). A suspensão viral foi irradiada com luz ultravioleta por 15 minutos. Posteriormente a alíquota foi titulada em duplicata conforme protocolo descrito no item 5.7.1.

5.12 Sensibilidade ao calor

5.12.1 *Megalocytivirus*

Foram estudadas alterações nos títulos virais da quinta passagem do inóculo viral de *Megalocytivirus* nas temperaturas 16°C, 25°C, 37°C e 56°C, segundo o protocolo descrito por Speare e Smith (1992) com algumas modificações. Para cada temperatura, microtubos de 1,5mL contendo 1mL da quinta passagem do inóculo viral (P5) foram incubados por 6h em banho seco na temperatura desejada. Como controle negativo, 1mL de meio de manutenção foi incubado na mesma temperatura do inóculo. Posteriormente as amostras foram tituladas em duplicatas conforme protocolo descrito no item 5.7.1.

5.12.2 *Lymphocystivirus*

Foram estudadas alterações nos títulos virais nas temperaturas 16°C, 25°C, 37°C e 56°C, segundo o protocolo descrito por Speare & Smith (1992) com algumas modificações. Para cada temperatura, microtubos de 0,2 mL contendo 100µL da segunda passagem do inóculo viral (P2) foram incubados por 6h em banho seco na temperatura desejada. Como controle negativo, alíquota de 100µL de meio de manutenção foi incubada na mesma temperatura do inóculo. Posteriormente as amostras foram tituladas em duplicatas conforme protocolo descrito no item 5.7.1.

5.13 Susceptibilidade a diferentes pHs

5.13.1 *Megalocytivirus*

Foram estudadas alterações nos títulos virais nos pHs 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 11 e 12 de acordo com o protocolo descrito por Speare e Smith (1992). Foi testado também o pH do meio que é 7,8. Para isso, foram preparadas soluções de HCl 1M e NaOH 10M que foram adicionadas ao meio de manutenção, a fim de se obter os valores de pH desejados. Posteriormente, 500µL da quinta passagem do inóculo viral (P5) foram adicionados a 5mL da solução teste que se encontrava no pH desejado. As soluções foram então homogeneizadas e incubadas a 25°C por 1h. Após 1h, 500µL da solução anterior foram pipetados em 4,5mL de meio de manutenção e o pH foi neutralizado. Como controle negativo, foi utilizado o mesmo procedimento descrito anteriormente; contudo, utilizou-se meio de manutenção ao invés do inóculo. Posteriormente, as amostras foram tituladas em duplicatas conforme protocolo descrito no item 4.8.

5.13.2 *Lymphocystivirus*

Foram estudadas alterações nos títulos virais nos pHs 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 14 de acordo com o protocolo descrito por Speare e Smith (1992). Foi testado também o pH do meio que é 7,8. Para isso, foram preparadas soluções de HCl 1M e NaOH 10M que foram adicionadas ao meio de manutenção, a fim de se obter os valores de pH desejados. Posteriormente, 100µL da segunda passagem do inóculo viral (P2) foram adicionados a 900µL da solução teste que se encontrava no pH desejado. As soluções foram então homogeneizadas e incubadas a 25°C por 1h. Após 1h, o pH foi neutralizado. Como controle negativo, foi utilizado o mesmo procedimento descrito anteriormente; contudo, utilizou-se meio de manutenção ao invés do inóculo. Posteriormente as amostras foram tituladas em duplicatas conforme protocolo descrito no item 4.8.

5.14 Curva de Replicação

5.14.1 *Megalocytivirus*

Para a realização da curva de replicação viral foram preparadas placas de 24 poços (Corning®, Sigma-Aldrich Co., EUA), contendo 8×10^4 células BF-2/ml. As placas foram mantidas em meio de cultivo e incubadas em estufa a 25°C e 5% de CO₂ por 24h. Após 24h de incubação, 200µL da quinta passagem (P5) do inóculo viral foi diluído em 1,8mL de meio de manutenção e 16 poços da placa (dois para cada tempo) foram infectados com 100µL da solução. Após a inoculação, as placas foram mantidas em estufa a 25°C e 5% de CO₂ por 1h para a adsorção das partículas virais, sendo realizados movimentos circulares a cada 15 minutos para facilitar homogeneização. Posteriormente, 900µL de meio de manutenção foram adicionados a cada um dos poços. Como controle negativo, para cada tempo estudado foi adicionado 1mL meio de manutenção ao poço correspondente. O conteúdo dos poços foi coletado diariamente em duplicata nos tempos 12h, 24h, 36h, 48h, 72h, 96h, 120h e 144h após inoculação e mantidos a -80°C. Posteriormente, as alíquotas foram descongeladas e tituladas, de acordo com o protocolo descrito no item 5.7.1.

5.14.2 *Lymphocystivirus*

Para a realização da curva de replicação viral foram preparadas placas de 24 poços (Corning®, Sigma-Aldrich Co., EUA) contendo 8×10^4 células BF-2/ml. As placas foram mantidas em meio de cultivo e incubadas em estufa a 25°C e 5% de CO₂ por 24h. Após 24h de incubação, 12 poços da placa (dois para cada tempo) foram infectados com 250µL da segunda passagem do inóculo viral (P2). Após inoculação, as placas foram mantidas em estufa a 25°C e 5% de CO₂ por 1h para a adsorção das partículas virais, sendo realizados movimentos circulares a cada 15 minutos para facilitar homogeneização. Posteriormente, 750µL de meio de manutenção, foram adicionados a cada um dos poços. Como controle negativo, para cada tempo estudado foi adicionado 1mL meio de manutenção ao poço correspondente. O conteúdo dos poços foi coletado diariamente em duplicata nos tempos 24h, 48h, 72h, 96h, 120h e 144h após inoculação e mantidos a -80°C. Posteriormente, as alíquotas foram descongeladas e tituladas, de acordo com o protocolo descrito no item 5.7.1.

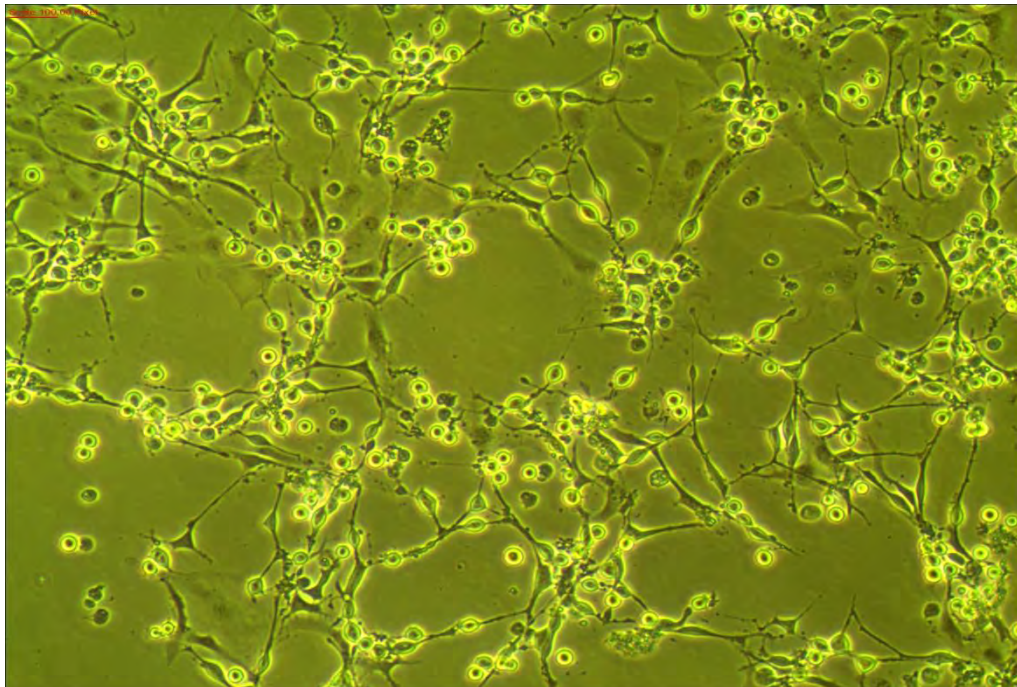
6 RESULTADOS

6.1 Isolamento viral

6.1.1 *Megalocytivirus*

Do total de amostras submetidas ao isolamento viral, apenas a amostra referente ao *pool* de tecidos oriundo da espécie de peixe *Poecilia reticulata* apresentou efeito citopático em placa após a segunda passagem (P2). O efeito citopático foi observado seis dias após a inoculação da primeira passagem (P1) e caracterizou-se pelo arredondamento celular, desprendimento das células da superfície da placa e posteriormente morte celular (Figura 1). O controle negativo de células que foi inoculado com meio de manutenção encontra-se demonstrado na Figura 2. Posteriormente foram realizadas passagens sucessivas do inóculo viral em garrafas de 25cm², a fim de se aumentar o título viral para a realização dos ensaios posteriores. Todos os estudos de caracterização viral descritos a seguir foram realizados utilizando a quinta passagem do inóculo viral (Figura 3).

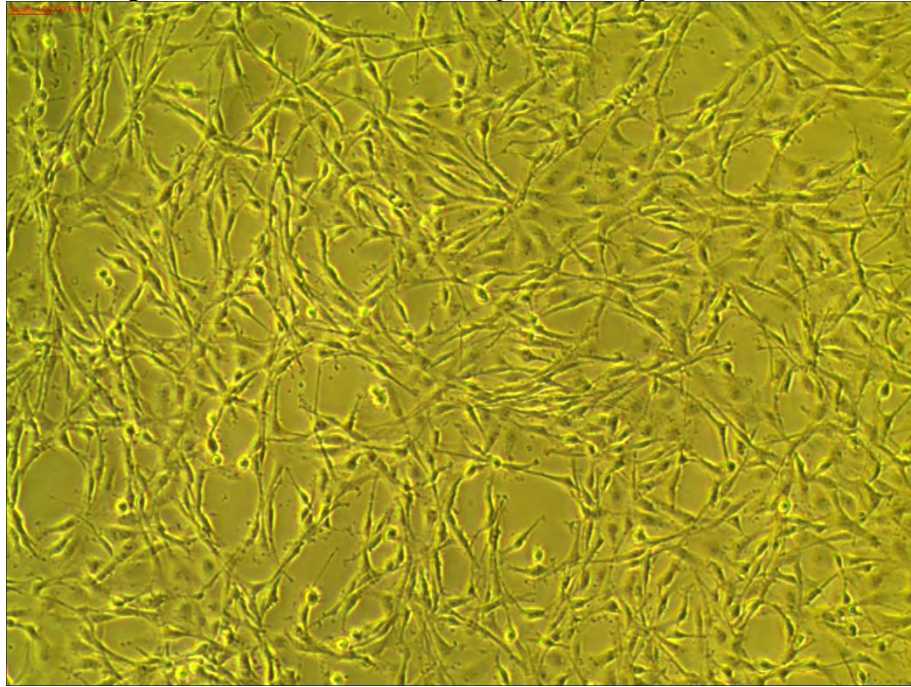
Figura 1 – Efeito citopático obtido a partir da inoculação da primeira passagem do inóculo viral de *Megalocytivirus* oriundo do *pool* de tecidos de peixe ornamental *Poecilia reticulata*.



Legenda: Legenda: Monocamada de células BF-2 inoculada com a primeira passagem do inóculo viral no sexto dia pós inoculação observada no aumento de 100X. Na figura, observa-se o arredondamento celular e a destruição da monocamada caracterizando a presença de efeito citopático.

Fonte: Própria autoria.

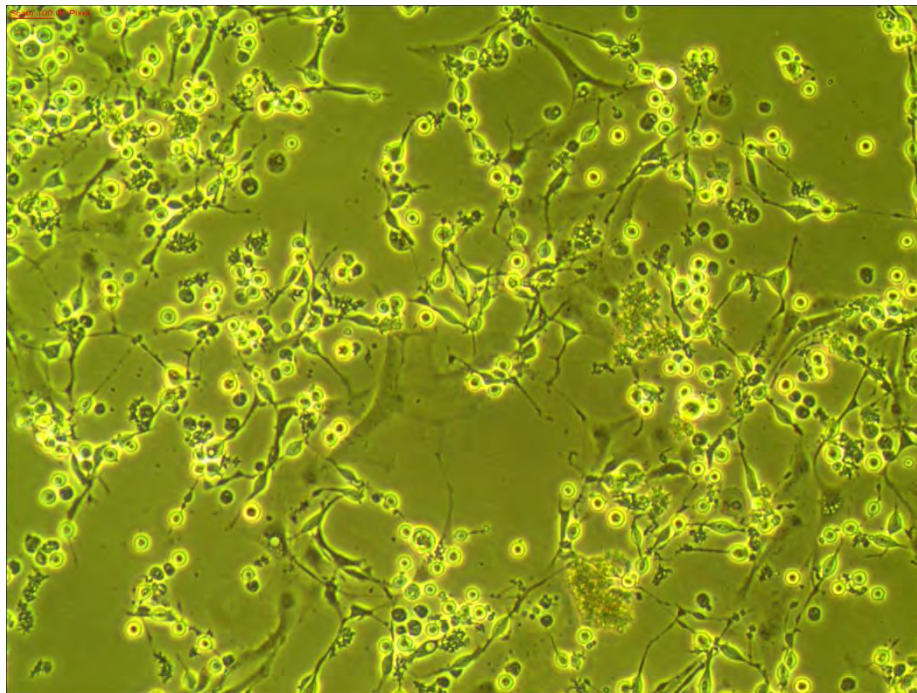
Figura 2 – Controle negativo de células BF-2 obtido a partir da adição de meio de manutenção 2% SFB.



Legenda: Monocamada de células BF-2 após 2 dias da adição de meio de manutenção 2% SFB observada no aumento de 100X.

Fonte: Própria autoria.

Figura 3 – Efeito citopático obtido a partir da inoculação da quarta passagem do inóculo viral de *Megalocytivirus* oriundo do pool de tecidos de peixe ornamental *Poecilia reticulata*.



Legenda: Monocamada de células BF-2 inoculada com a quarta passagem do inóculo viral no segundo dia pós inoculação observada no aumento de 100X. Na figura, observa-se o arredondamento celular e a destruição da monocamada caracterizando a presença de efeito citopático.

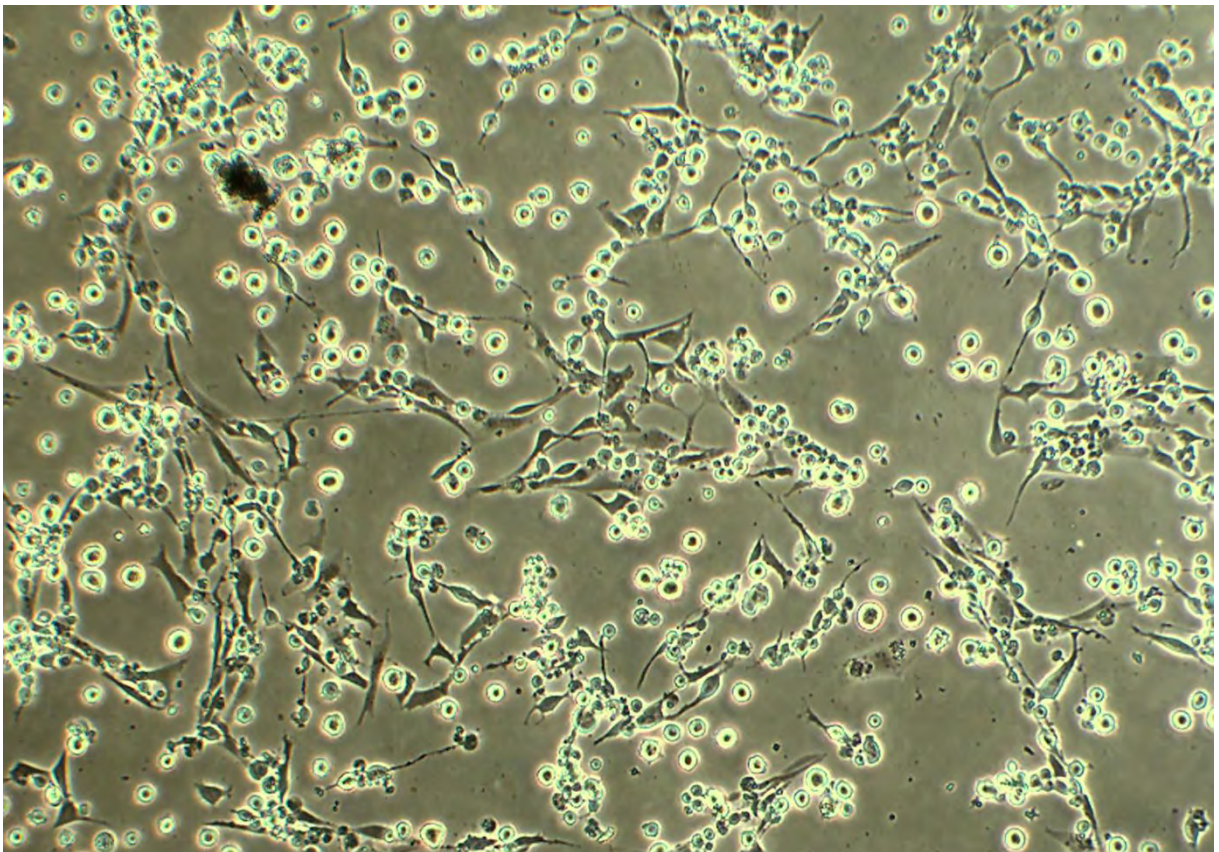
Fonte: Própria autoria.

6.1.2 *Lymphocystivirus*

A amostra oriunda da lesão de pele do peixe Anjo de face azul (*Pomacanthus xanthometopon*) apresentou efeito citopático após a primeira passagem em placa (P1). O efeito citopático ocorreu 5 dias após a inoculação da amostra e foi caracterizado pela presença de células arredondadas e refratárias ao longo da placa (Figura 4), evoluiu para o desprendimento de células BF-2 da monocamada e posteriormente morte celular. A figura 5 ilustra o controle negativo de células inoculado apenas com meio de manutenção 2% SFB.

Após a observação do efeito citopático foi realizada mais uma passagem sucessiva em placa (P2) devido à dificuldade de obtenção de efeito citopático em garrafa de 25 cm² (Figura 6).

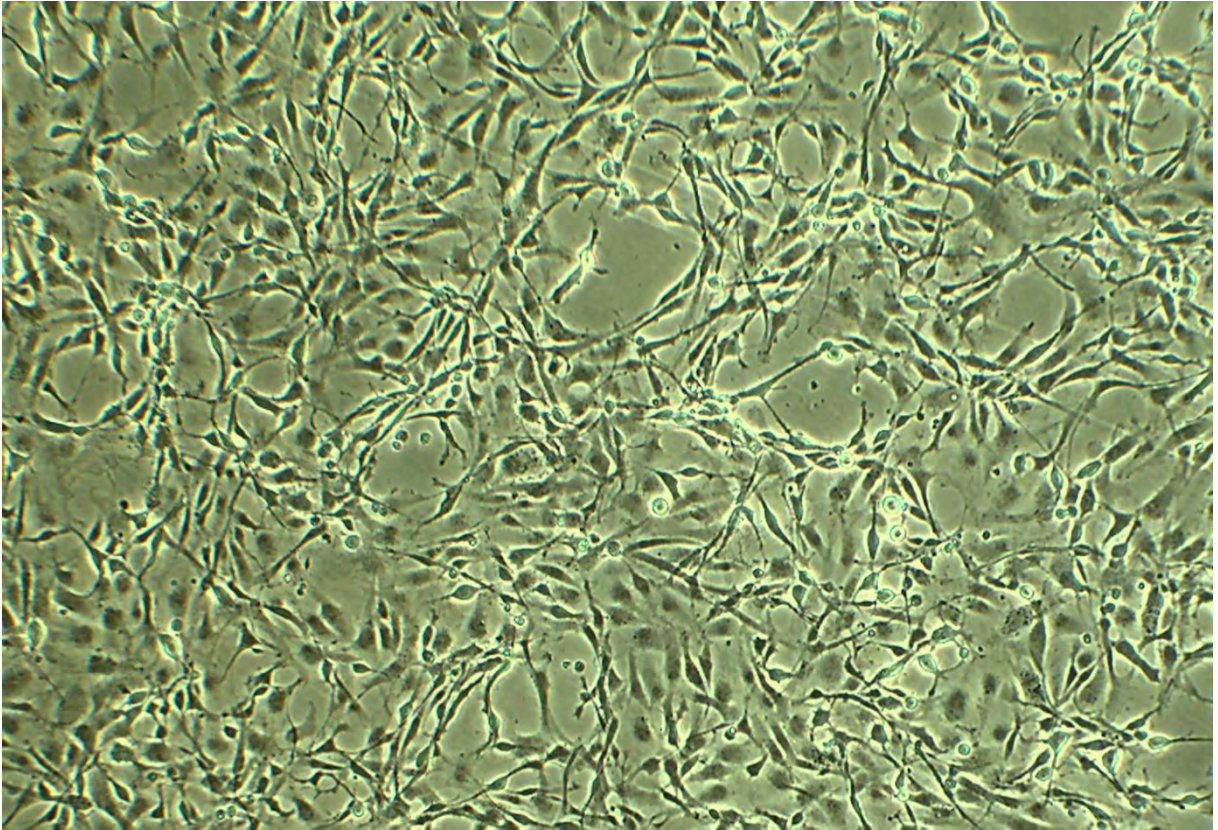
Figura 4 – Efeito citopático obtido para a primeira passagem do inóculo viral de *Lymphocystivirus* oriundo da lesão de pele de peixe ornamental *Pomacanthus xanthometopon*.



Legenda: Monocamada de células BF-2 inoculada com o inóculo viral no quinto dia pós inoculação observada no aumento de 100X. Na figura, observa-se o arredondamento celular e a destruição da monocamada caracterizando a presença de efeito citopático.

Fonte: Própria autoria.

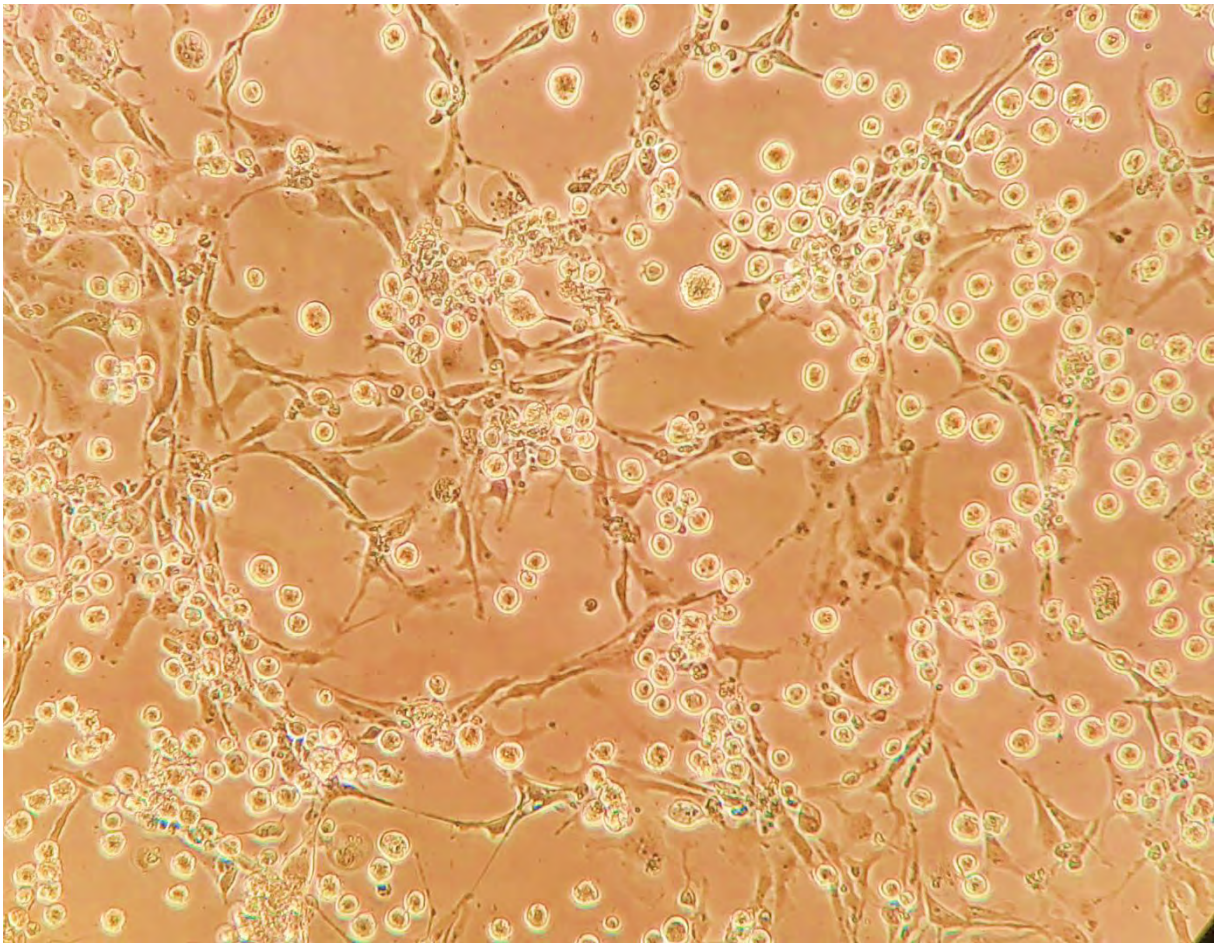
Figura 5 – Controle negativo de células BF-2 obtido a partir da adição de meio de manutenção 2% SFB.



Legenda: Monocamada de células BF-2 após 5 dias da adição de meio de manutenção 2% SFB observada no aumento de 100X.

Fonte: Própria autoria.

Figura 6 – Efeito citopático obtido para a segunda passagem do inóculo viral de *Lymphocystivirus* oriundo da lesão de pele de peixe ornamental *Pomacanthus xanthurus*.



Legenda: Monocamada de células BF-2 inoculada com a primeira passagem do inóculo viral no quarto dia pós inoculação observada no aumento de 100X. Na figura, observa-se o arredondamento celular e a destruição da monocamada caracterizando a presença de efeito citopático.

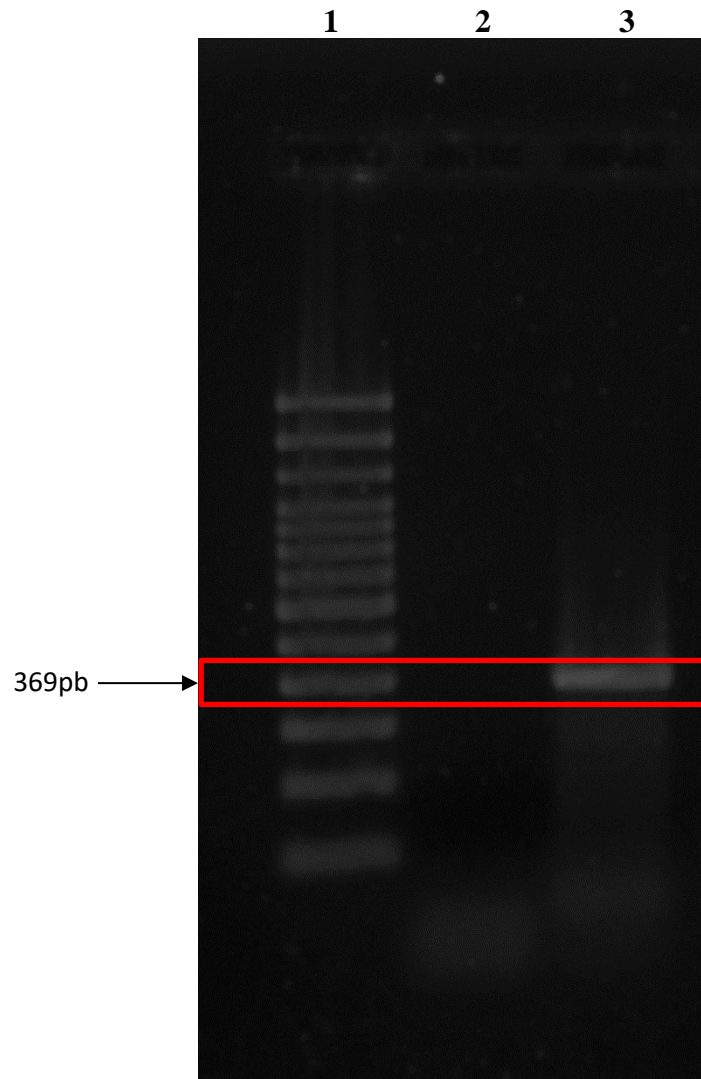
Fonte: Própria autoria.

6.2 PCR para confirmação do isolamento

6.2.1. *Megalocytivirus*

A confirmação do isolamento para *Megalocytivirus* foi realizada a partir do DNA extraído da quinta passagem do inóculo viral que apresentou efeito citopático. A eletroforese em gel de agarose contendo os amplicons obtidos no *nested*-PCR visando à amplificação do gene MCP de *Megalocytivirus* revelou a presença de uma banda de 369pb (Figura 7) compatível com o tamanho de fragmento esperado que era de 369pb; dessa forma, a banda de foi excisada do gel, purificada e enviada para sequenciamento de nucleotídeos na empresa HELIXXA em Paulínia - SP.

Figura 7 - Fotografia de gel de agarose a 1,5% corado com SYBR[®] Gold, sob luz UV, ilustrando resultados de amplificação de fragmento de 369pb, obtidos a partir do DNA extraído da terceira passagem do inóculo viral através da técnica de *nested*-PCR, relativo ao gene MCP do genoma de *Megalocytivirus*.



Legenda: (1) Marcador de peso molecular de 100pb (PROMEGA, EUA). (2) Controle Negativo de Células. (3) Isolado Brasileiro de *Megalocytivirus*.

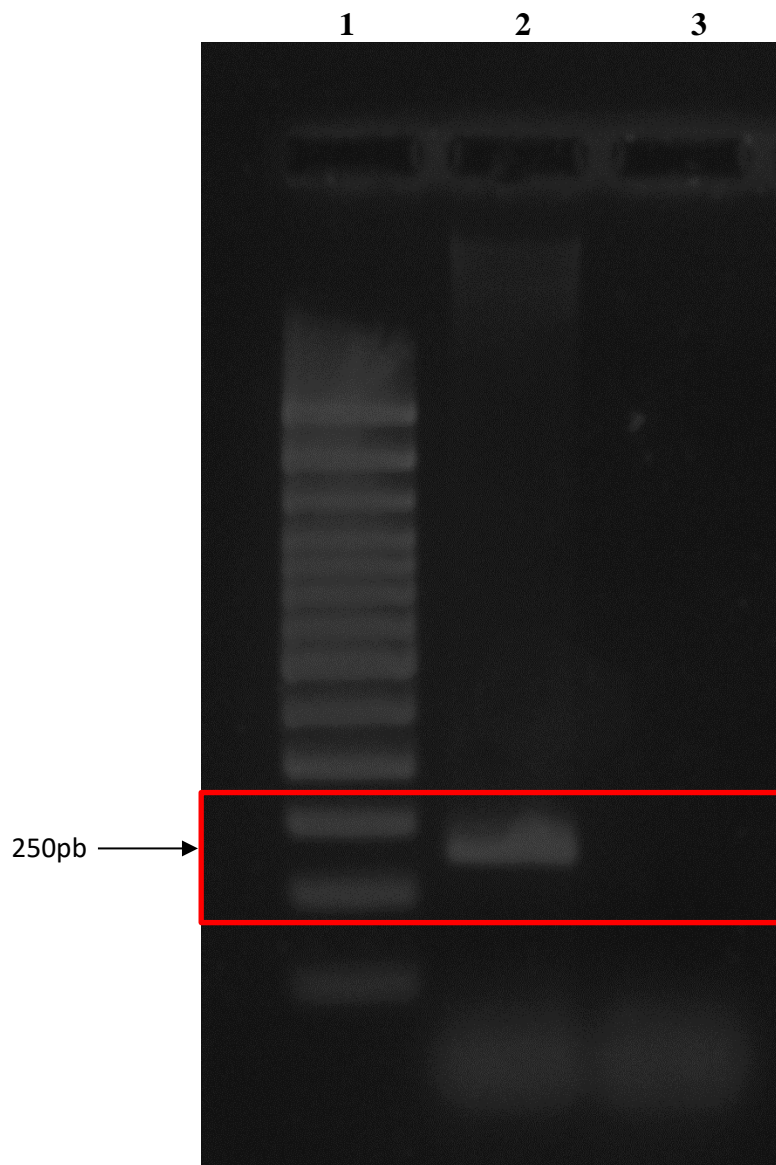
Fonte: Própria autoria.

6.2.2. *Lymphocystivirus*

A confirmação do isolamento para *Lymphocystivirus* foi realizada a partir do DNA extraído da terceira passagem do inóculo viral que apresentou efeito citopático. A eletroforese em gel de agarose contendo os amplicons obtidos no PCR visando à amplificação do gene MCP de *Lymphocystivirus* revelou a presença de uma banda de 250pb (Figura 8), compatível com o tamanho de fragmento esperado para o genótipo II de *Lymphocystivirus* que era de 250pb.

A eletroforese em gel de agarose contendo os amplicons obtidos no PCR visando à amplificação de um fragmento maior do gene MCP de *Lymphocystivirus* revelou a presença de bandas de 512pb e 542pb (Figura 9), compatíveis com os tamanhos de fragmentos esperados para *Lymphocystivirus*.

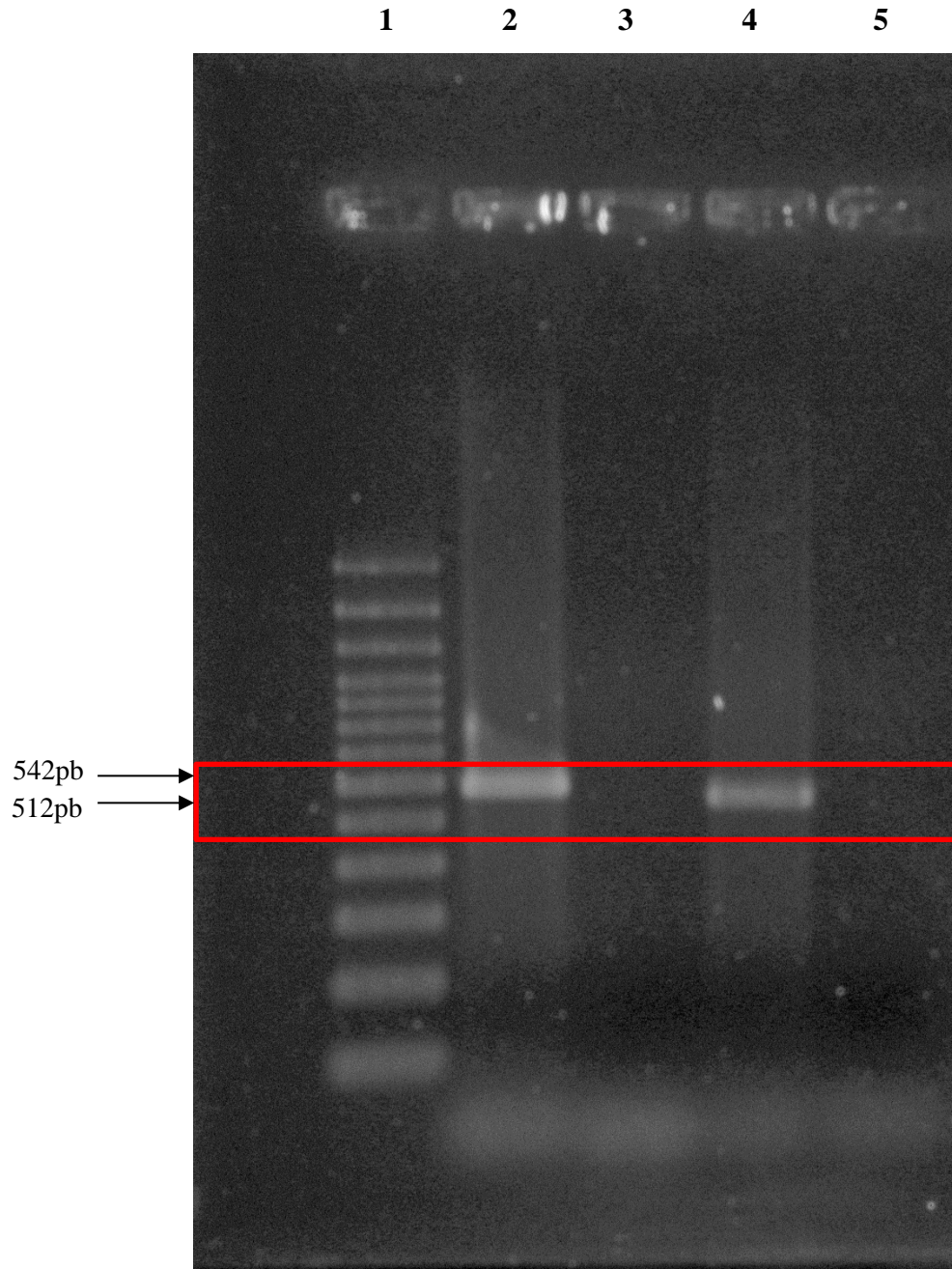
Figura 8 - Fotografia de gel de agarose a 1,5% corado com SYBR® Gold, sob luz UV, ilustrando resultados de amplificação de fragmento de 250pb relativo ao gene MCP de *Lymphocystivirus*. O fragmento foi obtido através da técnica de PCR realizada a partir do DNA extraído da terceira passagem do inóculo viral.



Legenda: (1) Marcador de peso molecular de 100pb (PROMEGA, EUA). (2) Isolado Brasileiro de *Lymphocystivirus*. (3) Controle Negativo de Células.

Fonte: Própria autoria.

Figura 9 - Fotografia de gel de agarose a 1,5% corado com SYBR[®] Gold, sob luz UV, ilustrando resultados da amplificação dos fragmentos de 542pb e 512pb, relativos ao gene MCP de *Lymphocystivirus*. Os fragmentos foram obtidos através da técnica de PCR realizada a partir do DNA extraído da terceira passagem do inóculo viral.



Legenda: (1) Marcador de peso molecular de 100pb (PROMEGA, EUA). (2) Terceira Passagem do Isolado Brasileiro de *Lymphocystivirus* (**Fragmento de 542pb**). (3) Controle Negativo de Células. (4) Terceira Passagem do Isolado Brasileiro de *Lymphocystivirus*. (**Fragmento de 512pb**). (5) Controle Negativo de Células.

Fonte: Própria autoria.

6.3 Sequenciamento nucleotídico e alinhamento de sequências

6.3.1 *Megalocytivirus*

O sequenciamento de nucleotídeos do fragmento de 369pb obtido a partir do DNA extraído da quinta passagem do inóculo viral confirmou que se trata de um fragmento do gene MCP de *Megalocytivirus*. A busca realizada no programa BLAST revelou que o fragmento obtido neste trabalho apresentou 99,2% de identidade com o *Megalocytivirus* Sabah/RAA/2012 strain BMGIV56 (JQ253373) e com o *Infectious Spleen and Kidney Necrosis Virus*, espécie tipo do gênero *Megalocytivirus*.

6.3.2 *Lymphocystivirus*

O sequenciamento de nucleotídeos do fragmento de 512pb obtido a partir do DNA extraído da segunda passagem do inóculo viral confirmou que se trata de um fragmento do gene MCP de *Lymphocystivirus*. A busca realizada no programa BLAST revelou que o fragmento obtido neste trabalho apresentou 92,4% de identidade com o *Lymphocystis disease virus 1* isolate LCDV-PF (KJ408271.1).

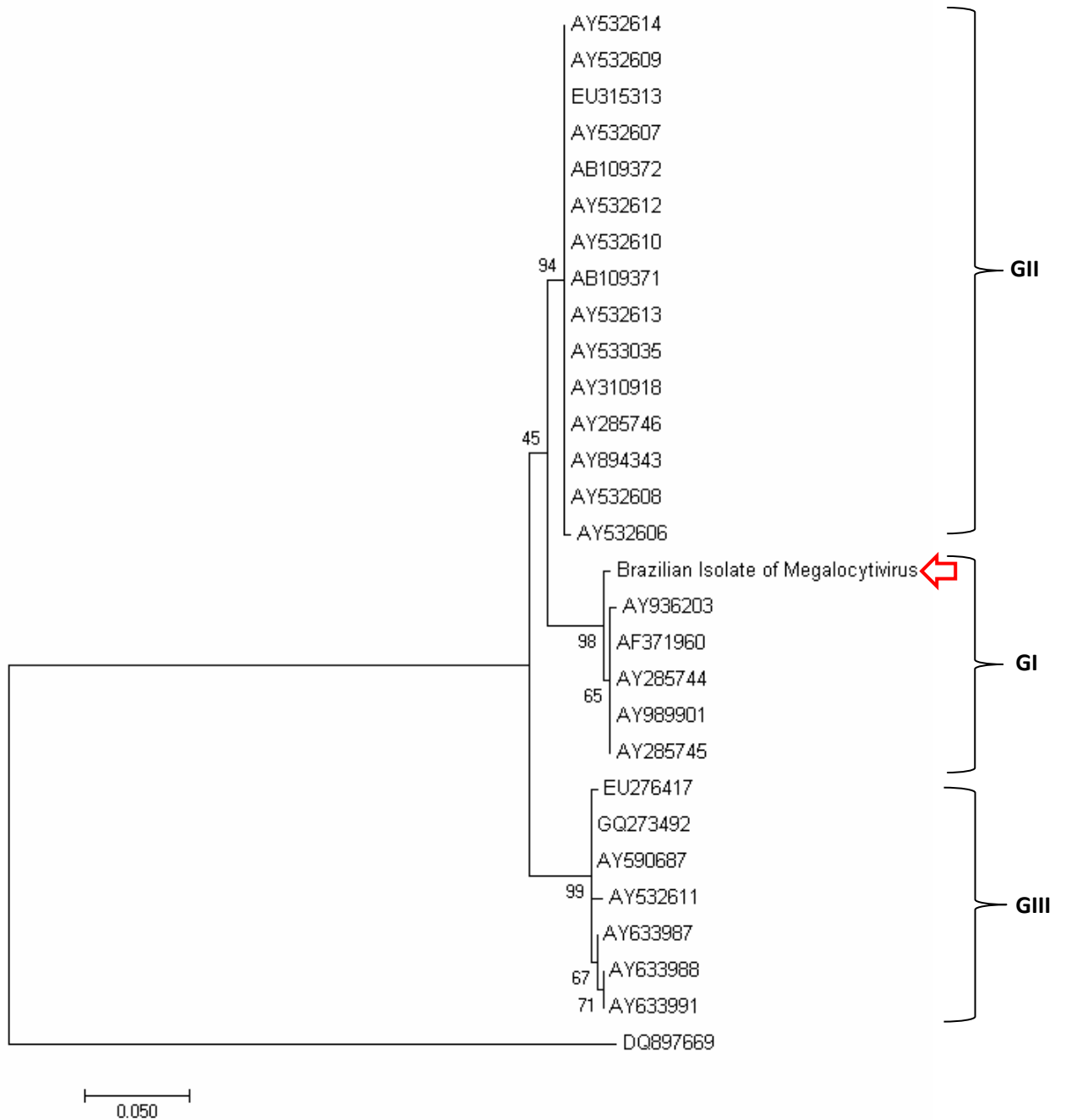
6.4 Análise Filogenética e de Similaridade

6.4.1 *Megalocytivirus*

A figura 10 representa a reconstrução filogenética obtida a partir de um fragmento de 369pb do gene MCP oriundo do isolado brasileiro de *Megalocytivirus* e outras sequências do mesmo gênero viral descritas na literatura e obtidas a partir do GenBank.

Na reconstrução filogenética, foi possível observar a separação dos clados em função dos genótipos conforme descrito na literatura: Genótipo ISKNV: *Infectious spleen and kidney necrosis iridovirus*, Genótipo RSIV: *Red seabream iridovirus* e Genótipo TRBIV: *Turbot reddish body iridovirus*. O isolado brasileiro agrupou-se no clado1 relativo ao genótipo ISKNV, onde estão presentes os isolados descritos como pertencentes a espécie *Infectious spleen and kidney necrosis iridovirus*.

Figura 10 – Reconstrução filogenética para o isolado brasileiro e outras cepas de referência de *Megalocytivirus*, baseada no alinhamento de seqüências nucleotídicas de 369pb do gene MCP. A seta indica a seqüência obtida neste estudo. Barra de escala: distância genética das seqüências nucleotídicas.

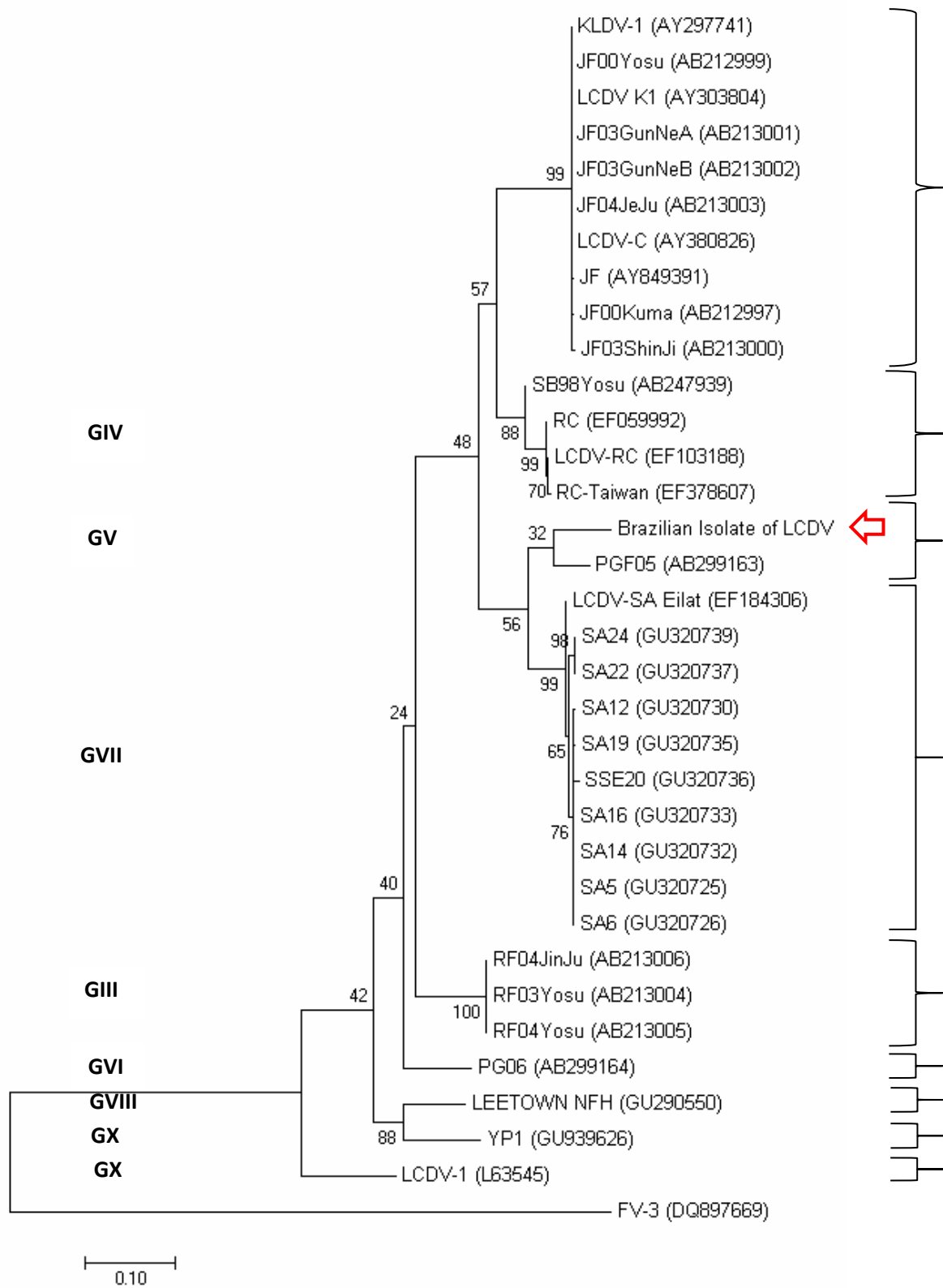


Fonte: Própria autoria.

6.4.2 *Lymphocystivirus*

Afigura 11 ilustra a reconstrução filogenética obtida a partir de um fragmento de 512pb relativo ao gene MCP do isolado brasileiro de *Lymphocystivirus* e outras sequências para o mesmo fragmento retirada do GenBank. A partir da reconstrução filogenética foi possível observar a divisão dos clados em função dos 9 genótipos descritos na literatura para *Lymphocystivirus*. O isolado brasileiro agrupou-se com sequências descritas como pertencentes ao genótipo.

Figura 11 – Reconstrução filogenética para o isolado brasileiro e outras cepas de referência de *Lymphocystivirus*, baseada no alinhamento de sequências nucleotídicas de 512pb do gene MCP. A seta indica a sequência obtida neste estudo. Barra de escala: distância genética das sequências nucleotídicas.

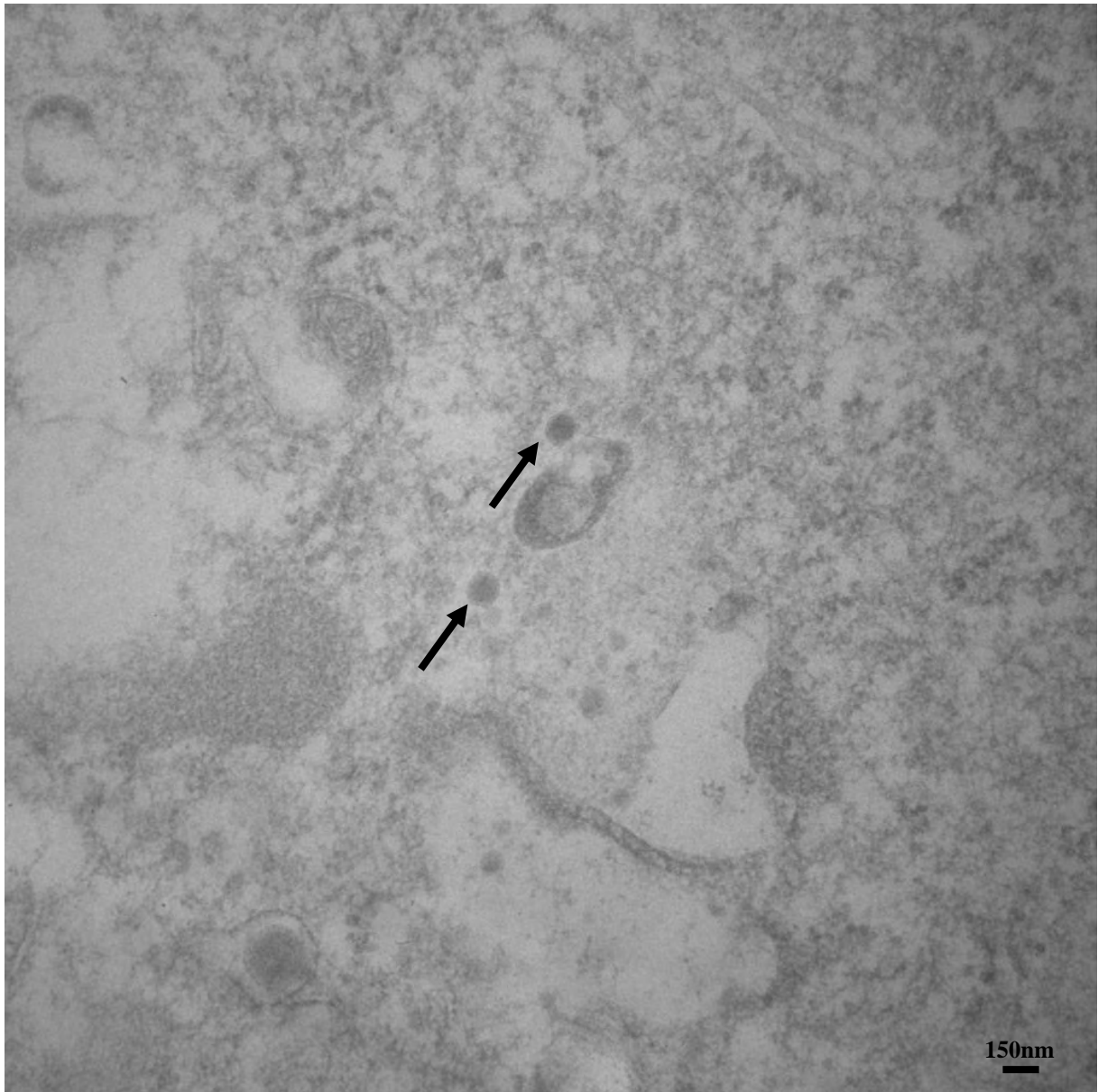


Fonte: Própria autoria.

6.5 Microscopia eletrônica de transmissão

A técnica de microscopia eletrônica de transmissão das células BF-2 inoculadas com a quinta passagem do inóculo viral revelou a presença de partículas virais hexagonais (Figuras 4 e 5) no citoplasma das células, sendo esse formato compatível com o formato icosaédrico apresentado pelos membros do gênero *Megalocytivirus*. As partículas virais observadas apresentaram aproximadamente 150nm de diâmetro, sendo que este tamanho se encontra dentro do padrão esperado para *Megalocytivirus* que é de 120 a 200nm de diâmetro. No aumento de 100.000X, observa-se que, externamente, as partículas virais apresentam uma fina camada denominada de capsídeo, seguida de uma zona translúcida separando o capsídeo do núcleo e mais internamente apresentam um núcleo denso.

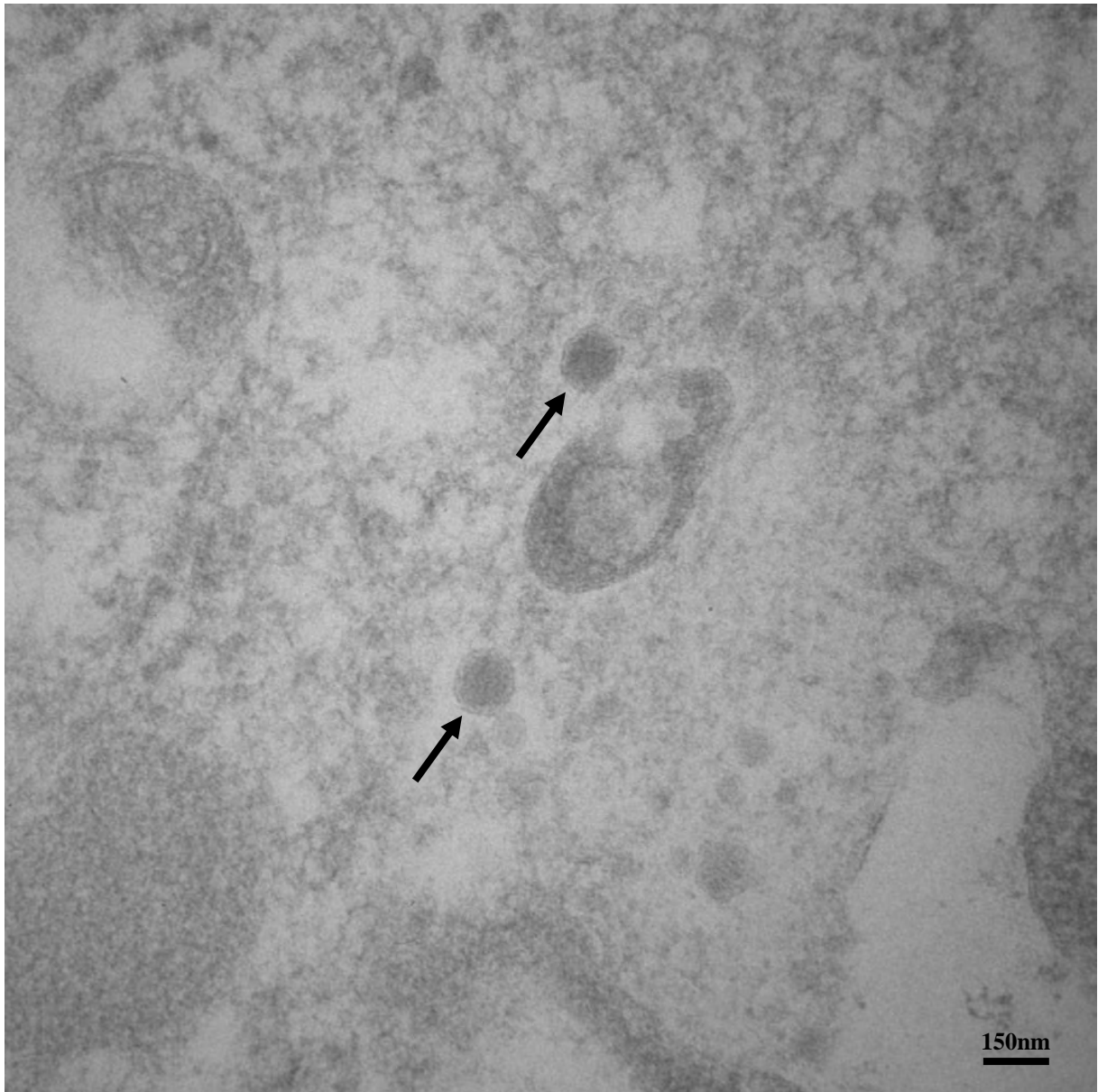
Figura 12– Fotomicrografia eletrônica de transmissão das células BF-2 inoculadas com a quinta passagem do inóculo viral de *Megalocytyivirus* 24h após inoculação.



Legenda: Na fotomicrografia observa-se a presença de 2 partículas hexagonais (setas) com tamanho próximo a 150nm compatível com a morfologia de um vírus icosaédrico. A barra corresponde a 150nm e a imagem encontra-se no aumento 50.000X.

Fonte: Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Medicina – USP – Ribeirão Preto/SP.

Figura 13– Fotomicrografia eletrônica de transmissão das células BF-2 inoculadas com a quinta passagem do inóculo viral de *Megalocytivirus* 24h após inoculação.



Legenda: Na fotomicrografia observa-se a presença de 2 partículas hexagonais (setas) com tamanho próximo a 150nm. Na partícula viral, observa-se externamente a presença de uma fina camada representando o capsídeo, uma zona translúcida separando o capsídeo do núcleo e internamente o núcleo denso. A barra corresponde a 150nm e a imagem encontra-se no aumento 100.000X.

Fonte: Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Medicina – USP – Ribeirão Preto/SP.

6.6 Determinação do título viral

6.6.1 *Megalocytivirus*

A titulação da terceira passagem do inóculo viral (P3) em células da linhagem BF-2 resultou num título de $10^{6,8}$ TCID₅₀.ml⁻¹. Já a titulação da quinta passagem do inóculo viral (P5) em células da linhagem BF-2 resultou num título de $10^{7,5}$ TCID₅₀.ml⁻¹ evidenciando um aumento na concentração das partículas virais ao longo das passagens.

6.6.2 *Lymphocystivirus*

A titulação da segunda passagem do inóculo viral (P2) em células da linhagem BF-2 resultou num título de $10^{3,8}$ TCID₅₀.ml⁻¹. Já a titulação da segunda passagem do inóculo viral (P2) resultou num título de $10^{4,8}$ TCID₅₀.ml⁻¹, indicando um aumento do título viral de uma passagem para outra.

6.7 Sensibilidade ao descongelamento

6.7.1 *Megalocytivirus*

A titulação da quinta passagem (P5) do inóculo viral de *Megalocytivirus* submetido ao congelamento a -80°C e descongelamento sequenciais, por 3 vezes, resultou em $10^{7,5}$ TCID₅₀.ml⁻¹, o mesmo valor de título obtido para o controle, indicando que o ato de congelar e descongelar uma alíquota à -80°C não promoveu alterações no título viral. Já para a alíquota submetida ao congelamento a -20°C e posterior descongelamento por 3 vezes, o título obtido foi de $10^{6,9}$ TCID₅₀.ml⁻¹, já para a alíquota controle o título obtido foi de $10^{7,5}$ TCID₅₀.ml⁻¹, demonstrando que o congelamento a longo prazo nessa temperatura pode não ser efetivo na preservação da viabilidade viral.

6.7.2 *Lymphocystivirus*

A titulação da segunda passagem (P2) do inóculo viral de *Lymphocystivirus* submetida ao congelamento a -80°C e descongelamento sequenciais, por 3 vezes, resultou em $10^{3,1}$ TCID₅₀.ml⁻¹, sendo que valor de título obtido para o controle foi de $10^{4,8}$, indicando que o ato

de congelar e descongelar uma alíquota à -80°C pode promover alterações significativas no título viral. Já para a alíquota submetida ao congelamento a -20°C e posterior descongelamento por 3 vezes, o título obtido foi de $10^{2,9}\text{TCID}_{50}.\text{ml}^{-1}$, já para a alíquota controle o título obtido foi de $10^{4,8}\text{TCID}_{50}.\text{ml}^{-1}$, demonstrando que o congelamento à -20°C não é efetivo para armazenamento do vírus.

6.8 Sensibilidade ao éter

6.8.1 *Megalocytivirus*

A titulação da quinta passagem (P5) do inóculo viral de *Megalocytivirus* incubada com éter por 18 horas resultou num título de $10^{3,7}\text{TCID}_{50}.\text{ml}^{-1}$, enquanto para a amostra controle obteve-se um título de $10^{7,5}\text{TCID}_{50}.\text{ml}^{-1}$. Esses resultados demonstram uma redução de mais de 99,9% no título viral, em termos de partículas virais, indicando que a maioria dos vírions apresentavam uma membrana lipídica.

6.8.2 *Lymphocystivirus*

A titulação da segunda passagem (P2) do inóculo viral de *Lymphocystivirus* incubada com éter por 18 horas resultou num título de $10^{2,8}\text{TCID}_{50}.\text{ml}^{-1}$, enquanto para a amostra controle obteve-se um título de $10^{4,8}\text{TCID}_{50}.\text{ml}^{-1}$. Esses resultados demonstram uma redução de 99,0% em termos de partículas virais, indicando que a maioria dos vírions apresentavam uma membrana lipídica.

6.9 Sensibilidade ao clorofórmio

6.9.1 *Megalocytivirus*

A titulação da quinta passagem (P5) do inóculo viral de *Megalocytivirus* incubada com clorofórmio por 30 minutos resultou num título igual a zero, enquanto para a amostra controle obteve-se um título de $10^{7,5}\text{TCID}_{50}.\text{ml}^{-1}$.

6.9.2 *Lymphocystivirus*

A titulação da segunda passagem (P2) do inóculo viral de *Lymphocystivirus* incubada com clorofórmio por 30 minutos resultou num título igual a zero, enquanto para a amostra controle obteve-se um título de $10^{4,8}$ TCID₅₀.ml⁻¹.

6.10 Sensibilidade a luz ultravioleta

6.10.1 *Megalocytivirus*

Para a suspensão viral obtida a partir da quinta passagem (P5) do inóculo viral de *Megalocytivirus* e irradiada com luz ultravioleta por 15 minutos, o título viral obtido foi igual a zero, indicando que a luz ultravioleta é efetiva na inativação das partículas virais.

6.10.2 *Lymphocystivirus*

Para a segunda passagem (P2) do inóculo viral de *Lymphocystivirus* irradiada com luz ultravioleta por 15 minutos, o título viral obtido também foi igual a zero, indicando a ausência de partículas virais infectantes.

6.11 Sensibilidade ao calor

6.11.1 *Megalocytivirus*

Foram estudadas alterações nos títulos virais nas temperaturas 16°C, 25°C, 37°C e 56°C (Quadro6). Para as amostras incubadas à 25°C e 37°C foram obtidos os mesmos valores de título viral ($10^{7,1}$ TCID₅₀.ml⁻¹). Já para a amostra incubada a 16°C obteve-se um título de $10^{7,0}$ TCID₅₀.ml⁻¹. O título da amostra controle foi de $10^{7,5}$ TCID₅₀.ml⁻¹. Nesse sentido, nestas temperaturas analisadas não houve alterações tão significativas no valor do título viral.

Já a titulação da quinta passagem (P5) do inóculo viral incubada a 56°C por 6 horas resultou em zero indicando que não existiam mais partículas virais viáveis.

Quadro 6 – Valores de título viral (TCID₅₀.ml⁻¹) obtidos a partir da incubação da quinta passagem do inóculo viral de *Megalocytivirus* em diferentes temperaturas.

Temperatura	Título viral (TCID ₅₀ .ml ⁻¹)
Controle	10 ^{7,5}
16°C	10 ^{7,0}
25°C	10 ^{7,1}
37°C	10 ^{7,1}
56°C	0

Fonte: Própria autoria.

6.11.2 *Lymphocystivirus*

Foram estudadas alterações nos títulos virais nas temperaturas 16°C, 25°C, 37°C e 56°C (Quadro7). Para as amostras incubadas à 16°C e à 25°C foram obtidos os mesmos valores de título viral (10^{4,8} TCID₅₀.ml⁻¹). Já a titulação da primeira passagem (P1) do inóculo viral de *Lymphocystivirus* incubada à 56°C por 6 horas, resultou num título viral igual a zero, indicando a inativação das partículas virais.

Quadro 7– Valores de título viral (TCID₅₀.ml⁻¹) obtidos a partir da incubação da segunda passagem do inóculo viral de *Lymphocystivirus* em diferentes temperaturas.

Temperatura	Título viral (TCID ₅₀ .ml ⁻¹)
Controle	10 ^{4,8}
16°C	10 ^{4,8}
25°C	10 ^{4,8}
37°C	10 ^{5,0}
56°C	0

Fonte: Própria autoria.

6.12 Susceptibilidade a diferentes pHs

6.12.1 *Megalocytivirus*

Foram estudadas alterações nos títulos virais nos pH 1,0, 2,0, 3,0, 4,0,6,0, 8,0, 10,0, 11,0 e 12,0. Os resultados encontram-se descritos no quadro8. Entre os pHs ácidos estudados, foram

observadas mudanças significativas no título viral após 1h de incubação nos valores de pH igual 1, 2 e 3. As reduções foram da ordem de 2,7, 2,4 e 1,8, unidades logarítmicas, respectivamente. Esses valores correspondem a uma redução de 99,8% (pH 1,0), 99,6% (pH 2,0) e 98,4% (1,8), em números de partículas virais, quando comparadas com o controle ($10^{5,5}$ TCID₅₀.ml⁻¹). Já entre os pHs básicos estudados, foram observadas mudanças significativas no título viral nos valores de pH igual 11,0 e 12,0. As reduções foram da ordem de 1,7 e 2,9, unidades logarítmicas, respectivamente, o que representa uma redução de 98,0% (pH 11,0) e 99,9% (pH 12,0) em termos de quantidade de partículas virais. A titulação da quinta passagem (P5) exposta ao pH 7,8 (pH do meio do cultivo) resultou num título de $10^{5,5}$ TCID₅₀.ml⁻¹, mesmo título do controle.

Quadro 8 – Valores de título viral (TCID₅₀.ml⁻¹) obtidos a partir da incubação da quinta passagem do inóculo viral de *Megalocytivirus* em diferentes pHs.

pH	Título viral (TCID ₅₀ .ml ⁻¹)
Controle	$10^{5,5}$
1	$10^{2,8}$
2	$10^{3,1}$
3	$10^{3,7}$
4	$10^{5,1}$
6	$10^{5,0}$
7,8 (pH do meio)	$10^{5,5}$
8	$10^{5,5}$
10	$10^{4,8}$
11	$10^{3,8}$
12	$10^{2,6}$

Fonte: Própria autoria.

6.12.2 *Lymphocystivirus*

Foram estudadas alterações nos títulos virais nos pH 2,0, 4,0,6,0, 8,0, 10,0, 12,0 e 14,0. Os resultados encontram-se descritos no Quadro 9. Entre os pHs estudados, foram observadas mudanças significativas no título viral após 1h de incubação nos valores de pH igual a 2,0 e 12,0. As reduções foram da ordem de 1,7, e 2,2, unidades logarítmicas, respectivamente. Esses valores correspondem a uma redução de 98% (pH 2,0) e 99,4% (pH 12,0) em números de partículas virais, quando comparadas com o controle ($10^{4,8}$ TCID₅₀.ml⁻¹). A titulação da

segunda passagem (P2) exposta ao pH 7,8 (mesmo pH do meio do cultivo) resultou num título de $10^{4,8}$ TCID₅₀.ml⁻¹, mesmo título do controle.

Quadro 9 – Valores de título viral (TCID₅₀.ml⁻¹) obtidos a partir da incubação da segunda passagem do inóculo viral de *Lymphocystivirus* em diferentes pHs.

pH	Título viral (TCID ₅₀ .ml ⁻¹)
Controle	10 ^{4,8}
2	10 ^{3,1}
4	10 ^{5,1}
6	10 ^{5,0}
7,8 (pH do meio)	10 ^{4,8}
8	10 ^{4,8}
10	10 ^{4,8}
12	10 ^{2,6}
14	0

Fonte: Própria autoria.

6.13 Curva de Replicação

6.13.1 *Megalocytivirus*

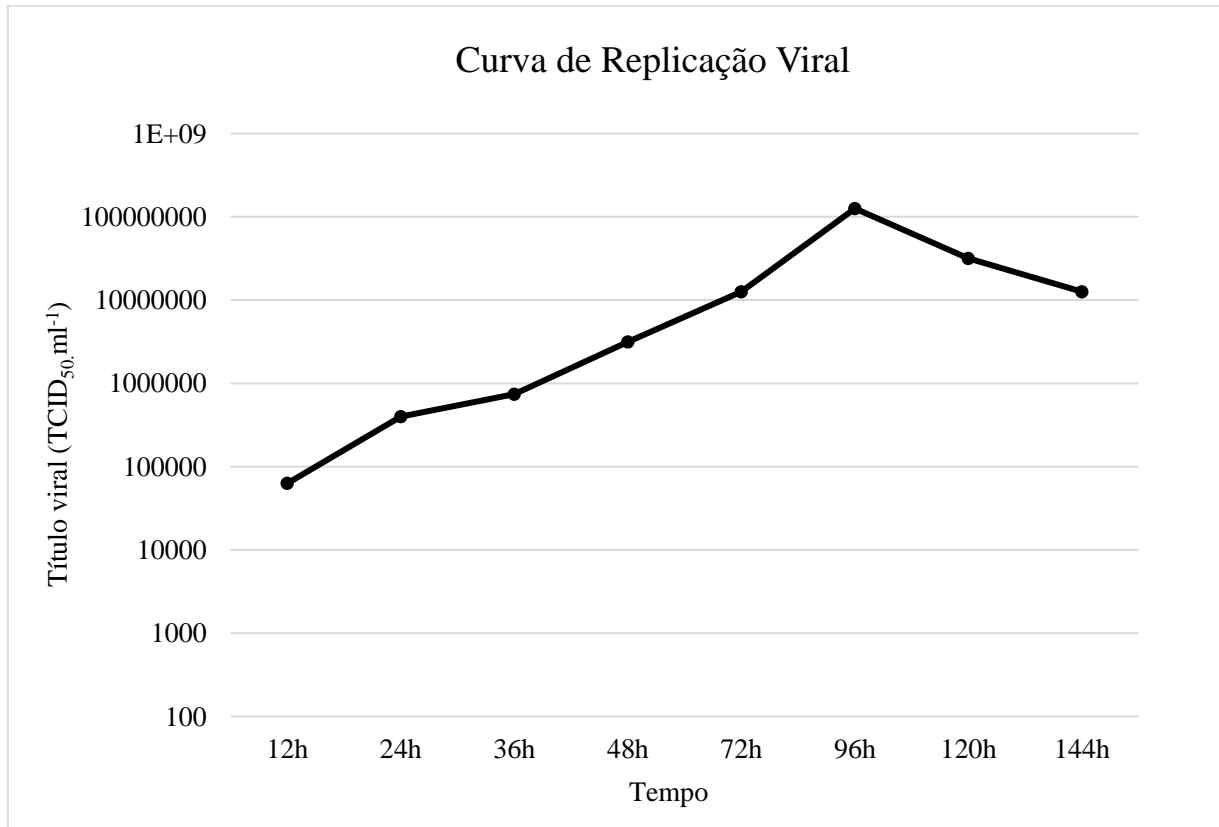
A titulação viral da quinta passagem do inóculo viral de *Megalocytivirus*, diluída 10X, resultou num aumento progressivo do título no decorrer dos quatro primeiros dias após inoculação, atingindo o maior valor de título no quarto dia após inoculação ($10^{8,1}$ TCID₅₀.ml⁻¹), com massiva destruição da monocamada de células BF-2ao longo do tempo (Figuras 14 e 15). No quinto e no sexto dia após inoculação, observou-se uma redução no título viral sendo que no quinto após inoculação todas as células da monocamada já estavam em suspensão, indicando morte celular. Os valores de título viral (TCID₅₀.ml⁻¹), obtidos em função do tempo, encontram-se descritos no Quadro 10.

Quadro 10 – Valores de título viral ($\text{TCID}_{50}.\text{ml}^{-1}$) obtidos em função do tempo para a construção da curva de replicação viral para *Megalocytivirus*.

Tempo após inoculação (h)	Título viral ($\text{TCID}_{50}.\text{ml}^{-1}$)
12	$10^{4,8}$
24	$10^{5,6}$
36	$10^{5,87}$
48	$10^{6,5}$
72	$10^{7,1}$
96	$10^{8,1}$
120	$10^{7,5}$
144	$10^{7,1}$

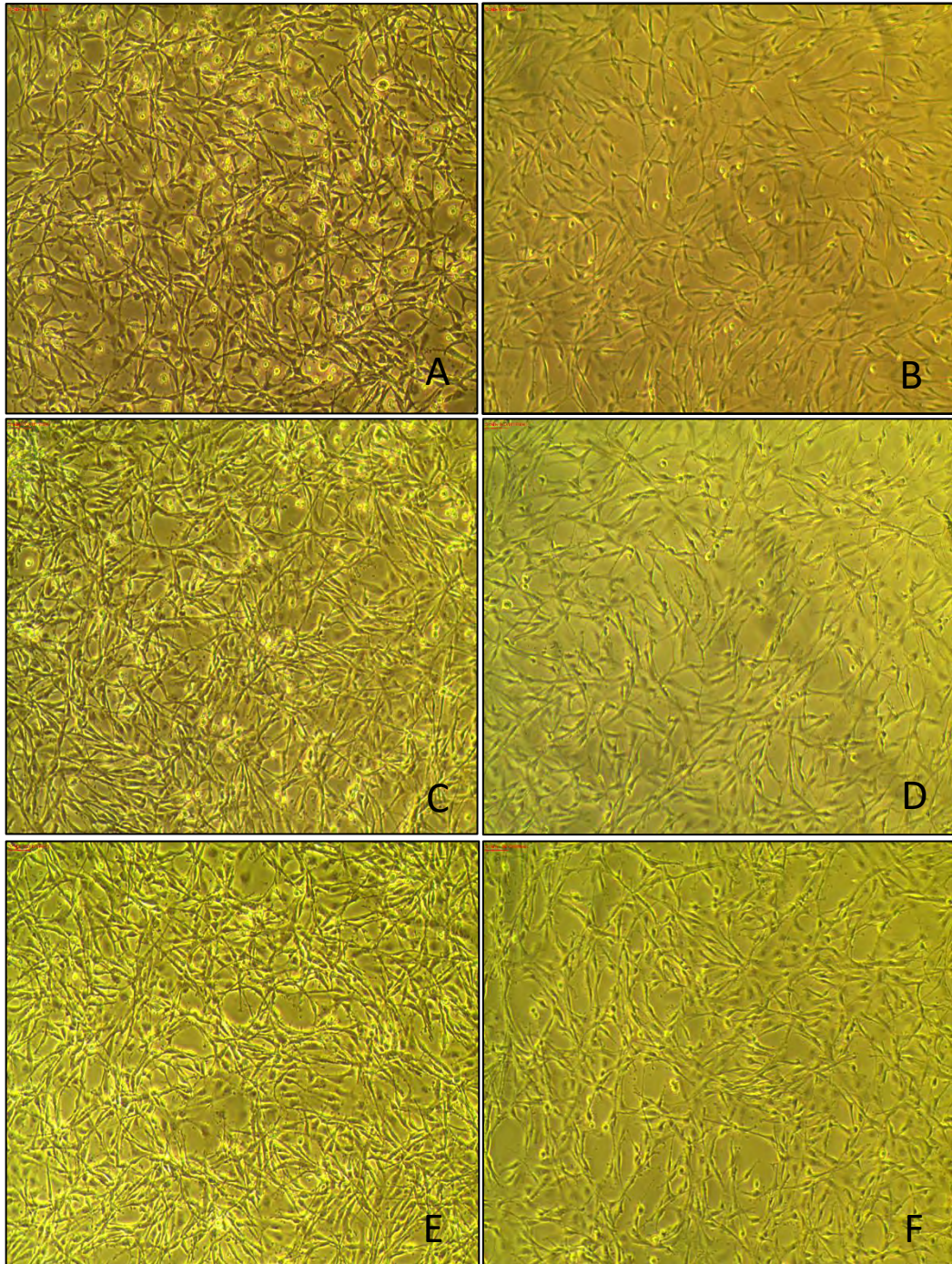
Fonte: Própria autoria.

Gráfico 1 – Curva de replicação viral obtida para o isolado brasileiro de *Megalocytivirus* nos diferentes tempos a partir da inoculação da quinta passagem do inóculo viral.



Fonte: Própria autoria.

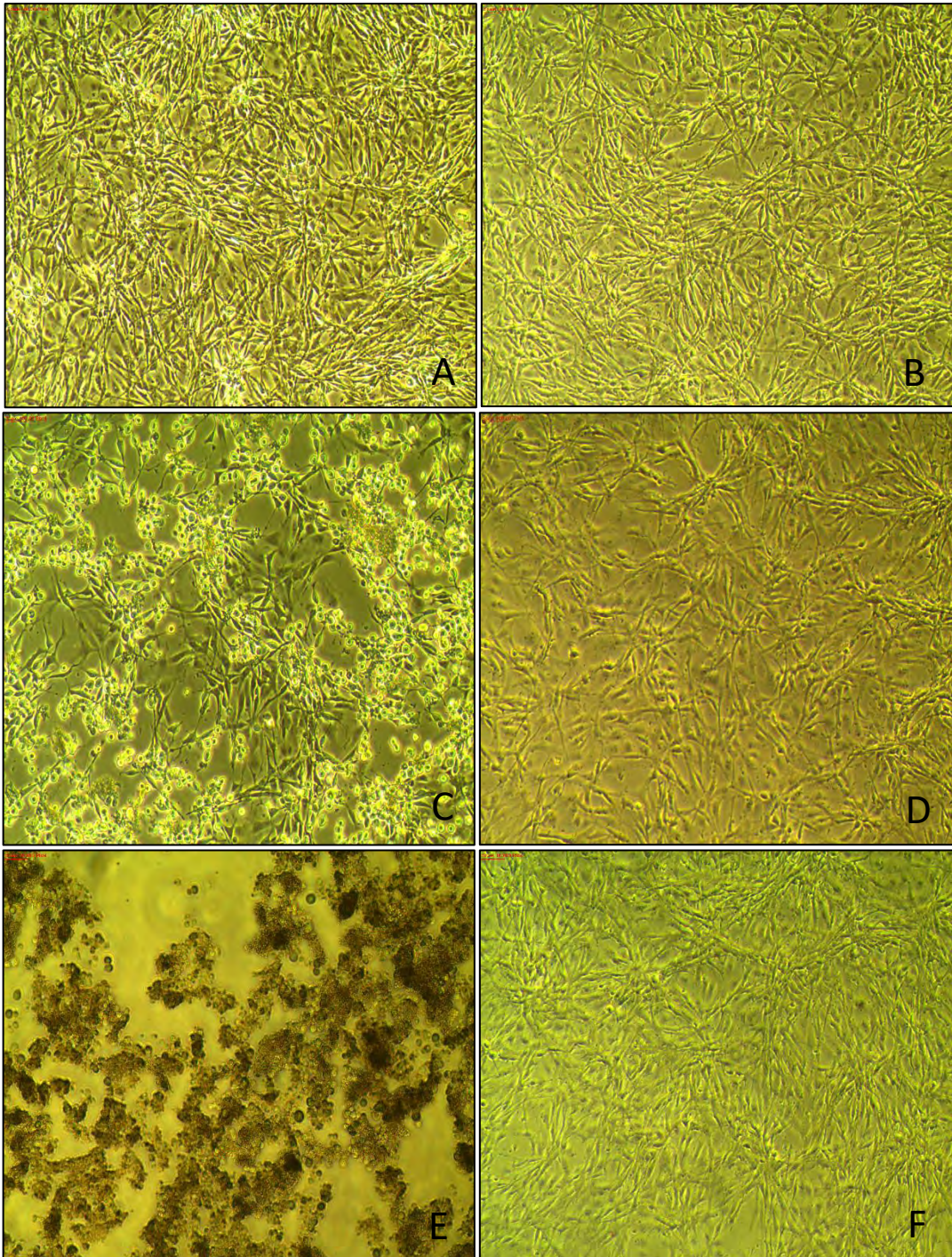
Figura 14—Monocamada de células BF-2 inoculada com a quinta passagem do inóculo viral de *Megalocytivirus* nos tempos 12h, 24h e 36h após inoculação.



Legenda: **A:** Monocamada de células BF-2 12h após inoculação da quinta passagem do inóculo viral. **B:** Controle Negativo – Monocamada de células BF-2 inoculada com meio de manutenção suplementado com 2% SFB após 12h. **C:** Monocamada de células BF-2 24h após inoculação da quinta passagem do inóculo viral. **D:** Controle Negativo – Monocamada de células BF-2 inoculada com meio de manutenção suplementado com 2% SFB após 24h. **E:** Monocamada de células BF-2 36h após inoculação da quinta passagem do inóculo viral. **F:** Controle Negativo – Monocamada de células BF-2 inoculada com meio de manutenção suplementado com 2% SFB após 36h. Todas as imagens estão no aumento de 100X.

Fonte: Própria autoria.

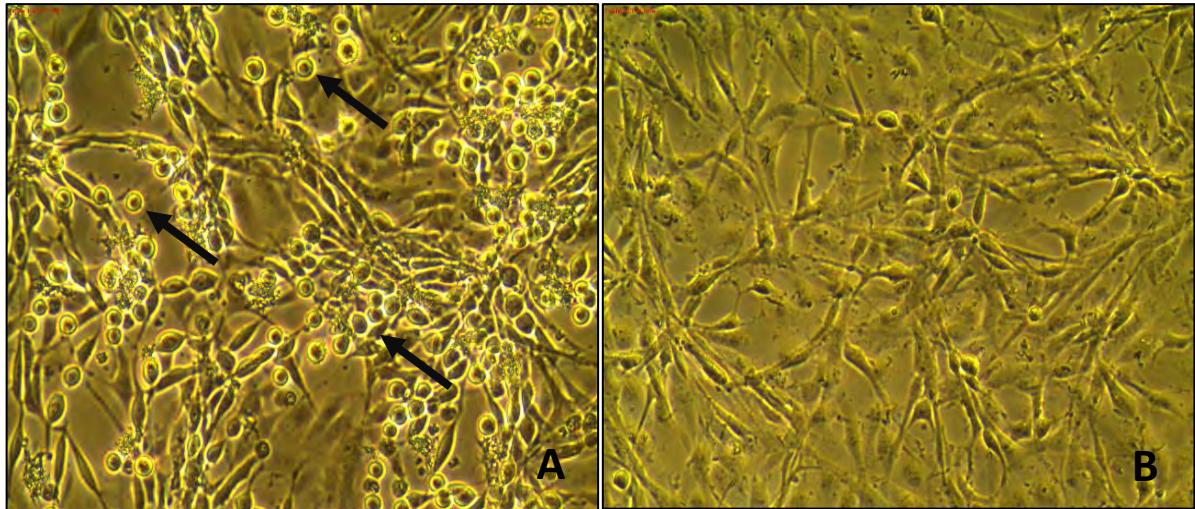
Figura 15–Monocamada de células BF-2 inoculada com a quinta passagem do inóculo viral de *Megalocytivirus* nos tempos 48h, 72h e 96h após inoculação.



Legenda: **A:** Monocamada de células BF-2 48h após inoculação da quinta passagem do inóculo viral. **B:** Controle Negativo – Monocamada de células BF-2 inoculada com meio de manutenção suplementado com 2% SFB após 48h. **C:** Monocamada de células BF-2 72h após inoculação da quinta passagem do inóculo viral. **D:** Controle Negativo – Monocamada de células BF-2 inoculada com meio de manutenção suplementado com 2% SFB após 72h. **E:** Monocamada de células BF-2 96h após inoculação da quinta passagem do inóculo viral. **F:** Controle Negativo – Monocamada de células BF-2 inoculada com meio de manutenção suplementado com 2% SFB após 96h. Todas as imagens estão no aumento de 100X.

Fonte: Própria autoria.

Figura 16—Monocamada de células BF-2 inoculada com a quinta passagem do inóculo viral de *Megalocytivirus* no tempo 72h após inoculação (aumento 200X).



Legenda: **A:** Monocamada de células BF-2 72h após inoculação da quinta passagem do inóculo viral visualizada no aumento 200X. A figura evidencia a presença de células arredondadas características de efeito citopático (setas). **B:** Controle Negativo – Monocamada de células BF-2 inoculada com meio de manutenção suplementado com 2% SFB após 72h. Aumento 200X.

Fonte: Própria autoria.

6.12.1 *Lymphocystivirus*

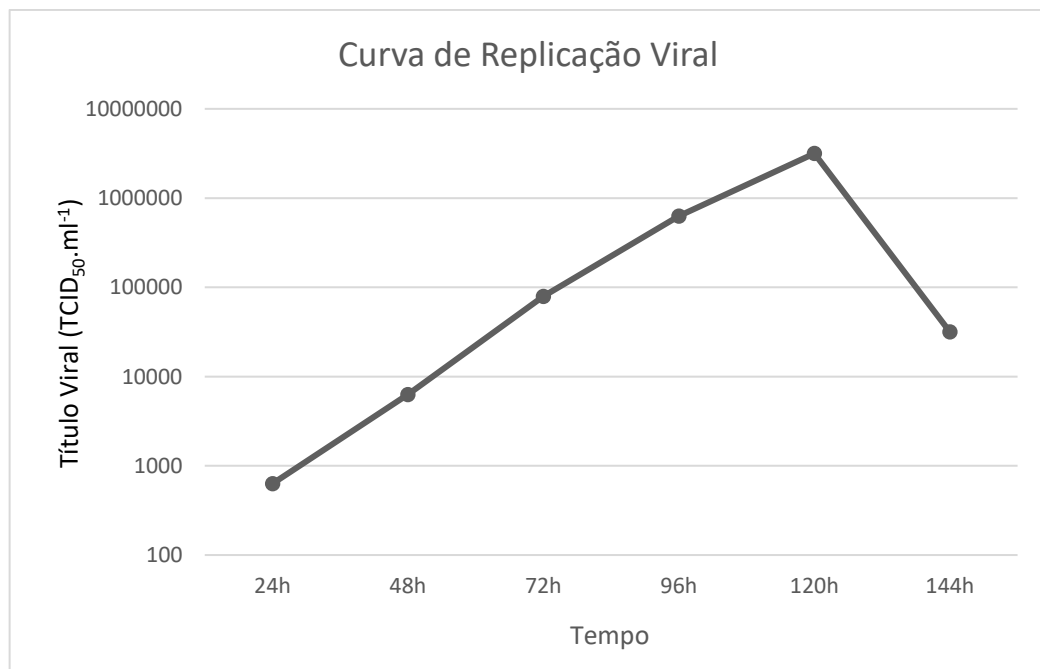
A titulação da segunda passagem do inóculo viral de *Lymphocystivirus* usada para a construção da curva de replicação viral resultou num aumento progressivo do título no decorrer dos cinco primeiros dias após inoculação, atingindo o maior valor de título no quinto dia após inoculação ($10^{6,5}$ TCID₅₀.ml⁻¹). Observou-se massiva destruição da monocamada de células BF-2 ao longo do tempo (Figuras 17 e 18). No sexto dia após inoculação, observou-se uma redução progressiva no título viral obtido pois já não havia mais células viáveis para a infecção e replicação viral. Os valores de título viral (TCID₅₀.ml⁻¹) obtidos em função do tempo encontram-se descritos no Quadro 11.

Quadro 11 – Valores de título viral ($\text{TCID}_{50}.\text{ml}^{-1}$) obtidos em função do tempo para a construção da curva de replicação viral para *Lymphocystivirus*.

Tempo após inoculação (h)	Título viral ($\text{TCID}_{50}.\text{ml}^{-1}$)
24	$10^{2,8}$
48	$10^{3,8}$
72	$10^{4,9}$
96	$10^{5,8}$
120	$10^{6,5}$
144	$10^{4,5}$

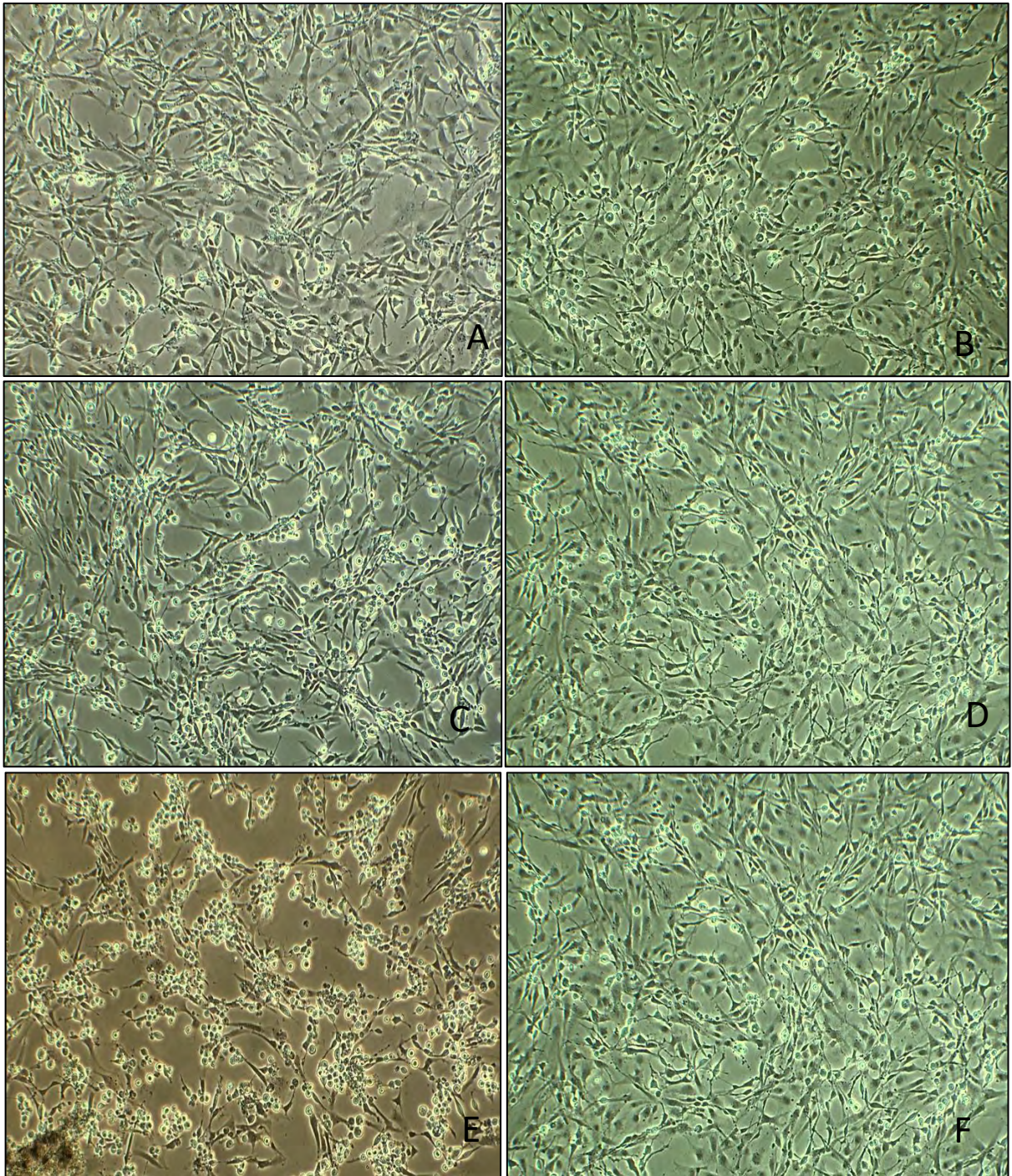
Fonte: Própria autoria.

Gráfico 2 – Curva de replicação viral obtida para o isolado brasileiro de *Lymphocystivirus* nos diferentes tempos a partir da inoculação da segunda passagem do inóculo viral.



Fonte: Própria autoria.

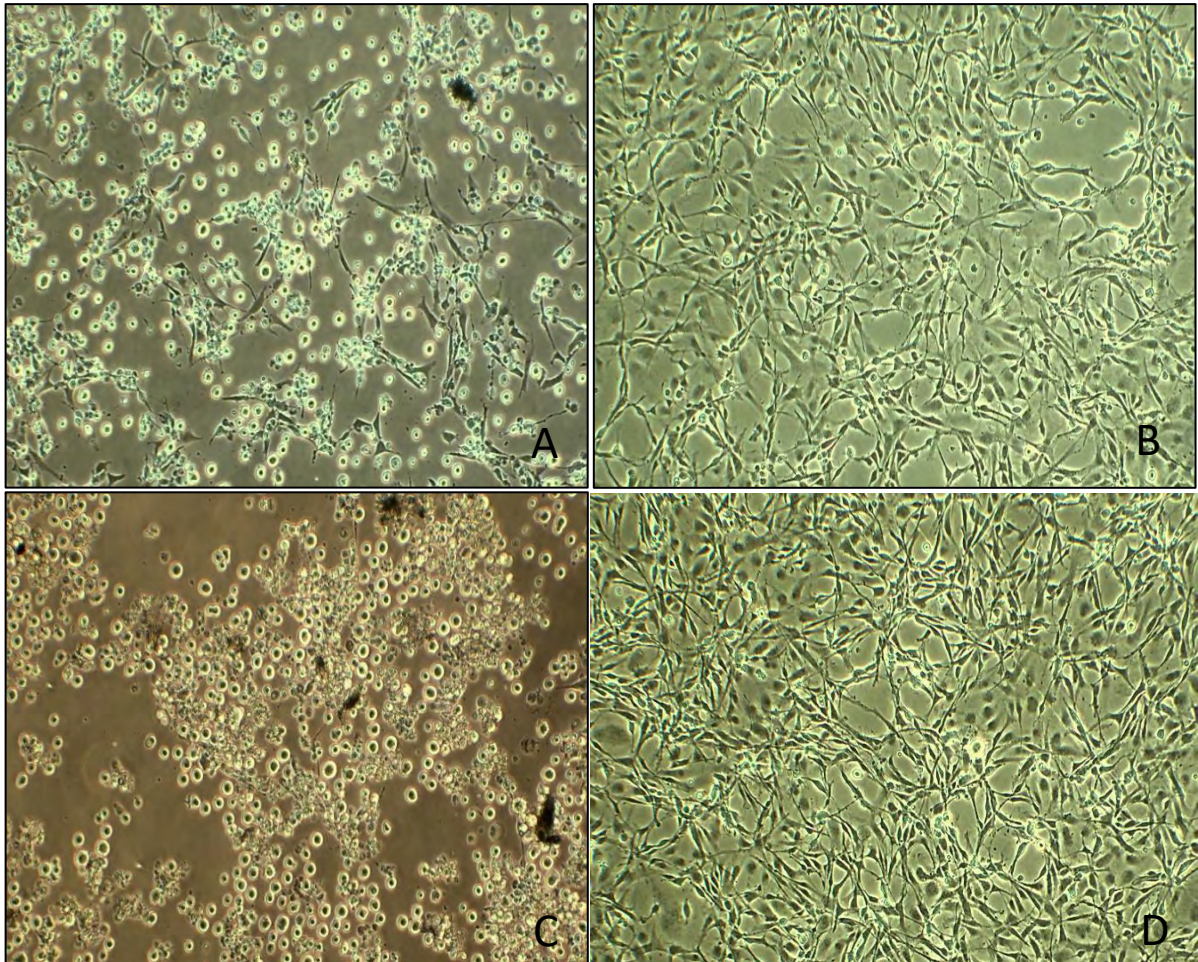
Figura 17–Monocamada de células BF-2 inoculada com a segunda passagem do inóculo viral de *Lymphocystivirus* nos tempos 24h, 48h e 72h após inoculação.



Legenda: **A:** Monocamada de células BF-2 24h após inoculação da segunda passagem do inóculo viral. **B:** Controle Negativo – Monocamada de células BF-2 inoculada com meio de manutenção suplementado com 2% SFB após 24h. **C:** Monocamada de células BF-2 48h após inoculação da segunda passagem do inóculo viral. **D:** Controle Negativo – Monocamada de células BF-2 inoculada com meio de manutenção suplementado com 2% SFB após 48h. **E:** Monocamada de células BF-2 72h após inoculação da segunda passagem do inóculo viral. **F:** Controle Negativo – Monocamada de células BF-2 inoculada com meio de manutenção suplementado com 2% SFB após 72h. Todas as imagens estão no aumento de 100X.

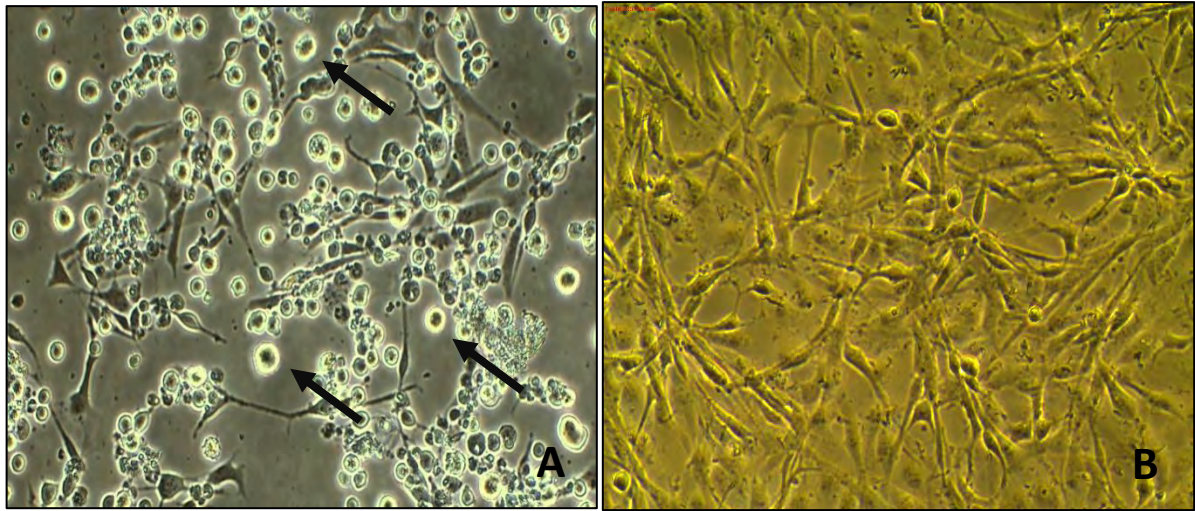
Fonte: Própria autoria.

Figura 18—Monocamada de células BF-2 inoculada com a segunda passagem do inóculo viral de *Lymphocystivirus* nos tempos 96h e 120h após inoculação.



Legenda: **A:** Monocamada de células BF-2 96h após inoculação da segunda passagem do inóculo viral. **B:** Controle Negativo – Monocamada de células BF-2 inoculada com meio de manutenção suplementado com 2% SFB após 96h. **C:** Monocamada de células BF-2 120h após inoculação da quinta passagem do inóculo viral. **D:** Controle Negativo – Monocamada de células BF-2 inoculada com meio de manutenção suplementado com 2% SFB após 120h. Todas as imagens estão no aumento de 100X. Fonte: Própria autoria.

Figura 19–Monocamada de células BF-2 inoculada com a segunda passagem do inóculo viral de *Lymphocystivirus* no tempo 96h após inoculação (aumento 200X).



Legenda: **A:** Monocamada de células BF-2 96h após inoculação da quinta passagem do inóculo viral visualizada no aumento 200X. A figura evidencia a presença de células arredondadas características de efeito citopático (setas). **B:** Controle Negativo – Monocamada de células BF-2 inoculada com meio de manutenção suplementado com 2% SFB após 72h. Aumento 200X.

Fonte: Própria autoria.

7 DISCUSSÃO

7.1 *Megalocytivirus*

O estudo realizado teve como objetivos principais isolar em células BF-2 a estirpe brasileira de *Megalocytivirus* obtida a partir de peixe ornamental, realizar a caracterização fenotípica da estirpe isolada através da técnica de microscopia eletrônica de transmissão e dos ensaios de susceptibilidade a solvente lipídico, susceptibilidade a diferentes temperaturas, susceptibilidade a diferentes pHs e susceptibilidade ao descongelamento, bem como construir a curva de replicação viral e caracterizar filogeneticamente o isolado.

Dessa forma, 4 amostras de *pool* de tecidos (fígado, baço e rins), provenientes de peixes ornamentais das espécies *Poecilia reticulata*, *Pygocentrus nattereri*, *Cyprinus carpio* e *Carassius auratus* que foram positivas ao diagnóstico molecular para *Megalocytivirus*, sendo os resultados confirmados por sequenciamento de nucleotídeos, foram submetidas ao isolamento. Após a segunda passagem em cultura de células BF-2, observou-se o aparecimento de efeito citopático na amostra oriunda da espécie *Poecilia reticulata*, sendo o efeito citopático caracterizado inicialmente pelo arredondamento celular progredindo para o desprendimento das células da superfície da placa com conseqüente morte celular.

Segundo Subramaniam et al. (2012) e Kawato et al. (2020), a infecção por *Megalocytivirus* já é bem conhecida mundialmente em diferentes espécies de peixes ornamentais; entretanto, os dados sobre as características físico-químicas do vírus ainda são escassos devido ao número reduzido de linhagens celulares susceptíveis a infecção pelo gênero e a dificuldade do isolamento viral em cultivo celular. Dessa forma, o isolamento viral da estirpe brasileira de *Megalocytivirus*, realizado de forma inédita no país, permitiu a criação de um biobanco de diferentes passagens do isolado viral que por sua vez servirá de subsídio para a realização de estudos posteriores envolvendo o sequenciamento do genoma completo do isolado, a investigação da interação vírus-hospedeiro através da análise da expressão de genes relacionados a resposta imune e o desenvolvimentos de formas efetivas de prevenção com ênfase na produção de vacinas (SUBRAMANIAM et al., 2012).

A espécie *Poecilia reticulata* destaca-se em termos de volume de produção, como uma das principais espécies de peixes ornamentais comercializadas internacionalmente, sendo, portanto, mais susceptível a ocorrência de doenças (EVERS; PINNEGAR; TAYLOR, 2019; MACEDO-VEIGA; CABLE, 2019). Por ser uma espécie muito popular entre os aquaristas, estes peixes são constantemente submetidos a técnicas de melhoramento genético, o que pode

resultar em consanguinidade e perda da diversidade alélica, tornando-os mais susceptível a ocorrência de diversas doenças de organismos aquáticos (LAGEN et al., 2011; MACEDO-VEIGA; CABLE, 2019; SCHENEKAR; WEIS, 2017; SMALLBONE; OOSTERHOUT; CABLE, 2016).

A reconstrução filogenética com base no fragmento de 369pb do gene MCP do isolado brasileiro de *Megalocytivirus* e outros isolados do gênero disponíveis no GenBank revelou a separação das sequências em três clados principais, sendo que cada clado correspondeu a um genótipo (ISKNV, RSIV e TRBIV). Resultados semelhantes na separação das sequências em função dos genótipos foram descritos por Wen et al. (2017) e Koda et al. (2018). O isolado brasileiro agrupou-se no mesmo clado das sequências descritas como pertencentes ao genótipo ISKNV com alto grau de confiabilidade (79). Esse resultado já era esperado conforme revelado pela busca no programa Blast, onde a sequência brasileira apresentou 99,2% de identidade com 2 sequências pertencentes ao genótipo ISKNV.

A caracterização morfológica da estirpe isolada de *Megalocytivirus* através da técnica de microscopia eletrônica de transmissão revelou a presença de partículas virais hexagonais no citoplasma das células infectadas, sendo o formato hexagonal indicativo de capsídeo icosaédrico. Sriwanayos et al. (2013), ao realizarem a técnica de microscopia eletrônica de peixes da espécie *Platax orbicularis* infectados por *Megalocytivirus*, também observaram a presença de partículas icosaédricas no citoplasma das células.

A técnica de microscopia eletrônica de transmissão revelou que as partículas virais do isolado brasileiro apresentavam cerca de 150nm de diâmetro sendo que este tamanho está dentro do tamanho descrito por Kurita e Nakajima (2012) para *Megalocytivirus*, que é de 120 a 200nm, sendo, portanto, a partícula viral do isolado compatível com vírions de *Megalocytivirus*. Sudthongkong et al. (2002) também descreveram virions de *Megalocytivirus* com diâmetro semelhante ao isolado brasileiro de *Megalocytivirus*. Partículas virais de *Megalocytivirus* com tamanho próximo a 150nm também foram descritas por Sriwanayos et al. (2013). Koda et al. (2018) também observaram, após a realização da técnica de microscopia eletrônica, a presença de partículas virais de *Megalocytivirus* no citoplasma celular sendo que as mesmas apresentavam tamanho próximo a 144nm quando medidas de um vértice ao outro.

Na visualização, em aumento de 100.000X, a partícula viral do isolado brasileiro apresentou três regiões. Externamente, há uma fina camada representando o capsídeo; na sequência, uma zona translúcida separando o núcleo do capsídeo e, mais internamente, encontra-se um núcleo denso. Essas características morfológicas também foram descritas por Zhang et al. (2012) na microscopia eletrônica de *Megalocytivirus*, obtido a partir de peixes da

espécie *Oplegnathus fasciatus*, bem como nos estudos realizados por Sriwanayos et al. (2013) e Bermúdez et al. (2018).

Estudos com *Megalocytyivirus* demonstram que passagens sucessivas do vírus em células BF-2 e GF resultam em uma perda progressiva da infectividade viral e como consequência temos uma redução no título viral (JUN et al., 2009; NAKAJIMA; SORIMACHI, 1994). Entretanto, para o isolado brasileiro de *Megalocytyivirus* observamos um aumento no título viral quando comparamos a terceira passagem do inóculo viral ($10^{6,8}\text{TCID}_{50}.\text{ml}^{-1}$) em células da linhagem BF-2 com a quinta passagem ($10^{7,5}\text{TCID}_{50}.\text{ml}^{-1}$). Isso evidencia um aumento na concentração das partículas virais ao longo das passagens.

O congelamento a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ e o descongelamento por sucessivas vezes de uma alíquota do isolado brasileiro de *Megalocytyivirus* não promoveu alterações significativas no título viral, indicando que o ato de congelar e descongelar o vírus não promove redução da sua infectividade, resultado semelhante ao obtido por Nakajima e Sorimachi (1994) quando expôs uma alíquota de RSIV ao congelamento a -80°C e posterior descongelamento por 2 vezes.

Na temperatura de 25°C não foram observadas alterações significativas no valor do título viral já que 25°C está dentro da faixa de temperatura considerada ótima ($20\text{-}25^{\circ}\text{C}$) para a replicação de *Megalocytyivirus* em células da linhagem BF-2 de acordo com Kurita e Nakajima (2012). Alguns estudos realizados *in vivo* demonstraram que em temperaturas próximas a 25°C , temperatura considerada ótima para a execução da resposta imune na maioria das espécies de peixes, a replicação viral é tão rápida que causa a morte de 100% dos animais acometidos (JUN et al., 2009; JUNG et al., 2015); dessa forma, a temperatura parece atuar como um fator crucial para a replicação viral, pois são observadas altas taxas de mortalidade numa temperatura onde, a princípio, espera-se obter também o pico de resposta imune (JUNG et al., 2015).

Quando o vírus foi colocado a 37°C por 6 horas, também não foram observadas alterações significativas na infectividade das partículas virais, permanecendo o valor do título obtido ($10^{7,1}\text{TCID}_{50}.\text{ml}^{-1}$) próximo ao título controle ($10^{7,5}\text{TCID}_{50}.\text{ml}^{-1}$). Segundo He et al. (2002), quando vírus do gênero *Megalocytyivirus* são expostos a temperaturas inferiores a 40°C não perdem a infectividade. Já segundo Fusianto et al. (2019), a exposição de uma cepa de *Infectious Spleen and Kidney Necrosis Iridovirus* a temperatura de 40°C por 20 min não promoveu alterações na infectividade viral.

Já na temperatura de 16°C , o valor do título obtido foi de $10^{7,1}\text{TCID}_{50}.\text{ml}^{-1}$, próximo ao título controle ($10^{7,5}\text{TCID}_{50}.\text{ml}^{-1}$). Segundo estudos, quando os vírus do gênero *Megalocytyivirus* são expostos a temperaturas próximas a 15°C , eles não perdem a infectividade, mas apresentam uma taxa de replicação mais lenta (JUNG et al., 2015; NAKAJIMA; SORIMACHI, 1994).

As temperaturas mais baixas, compreendidas na faixa de 13°C a 17°C, têm sido bastante estudadas com relação a infecção por *Megalocytivirus*. Estudos mostram que nas estações do ano onde as temperaturas permanecem mais baixas, a replicação viral é mínima; entretanto, o sistema imune do peixe não é capaz de eliminar estas partículas virais já que nesta temperatura temos um comprometimento da fisiologia do animal. Dessa forma, no verão, quando ocorre um aumento da temperatura da água, estes vírus voltam a se replicar de forma acelerada causando altas taxas de mortalidade (JUN et al., 2009; JUNG et al., 2015).

Entre as temperaturas estudadas, observou-se que o título viral do isolado brasileiro de *Megalocytivirus* reduziu a zero na temperatura de 56°C, indicando que o vírus é sensível a tratamentos nessa temperatura, conforme descrito anteriormente por Kurita e Nakajima (2012). Esse resultado permite que a temperatura em questão pode ser usada futuramente como um método efetivo de desinfecção em tanques onde tenha ocorrido surtos causados por esse gênero viral. Estudos realizados com o *Infectious Spleen and Kidney Necrosis Iridovirus*, espécie tipo do gênero *Megalocytivirus*, também demonstraram uma inativação viral quando o vírus foi exposto a temperaturas superiores a 50°C por 30 min (HE et al., 2002). Kurita e Sorimachi (1994) classificaram um isolado de *Red seabream iridovirus* pertencente ao genótipo II de *Megalocytivirus* como sensível ao calor, após observarem uma redução drástica no título viral de uma alíquota exposta a 56°C por 30 min. Um estudo recente realizado por Fusianto et al. (2019) para analisar a susceptibilidade do *Infectious Spleen and Kidney Necrosis Iridovirus* a agentes físicos verificou que a exposição viral à temperatura de 60°C, por apenas 5min, não promoveu a perda da infectividade viral; entretanto, quando a temperatura foi aumentada para 65°C e o tempo de exposição prolongado (20min) o vírus foi inativado, o que indica que o tempo de exposição pode ser um fator crucial para a inativação viral.

Entre os pHs ácidos estudados, nos pHs 1,0 e 2,0, observaram-se as reduções mais drásticas do título viral, sendo essas reduções da ordem de 2,7 e 2,4 unidades logarítmicas, respectivamente.

No pH 3,0, observou-se uma redução de 1,8 unidades logarítmicas no título viral do isolado brasileiro quando comparado com o controle, indicando a presença de partículas virais ainda com potencial de infectividade. Nakajima e Sorimachi (1994) relataram que um isolado de RISV é sensível a valores de pH inferiores a 3,0; entretanto, no estudo por eles realizado, o título viral caiu drasticamente, mas não zerou, indicando que ainda existiam partículas virais viáveis que poderiam infectar outros animais. Estudos realizados por He et al. (2002) com ISKNV, espécie tipo do gênero *Megalocytivirus* e pertencente ao mesmo genótipo do isolado brasileiro, também revelaram que tratamentos realizados em pH 3,0 promoviam uma redução

no título, mas não causavam perda da infectividade viral, pois quando as partículas virais tratadas foram expostas a um hospedeiro susceptível verificou-se a morte de 100% dos animais. Estudos mais recentes realizados por Fusianto et al. (2019) com um isolado de ISKNV demonstraram que o isolado era sensível a tratamentos em pH 3,0, mas ainda foram detectadas a presença de partículas virais após a realização do PCR em tempo real.

Sivasankar et al. (2017), em estudo com isolados de ranavírus, outro membro da família *Iridoviridae*, observaram uma queda de 2,5 unidades logarítmicas quando o isolado foi exposto ao pH 3,0. Zhou et al. (2013), ao incubarem isolados de ranavírus em soluções de pH 3,0 e pH 10,0, também observaram reduções acentuadas no título viral obtido, sendo que essas reduções foram da ordem de 3,5 unidades logarítmicas para os dois valores de pH testados. Estes resultados indicam que pode existir uma diferença de susceptibilidade frente aos pHs ácidos e alcalinos entre os diferentes gêneros da família *Iridoviridae*.

Conforme esperado, quando o isolado foi exposto a soluções com valores de pH igual a 7,8 e 8,0 não se verificaram alterações no valor do título obtido ($10^{5.5} \text{TCID}_{50} \cdot \text{ml}^{-1}$) quando comparado com o grupo controle ($10^{5.5} \text{TCID}_{50} \cdot \text{ml}^{-1}$), pois esses valores são iguais (7,8) ou muito próximos (8,0) do pH do meio de cultivo que é de 7,8 e também estão próximos do pH neutro. He et al. (2002) obtiveram resultados semelhantes relatando a permanência da capacidade infectiva viral após submeterem um isolado de ISKNV ao pH 7,0.

Com relação ao pH 11,0, os estudos descritos na literatura ainda não são conclusivos. Para o isolado brasileiro de *Megalocytivirus*, após exposição em pH 11,0 por 1h, observou-se uma queda no título viral da ordem de 1,9 unidades logarítmicas, o que indica a presença de uma quantidade significativa de partículas virais viáveis. He et al. (2002), ao tratarem um isolado de ISKNV em solução no pH 11,0, relataram a inativação viral, confirmada após exposição dos animais ao vírus tratado. Já Kurita e Sorimachi (1994), ao submeterem um isolado pertencente ao genótipo RSIV, nas mesmas condições do estudo anterior, não observaram alterações significativas no título viral do grupo tratado, indicando que o pH 11,0 pode não ser efetivo na inativação desse genótipo viral.

Entre todos os pH testados neste estudo, o pH 12,0 foi o que mostrou uma maior redução no título viral, sendo esta da ordem de 2,9 unidades logarítmicas. Este resultado revela que protocolos efetivos de desinfecção dependem da escolha correta do desinfetante a ser utilizado, levando em consideração o pH do mesmo.

A presença de envelope lipídico nas partículas virais de *Megalocytivirus* ainda é uma questão controversa. Em fotomicrografias eletrônicas de transmissão de células infectadas com partículas virais do gênero *Ranavirus* é possível observar a aquisição do envelope lipídico pelas

partículas virais ao saírem por brotamento da célula hospedeira; entretanto, isso nunca foi visto em células infectadas com *Megalocytivirus*, o que indica que isso provavelmente não ocorra para esse gênero viral. De fato, Chinchar et al. (2017) relata que os vírions da família *Iridoviridae* apresentam uma membrana lipídica interna entre o núcleo e o capsídeo e dependendo do gênero, as partículas virais maduras podem adquirir um envelope lipídico externo por brotamento através da membrana plasmática celular ou permanecerem não envelopados.

O teste de susceptibilidade a solventes lipídicos realizado com éter resultou numa queda acentuada do título viral, da ordem de aproximadamente 4 unidades logarítmicas, indicando algum efeito deletério do éter na membrana lipídica interna da maioria dos vírions de *Megalocytivirus* conforme descrito por Shi et al. (2004) e Kurita e Nakajima (2012). Após o tratamento com éter, o título não zerou, o que nos permite supor que algumas partículas virais não sofreram o efeito deletério do éter ou não possuíam uma membrana lipídica como proposto por Sriwanayos et al. (2013) e Bermúdez et al. (2018).

A queda drástica no título revela também que a maioria das partículas virais que compõem a população de *Megalocytivirus* apresenta um envelope lipídico externo, conforme também descrito por Shi et al. (2004) e Kurita e Nakajima (2012). Embora grande parte dos vírions de *Megalocytivirus* apresentaram-se envelopados, uma parte deles não apresentou envelope, conforme igualmente descrito por Sriwanayos et al. (2013) e Bermúdez et al. (2018).

A construção da curva de replicação viral resultou num aumento progressivo do título viral no decorrer dos quatro primeiros dias após inoculação, atingindo o maior valor de título no quarto dia após inoculação ($10^{8.1}$ TCID₅₀.ml⁻¹). O aumento no título viral foi acompanhado pela progressão do efeito citopático, conforme também observado por Wen et al. (2008) ao construir *in vitro* a curva de replicação viral de uma estirpe de *Megalocytivirus*. Entretanto, em estudo realizado por Wen et al. (2008), o maior valor de TCID₅₀.ml⁻¹ foi observado no quinto dia após inoculação, sendo que após esse tempo também foi relatado uma redução no título viral no decorrer dos tempos subsequentes.

Os resultados obtidos até momento permitiram a caracterização morfológica e a construção da curva de replicação viral do isolado brasileiro de *Megalocytivirus*, fornecendo bases de extrema relevância para a realização de estudos posteriores objetivando, em última análise, a busca por formas efetivas de controle e prevenção da infecção causada por esse gênero viral.

7.2 *Lymphocystivirus*

O estudo realizado teve como objetivos principais, isolar em células BF-2, a estirpe brasileira de *Lymphocystivirus* obtida a partir de lesão de peixe ornamental, realizar a caracterização fenotípica da estirpe isolada através dos ensaios de susceptibilidade a solvente lipídico, susceptibilidade a diferentes temperaturas, susceptibilidade a diferentes pHs e susceptibilidade ao descongelamento, bem como construir a curva de replicação viral e caracterizar filogeneticamente o isolado.

Para o isolamento viral do *Lymphocystivirus* em cultivo celular, foi utilizada 1 amostra proveniente de uma lesão da nadadeira do peixe marinho da espécie *Pomacanthus xanthurus*, sendo a amostra positiva ao diagnóstico molecular para gênero viral em questão. Após a primeira passagem em cultura de células BF-2, observou-se o aparecimento de efeito citopático na amostra, sendo o efeito citopático caracterizado inicialmente pelo arredondamento celular progredindo para o desprendimento das células da superfície da placa com consequente morte celular.

O isolamento viral, a partir de uma lesão de pele oriunda do peixe ornamental, foi realizado em células da linhagem BF-2. Embora Iwamoto et al. (2002) tenham descrito o gênero *Lymphocystivirus* como de difícil isolamento e propagação em cultivo celular devido a sua seletividade com relação as suas células hospedeiras, observou-se o aparecimento de efeito citopático após a primeira passagem em cultura de células BF-2.

Segundo Iwamoto et al. (2002), Borrego et al. (2015) e Ciulli et al. (2015), o *Lymphocystivirus* trata-se de um gênero viral que demanda muito tempo para a obtenção de resultados satisfatórios e de difícil isolamento em cultivo celular devido a sua seletividade com relação as células hospedeiras e, dessa forma, a partir do isolamento viral inédito da estirpe brasileira de *Lymphocystivirus*, foi possível criar um biobanco de diferentes passagens do isolado viral no Laboratório Multiusuário de Microbiologia e Higiene Zootécnica para a realização de estudos futuros envolvendo a pesquisa por novas linhagens celulares permissivas a infecção pelo gênero viral, o sequenciamento do genoma completo da estirpe circulante no país bem como a pesquisa de vacinas voltadas para a prevenção da doença.

O sucesso no isolamento viral pode ter ocorrido em decorrência da escolha correta da linhagem celular a ser utilizada. Estudos demonstram que os fibroblastos parecem ser a linhagem celular de escolha para replicação do LCDV em cultivo celular (ALONSO et al., 2005).

Inicialmente, o efeito citopático foi caracterizado pela presença de células arredondadas e refratárias ao longo da placa, evoluindo posteriormente para a morte celular. Estudos realizados por Perez-Prieto et al. (1999) e Garcia-Rosado et al. (1999) também observaram a ocorrência de células arredondadas e aumentadas bem como a presença de células refratárias em células submetidas a infecção por *Lymphocystivirus*.

A reconstrução filogenética com base no fragmento de 512pb do gene MCP do isolado brasileiro de *Lymphocystivirus* e outras sequências do gênero disponíveis no GenBank revelou a separação das sequências em nove clados principais, sendo que cada clado correspondeu a um genótipo do vírus. Cano et al. (2010) e Palmer et al. (2012) também observaram a separação dos clados em função dos nove genótipos. O isolado brasileiro agrupou-se no mesmo clado da sequência descrita como pertencente ao genótipo V. Já de acordo com a busca realizada no programa Blast, a sequência brasileira apresentou 92,4% de identidade com uma sequência de *Lymphocystivirus* (KJ408271) pertencente ao genótipo II assim como os resultados obtidos no *nested-PCR* usando os pares de primers específicos para os genótipos I, II e III. Embora o gene MCP por ser muito conservado seja indicado para a realização de estudos filogenéticos, quando trabalhamos com fragmentos menores temos uma maior probabilidade de encontrar similaridade entre os fragmentos de MCP de genótipos diferentes.

O método físico de desinfecção por irradiação com luz ultravioleta mostrou-se efetivo na inativação das partículas virais. Estudos realizados por Iwamoto et al. (2002) também obtiveram resultados semelhantes ao irradiar uma cepa de *Lymphocystivirus* oriunda da espécie *Paralichthys olivaceus* com luz UV por curtos períodos de tempo.

Os testes de susceptibilidade a solvente lipídico realizados com éter e clorofórmio demonstraram eficácia na redução da infectividade, sendo que o clorofórmio foi capaz de reduzir o título viral a zero. Os resultados descritos na literatura com relação a eficácia dos solventes lipídicos na inativação do *Lymphocystivirus* ainda são controversos. Alonso et al. (2005) verificaram que isolados do vírus provenientes de 3 espécies de peixes não foram sensíveis ao tratamento com clorofórmio e defenderam a hipótese que o clorofórmio não é capaz de remover completamente o conteúdo lipídico do capsídeo viral, sendo que éter teria esse efeito. Já Iwamoto et al. (2002) demonstraram que o éter foi capaz de eliminar a infectividade de isolado oriundo de *Paralichthys olivaceus*.

Para *Lymphocystivirus*, a temperatura exerce um efeito muito maior na replicação viral quando comparado com a queda na imunidade causada pela alteração da temperatura (HOSSAIN et al., 2009). Além disso, estudos relatam que a temperatura é um fator

determinante para o aparecimento ou não dos sinais clínicos nos animais infectados, o que favorece a transmissão em casos de coabitação (HOSSAIN et al., 2009).

Entre as temperaturas estudadas, não foram observadas alterações significativas nos títulos virais dos inóculos incubados a 16°C, 25°C e 37°C; entretanto, na temperatura de 56°C, o título viral foi igual a zero. Estudos demonstram que a temperatura ideal para a replicação do vírus da doença de *Lymphocystis* é de 20°C e que, nessa temperatura, devido à otimização da replicação viral, há o aparecimento dos nódulos hipertróficos. Já nas temperaturas de 10°C e 30°C, embora não se observe o aparecimento dos sinais clínicos, o animal apresenta uma carga viral reduzida e quando submetido a alterações de temperatura, pode vir a desenvolver os nódulos na pele (HOSSAIN et al., 2009).

Estudos envolvendo ensaios de susceptibilidade de isolados de *Lymphocystivirus* a diferentes pH ainda são bastante escassos. O isolado brasileiro de *Lymphocystivirus* apresentou sensibilidade aos valores de pH inferior a 2,0 e superior a 12,0, com redução de 1,7 e 2,2 unidades logarítmicas, respectivamente. Iwamoto et al. (2002) observaram uma redução de 1,25 unidades logarítmicas no título viral de um isolado de *Lymphocystivirus* submetido a pH 3,0 por 3h. Os resultados obtidos norteiam as pesquisas por protocolos efetivos de desinfecção de tanques ou aquários em caso de infecção por esse gênero viral, visando a completa eliminação das partículas virais antes da reabitação do local.

A sensibilidade dos vírions a tratamentos com temperatura de 56°C e valores de pH inferiores a 3,0 é algo comum para os vírus pertencentes a família *Iridoviridae*. Sinvasakar et al. (2017) relataram que vírions pertencentes ao gênero *Ranavirus* também se mostravam sensíveis quando expostos a essas condições.

A curva de replicação viral do isolado de *Lymphocystivirus* resultou num aumento progressivo do título viral no decorrer dos cinco primeiros dias após inoculação, atingindo o maior valor de título no quinto dia após inoculação ($10^{6,5}$ TCID₅₀.ml⁻¹). O aumento no título viral foi acompanhado pela progressão do efeito citopático e a queda no título viral, no sexto dia pós inoculação, ocorreu provavelmente em decorrência da ausência de novas células para a infecção.

Os resultados obtidos permitiram a determinação das propriedades físico-químicas e a construção da curva de replicação viral do isolado brasileiro de *Lymphocystivirus*, fornecendo uma base sólida para a realização de estudos posteriores envolvendo a caracterização morfológica, o sequenciamento do genoma completo do isolado e objetivando, em última análise, a busca por formas efetivas de prevenção da infecção através do desenvolvimento de vacinas.

8 CONCLUSÕES

A partir da realização desse trabalho, foi possível isolar em células da linhagem BF-2, uma estirpe brasileira de *Megalocytivirus* e uma estirpe brasileira de *Lymphocystivirus*. O isolamento em cultivo celular desses gêneros virais é bastante difícil e foi realizado pela primeira vez no Brasil, no presente trabalho, abrindo caminhos para futuros estudos envolvendo a busca por formas efetivas de controle e principalmente prevenção dessas doenças que estão associadas a altas perdas econômicas na aquicultura mundial.

Na reconstrução filogenética, com base num fragmento do gene MCP do gênero *Megalocytivirus*, o isolado brasileiro foi mais próximo filogeneticamente de sequências representativas do genótipo I, o qual inclui isolados descritos como pertencentes a espécie *Infectious Spleen and Kidney Necrosis Iridovirus*. Já a árvore filogenética para *Lymphocystivirus* revelou a existência de 9 clados, conforme genótipos descritos para o gênero, sendo que o isolado brasileiro de *Lymphocystivirus* agrupou-se em clado contendo um isolado pertencente ao genótipo V.

Os resultados indicaram que a estirpe brasileira de *Megalocytivirus* apresenta uma população de vírions majoritariamente envelopados, é sensível à luz ultravioleta, à temperatura de 56°C, aos tratamentos realizados com valores de pHs muito ácidos (inferiores a 2,0) e muito básicos (superiores a 10,0) e não é sensível ao congelamento à -80°C e descongelamento por sucessivas vezes. O isolado mostrou-se susceptível a alterações no título viral ao ser congelado à -20°C e descongelado por sucessivas vezes. A técnica de microscopia eletrônica de transmissão revelou a presença de partículas hexagonais no citoplasma celular compatíveis com o formato icosaédrico descrito para o gênero *Megalocytivirus*.

Os resultados para a estirpe brasileira de *Lymphocystivirus* revelaram uma população de vírions sensíveis ao tratamento com éter e clorofórmio, o que revela a presença de uma membrana lipídica na partícula viral, sensível a luz ultravioleta, à temperatura de 56°C, aos valores de pHs inferiores a 2,0 e superiores a 12,0 e que é susceptível a alterações no título viral ao ser congelado à -20°C e à 80°C e descongelado por sucessivas vezes.

A curva de replicação viral para os dois isolados demonstrou que o aumento no título viral acompanha a progressão do efeito citopático, alcançando o maior valor de TCID₅₀.ml⁻¹ para *Megalocytivirus* no quarto pós inoculação, e para *Lymphocystivirus*, no quinto dia pós inoculação.

REFERÊNCIAS

- AHNE, W.; SCHLOTFELDT, H. J.; THOMSEN, I. Fish viruses: isolation of an icosahedral cytoplasmic deoxyribovirus from sheatfish (*Silurus glanis*). **Journal of Veterinary Medicine, Series B**, Berlin, v. 36, p. 333-336, 1989.
- ALAVANDI, S. V.; POORNIMA, M. Viral metagenomics: a tool for virus discovery and diversity in aquaculture. **Indian Journal of Virology**, New Delhi, v. 23, n. 2, p. 88-98, 2012.
- ALONSO, M. C. Comparison of Lymphocystis Disease Virus (LCDV) isolates obtained from different marine fish species and geographical areas. **Bulletin- European Association of Fish Pathologists**, Netherlands, v. 27, p. 157-164, 2007.
- ALONSO, M. C. *et al.* Isolation of lymphocystis disease virus from sole, *Solea senegalensis* Kaup, and blackspot sea bream, *Pagellus bogaraveo* (Brünnich). **Journal of Fish Diseases**, Chichester, v. 28, p. 221-228, 2005.
- ALTSCHUL, S. F. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.
- ANDERS, K. Lymphocystis disease of fishes. *In*: AHNE, W.; KURSTAK, D. (ed.). **Viruses of lower vertebrates**. Berlin: Springer, 1989. p. 141-60.
- AO, J. Q.; CHEN, X. H. Identification and characterization of a novel gene encoding an RGD-containing protein in large yellow croaker iridovirus. **Virology**, Waltham, v. 355, p. 213-222, 2006.
- BASURCO, A. *et al.* First report on lymphocystis disease in *Sparus aurata* (Linnaeus in Spain). **Bulletin- European Association of Fish Pathologists**, Netherlands, v. 10, p. 71-73, 1990.
- BÉNÉ, C. *et al.* Feeding 9 billion by 2050 – Putting fish back on the menu. **Food Security**, Dordrecht, v. 7, p. 261-274, 2015.
- BERMÚDEZ, R. *et al.* First description of a natural infection with spleen and kidney necrosis virus in zebrafish. **Journal of Fish Disease**, Chichester, p. 1-12, 2018.
- BLACK, P.N. *et al.* Biochemistry and ultrastructure of iridescent virus type 29. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 38, p. 12–21, 1981.
- BOISON, J. O.; TURNIPSEED, S. B. A review of aquaculture practices and their impacts on chemical food safety from a regulatory perspective. **Journal of AOAC International**, Rockville, v. 98, n. 3, p. 541-549, 2015.
- BORREGO, J. J. *et al.* Lymphocystis disease virus: its importance in aquaculture. **Reviews in Aquaculture**, Richmond, p. 1-15, 2015.
- BRASIL. Ministério de Pesca e Aquicultura. **Emprego e renda**. 2011. Disponível em: <http://www.mpa.gov.br/index.php/aquiculturampa/informacoes/emprego-e-renda>. Acesso em: 22 fev. 2014.

BREITBART, M. Marine viruses: truth or dare. **Annual Review of Marine Science**, Califórnia, v. 4, p. 425-448, 2012.

BRODIN, J. *et al.* A multiple-alignment based primer design algorithm for genetically variable DNA targets. **BMC Bioinformatics**, London, v. 14, p. 1-9, 2013

CANO, I. *et al.* Transmission of Lymphocystis Disease Virus to Cultured Gilthead Seabream, Sparus Aurata L., Larvae. **Journal of Fish Disease**, Chichester, v. 36, p. 569-576, 2013.

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

CANO, I. *et al.* Detection and persistence of Lymphocystis disease virus (LCDV) in *Artemia* sp. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 32, p. 230-236, 2009.

CARBALLO, C. *et al.* Feed and immersion challenges with lymphocystis disease virus (LCDV) reveals specific mechanisms for horizontal transmission and immune response in senegalese sole post-larvae. **Fish & Shellfish Immunology**, London, v. 89, p. 710-718, 2019.

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

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

CHEN, S. L. *et al.* Establishment of a continuous embryonic cell line from Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* for virus isolation. **Disease of Aquatic Organisms**, Oldendorf, v. 60, p. 241-246, 2004.

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

CHINCHAR, V. G. *et al.* ICTV virus taxonomy profile: Iridoviridae. **Journal of General Virology**, v. 98, p. 890-891, 2017.

CHINCHAR, V. G. *et al.* Family Iridoviridae: poor viral relations no longer. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, Heidelberg, v. 328, p. 123-170, 2009.

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

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

- CIULLI, S. *et al.* Development and application of a real-time PCR assay for the detection and quantitation of lymphocystis disease virus. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 213, p. 164-173, 2015.
- COHEN, F. P. A.; VALENTI, W.C.; CALADO, C. Traceability issues in the trade of marine ornamental species. **Reviews in Fisheries Science**, Boca Raton, v. 21, p. 98-111, 2013.
- COLLINS, J. P.; STORFER, A. Global amphibian declines: sorting the hypotheses. **Diversity and Distributions**, Chichester, v. 9, p. 89-98, 2003.
- COLORNI, A.; DIAMANT, A. Splenic and cardiac lymphocystis in the red drum, *Scaenops ocellatus* (L.). **Journal of Fish Diseases**, Chichester, v. 18, p. 467-471, 1995.
- DASZAK, P. *et al.* Emerging infectious diseases and amphibian population declines. **Emerging Infectious Disease**, Atlanta, v. 5, p. 735-748, 1999.
- DASZAK, P.; CUNNINGHAM, A. A.; HYATT, A. D. Infectious disease and amphibian population declines. **Diversity and Distributions**, Chichester, v.9, p. 141-150, 2003.
- DO, J. W. *et al.* Phylogenetic analysis of the major capsid protein gene of iridovirus isolates from cultured flounders *Paralichthys olivaceus* in Korea. **Disease of Aquatic Organisms**, Oldendorf, v. 64, p. 193-200, 2005.
- DO, J. W. *et al.* Complete genomic DNA sequence of rock bream iridovirus. **Virology**, Waltham, v. 325, p. 351-363, 2004.
- DONG, C. *et al.* Cloning of a new fibroblast cell line from an early primary culture from mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) fry for efficient proliferation of megalocytiviruses. **Cytotechnology**, Dordrecht, v. 66, p. 883-890, 2014.
- DONG, C. *et al.* A new marine megalocytivirus from spotted knifejaw, *Oplegnathus punctatus*, and its pathogenicity to freshwater mandarin fish, *Siniperca chuatsi*. **Virus research**, v. 147, p. 98-106, 2010.
- DONG, C. F. Global landscape of structural proteins of infectious spleen and kidney necrosis virus. **Journal of Virology**, Washington, v. 85, p. 2869-2877, 2011.
- DONG, C. F. Development of a mandarin fish *Siniperca chuatsi* fry cell line suitable for the study of infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV). **Virus Research**, Amsterdam, v. 13, p. 273-281, 2008.
- DOSZPOLY, A. *et al.* Complete genome sequence and analysis of a Lymphocystivirus detected in whitemouth croaker (*Micropogonias furnieri*): lymphocystis disease virus 4. **Archives of Virology**, Wien v. 165, p. 1215-1218, 2020.
- EATON, H. E.; RING, B. A.; BRUNETTI, C. R. The genomic diversity and phylogenetic relationship in the family *Iridoviridae*. **Viruses**, Basel, v. 2, p. 1458-1475, 2010.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. **Pesca e aquicultura**.2018. Disponível em: <https://www.embrapa.br/tema-pesca-e-aquicultura/nota-tecnica>. Acesso em: 22 out. 2018.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. **Pesca e aquicultura**.2016. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/18797150/aquicultura-brasileira-cresce-123-em-dez-anos>. Acesso em: 22 out. 2018.

EVERS, H. J.; PINNEGAR, J. K.; TAYLOR, M. I. Where are they all from? – sources and sustainability in the ornamental freshwater fish trade. **Journal of Fish Biology**, London, v. 94, p. 909-916, 2019.

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

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO. **The State of world fisheries and aquaculture**. Rome: FAO, 2022.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO. **The State of world fisheries and aquaculture**. Rome: FAO, 2020.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO. **The State of world fisheries and aquaculture**. Rome: FAO, 2018.

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

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAO. **The State of world fisheries and aquaculture**. Rome: FAO, 2006.

FRESHNEY, R. I. **Culture of animal cells: a manual of basic technique**. 5th ed. New York: Wiley-Liss, 2005.

FUSIANTO, C. *et al.* Stability of Infectious spleen and kidney necrosis virus and susceptibility to physical and chemical disinfectants. **Aquaculture**, Amsterdam v. 506, p. 104-111, 2019.

GARCIA-ROSADO, E. *et al.* Isolation and characterization of lymphocystis virus (FLDV) from gilt-head sea bream (*Sparus aurata*, L.) using a new homologous cell line. **Buletin of the European Association of Fish Pathologists**, Netherlands, v. 19, p. 53-56, 1999.

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

GO, J.; WHITTINGTON, R. Experimental transmission and virulence of a megalocytivirus (Family *Iridoviridae*) of dwarf gourami (*Colisa lalia*) from Asia in Murray cod

(*Maccullochella peelii peelii*) in Australia. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 258, p. 140–149, 2006.

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

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

HE, J. G. *et al.* Experimental transmission, pathogenicity and physical-chemical properties of infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 204, p. 11–24, 2002.

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

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

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

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

HILLS, D. M.; BULL, J. J. An empirical test of boot strapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. **Systematic Biology**, Basingstoke, v. 42, p. 182-192, 1993.

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

HOSSAIN, M. Lymphocystis disease virus persists in the epidermal tissues of olive flounder, *paralichthys olivaceus* (Temminch & Schlegel), at low temperatures. **Journal of Fish Diseases**, Chichester, v. 32, p. 699-703, 2009.

HUANG, S-M. *et al.* Genetic analysis of fish iridoviruses isolated in Taiwan during 2001-2009. **Archives of Virology**, Wien, v. 156, p. 1505-1515, 2011.

IMAJOH, M.; IKAWA, T; OSHIMA, S-I. Characterization of a new fibroblast cell line from a tail fin of red sea bream, *Pagrus major*, and phylogenetic relationships of a recent RSIV isolate in Japan. **Virus research**, Amsterdam, v. 126, p. 45-52, 2007.

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

- IWAMOTO, R. *et al.* Isolation and characterization of the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) lymphocystis disease virus. **Journal of Aquatic Animal Health**, New York, v. 14, p. 114-123, 2002.
- JANCOVICH, J. K. *et al.* Evidence for emergence of an amphibian iridoviral disease because of human-enhanced spread. **Molecular Ecology**, Chichester, v. 14, p. 213-224, 2005.
- JEONG, J. B. *et al.* Outbreaks and risks of infectious spleen and kidney necrosis virus disease in freshwater ornamental fishes. **Diseases of Aquatic Organisms**, Oldendorf, v. 78, p. 209-215, 2008.
- JEONG, J. M. *et al.* Molecular cloning and characterization of the rock bream, *Oplegnathus fasciatus*, Fas (CD95/APO-1), and its expression analysis in response to bacterial or viral infection. **Results in Immunology**, Amsterdam, v. 1, p.11-17, 2011.
- JEONG, J. B. *et al.* Characterization of the DNA nucleotide sequences in the genome of red sea bream iridoviruses isolated in Korea. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 220, p.119-133, 2003.
- JOHNSON, S. J. *et al.* The impact of pooling samples on surveillance sensitivity for the megalocytivirus Infectious spleen and kidney necrosis virus. **Trasbound Emerging Diseases**, Berlin, v. 66, p. 2318-2328, 2019.
- JUN, L. J. *et al.* Influence of temperature shifts on the onset and development of red sea bream iridoviral disease in rock bream *Oplegnathus fasciatus*. **Disease of Aquatic Organisms**, Oldendorf, v. 84, p. 201–208, 2009.
- JUNG, S. J.; OH, M. J. Iridovirus-like infection associated with high mortalities of striped beak perch, *Oplegnathus fasciatus* (Temmincker Schlegel), in southern coastal areas of the Korea peninsula. **Journal of Fish Diseases**, Chichester, v. 23, p. 223-236, 2000.
- JUNG, M. H. *et al.* Effects of water temperature on mortality in *Megalocytivirus*-infected rock bream *Oplegnathus fasciatus* (Temminck et Schlegel) and development of protective immunity. **Journal of Fish Diseases**, Chichester, v. 38, p. 729-737, 2015.
- JUNG-SCHROERS, V. *et al.* First outbreak of an infection with infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) in ornamental fish in Germany. **Disease of Aquatic Organisms**, Oldendorf, v. 119, n. 3, p. 239–244, 2016.
- KANG, M. S. *et al.* Establishment and characterization of two new cell lines derived from flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck & Schlegel). **Journal of Fish Diseases**, Chinchester, v. 26, p. 657–665, 2003.
- KAUR, G.; DUFOUR, J. M. Cell lines Valuable tools or useless artifacts. **Spermatogenesis**, Austin, v. 2, p. 1–5, 2012.
- KAWATO, Y. *et al.* Isolation and characterisation of an ISKNV-genotype megalocytivirus from imported angelfish *Pterophyllum scalare*. **Disease of Aquatic Organisms**, Oldendorf, v. 140, p. 129–141, 2020.

- KING, T. A. Wild Caught Ornamental Fish: A perspective from the UK ornamental aquatic industry on the sustainability of aquatic organisms and livelihoods. **Journal of Fish Biology**, London, v. 94, p. 925-936, 2019.
- KITAMURA, S. *et al.* Seasonal prevalence of lymphocystis disease virus and aquabirnavirus in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* and blue mussel, *Mytilus galloprovincialis*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 266, p. 26-31, 2007.
- KITAMURA, S.; JUNG, S. J.; OH, M. J. Differentiation of lymphocystis disease virus genotype by multiplex PCR. **The Journal of Microbiology**, Seoul, v. 44, p. 248-253, 2006.
- KODA, S. A. *et al.* Phylogenomic characterization of two novel members of the genus Megalocytivirus from archived ornamental fish samples. **Diseases of Aquatic Organisms**, Oldendorf, v. 130, p. 11–24, 2018.
- KUBITZA, F. *et al.* Piscicultura no Brasil: a sanidade na piscicultura, do ponto de vista dos produtores e técnicos. **Panorama da Aquicultura**, Rio de Janeiro, v. 23, p. 16–25, 2013.
- KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA 7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular Biology and Evolution**, Cary, Mar. 2016.
- KURITA, J.; NAKAJIMA, K. Megalocytiviruses. **Viruses**, Basel, v.4, p. 521-538, 2012.
- KVITT, H.; HEINISCH, G.; DIAMANT, A. Detection and phylogeny of Lymphocystivirus in sea bream *Sparus aurata* based on the DNA polymerase gene and major capsid protein sequences. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 275, p. 58-63, 2008.
- KWON, W. J. *et al.* Development and characterization of megalocytivirus persistently infected cell cultures for high yield of virus. **Tissues and Cells**, Edinburgh, v. 66, 2020.
- LANGDON, J. S. *et al.* First virus isolation from Australian fish: an iridovirus-like pathogen from redfin perch *Perca fluviatilis*. **Journal of Fish Diseases**, Chichester, v.9, p. 263-268, 1986.
- LANGEN, K. *et al.* Microsatellite Support for Active Inbreeding in a Cichlid Fish. **PLOS ONE**, San Francisco, v. 6, p. 1-9, 2011.
- LEIVA-REBOLLO, R. *et al.* Persistence of Lymphocystis Disease Virus (LCDV) in Seawater. **Food and Environmental Virology**, New York, v.12, p. 174-179, 2020.
- LEU, J. H.; WU, M. H.; CHOU, H. Y. A comparative study between Ranavirus and Megalocytivirus infections in Orange-spotted grouper (*Epiplatys coioides*). **Journal of Marine Science and Technology**, Tokyo, v. 21, p. 58-64, 2013.
- LIU, H.-I. *et al.* Cloning of the Major Capsid Protein (MCP) of Grouper Iridovirus of Taiwan (TGIV) and Preliminary Evaluation of a Recombinant MCP Vaccine against TGIV. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 16, p. 28647–28656, 2015.

LÓPEZ-BUENO, A. *et al.* Concurrence of Iridovirus, Polyomavirus, and a Unique Member of a New Group of Fish Papillomaviruses in Lymphocystis Disease-Affected Gilthead Sea Bream. **Journal of Virology**, Washington, v. 90, p. 8768-8779, 2016.

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

MACEDA-VEIGA, A.; CABLE, J. Diseased fish freshwater trade: from retailers to private aquarists. **Disease of Aquatic Organisms**, Oldendorf, v. 132, p. 157-162, 2019.

MAGANHA, S. R. L. *et al.* Detection and molecular characterization of Lymphocystivirus in Brazilian ornamental fish. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 51, p. 531-535, 2019.

MAGANHA, S. R. L. *et al.* Molecular detection and phylogenetic analysis of megalocytivirus in Brazilian ornamental fish. **Archives of Virology**, Wien, v. 163, p. 2225-2231, 2018.

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

MARTINS, M. L. *et al.* Parasitic infections in cultivated freshwater fishes a survey of diagnosed cases from 1993 to 1998. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 9, p. 23-28, 2000.

MARTINS, M. L. *et al.* *Piscinoodinium pillulare* (Schäperclaus, 1954) Lom, 1981 (Dinoflagellida) infection in cultivated freshwater fish from the northeast region of São Paulo state, Brazil. Parasitological and pathological aspects. **Brazilian Journal of Biology**, São Paulo, v. 61, p. 639-644, 2001.

MARTINS, M. L. *et al.* Recent studies on parasitic infections of freshwater cultivated fish in the state of São Paulo, Brazil. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 24, p. 981-985, 2002.

NAKAJIMA, K.; SORIMACH, M. Biological and Physico-chemical properties of the iridovirus isolated from cultured red sea bream, *Pagrus major*. **Fish Pathology**, London, v. 29, p. 29-33, 1994.

NAKAJIMA, K. *et al.* Vaccination Against Red Sea Bream Iridoviral Disease in Red Sea Bream. **Fish pathology**, London, v. 36, p. 73-75, 1997.

NAKAJIMA, K. *et al.* Effectiveness of a vaccine against red sea bream iridoviral disease in a field trial test. **Disease of Aquatic Organisms**, Oldendorf, v. 36, p. 73-75, 1999.

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

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

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

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

PAPERNA, I. *et al.* Iridovirus infections in farm-reared tropical ornamental fish. **Diseases of Aquatic Organisms**, Oldendorf, v. 48, p. 17-25, 2001.

PARAMESWARAN, V. Development and characterization of two new cell lines from Milkfish (*Chanos chanos*) and Grouper (*Epinephelus coioides*) for virus isolation. **Marine Biotechnology**, New York, v. 9, p. 281-291, 2007.

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

PINCINATO, R. B. M.; ASCHEA, F. The development of Brazilian aquaculture: introduced and native species. **Aquaculture Economics & Management**, Abingdon, v. 20, n. 3, p. 312-323, 2016.

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

QIN, Q. W. *et al.* Development and characterization of a new tropical marine fish cell line from grouper, *Epinephelus coioides* susceptible to iridovirus and nodavirus. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 131, p. 58-64, 2006.

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

RAGHAVAN, R. *et al.* Uncovering an obscure trade: Threatened freshwater fishes and the aquarium pet markets. **Biological conservation**, v. 164, p. 158-169, 2013.

RAZAK, A. A.; RANSANGAN, J.; SADE, A. First report of Megalocytivirus (Iridoviridae) in grouper culture in Sabah, Malaysia. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, Kancheepuram, v. 3, 896-909, 2014.

REED, L. J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. **American Journal of Hygiene**, Cary, v. 27, p. 493-497, 1938.

RIMMER, A. E. *et al.* Susceptibility of a number of Australian freshwater fishes to dwarf gourami iridovirus (*Infectious spleen and kidney necrosis virus*). **Journal of Fish Diseases**, Chichester, v. 40, n. 3, p. 293-310, 2016.

RIMMER, A. E. *et al.* Detection of dwarf gourami iridovirus (*Infectious spleen and kidney necrosis virus*) in populations of ornamental fish prior to and after importation into Australia,

with the first evidence of infection in domestically farmed Platy (*Xiphophorus maculatus*). **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 122, p. 181-194, 2015.

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

SAINT-PAUL, U. Native fish species boosting Brazilian's aquaculture development. **Acta of Fisheries and Aquatic Resources**, São Cristovão, v. 5, n. 1, p. 1-9, 2017.

SANT'ANA, F. J. F. *et al.* Surtos de infecção por *Piscinoodinium pillulare* e *Henneguya* spp. em pacus (*Piaractus mesopotamicus*) criados intensivamente no Sudoeste de Goiás. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 32, p.121–125, 2012.

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

SCHENEKAR, T.; WEISS, S. Selection and genetic drift in captive versus wild populations: an assessment of neutral and adaptive (MHC-linked) genetic variation in wild and hatchery brown trout (*Salmo trutta*) populations. **Conservation Genetics**, Dordrecht, v.18, p. 1011–1022, 2017.

SHA, Z. Development and characterization of a cell line from the embryos of half smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). **Acta Oceanologica Sinica**, Beijing, v.29, p. 81–87, 2010.

SHI, C. Y. *et al.* The first report of an iridovirus-like agent infection in farmed turbot, *Scophthalmus maximus*, in China. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 236, p. 11–25, 2004.

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

SHIU, J. Y. *et al.* Complete genome sequence and phylogenetic analysis of Megalocytivirus RSIV-Ku: A natural recombination infectious spleen and kidney necrosis virus. **Archives of Virology**, Wien, v. 163, n. 4, p. 1037-1042, 2018.

SIVASANKAR, P. *et al.* Characterization of a virulent ranavirus isolated from marine ornamental fish in India. **Virus disease**, New Delhi, v. 28, p. 373-382, 2017.

SOMMERSET, I. *et al.* Vaccines for fish in aquaculture. **Expert Review of Vaccines**, London, v. 4, p. 89-101, 2005.

SMALLBONE, W.; OOSTERHOUT, C.; CABLE, J. The effects of inbreeding on disease susceptibility: *Gyrodactylus turnbulli* infection of guppies, *Poecilia reticulata*. **Experimental Parasitology**, New York, v. 167, p.32-37, 2016.

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

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

SPEARE, R.; SMITH, J. R. An iridovirus-like agent isolated from the ornate burrowing frog *Limnodynastes ornatus* in northern Australia. **Diseases of Aquatic Organisms**, Oldendorf, v. 14, p. 51-57, 1992.

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

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

SUBRAMANIAM, K. *et al.* Megalocytivirus infection in fish. **Reviews in Aquaculture**, Hoboken, v. 4, p. 221-233, 2012.

SUDTHONGKONG, C.; MIYATA, M.; MIYAZAKI, M. Viral DNA sequences of gene encoding the ATPase and the major capsid protein of tropical iridovirus isolates which are pathogenic to fishes in Japan, South China sea and Southeast Asian countries. **Archives of Virology**, Wien, v. 147, p. 2089-2109, 2002.

TAVARES-DIAS, M. Piscicultura continental no estado do Amapá: diagnóstico e perspectivas. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 81. Macapá: Embrapa Amapá, 2011.

TAVARES-DIAS, M; MARTINS, M. L. An overall estimation of losses caused by diseases in the Brazilian fish farms. **Journal of Parasitic Diseases**, New Dehli, v. 41, n. 4, p. 913–918, 2017.

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

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

TIDONA, C. A.; DARAI, G. Lymphocystis Disease Virus (*Iridoviridae*). In: GRANOFF, A.; WEBSTER, R. G. (ed.). **Encyclopedia of Virology**. 2nd ed. New York: Academic Press, 1999. p. 908-911.

TLUSTY, M. The benefits and risks of aquacultural production for the aquarium trade. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 205, p. 203-209, 2002.

TOUFIQUE, K. A.; BELTON, B. Is aquaculture pro-poor? Empirical evidence of impacts on fish onsumption in Bangladesh. **World Development**, Kidlington, v. 64, p. 609-620, 2014.

TROELL, M. Does aquaculture add resilience to the global food system? **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 111, p. 13257-13263, 2014.

- UCHUII, K. *et al.* An emerging infectious pathogen endangers an ancient lineage of common carp by acting synergistically with conspecific exotic strains. **Animal Conservation**, Chichester, v. 16, p. 324-330, 2013.
- VALVERDE, E. J. *et al.* Application of a new real-time polymerase chain reaction assay for surveillance studies of lymphocystis disease virus in farmed gilthead seabream. **BMC Veterinary Research**, London, v. 12, p. 1-8, 2016.
- VALVERDE, E. J. *et al.* Target organs for lymphocystis disease virus replication gilthead seabream (*Sparus aurata*). **Veterinary research**, London, local, v. 48, p. 1-11, 2017.
- WALKER, P. J.; WINTON, J. R. Emerging viral diseases of fish and shrimp. **Veterinary Research**, London, v. 41, p. 1-24, 2010.
- WALTZEK, T. B. *et al.* Systemic iridovirus from threespine stickleback *Gasterosteus aculeatus* represents a new megalocytivirus species (family *Iridoviridae*). **Disease of Aquatic Organisms**, Oldendorf, v. 98, p. 41-56, 2012.
- WANG, N. *et al.* Development and characterization of a new marine fish cell line from turbot (*Scophthalmus maximus*). **Fish Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 36, p 1227–1234, 2010.
- WANG, Q. *et al.* Outbreaks of an iridovirus in marbled sleepy goby, *Oxyeleotris marmoratus* (Bleeker), cultured in southern China. **Journal of Fish Diseases**, Chichester, v. 34, p. 399-402, 2011.
- WEBER, E. S. *et al.* Systemic iridovirus infection in the Banggai cardinalfish (*Pterapogon kauderni* Koumans 1933). **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Thousand Oaks, v. 21, p. 306-320, 2009.
- WEI, Y. *et al.* Establishment of a novel fin cell line from Brown-marbled grouper, *Epinephelus fuscoguttatus* (Forsskål), and evaluation of its viral susceptibility. **Aquaculture research**, Oxford, v. 40, p. 1523-1531, 2009.
- WEI, Y. B. *et al.* A novel heart-cell line from brown-marbled grouper *Epinephelus fuscoguttatus* and its susceptibility to iridovirus. **Journal of Fish pathology**, London, v. 76, p. 1149-1158, 2010.
- WEN, C.-M., HONG, J.-R. Complete genome sequence of a giant sea perch iridovirus in Kaohsiung, Taiwan. **Genome Announcements**, Washington, v. 4, p. 1, 2016.
- WEN, C. M. *et al.* Development of two cell lines from *Epinephelus coioides* brain tissue for characterization of betanodavirus and megalocytivirus infectivity and propagation. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 278, p. 14-21, 2008.
- WHITTINGTON, R. J.; BECKER, J. A.; DENNIS, M. M. Iridovirus infections in finfish – critical review with emphasis on ranaviruses. **Journal of Fish Diseases**, Chichester, v. 33, p. 95-122, 2010.

WHITTINGTON, R. J.; CHONG, R. Global trade in ornamental fish from an Australian perspective: The case for revised import risk analysis and management strategies. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 81, p. 92-116, 2007.

WILLIS, D. B. *et al.* Macromolecular synthesis in cells infected by frog virus 3. VII. Transcriptional and post-transcriptional regulation of virus gene expression. **Journal of Virology**, Washington, v. 24, 326–342, 1977.

WOLF, K. **Fish viruses and fish viral diseases**. Cidade: Cornell University Press, 1988. 476p.

WOLF, K. M.; QUIMBY, M. Lymphocystis virus: isolation and propagation in centrarchid fish cell lines. **Science**, New York, v.151, p. 1004–1005, 1966.

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

WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH – OIE. **OIE-Listed diseases, infections and infestations in force in 2018**. 2018. Disponível em: <http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2016/>. Acesso em: 08 out. 2018.

XU, J. *et al.* A Novel Cell Line from Liver of Stone Flounder, *Kareius bicoloratus*, and Its Susceptibility to Different Iridoviruses. **Journal of the World Aquaculture Society**, Baton Rouge, v. 42, p. 73-81, 2011.

YAN, X. Y. Analysis of the genetic diversity of the lymphocystis virus and its evolutionary relationship with its hosts. **Virus Genes**, Boston, v. 43, p. 358–366, 2011.

YOON, H.; LEITNER, T. PrimerDesign-M: a multiple-alignment based multiple-primer design tool for walking across variable genomes. **Bioinformatics**, Oxford, v. 31, p. 1472-1474, 2014.

ZHANG, Q. Y. *et al.* Infection and propagation of lymphocystis virus isolated from the cultured flounder *Paralichthys olivaceus* in grass carp cell lines. **Disease of Aquatic Organisms**, Oldendorf, v. 57, p. 27–34, 2003.

ZHANG, Q. Y. *et al.* Complete genome sequence of Lymphocystivirus Disease Virus isolated from China. **Journal of Virology**, Washington, v. 78, 6982–6994, 2004.

ZHANG, B. *et al.* Establishment and characterization of a testicular cell line from the half-smooth tongue sole, *cynoglossus semilaevis*. **International Journal of Biological Sciences**, Austrália, v. 7, p. 452-459, 2011.

ZHANG, M. *et al.* Characterization of a megalocytivirus from cultured rock bream, *Oplegnathus fasciatus* (Temminck & Schlege), in China. **Aquaculture Research**, Chichester, v. 43, p. 554-564, 2012.

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

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

ZHENG, Y. *et al.* Establishment and characterization of a new cell line from head kidney of half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). **Fish Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 38, p. 1635-1643, 2012.

ZHOU, Z. Y. *et al.* Characterization of a ranavirus isolated from the Chinese giant salamander (*Andrias davidianus*, Blanchard 1871) in China. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 384-387, p. 66-73, 2013.