

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Escola de Veterinária
Programa de Pós-graduação em Ciência Animal

Tarcisio Martins França e Silva

**MODELO DE INFECÇÃO EXPERIMENTAL E EFEITO DA TEMPERATURA NA
PATOGENICIDADE DO ISKNV EM JUVENIS DE TILÁPIA DO NILO
(*Oreochromis niloticus*)**

Belo Horizonte
2022

Tarcisio Martins França e Silva

**MODELO DE INFECÇÃO EXPERIMENTAL E EFEITO DA TEMPERATURA
NA PATOGENICIDADE DO ISKNV EM JUVENIS DE TILÁPIA DO NILO
(*Oreochromis niloticus*)**

Versão final

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Gomes Leal

Belo Horizonte
2022

S586m

Silva, Tarcisio Martins França e, 1969-
Modelo de infecção experimental e efeito da temperatura na Patogenicidade do ISKNV em Juvenis de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) / Tarcisio Martins França e Silva. – 2022.
73 f.:il

Orientador: Carlos Augusto Gomes Leal
Dissertação (Mestrado) apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.
Área de concentração: Medicina Veterinária Preventiva
Bibliografias: f. 66 a 72.

1. Tilápia – Criação - Teses - 2. Aquicultura - Teses – 3. Psicultura - Teses - I. Leal, Carlos Augusto Gomes – II. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária - III. Título.

CDD – 636.089

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes – CRB256
Biblioteca da Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

FOLHA DE APROVAÇÃO

TARCISIO MARTINS FRANÇA E SILVA

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração Medicina Veterinária Preventiva.

Aprovado(a) em 10 de fevereiro de 2022, pela banca constituída pelos membros:

Dr.(a). Carlos Augusto Gomes Leal - Presidente - Orientador(a)

Dr.(a). Guilherme de Campos Tavares

Dr.(a). Enio Ferreira



Documento assinado eletronicamente por **Carlos Augusto Gomes Leal, Coordenador(a) de curso**, em 10/02/2022, às 16:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Guilherme Campos Tavares, Professor do Magistério Superior**, em 11/02/2022, às 11:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Enio Ferreira, Professor do Magistério Superior**, em 11/02/2022, às 16:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1215839** e o código CRC **E5629661**.

A Deus, pelo seu infinito Amor por todas as criaturas. À memória de meus amados pais, Narciso e Rosa, pelo exemplo de amor e fé; a minha esposa, Denizia e aos meus filhos, Victor, Gustavo e Rafael pelo amor e apoio em todos os momentos; e aos meus queridos irmãos, Célia Regina e Celso José.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus. Por ter guardado e guiado meu caminho, mantendo minha saúde e coragem na busca desse sonho tão estimado.

Aos meus amados pais (*in memoriam*), Narciso de França e Rosa Martins, por terem sido meu eixo principal, minha primeira fonte de amor e de força para enfrentar a vida. Por terem mostrado o caminho e como caminhar. Pelo exemplo de humildade, determinação e fé em Deus.

A toda a minha família, esposa e filhos, pelo carinho e por toda a felicidade que vocês me trazem. Aos meus irmãos, pela amizade e segurança que tenho em vocês. Aos meus cunhados, Tarcisio, Delvânia e Denilde, por toda a ajuda nos momentos em que precisei.

A Escola de Veterinária da UFMG, pela oportunidade do acesso ao conhecimento e pelo amadurecimento pessoal que experimentei durante a vida acadêmica.

A todos os professores que me acolheram e me inspiraram a seguir em frente.

Agradeço especialmente ao meu orientador, Prof. Dr. Carlos Augusto Gomes Leal, pelo apoio e pela confiança.

Ao Prof. Dr. Enio Ferreira, meu chefe imediato, pela compreensão e pelo incentivo para que eu buscasse essa realização. Também pelo valioso auxílio nas análises histológicas.

Ao Prof. Dr. Guilherme Tavares, por toda a atenção e disponibilidade.

A amiga e técnica do Laboratório de Bacteriologia, Dra. Junia Pacheco, por toda a paciência em partilhar seu conhecimento e pelos bons conselhos.

Ao amigo e companheiro de laboratório, Guilherme Queiroz, por todo o ensinamento partilhado e parceria nessa conquista.

A todos os funcionários de nossa querida Instituição que muito me ajudaram administrativa e operacionalmente.

A todos os meus colegas do curso de Pós-graduação pela amizade durante esta caminhada.

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

“O correr da vida embrulha tudo. A vida é assim: esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa, sossega e desinquieta. O que ela quer da gente é coragem.” (Guimarães Rosa, Grande Sertão: Veredas, 1956).

RESUMO

O rápido crescimento da produção aquícola mundial tem contribuído significativamente para o desenvolvimento nutricional e para a segurança alimentar em todo o mundo. No entanto, muitas das características da aquicultura, que apresentam oportunidades para o incremento da produção, representam também fatores de risco para o surgimento e a propagação de doenças. O Vírus da necrose infecciosa do baço e do rim (*Infectious spleen and kidney necrosis virus* - ISKNV) é um vírus de distribuição global e causador de graves perdas econômicas para a indústria aquícola. O ISKNV está associado a surtos de alta mortalidade em diversas espécies de peixes marinhos e de água doce. A partir de 2015, de maneira emergente, cultivos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) em diversas partes do mundo foram acometidos por surtos com alta taxa de mortalidade e posteriormente confirmada a infecção por ISKNV. No Brasil, o primeiro relato de infecção pelo vírus ocorreu em 2020, evidenciando o alto risco da propagação da doença como ameaça ao desenvolvimento da atividade aquícola nacional. Estudos recentes em diversas espécies de peixes e camarões peneídeos tem associado a temperatura da água como fator determinante na inibição ou intensificação da patogênese de outras espécies de vírus. No entanto, apesar da importância do vírus e da espécie de peixe, não existem dados sobre o efeito da temperatura da água sobre a virulência do ISKNV para tilápia do Nilo. Assim, um modelo de infecção experimental a partir da inoculação de homogenato viral foi desenvolvido com o objetivo de compreender o desenvolvimento da doença, bem como, avaliar possíveis métodos de prevenção e controle. Posteriormente, grupos experimentais mantidos sob diferentes temperaturas (26, 28, 30, 32, e 34°C) foram desafiados para avaliação do efeito na virulência do patógeno. Significativa redução da mortalidade e da taxa de replicação viral foi observada nos grupos mantidos em temperaturas mais altas. Como conclusão, o modelo de infecção reproduziu com sucesso a doença em condições experimentais e a elevação da temperatura da água promoveu uma redução na patogenicidade do ISKNV em juvenis de tilápia. Esses resultados criam a possibilidade da utilização de tratamentos hipertérmicos a campo como ferramenta de controle e prevenção contra o ISKNV.

Palavras-chave: Controle, ISKND, Iridovirus, PCR em tempo real (qPCR), Piscicultura, Tratamento térmico.

ABSTRACT

The rapid growth of world aquaculture production has significantly contributed to nutritional development and food security around the world. However, many of the features of aquaculture that present opportunities for increased production also represent risk factors for the emergence and spread of diseases. The Infectious Spleen and Kidney Necrosis Virus - ISKNV is a virus with global distribution that causes serious economic losses to the aquaculture industry. ISKNV has been associated with outbreaks of high mortality in several marine and freshwater fish species. Since 2015, Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) farms, in different parts of the world were affected by outbreaks with high mortality rates that were later confirmed as caused by ISKNV. In Brazil, the first report of infection by the virus occurred in 2020, evidencing the high risk of spreading the disease as a threat to the development of the Brazilian aquaculture. Recent studies in several species of fish and penaeid shrimp proved effect of water temperature in the pathogenesis of other virus species. In spite the importance of tilapia and the disease, the effect of water temperature on ISKNV virulence has never been scientifically addressed. Thus, an experimental infection model, based on the inoculation of viral homogenates, was developed to reproduce the disease under experimental conditions. Afterwards, fish groups maintained under different water temperatures (26, 28, 30, 32, and 34°C) were challenged to address its effect on the virus virulence. The results showed a significant reduction in the mortality in groups kept at higher temperatures. In conclusion, disease was successfully reproduced under lab conditions and high temperature reduced the ISKNV virulence in Nile tilapia juveniles, being the hyperthermia a possible way to control the disease at field.

Keywords: Aquaculture in Brazil, Heat treatment, Iridovirus, ISKND, Real-time PCR (qPCR).

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Morfologia externa do vírus iridescente de invertebrado 2 (IIV-2) (A); Diagrama esquemático de seção transversal de uma partícula de iridovírus, mostrando capsômeros, proteínas transmembrana dentro da bicamada lipídica e um núcleo de nucleoproteína filamentososa interna (B).33
- Figura 2 - Ciclo de replicação do FV- 3 (Frog virus - FV-3)..... 34
- Figura 3 - Ocorrência mundial do Vírus da necrose infecciosa do baço e do rim (ISKNV) no cultivo de tilápias.47
- Figura 4 - Distribuição geográfica do ISKNV no Brasil: estados com diagnóstico confirmado de ISKNV (vermelho) e com risco elevado/evidencia da circulação da doença (laranja). 50
- Figura 5 - Animais moribundos do grupo infectado apresentando melanose (A); exoftalmia e ascite (setas; B); peixe em estado letárgico no fundo do aquário (C). 58
- Figura 6 - Animais moribundos do grupo infectado apresentando palidez branquial (seta;A), redução do baço (seta; B) e palidez visceral com presença de exsudato (C). 59
- Figura 7 - Mortalidade acumulada em juvenis de tilápia durante período de infecção experimental por ISKNV.....60
- Figura 8 - (A): Baço, peixe G2-P7 (*Oreochromis niloticus*) experimentalmente infectado com ISKNV. Fragmento histológico apresentando área de polpa branca com presença predominante de células linfóides e macrófagos com presença de degeneração hialina. Em algumas células linfóides é possível observar o aumento do volume citoplasmático (megalócitos), com presença de corpúsculos basofílicos intracitoplasmáticos (sugestivos de partículas virais) rechaçando o núcleo periféricamente (setas). Técnica de coloração em Hematoxilina e Eosina (H&E), aumento de 600x. (B): Rim, peixe G2-P7 (*Oreochromis niloticus*) experimentalmente infectado com ISKNV. Fragmento histológico apresentando região de córtex renal, representado principalmente por túbulos renais com presença de degeneração hialina. Em algumas células do epitélio tubular renal é possível observar aumento de volume citoplasmático, com presença de corpúsculos eosinofílicos intracitoplasmáticos. Técnica de coloração em Hematoxilina e Eosina (H&E), aumento de 600x..... 62
- Figura 9 - (A): Rim, peixe G2-P6 (*Oreochromis niloticus*) experimentalmente infectado com ISKNV. Fragmento histológico apresentando células do epitélio tubular renal com degeneração hialina e presença de corpúsculo de inclusão intracitoplasmático sugestivo de partículas virais (seta). Técnica de coloração em corante de Shorr, aumento de 600x. (B): Baço, peixe G2-P6 (*Oreochromis niloticus*) experimentalmente infectado com ISKNV. Fragmento histológico apresentando células linfóides aumentadas com inclusão de corpúsculo intracitoplasmático sugestivo de partículas virais (setas). Técnica de coloração em corante de Shorr, aumento de 600x. 62

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1- Principais espécies de peixes produzidos pela aquicultura mundial (milhões de toneladas) em 2018. Adaptado de: FAO, 2020..... | 19 |
| Tabela 2 - Principais grupos taxonômicos de vírus de peixes de importância veterinária na aquicultura. Adaptado de: Kibenge et al., 2012. | 22 |
| Tabela 3 - Cepas isoladas dentro das espécies ISKNV/SDDV. Adaptado de: ICTV, 2020..... | 36 |
| Tabela 4 - Espécies de peixes ornamentais e de produção com relatos de infecção por RSIV/ISKNV. Adaptado de: Kibenge et al., 2012. | 36 |
| Tabela 5 - Grupos experimentais, desafio e temperatura da água. | 56 |
| Tabela 6 - Mortalidade e análises estatísticas dos grupos experimentais submetidos a diferente temperatura da água. | 61 |

LISTA DE ABREVIÇÕES

| | |
|--------|--|
| °C | Graus Celcius |
| µl | Microlitro |
| ABCC | Associação Brasileira de Criadores de Camarão |
| ALIV | African lampeye iridovirus |
| ATPase | Adenosinatrifosfatase |
| BF-2 | Bluegill fry –2 cell line |
| BVI | Bohle Iridovirus |
| CENAIM | Centro Nacional de Aquicultura e Investigações Marinhas |
| CEUA | Comissão de ética no uso de animais |
| CHV | Herpesvirus da carpa |
| Cq | Ciclo de quantificação |
| DGIV | Dwarf gourami iridovirus |
| DNA | Ácido Desoxirribonucleico |
| dpi | Dias pós-infecção |
| ECP | Efeito citopático |
| EHNV | Vírus da necrose hematopoética epizoótica |
| EM | Microscopia eletrônica |
| EUS | Síndrome ulcerativa epizoótica |
| FAO | Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura |
| FCA | Adjuvante completo de Freund |
| FV-3 | Ranavirus tipo 3 |
| GC | Guanina/citosina |
| GF | Grunt fin cell line |
| H&E | Hematoxilina e eosina |
| ICTV | Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus |
| IEM | Microscopia imunoeletrônica |
| IPNV | Necrose Pancreática Infeciosa |
| IRF | Interferon regulatory transcription factor |
| ISG | Interferon stimulated genes |
| ISKND | Doença do vírus da necrose infecciosa do rim e do baço |
| ISKNV | Vírus da necrose infecciosa do rim e do baço |
| IWV | Vírus inteiro inativado |
| Kbp | Kilopares de bases |
| kDa | Kilo Dalton |
| KHV | Koy herpesvirus |
| HIRRV | Hirame novirhabdovirus |
| KRE-3 | Kelp and Red spotted grouper embryo |
| LAMP | Amplificação isotérmica mediada por loop |
| LCDV | Doença do Lymphocystivirus |
| MAPA | Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento |
| MCP | Proteína principal do capsídeo |
| MDA-5 | Melanoma differentiation-associated protein 5 |
| MEM | Meio essencial mínimo |
| MHC | Complexo de histocompatibilidade maior |

| | |
|-------|--|
| MIQE | Informações mínimas para publicação de experimentos quantitativos de PCR em tempo real |
| OIE | Organização Mundial de Saúde Animal |
| OSGIV | Orange-spotted grouper iridovirus |
| PB | Proteína bruta |
| PCR | Reação em cadeia da polimerase |
| pH | Potencial hidrogeniônico |
| POP | Procedimento operacional padrão |
| PRR | Receptores de reconhecimento padrão |
| PV | Peso vivo |
| qPCR | Reação em cadeia da polimerase em tempo real |
| RBIV | Rock bream iridovirus |
| RIG-I | Retinoic acid-inducible gene I |
| RNA | Ácido ribonucleico |
| RR | Risco Relativo |
| RRR | Redução do Risco Relativo |
| RSIV | Iridovirus da dourada |
| RSIVD | Doença do Iridovírus da dourada |
| SDDV | Scale drop disease virus |
| SNC | Sistema nervoso central |
| TGI | Trato gastrointestinal |
| TiLV | Vírus da tilápia do lago |
| TiPV | Parvovirus da tilápia |
| TLEV | Encefalite das pós-larvas de tilápia |
| TLR | Toll-like receptors |
| TRBIV | Turbot reddish body iridovirus |
| TSIV | Threespine stickleback iridovirus |
| UFMG | Universidade Federal de Minas Gerais |
| UV | Luz ultravioleta |
| VNN | Vírus da necrose nervosa |
| WSSV | Vírus da síndrome da mancha branca |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 16 |
| 2. OBJETIVOS | 17 |
| 3. REVISÃO DE LITERATURA | 17 |
| 3.1 AQUICULTURA MUNDIAL | 17 |
| 3.2 AQUICULTURA BRASILEIRA | 19 |
| 3.3 PRINCIPAIS PATÓGENOS EM PEIXES CULTIVADOS | 21 |
| 3.4 PRINCIPAIS VÍRUS DE TILÁPIA | 24 |
| 3.4.1 Lymphocystis virus (LCV) | 25 |
| 3.4.2 Nervous necrosis virus (NNV)..... | 26 |
| 3.4.3 Tilapia larvae encephalitis virus (TLEV)..... | 27 |
| 3.4.4 Bohle iridovirus (BIV)..... | 28 |
| 3.4.5 Tilapia lake virus (TiLV) | 29 |
| 3.4.6 Tilapia parvovirus (TiPV) | 30 |
| 3.5 IRIDOVIROSES | 31 |
| 3.5.1 Família Iridoviridae..... | 31 |
| 3.5.2 Megalocitivirus | 34 |
| 3.5.2.1 Epidemiologia | 37 |
| 3.5.2.2 Patologia..... | 39 |
| 3.5.2.3 Métodos de diagnóstico..... | 39 |
| 3.6 INFECÇÃO POR ISKNV EM TILÁPIAS | 45 |
| 3.7 EFEITO DA TEMPERATURA NA PATOGENICIDADE DE VÍRUS DE ANIMAIS AQUÁTICOS..... | 51 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS | 53 |
| 4.1 AMOSTRAS DE ISKNV | 53 |
| 4.2 EXTRAÇÃO DE DNA..... | 53 |
| 4.3 PCR EM TEMPO REAL (qPCR)..... | 53 |

| | |
|--|----|
| 4.4 DESENVOLVIMENTO DE MODELO DE INFECÇÃO EXPERIMENTAL | 54 |
| 4.4.1 Peixes | 54 |
| 4.4.2 Preparação do homogenato viral | 54 |
| 4.4.3 Infecção experimental | 55 |
| 4.5 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA TEMPERATURA NA VIRULÊNCIA DO ISKNV EM TILÁPIA | 55 |
| 4.5.1 Peixes | 55 |
| 4.5.2 Grupos experimentais..... | 56 |
| 4.5.3 Infecção experimental | 57 |
| 4.6 ANÁLISES HISTOPATOLÓGICAS | 57 |
| 4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA | 57 |
| 5. RESULTADOS | 58 |
| 5.1 MODELO DE INFECÇÃO EXPERIMENTAL | 58 |
| 5.2 EFEITO DA TEMPERATURA NA VIRULÊNCIA DO ISKNV | 60 |
| 5.3 HISTOPATOLOGIA | 61 |
| 6. DISCUSSÃO..... | 63 |
| 7. CONCLUSÕES..... | 68 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 69 |

1. INTRODUÇÃO

O cultivo da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é um dos setores mais importantes e promissores da aquicultura mundial, com uma produção global total estimada em 4,5 milhões de toneladas em 2018, sendo o Brasil o quarto maior produtor mundial. A relativa facilidade no cultivo da tilápia fomenta o desenvolvimento da atividade em mais de 120 países, onde impulsiona o desenvolvimento socioeconômico das regiões produtoras e constitui uma fonte de proteína animal acessível e de alta qualidade para o consumo humano, promovendo ainda a sustentabilidade ambiental e a segurança alimentar (FAO, 2020).

No entanto, condições de alta densidade de estocagem e manejos frequentes, necessários em sistemas intensivos de produção, diminuem a imunidade dos peixes e favorecem a manutenção e a disseminação de patógenos. Com o aumento crescente da produção de tilápias no mundo, a emergência de doenças infecciosas causando graves prejuízos ao setor tem sido uma preocupação constante para os produtores. Assim, medidas sanitárias visando à prevenção e o controle de doenças torna-se necessário.

Embora a tilápia não esteja listada pela OIE como espécie susceptível à iridovirose, recentemente diferentes regiões produtoras de tilápias no mundo sofreram de maneira emergente com surtos causados por megalocitivirus, posteriormente com identificação positiva para o ISKNV.

O primeiro relato de tilápias cultivadas acometidas pelo ISKNV ocorreu em 2015 na Tailândia (DONG et al., 2015), seguido por surtos nos EUA em 2016 que registraram mortalidades entre 50%-75% (SUBRAMANIAM et al., 2016). Em 2019, em Gana, na África, a produção chegou a ser interrompida quando durante algumas semanas, dezenas de toneladas de peixes mortos eram diariamente retiradas da água (RAMÍREZ-PAREDES et al., 2020). No Brasil, no estado de Goiás, foi relatado em 2020 o primeiro surto de ISKNV em tilápias cultivadas (FIGUEIREDO et al., 2021).

O desenvolvimento de um modelo de infecção experimental é essencial para a melhor compreensão da patogênese, transmissão, bem como, avaliar métodos de prevenção e controle. No entanto, o isolamento do vírus ISKNV não é simples. Assim, métodos alternativos de infecção, como a inoculação através de homogenatos de órgãos obtidos a partir de animais naturalmente infectados tem sido uma opção para o desenvolvimento de estudos com modelos experimentais de infecção com esse vírus. Estudos de infecção experimental conduzidos por Jeffrey Go e Richard Whittington (2006), na Austrália, detalham o protocolo

de utilização do homogenato viral utilizado no modelo de infecção experimental bem sucedido em peixes ornamentais (GO; WHITTINGTON, 2006).

Pesquisadores em diversas partes do mundo têm relatado a importância da temperatura como um fator chave na replicação de vírus tanto na cultura de células quanto nos tecidos de peixes infectados experimentalmente. Estudos em diferentes faixas de temperaturas durante processo experimental de infecção por vírus têm sido explorados com o objetivo de controlar a doença em instalações de piscicultura e carcinicultura. Conforme relatado em pesquisas com espécies, como a carpa (*Cyprinus carpio carpio*) e o camarão (*Marsupenaeus japonicus*), o impacto da doença pode ser significativamente reduzido pelo aumento da temperatura da água (LAPATRA et al., 2014; WATSON; MILANI; HEDRICK, 1998; YOU et al., 2010).

Apesar da importância dos resultados obtidos a partir de investigações sobre os efeitos da temperatura da água no desenvolvimento de doenças virais em diversas espécies aquáticas comercialmente cultivadas, ainda não existem dados científicos dos efeitos da temperatura sobre a patogênese das infecções causadas pelo ISKNV em tilápias.

2. OBJETIVOS

O presente estudo teve como principais objetivos padronizar um modelo de infecção experimental de juvenis de tilápia por ISKNV e avaliar os efeitos da temperatura da água na patogênese da infecção por ISKNV em juvenis de tilápias do Nilo.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 AQUICULTURA MUNDIAL

O consumo global de alimentos provenientes da aquicultura aumentou em uma taxa média anual de 3,1% entre 1961 a 2017. Essa taxa de crescimento corresponde a quase o dobro da observada no crescimento da população mundial, que é de 1,6% para o mesmo período. O avanço da aquicultura também é superior a todos os outros setores produtores de proteína de origem animal como carnes, laticínios, leite, etc., que tiveram um crescimento anual médio de 2,1% no período. Nas últimas décadas, o consumo *per capita* de pescado aumentou 1,5% ao ano, passando de 9,0 kg em 1961, para 20,5 kg em 2018 (FAO, 2020).

Entre os três principais grupos de animais aquáticos cultivados (peixes, crustáceos e moluscos), a piscicultura se destaca como o principal setor produtivo da aquicultura com 354

espécies de peixes cultivadas, seguida por malacocultura e carcinicultura com 102 e 59, respectivamente (FAO, 2020).

A partir da década de 1980, a contribuição da indústria pesqueira, explorando os estoques naturais, como fonte de proteína animal para o consumo humano tem apresentado uma tendência de estabilidade no volume de produção. Os aumentos da frota e do esforço na captura frente a essa tendência indicam a diminuição do recurso pesqueiro, sendo a aquicultura o único setor de produção de proteína animal, capaz de suprir a crescente demanda pelo pescado para o consumo humano (FAO, 2020).

Estima-se que a produção mundial de peixes alcance 204 milhões de toneladas no ano de 2030, aumentando 15% em relação a 2018. Essa estimativa de crescimento é acompanhada pela atividade da aquicultura, que atualmente produz 82,1 milhões de toneladas, representando 46% da produção total de pescado (BARROSO; MUÑOZ; CAI, 2019).

Segundo dados da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura-FAO (FAO, 2020), a produção global de peixes atingiu cerca de 179 milhões de toneladas em 2018, com um valor comercial estimado de US\$ 401 bilhões, dos quais US\$ 250 bilhões são provenientes da aquicultura. Do total geral, 156 milhões de toneladas foram usadas para consumo humano. Os 23 milhões de toneladas restantes foram destinados para usos não alimentares, principalmente para a produção de farinha de peixe e óleo de peixe.

A China é o maior produtor mundial de pescado. Em 2018 a produção aquícola chinesa representou 35% de toda a produção mundial. Excluindo os dados da produção chinesa, outra parcela significativa de produção em 2018 veio de outros países asiáticos (34%), a frente das Américas (14%), Europa (10%), África (7%) e Oceania (1%) (FAO, 2020).

A grande diversidade de condições climáticas e ambientais em todo o mundo possibilita uma grande diversidade de espécies de peixes cultivadas, tanto marinhas como de água doce. Apesar disso, a produção de peixes na aquicultura mundial é dominada por um pequeno grupo de espécies que chega a representar 90% do total produzido. O grupo das espécies de carpas domina a produção, enquanto as tilápias representam o terceiro grupo de peixes produzidos na aquicultura mundial (tabela 1), sendo cultivadas em mais de 120 países. Nas últimas três décadas a produção mundial de tilápias, aumentou de 0,3 milhão de toneladas em 1987 para 4,5 milhões de toneladas em 2018, com incremento no valor comercial de 304 milhões para 11 bilhões de dólares anuais (FAO, 2020). Os maiores produtores mundiais de tilápia (em toneladas) são a China com 1,8 milhão, a Indonésia com 1,1 milhão, o Egito com

800 mil e o Brasil com 486 mil, destacando-se como o quarto maior produtor mundial (Peixe-BR, 2021).

Tabela 1- Principais espécies de peixes produzidos pela aquicultura mundial (milhões de toneladas) em 2018. Adaptado de: FAO, 2020.

| Espécie | Produção mundial | Percentual (%) |
|--|-------------------------|-----------------------|
| Carpa capim, <i>Ctenopharyngodon idellus</i> | 5.704 | 10,5 |
| Carpa prateada, <i>Hypophthalmichthys molitrix</i> | 4.788 | 8,8 |
| Tilápia do Nilo, <i>Oreochromis niloticus</i> | 4.525 | 8,3 |
| Carpa comum, <i>Cyprinus carpio</i> | 4.189 | 7,7 |
| Carpa cabeçuda, <i>Hypophthalmichthys nobilis</i> | 3.143 | 5,8 |
| Catla, <i>Catla catla</i> | 3.041 | 5,6 |
| <i>Carassius</i> spp. | 2.772 | 5,1 |
| Peixes de água doce, Osteichthyes | 2.545 | 4,7 |
| Salmão do Atlântico, <i>Salmo salar</i> | 2.435 | 4,5 |
| Panga, <i>Pangasianodon hypophthalmus</i> | 2.359 | 4,3 |

3.2 AQUICULTURA BRASILEIRA

Durante as duas últimas décadas, o Brasil vem empreendendo esforços no sentido de aumentar a produção do seu setor aquícola, principalmente pela intensificação do cultivo de peixes em sistemas como tanques escavados e tanques-rede. Além disso, de acordo com Barroso e colaboradores (2019), o crescente desempenho social e econômico do cultivo de tilápia no Brasil também tem sido marcado pela utilização de técnicas mais eficientes de produção, pelo melhor aproveitamento dos recursos hídricos e capacitação da mão-de-obra empregada. Da mesma forma que, desde o final da década de 1990, os piscicultores brasileiros vêm buscando melhorar a administração dos custos de produção, o aumento da qualidade do seu produto frente à competitividade do mercado, bem como, o alinhamento pela manutenção da qualidade do meio ambiente. E por fim, que o desenvolvimento e a modernização de toda a cadeia industrial aquícola, por exemplo, transporte, nutrição animal e utensílios, reforçam a importância econômica e possibilitaram o crescimento do setor aquícola nacional (BARROSO; MUÑOZ; CAI, 2019).

Atualmente, em 52% dos municípios brasileiros há registro de produção aquícola. Ações de políticas públicas com o objetivo de promover o desenvolvimento da atividade aquícola no país, como linhas de crédito específicas para piscicultores, indústrias frigoríficas e a promoção da regulamentação da produção aquícola em reservatórios públicos, aumentam a

percepção da aquicultura como importante setor produtivo de alimento, bem como, fomentam empregos e programas de desenvolvimento social (BARROSO; MUÑOZ; CAI, 2019).

De acordo com o relatório da Associação Brasileira da Piscicultura (Peixe-BR, 2021), peixes de água doce dominam a aquicultura no Brasil e a tilápia é a principal espécie cultivada. A produção total de peixes de cultivo em 2020 no Brasil apresentou um crescimento de 5,93% em relação ao ano anterior, alcançando 802.930 toneladas. No entanto o Brasil, que já foi apontado como o país com o maior potencial para o desenvolvimento da atividade de aquicultura, ocupa hoje apenas o 13º lugar na produção mundial de peixes cultivados, sendo o 8º produtor mundial de peixes de água doce.

A tilapicultura brasileira destacou-se em 2020 com o incremento de 12,5% da produção em relação ao ano anterior, somando 486.155 toneladas e passando a representar 60,6% da produção nacional de peixes em cultivo. Entre os principais estados produtores destacam-se o Paraná (166.000 toneladas), São Paulo (70.500 toneladas), Minas Gerais (42.000 toneladas), Santa Catarina (40.059 toneladas) e Mato Grosso do Sul (29.090 toneladas). Os peixes nativos, como o tambaqui (*Colossoma macropomum*) e o pacu (*Piaractus mesopotamicus*) bem como seus híbridos, aparecem como o segundo maior grupo de peixes cultivados no Brasil (Peixe-BR, 2021).

Ainda de acordo com o relatório da Associação Brasileira da Piscicultura (Peixe-BR, 2021), a produção de peixes nativos no Brasil, alcançou 278.671 toneladas em 2020, apresentando um recuo de 3,2% em relação ao ano anterior, passando a representar 34,7% da produção nacional de peixes em cultivo. Resultados igualmente desfavoráveis foram obtidos em 2018, quando o recuo na produção foi de 4,7%. Já em 2019 o aumento registrado foi de apenas 20 toneladas. Embora o levantamento feito pela instituição aponte o cultivo de peixes nativos em quase todos os estados brasileiros (com exceção do Ceará), as principais regiões produtoras são a Norte e Centro-oeste. Os principais estados produtores são Rondônia (65.500 toneladas), Mato Grosso (42.000 toneladas), Maranhão (40.800 toneladas), Pará (24.900 toneladas) e o Amazonas (21.500 toneladas). Entre as principais dificuldades enfrentadas pelo setor de produção de peixes nativos, destaca-se a falta de investimento nos principais estados produtores.

Problemas sanitários relacionados ao cultivo de peixes estão entre os mais graves entraves à expansão e ao desenvolvimento da aquicultura sustentável. Para espécies comercializadas internacionalmente, como as tilápias, os impactos da interrupção do fornecimento pela ocorrência de surtos infecciosos, vão além das fronteiras do país ou região

em que ocorrem (OIE, 2021a). No entanto, este tem sido um dos maiores desafios no desenvolvimento da atividade aquícola mundial. As condições de alta densidade de estocagem e manejos frequentes, necessários em sistemas intensivos de produção, são fatores de estresse que diminuem a imunidade dos peixes e favorecem a manutenção e a disseminação de patógenos (OIE, 2021a).

3.3 PRINCIPAIS PATÓGENOS EM PEIXES CULTIVADOS

Historicamente, as infecções bacterianas têm sido descritas como as principais ameaças para o desenvolvimento do cultivo de peixes, com registros de acometimento por várias bactérias como *Aeromonas spp.* e *Streptococcus spp.* (MACHIMBIRIKE et al., 2019). Uma das doenças de origem bacteriana mais comum em peixes cultivados é causada pela bactéria *Aeromonas hydrophila*, considerada um patógeno oportunista causando nos peixes infectados uma doença de natureza hemorrágica, em que os animais infectados apresentam sinais clínicos como hidropsia, ulceração e necrose de nadadeiras e cauda (YE et al., 2012). As principais espécies do gênero *Streptococcus* que causam doenças e que acometem principalmente o sistema nervoso de peixes infectados, tanto de água doce quanto de espécies marinhas são: *Streptococcus agalactiae* e o *Streptococcus iniae* (FIGUEIREDO; LEAL, 2008).

A doença parasitária causada pelo *Ichthyophthirius multifilii* está entre as mais comuns em peixes cultivados, sendo caracterizada pelo aparecimento de pontos brancos ao longo do corpo do peixe infectado (WEI; LI; YU, 2013). Outros parasitas de importância veterinária são: *Cryptobia salmositica*, *Loma salmonae*, *Lepeophtheirus salmoni*, *Caligus rogercresseyi* e *Gyrodactylus salaris*, sendo este de notificação obrigatória pela OIE (GUO; WUO, 2009).

Alguns fungos também são causadores de doenças que podem gerar graves perdas econômicas nos ambientes de cultivo de peixes como: *Branchiomyces sp.*, *Saprolegnia diclina* e *Aphanomyces invadans*. O *Aphanomyces invadans* é também o agente causador da doença conhecida como Síndrome ulcerativa epizoótica (*Epizootic Ulcerative Syndrome – EUS*), que tem sua notificação obrigatória para a OIE (LIU et al., 2016).

Segundo Kibenge e colaboradores (2012), os principais agentes causadores de doenças no cultivo comercial de peixes são as bactérias (54,9%), seguidas por vírus (22,6%), parasitas (19,4%) e fungos (3,1%). No entanto, as doenças virais são as que apresentam a maior dificuldade de controle. A ampla gama de peixes susceptíveis, ações terapêuticas limitadas, pouco conhecimento sobre a patogênese das doenças virais e mecanismos naturais de defesa

dos animais, colocam os vírus no topo da classificação dos agentes patogênicos capazes de afetar negativamente a aquicultura global (tabela 2). Em contrapartida, o vigoroso aumento da participação do setor aquícola na produção de proteína animal, de alta qualidade para o consumo humano, tem aumentado o interesse de pesquisadores em estudos de doenças virais de animais aquáticos.

A ocorrência de surtos de doenças virais pode impor mortalidade massiva em peixes de cultivo, causando grave prejuízo financeiro. Dessa forma, a prevenção e o controle eficazes das doenças virais dependem muito do desenvolvimento da biossegurança e da sanidade dos animais cultivados. Tais medidas de controle dependem ainda, da compreensão de todos os aspectos do vírus e sua relação com a doença e epidemiologia, incluindo a interação entre populações selvagens e cultivadas (KIBENGE et al., 2012).

Os vírus ocupam uma posição única na biologia. Embora possuam algumas das propriedades dos sistemas vivos como um genoma, eles são na verdade entidades infecciosas não vivas e por isso podem também não ser considerados microrganismos por alguns autores. Os vírus têm duas fases claramente definidas em seu ciclo de vida, como uma partícula metabolicamente inerte quando está fora de uma célula hospedeira ou quando está dentro de sua célula hospedeira e funcionalmente ativo. Esta é sua fase replicativa, na qual o genoma viral explora a maquinaria da célula hospedeira para produzir cópias do genoma da progênie, quando RNA mensageiro viral e proteínas se reúnem para formar novas partículas de vírus (KIBENGE; GODOY, 2016).

Tabela 2 - Principais grupos taxonômicos de vírus de peixes de importância veterinária na aquicultura. Adaptado de: Kibenge et al., 2012.

| DNA / Família | Gênero | Espécie |
|--------------------------|-----------------------|--|
| <i>Circoviridae</i> | Não atribuído | Barbel circovirus (BaCV1 and 2) |
| | Não atribuído | European catfish circovirus (CfCV) |
| <i>Parvoviridae</i> | Não atribuído | Novel salmon parvovirus |
| | <i>Chapparvovirus</i> | Tilapia parvovirus (TiPV) |
| <i>Hepadnaviridae</i> | Não atribuído | White sucker hepatitis B virus (WSHBV) |
| <i>Adenoviridae</i> | <i>Ichtadenovirus</i> | Sturgeon ichtadenovirus A |
| | Não atribuído | Cod adenovirus |
| | Não atribuído | Dab adenovirus |
| <i>Alloherpesviridae</i> | <i>Cyprinivirus</i> | Anguillid herpesvirus 1 (AngHV1) |
| | | Cyprinid herpesvirus (CyHV1-3) |
| | <i>Ictalurivirus</i> | Acipenserid herpesvirus (AciHV1 and 2) |

Continuação...

| | | |
|-----------------------|---|---|
| | <i>Salmonivirus</i> | Ictalurid herpesvirus (IcHV1 and 2) Salmonid herpesvirus (1–3) |
| | Não atribuído | Gadid herpesvirus 1 (GaHV1) Pilchard herpesvirus Tilapia larvae encephalitis virus (TLEV) Percid herpesvirus 1 (PeHV1) |
| <i>Iridoviridae</i> | <i>Lymphocystivirus</i> <i>Megalocytivirus</i> | Lymphocystis disease virus Infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) Dwarf gourami iridovirus (DGIV) African lampeye iridovirus (ALIV) Red sea bream iridovirus (RSIV) Rock sea bream iridovirus (RBIV) Turbot reddish body iridovirus (TRBIV) Large yellow croaker iridovirus (LYCIV) Red tux swordtail iridovirus (RTSIV) |
| | <i>Ranavirus</i> | Epizootic hematopoietic necrosis virus (EHNV) European catfish virus (ECV) |
| | | Grouper iridovirus (GIV) <i>Bohle iridovirus</i> (BIV) Singapore grouper iridovirus (SGIV) Pike-perch iridovirus (PIIV) Short-finned eel ranavirus (SERV) Santee-Cooper ranavirus (Largemouth bass virus, LMBV) |
| | Não atribuído | White sturgeon iridovirus disease Erythrocytic necrosis virus (ENV) |
| <i>Poxviridae</i> | Não atribuído | Koi sleepy disease virus (KSD) Salmon gill poxvirus (SGPV) |
| RNA / Família | | |
| <i>Picornaviridae</i> | <i>Piscevirus</i> | Fathead minnow picornavirus (FHMPV) Bluegill picornavirus (BGPV) Eel picornavirus 1 (EPV-1) |
| | <i>Limnipivirus</i> | Cyprovirusj (Carp picornavirus 1, CPV-1) |
| <i>Caliciviridae</i> | <i>Salovirus</i> | Atlantic salmon calicivirus (ASCV) |
| <i>Hepeviridae</i> | <i>Piscihepevirus</i> | Piscihepevirus A |
| <i>Togaviridae</i> | <i>Alphavirus</i> | Salmon pancreas disease virus |
| | Não atribuído | Erythrocytic inclusion body syndrome (EIBS) |
| <i>Coronaviridae</i> | <i>Bafinivirus</i> | White bream virus (WBV) Fathead minnow nidovirus (FHMNV) |
| <i>Retroviridae</i> | <i>Epsilonretrovirus</i> | Walleye dermal sarcoma virus (WDSV) |
| | | Walleye epidermal hyperplasia virus 1 (WEHV-1) Walleye epidermal hyperplasia virus 2 (WEHV-2) |

Continuação...

| | | |
|-------------------------|------------------------|--|
| | Não atribuído | Perch epidermal hyperplasia virus 1 (PEHV-1) Perch epidermal hyperplasia virus 2 (PEHV-2) Salmon swimbladder sarcoma virus (SSSV) Salmon leukemia virus (SLV) Snakehead retrovirus (SnRV) Zebrafish endogenous retrovirus (ZFERV) |
| <i>Paramyxoviridae</i> | <i>Aquaspirovirus</i> | Atlantic salmon paramyxovirus Pacific salmon paramyxovirus |
| <i>Rhabdoviridae</i> | Não atribuído | Black sea bream paramyxovirus |
| | <i>Novirhabdovirus</i> | Viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) Infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) Snakehead virus (SHRV) |
| | <i>Perhabdovirus</i> | Hirame rhabdovirus (HIRRV) Perch rhabdovirus (PerRV) Anguillid rhabdovirus (eel virus) Sea trout rhabdovirus |
| | <i>Sprivivirus</i> | Spring viraemia of carp virus (SVCV) |
| <i>Arenaviridae</i> | Não atribuído | Pike fry rhabdovirus (PFRV) |
| <i>Orthomyxoviridae</i> | <i>Isavirus</i> | Novel carp and koi carp isolates Infectious salmon anemia virus |
| | Não atribuído | Koi carp orthomyxovirus |
| <i>Amnoonviridae</i> | <i>Tilapinevirus</i> | Tilapia lake virus (TiLV) |
| <i>Reoviridae</i> | <i>Aquareovirus</i> | Aquareovirus A (Chum salmon reovirus CS) Aquareovirus B (Chinook salmon reovirus B) Aquareovirus C (Golden shiner reovirus) Aquareovirus D (Channel catfish reovirus) Aquareovirus E (Turbot reovirus) Aquareovirus F (Chum salmon reovirus PSR) Aquareovirus G (American grass carp reovirus) |
| | <i>Orthoreovirus</i> | Piscine orthoreovirus (PRV) |

3.4 PRINCIPAIS VÍRUS DE TILÁPIA

Desde os primeiros relatos de tilápias acometidas por *Lymphocystis virus* em lagos africanos na década de 1970 (PAPERNA, 1973), diversas doenças virais foram reportadas em tilápias, dentre essas a Necrose Pancreática Infecciosa (*Infectious pancreatic necrosis virus* - IPNV) (HEDRICK et al., 1983); Necrose Nervosa Viral (*Nervous necrosis virus* - NNV) (BIGARRÉ et al., 2009); Encefalite das pós-larvas de tilápia (*Tilapia larvae encephalitis virus* - TLEV) (SHLAPOBERSKY et al., 2010; SINYAKOV et al., 2011); Bohle virus (*Bohle iridovirus* - BVI) (ARIEL; OWENS, 1997) e Parvovirose de tilápia (*Tilapia parvovirus* -

TiPV) (LIU et al., 2020). No entanto, somente a partir da identificação do Vírus da Tilápia do Lago (*Tilapia lake virus* - TiLV) (EYNGOR et al., 2014) causando grande mortalidade em tilápias cultivadas e também de vida livre, houve o aumento da atenção dos pesquisadores em nível mundial, para a ocorrência de doenças virais nesses peixes, com ênfase em monitorar e controlar potenciais surtos (MACHIMBIRIKE et al., 2019). Nesse contexto, e mais recentemente, foi relatada a ocorrência do Vírus da necrose infecciosa do baço e do rim (*Infectious spleen and kidney necrosis virus* - ISKNV), um megalocitívirus pertencente à família *Iridoviridae*. Esse tem se destacado como um dos principais agentes virais emergentes em cultivos de tilápias em diferentes continentes. Um exemplo claro da devastação causada pelo ISKNV nos cultivos de tilápia está nos surtos recentes ocorridos em Gana na África, onde taxas de mortalidade estimadas entre 60% e 90%, foram observadas (RAMÍREZ-PAREDES et al., 2020).

3.4.1 Lymphocystis virus (LCV)

A doença linfocitária (*Lymphocystis disease virus* - LCDV) foi a primeira doença viral de peixes a ser descrita e tem sido estudada ao longo de décadas. O vírus descoberto por microscopia eletrônica é um membro da família *Iridoviridae* representando grandes vírus não envelopados com simetria icosaédrica (LI et al., 2010). Os peixes infectados pelo LCV apresentam lesões externas caracterizadas pelo aparecimento de nódulos, formados por células hipertróficas, localizadas na pele e nadadeiras dos peixes. As principais células afetadas pela infecção são fibroblastos ou osteoblastos que sofrem hipertrofia e encapsulação por uma matriz extracelular de natureza hialina (TIDONA; DARAI, 1997). A doença linfocitária (LCDV) já foi relatada em 140 espécies de peixes marinhos e de água doce sob condições naturais e experimentais. Embora a doença raramente seja a causa de mortalidade, o principal impacto para os animais infectados é impressão desagradável causada pelas lesões, que torna o animal impróprio ao comércio. Além disso, tornam-se mais susceptíveis à infecção por outros patógenos e apresentam significativa redução nos índices zootécnicos (LI et al., 2010).

Casos de infecção de peixes por LCV já foram relatados em diversos países europeus e americanos. Além disso, nos últimos anos, a doença afetando a aquicultura marinha foi relatada em países asiáticos, incluindo Japão, Coreia do Sul e China (LI et al., 2010). Embora muitas tentativas tenham sido feitas para propagar o LCV *in vitro*, o ciclo de replicação completo e os processos de patogênese desse vírus não são bem compreendidos. Nos últimos

anos, foram realizadas pesquisas para a investigação dos mecanismos da patogênese viral, bem como o sequenciamento completo do genoma de dois isolados, incluindo LCDV-C de linguado japonês (*Paralichthys olivaceus*) na China e LCDV-1 de linguado (*Platichthys flesus*) na Europa (XU; FENG; HUANG, 2014). O primeiro caso de LCDV acometendo espécies de tilápias selvagens em lagos africanos foi relatado na década de 1970 (PAPERNA, 1973). Desde então relatos pontuais têm sido realizados, sendo esse vírus de baixa relevância para a tilapicultura mundial.

3.4.2 Nervous necrosis virus (NNV)

O Vírus da necrose nervosa (VNN) é um vírus de RNA fita simples do gênero *Betanodavirus*, responsável por altas taxas de mortalidade nos estágios larval e juvenil de peixes marinhos e de água doce. Atualmente, casos de infecção por VNN são descritos em mais de 50 espécies de peixes. Assim como alguns outros vírus, animais acometidos por VNN apresentam sinais clínicos muito semelhantes aos observados nas infecções bacterianas mais usuais em peixes tropicais, como natação errática, falta de apetite, exoftalmia, ascite e melanose (MACHIMBIRIKE et al., 2019).

O primeiro relato do acometimento de peixes de cultivo por VNN ocorreu no Japão em 1992 em larvas de xaréu branco (*Caranx hippos*), um peixe marinho de águas tropicais (TAHA et al., 2020). O VNN pode causar mortalidade elevada chegando a 100% em larvas e juvenis de muitas espécies marinhas e de água doce, mantendo o ciclo epidemiológico em uma ampla faixa de temperaturas (15 a 30°C). A doença causada pelo VNN já foi relatada em quase todos os continentes onde a aquicultura é praticada (SHETTY et al., 2012). Em 2007 foi relatado o primeiro surto causado por VNN em tilápias cultivadas na Europa. Nesse evento foi registrada uma alta taxa de mortalidade de alevinos (1,2 cm), que entre 0 – 7 dias pós-eclosão apresentavam sinais clínicos de natação errática e permanência na superfície. Exames histopatológicos revelaram lesões como vacuolização citoplasmática e núcleos picnóticos em algumas regiões do Sistema Nervoso Central (SNC) (BIGARRE et al., 2009).

Recentemente, a mortalidade em massa de alevinos em fazendas de tilapicultura, nas regiões de Kafr El Sheikh e El Beheira no Egito, durante o mês de Julho de 2019, impactou severamente a produção com a perda de aproximadamente 70% dos peixes. Os alevinos eram mantidos em tanques com renovação parcial da água, 20% a 30%, duas vezes por semana e a temperatura média registrada em 30°C. Os alevinos começaram apresentar escurecimento do

tegumento e natação em espiral no quinto dia pós-eclosão (0,25 g – 1,5 cm) e animais moribundos foram coletados quando a taxa de mortalidade era de 50%. No entanto, ao fim do surto a perda já havia atingido 70% da produção. Uma investigação sobre as possíveis causas da mortalidade massiva dos alevinos identificou cepas do vírus da necrose nervosa filogeneticamente relacionadas ao vírus da garoupa (*red-spotted grouper* - RGNNV). Os sinais clínicos macroscópicos e a patologia geral dos peixes naturalmente infectados foram consistentes com infecções clássicas por VNN, como manifestações neurológicas, opacidade ocular e exoftalmia, além de outros sinais inespecíficos incluindo melanose. O RNA do VNN foi detectado em todos os *pools* de alevinos coletados nas duas propriedades e também no cérebro e ovários de reprodutores da fazenda de El Beheira. Posteriormente um ensaio de infecção experimental foi proposto pelos pesquisadores, a partir da exposição de alevinos (2 g – 3 g), negativos para VNN, ao homogenato viral obtido dos alevinos naturalmente infectados nos surtos mencionados. A mortalidade e os sinais clínicos foram monitorados durante uma semana. Os alevinos de tilápia expostos ao homogenato de tecido preparado a partir de alevinos naturalmente infectados apresentaram os sinais clássicos associados à infecção por VNN, como escurecimento do tegumento, letargia, anorexia, natação errática (em círculo ou na superfície junto à borda do tanque) e opacidade ocular. A infecção experimental de alevinos pelo VNN resultou em 100% de morbidade e mortalidade superior a 70%. Esse relato reforça a importância da elucidação dos diferentes aspectos da epidemiologia viral, as possíveis formas de conter a propagação do vírus e prevenir futuros surtos, bem como a possibilidade de ocorrência da transmissão interespecíes (TAHA et al., 2020). Além disso, o caráter emergente da doença em tilapiculturas no Egito, que é o terceiro maior produtor mundial, acende o alerta para a necessidade do monitoramento do vírus, a fim de se evitar a propagação do patógeno entre outras regiões produtoras.

3.4.3 Tilapia larvae encephalitis virus (TLEV)

O acometimento repentino de larvas de tilápias criadas em um laboratório em Israel, manifestado por um comportamento de natação em espiral resultou em uma mortalidade massiva dos peixes afetados. Na maioria dos casos, essa “síndrome do rodopio” era precedida por uma pigmentação escura que começava nas nadadeiras e se espalhava rapidamente por toda a pele. Esses sintomas específicos de morbidade apareceram nos dias 4 a 6 na fase de alimentação e foram seguidos por rápido início de mortalidade (90% – 100%). As larvas

doentes originaram-se de algumas fêmeas distintas, sugerindo a transmissão vertical da doença. (SHLAPOBERSKY et al., 2010).

O agente etiológico dessa doença foi encontrado no tecido cerebral das larvas, e a doença denominada como Encefalite viral de larvas de tilápia. Em virtude de análises morfológicas, biofísicas e filogenéticas, a doença foi atribuída a um vírus da família *Herpesviridae* e denominado Vírus da encefalite de larvas de tilápia (*Tilapia larvae encephalitis virus* - TLEV). Exames de microscopia eletrônica revelaram a presença de partículas virais hexagonais icosaédricas, com cerca de 100 nm de diâmetro, com núcleos densos de elétrons dentro do citoplasma das células do tecido cerebral de larvas afetadas. O comprometimento do sistema nervoso central como observado em peixes infectados por TLEV torna as encefalopatias virais um desafio cada vez maior à aquicultura devido à alta taxa de mortalidade sofrida nos cultivos (SYNIAKOV et al., 2011). Posteriormente, a esses casos não foram relatados na literatura outros episódios de surtos de TLEV.

3.4.4 Bohle iridovirus (BIV)

Até meados da década de 1980, os ranavírus, membros da família *Iridoviridae*, eram vistos como modelos interessantes, mas não como patógenos importantes para peixes. No entanto, essa situação mudou quando Langdon e Humphrey (1987) relataram o isolamento de um agente intimamente relacionado e semelhante ao EHNV, iridovírus da *Perca* vermelha (*Perca fluviatilis*). O agente foi isolado após um surto, com taxa de mortalidade próxima de 100% que afetou uma população de tilápias mantida em um laboratório de doenças aquáticas na Austrália. A etiologia do surto foi provisoriamente atribuída ao Bohle iridovirus (BIV), um vírus originalmente encontrado em uma espécie de anfíbio endêmico da Austrália (*Lymnodynastes ornatus*). Os peixes afetados apresentaram importante melanose e natação rápida, por isso a doença é também conhecida por “Spinning Tilapia”(CULLEN; OWENS; WHITTINGTON, 1995).

O BIV é um raro exemplo de vírus capaz de infectar não somente espécies diferentes mas também classes, sendo patogênico tanto para anfíbios quanto para peixes. Ensaios de infecção experimental de barramundi (*Lates calcarifer*) com BIV resultou em 100% de mortalidade e lesões características como necrose do tecido renal e esplênico (CULLEN; OWENS; WHITTINGTON, 1995).

3.4.5 Tilapia lake virus (TiLV)

O Vírus da tilápia do lago (*Tilapia lake virus* - TiLV) é um vírus de RNA de polaridade negativa com um genoma de 10 segmentos, inicialmente atribuído à família *Orthomyxoviridae* devido à similaridade em um dos segmentos genômicos. O TiLV foi reclassificado e agora é oficialmente reconhecido como um novo vírus sob o gênero *Tilapinevirus* e família *Amnoonviridae*, e cientificamente conhecido como *Tilapia tilapinevirus* (ADAMS et al., 2017). O TiLV é altamente infeccioso e tem sido associado à "Síndrome da mortalidade de verão" no Egito e "Síndrome da tilápia de um mês" na Tailândia, onde causa mortalidades de 20% a 90% (CHAPUT et al., 2020).

Em 2011, após vários meses de mortalidade atípica na produção intensiva de alevinos de tilápia em fazendas na América Central, a investigação do surto, através de exame histopatológico revelou que as principais lesões eram restritas em grande parte ao fígado e trato gastrointestinal (TGI). As alterações hepáticas eram variáveis, mas frequentemente eram dominadas por extensa necrose de hepatócitos e presença de células sinciciais. Nesse momento a doença foi denominada de Hepatite sincicial da tilápia (FERGUSON et al., 2014).

A partir do verão de 2009, episódios de perdas massivas de tilápia foram registrados em diversas propriedades em todo o território de Israel. Esses surtos observados durante os meses mais quentes (Maio a Outubro) eram marcados por ondas de alta mortalidade tanto de alevinos quanto de peixes adultos. O agente infeccioso espalhava-se facilmente entre os tanques de cultivo. No entanto, dentro da diversidade de peixes que coabitavam os tanques, apenas espécies de tilápias eram afetadas. Para elucidar a causa da doença, houve um esforço investigativo através do isolamento do agente infeccioso em culturas celulares, bem como o desenvolvimento de ferramentas para o diagnóstico com técnicas moleculares para a identificação e o monitoramento da doença. Posteriormente, o agente isolado e identificado foi denominado como o Vírus da tilápia do lago (*Tilapia lake virus* – TiLV) em referência ao local onde foi inicialmente isolado (EYGNOR, 2014)

O vírus da tilápia do lago (TiLV) é um vírus emergente, responsável por surtos de mortalidade em massa de tilápias cultivadas e selvagens (*Oreochromis* spp. e híbridos). Desde 2014, em vários continentes, relatos de tilapiculturas acometidas pelo vírus têm reportado mortalidades de 10% a 90% nos planteis de alevinos, juvenis e adultos, causando graves perdas econômicas (FATHI et al., 2017).

A partir do relato dos surtos altamente contagiosos e seguidos de mortalidade massiva em Israel em 2014, o TiLV já foi relacionado com a mortalidade de tilápias em fazendas no Equador, Egito, Tailândia, Tanzânia, Malásia, Índia, Hong Kong, Filipinas, México, Peru, Colômbia e Estados Unidos. No Egito, em 2015, o vírus responsável pela “Síndrome da mortalidade de verão” causou a perda de 98.000 toneladas na produção de tilápia e um prejuízo avaliado em cerca de US\$ 100 milhões (CONTRERAS et al., 2021).

Os peixes acometidos pelo TiLV apresentam sinais clínicos característicos como letargia, isolamento do grupo (permanência na superfície junto à borda do tanque), perda do apetite, pele hemorrágica, exoftalmia e vesícula biliar dilatada. Avaliações histopatológicas realizadas em tecidos de peixes infectados revelam deformação nos túbulos renais e congestão grave com infiltrações de células inflamatórias no cérebro e nos rins. As lesões sinciciais, caracterizadas por células aumentadas e multinucleadas, bem como corpos de inclusão intracitoplasmáticos são frequentemente observadas nas seções de tecidos hepático e cerebral (BASRI et al., 2020).

3.4.6 Tilapia parvovirus (TiPV)

De Agosto a Setembro de 2015 na China, surtos de uma doença emergente acometeu a produção de tilápias em diversas regiões do País. A doença mostrou-se altamente contagiosa e letal para tilápias adultas cultivadas em tanques-rede. A taxa de mortalidade atingiu cerca de 70% dos peixes e os sinais clínicos observados incluíram letargia, anorexia e uma mudança no comportamento de natação semelhante a movimentos de flecha ou rodopio. Os peixes doentes também apresentaram hemorragias na superfície do corpo, mandíbula, abdômen, e bases das nadadeiras, juntamente com exoftalmia acompanhada de lesões oculares pronunciadas.

A caracterização e identificação do agente infeccioso foram determinadas a partir do isolamento em cultivo celular, microscopia eletrônica, hibridização *in situ*, PCR e análises do sequenciamento do genoma. Sinais de hibridização positivos foram observados em diversas amostras de tecido, incluindo rim, baço, coração, cérebro, fígado, brânquias e intestino. No entanto, a intensidade do sinal de hibridização variou entre esses órgãos e sinais mais intensos foram observados no rim e no baço. A temperatura mais adequada para o surto da doença foi determinada entre 28°C e 30°C.

As pesquisas de similaridade de sequências de nucleotídeos não encontraram correspondências significativas com qualquer outro vírus, enquanto nos níveis de

aminoácidos, a comparação entre sequências mostrou certo grau de semelhança com a família *Parvoviridae*. A sequência do genoma revelou um novo parvovírus identificado a partir de tilápias doentes, que foi posteriormente denominado de Parvovírus da tilápia (*Tilapia parvovirus* – TiPV) (LUI et al., 2020). Recentemente na Tailândia, a ocorrência de surtos com mortalidade massiva de tilápias cultivadas revelou a coinfeção por TiLV e TiPV. O sequenciamento genômico da cepa de TiPV isolada durante as análises, mostrou uma identidade de 98,74% com a cepa anteriormente isolada na China (YAMKASEM et al., 2021).

3.5 IRIDOVIROSES

3.5.1 Família Iridoviridae

A família *Iridoviridae* é composta por cinco gêneros e contempla grandes vírus, com capsídeos icosaédricos e genomas de DNA de fita dupla que variam em tamanho de 103 a 220 kbp. Os gêneros pertencentes à subfamília *Alphairidovirinae* (*Ranavirus*, *Lymphocystivirus* e *Megalocytivirus*), infectam vertebrados heterotérmicos tais como peixes ósseos, anfíbios e répteis. Enquanto membros da subfamília *Betairidovirinae* (*Iridovirus* e *Chloriridovirus*), infectam principalmente insetos e crustáceos. As infecções podem não apresentar sinais clínicos externos e, em vertebrados, podem levar a altos níveis de mortalidade entre peixes e anfíbios comercial e ecologicamente importantes (CHINCHAR et al., 2017). Todos os vírus da família são genericamente denominados de “iridovírus”.

Membros dos gêneros *Iridovirus* e *Chloriridovirus* infectam mais de 100 espécies de insetos e crustáceos. As infecções com sinais clínicos aparentes envolvem níveis massivos de replicação do vírus que resultam em larvas exibindo marcante iridescência, enquanto infecções assintomáticas podem reduzir a capacidade reprodutiva do hospedeiro. Os gêneros foram previamente distinguidos com base no tamanho do vírion e na cor iridescente das larvas infectadas; a análise filogenética de sequências completas do genoma agora oferece um método superior de diferenciação (CHINCHAR et al., 2017).

Os *Ranavirus* (*Alphairidovirinae*) são patógenos promíscuos capazes de infectar três classes de vertebrados heterotérmicos (peixes ósseos, anfíbios e répteis). Os ranavírus infectam não apenas várias espécies dentro de uma classe, mas alguns como, por exemplo, o Bohle virus (BVI) também são capazes de infectar hospedeiros de diferentes classes. As infecções são sistêmicas, envolvem múltiplos órgãos internos e podem levar a altos níveis de

morbidade e mortalidade entre peixes e anfíbios cultivados, bem como espécies selvagens ameaçadas de extinção (CHINCHAR et al., 2017). O Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV), atualmente reconhece seis espécies de ranavirus, mas há muitos isolados entre elas, bem como várias espécies provisórias dentro do gênero. O vírus da rã FV-3 (*Frog virus-3*) é a espécie típica (WHITTINGTON; BECKER; DENNIS, 2010).

A subfamília *Alphairidovirinae* contém o gênero *Lymphocystivirus* com apenas uma espécie descrita como capaz de acometer peixes (*Lymphocystis disease virus* - LCDV). O vírion de tamanho entre 198 – 350 nm tem um capsídeo icosaédrico e pode ser diferenciado de outros iridovirídeos pela presença de uma franja de 2,5 nm de protruções externas semelhantes a fibrilas (CHINCHAR et al., 2017). O padrão das lesões causadas pelo *Lymphocystivirus* é caracterizado por nódulos semelhantes a granulomas, que ocorrem ao longo do corpo, bem como na base das nadadeiras.

A morfologia das partículas de iridovírus consiste em um núcleo interno de DNA, uma membrana limitadora interna, um capsídeo viral e, no caso das partículas que brotam da membrana plasmática, um envelope viral. Os vírions exibem simetria icosaédrica e geralmente têm 120–200 nm de diâmetro, mas podem ter até 350 nm (por exemplo, gênero *Lymphocystivirus*). O núcleo do vírion é denso em elétrons e consiste em um filamento de nucleoproteína circundado por uma membrana lipídica contendo proteínas transmembrana de função desconhecida (figura 1). Cada partícula é formada por 12 pentassimetrons e 20 trissimetrons dispostos em uma simetria icosaédrica. Ambos os tipos de estrutura compreendem predominantemente capsômeros hexavalentes, um total de 1460 por vírion, que são compostos pela proteína do capsídeo principal (MCP) (JANCOVICH et al., 2012).

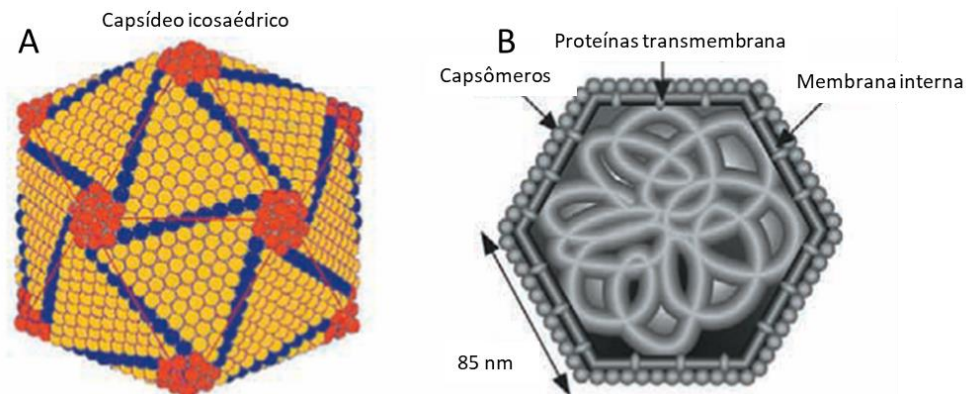


Figura 1- Morfologia externa do vírus iridescente de invertebrado 2 (IIV-2) (A); Diagrama esquemático de seção transversal de uma partícula de iridovirus, mostrando capsômeros, proteínas transmembrana dentro da bicamada lipídica e um núcleo de nucleoproteína filamentosa interna (B). Adaptado de: (JANCOVICH, et al., 2012).

O conhecimento sobre a estratégia de replicação dos iridovirus ainda é incipiente. A melhor compreensão foi obtida principalmente pelo estudo do FV-3 (*Frog virus -3*), a espécie típica do gênero *Ranavirus* (figura 2). A entrada do vírion ocorre por endocitose mediada por receptor para as partículas envelopadas ou pela remoção do revestimento viral diretamente na membrana plasmática da célula hospedeira para vírions nus. Após a remoção do revestimento, o genoma viral entra no núcleo onde ocorre a síntese do primeiro estágio de DNA e a síntese de transcrições virais. Em um processo, ainda não muito bem compreendido, uma ou mais proteínas associadas ao vírion agem como trans ativadores e redirecionam o RNA polimerase II do hospedeiro para sintetizar mRNAs virais usando o genoma viral metilado como molde. Os produtos genéticos codificados por transcritos virais incluem proteínas regulatórias e catalíticas. Um desses produtos gênicos, a DNA polimerase viral, catalisa o primeiro estágio da síntese do DNA viral núcleo da célula. Nesse processo, o genoma viral parental serve como molde e o DNA da progênie que tem no máximo duas vezes o comprimento do genoma. O DNA viral recém-sintetizado pode servir como molde para rodadas adicionais de replicação de DNA, ou pode ser transportado para o citoplasma onde ocorre o segundo estágio da replicação do DNA viral. No citoplasma, o DNA viral é concentrado em grandes concatâmeros ramificados que servem como molde para o empacotamento do DNA (JANCOVICH et al., 2012).

É provável que a metilação do DNA viral também ocorra no citoplasma e, embora seu papel preciso seja incerto, acredita-se que proteja o DNA viral do ataque de endonucleases presentes no citoplasma. A formação de vírions ocorre no citoplasma em locais de montagem

de vírus morfológicamente distintos. Dentro dos locais de montagem, o DNA viral concatamérico é empacotado em vírions, por meio de um mecanismo que resulta na geração de genomas circularmente permutados e terminalmente redundantes. Os vírions se acumulam no citoplasma dentro de grandes arranjos paracristalinos ou adquirem um envelope por brotamento da membrana plasmática. Frequentemente, nos casos de iridovirose em vertebrados, a maioria dos vírions permanece associada à célula hospedeira (JANCOVICH et al., 2012).

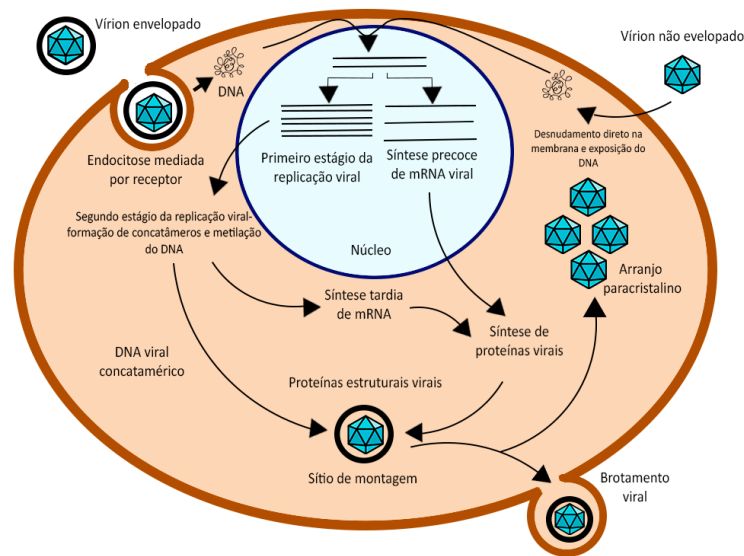


Figura 2 - Ciclo de replicação do FV- 3 (*Frog virus* - FV-3). Adaptado de: (CHINCHAR et al., 2002).

3.5.2 Megalocitivírus

Os megalocitivírus são vírus envelopados com um genoma linear de dupla fita de DNA, rodeado por um capsídeo icosaédrico de 140 a 200 nm de diâmetro (TSAI; HUANG, 2020). O genoma é curto em relação aos outros iridovírus de peixes, aproximadamente 110kb com uma relação de GC (guanina/citosina) de 53-55% (KIBENGE; GODOY, 2016). Os vírus do gênero *Megalocytivirus* são descritos como patógenos capazes de causar infecção sistêmica e impor mortalidade massiva a diversas espécies de peixes ornamentais e de produção, tanto em ambientes marinhos como em água doce. Entre os principais sinais clínicos, os animais infectados apresentam letargia, palidez branquial, melanose e exoftalmia (SUBRAMANIAM et al., 2012).

Com base nas análises de sequências genéticas e estudos sorológicos, todos os megalocitívirus isolados até o momento parecem ser cepas de duas espécies virais. A análise filogenética indica a presença de dois agrupamentos: um grande agrupamento de vírus tipo ISKNV, composto por RSIV (*Red seabream iridovirus* – RSIV), TRBIV (*Turbot reddish body iridovirus* – TRBIV), ISKNV e outros vírus altamente semelhantes e um segundo agrupamento, mais distante, composto por um único isolado, SDDV (*Scale drop disease virus* – SDDV). Se os membros do aglomerado maior representam espécies distintas ou cepas de uma única espécie, ainda não foi definido. Em geral, as cepas do tipo ISKNV são isoladas de peixes de água doce, enquanto as cepas do tipo RSIV infectam peixes marinhos (ICTV, 2020).

As cepas de megalocitívirus isoladas em diversas espécies hospedeiras apresentam um alto grau de similaridade. O compartilhamento da identidade das sequências de nucleotídeos é alto (JANCOVICH, et al., 2012). Com base em análises filogenéticas da proteína principal do capsídeo (MCP) e dos genes ATPase, oito cepas foram atribuídas à espécie ISKNV: *Infectious spleen and kidney necrosis Virus*-ISKNV; *Orange spotted grouper iridovirus* – OSGIV; *Giant sea perch iridovirus* - K1 – GSIV-K1; *Rock bream iridovirus* – RBIV; *Turbot reddish body iridovirus* – TRBIV; *Large yellow croaker iridovirus* – LYCIV; *Pompano iridovirus* – PIV e *Red seabream iridovirus* – RSIV (tabela 3). Embora as cepas relacionadas ao ISKNV estejam associadas à infecção de um pequeno grupo de peixes de água doce, tem sido capaz de impactar fortemente o cultivo de importantes espécies de peixes de produção e ornamentais de alto valor comercial (Tabela 4), como o peixe-mandarim (*Siniperca chuatsi*), o bacalhau-do-rio australiano (*Maccullochella peelii*), o barramundi (*Lates calcarifer*) e recentemente a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) (DONG et al., 2017; GO; WHITTINGTON, 2019; SUBRAMANIAM et al., 2016).

Tabela 3 - Cepas isoladas dentro das espécies ISKNV/SDDV. Adaptado de: ICTV, 2020.

| Espécie | Vírus | Sequência avaliada | Abreviação |
|---|---|---------------------------|-------------------|
| Infectious spleen and kidney necrosis virus | Infectious spleen and kidney necrosis virus | Genoma completo | ISKNV |
| | Orange spotted grouper iridovirus | Genoma completo | OSGIV |
| | Giant sea perch iridovirus - K1 | Genoma completo | GSIV-K1 |
| | Rock bream iridovirus | Genoma completo | RBIV |
| | Turbot reddish body iridovirus | Genoma completo | TRBIV |
| | Large yellow croaker iridovirus | Genoma completo | LYCIV |
| | Pompano iridovirus | Genoma completo | PIV |
| | Red seabream iridovirus | Genoma completo | RSIV |
| Scale drop disease virus | Scale drop disease virus | Genoma parcial | SDDV |

Os genomas completos das cepas contidas nas duas espécies de *Megalocytivirus* foram sequenciados. As partículas de megalocivírus contêm uma única molécula de dsDNA linear de 110.104 a 112.636 bp. Tal como acontece com outros membros da família, o DNA genômico é circularmente permutado, terminalmente redundante e altamente metilado (ICTV, 2020).

Tabela 4 - Espécies de peixes ornamentais e de produção com relatos de infecção por RSIV/ISKNV. Adaptado de: Kibenge et al., 2012.

| Peixe | País |
|------------------------|------------------|
| Marble sleepy goby | China |
| Banggai cardinal fish | Sudeste Asiático |
| Dwarf gourami | Malásia |
| African lampeye | Indonésia |
| Giant sea perch | Taiwan |
| Orange-spotted grouper | Taiwan |
| Silver sea bream | Taiwan |
| Chinese perch | China |
| Flathead mullet | Singapura |
| Reddrum | Malásia |

Continuação...

| | |
|-----------------------|---------------|
| Barramundi perch | Malásia |
| Murray cod | Austrália |
| Bastard halibut | Coreia do Sul |
| Turbot | China |
| Barred knifejaw | Coreia do Sul |
| Stone flounder | China |
| Red sea bream | Japão |
| Greater amberjack | Japão |
| Sea bass | Coreia do Sul |
| Pacific bluefin tuna | Japão |
| Japanese sea perch | Japão |
| Giant grouper | HongKong |
| Brown-marbled grouper | Singapura |
| Japanese amberjack | Japão |
| Spotted knifejaw | China |
| Striped jack | Japão |
| Yellowfin sea bream | HongKong |
| Common pony fish | Taiwan |
| Malabar grouper | Tailândia |
| Tilapia | Tailândia |

3.5.2.1 Epidemiologia

Muitas espécies importantes para a aquicultura são susceptíveis à infecção por megalocitivirus, e segundo Wang e colaboradores (2007), de 100 espécies de peixes marinhos selvagens capturados na China, 15% resultaram positivas para o vírus em testes de PCR específico (WANG et al., 2007). Esses vírus também foram detectados em peixes de água doce assintomáticos na Austrália, Malásia e Coreia do Sul, incluindo importantes espécies ornamentais das famílias: *Cichlidae* e *Poeciliidae* (JOON et al., 2008; RIMMER et al., 2015; SUBRAMANIAM et al., 2014).

O trânsito de peixes assintomáticos ou com infecção subclínica é tido como a principal forma da introdução de doenças em novas regiões. Para a detecção da infecção, a adoção de medidas de regulamentação estrita do comércio como testes para diagnóstico e quarentena são estratégias necessárias. Os megalocitivirus são conhecidos por sua natureza promíscua e pela capacidade de transmissão horizontal. Além disso, são capazes de cruzar os limites entre espécies conforme foi demonstrado por Go e Whittington (2006), quando o gourami anão (*Trichogaster lalius*) que é uma espécie ornamental mundialmente comercializada foi capaz de transmitir a doença para o bacalhau Murray após coabitação, causando um grave surto de mortalidade dessa espécie de produção que tem grande importância comercial na Austrália.

Ainda conforme esses pesquisadores, os peixes ornamentais haviam passado por uma quarentena antes da importação pela Austrália, e ainda assim, o vírus causou um surto de doença no bacalhau Morray cultivado.

A subdivisão do gênero *Megalocytivirus* em grupos filogenéticos, com base na sequência do gene MCP fornece correlações úteis em diferentes situações epidemiológicas (KURITA; NAKAJIMA, 2012; SONG et al., 2008). Vírus filogeneticamente relacionados com ISKNV foram amplamente distribuídos na Ásia, enquanto RSIV e TRBIV apresentaram um alcance geográfico mais limitado (SONG et al., 2008; SUBRAMANIAM et al., 2014). No entanto, isolados caracterizados da Tailândia (GSDIV), Coreia do Sul (RBIV) e Japão (RSIV) receberam nomes diferentes, mas pertencem ao mesmo grupo filogenético do RSIV, indicando uma distribuição geográfica mais ampla que a esperada para este genótipo (KURITA; NAKAJIMA, 2012).

Os megalocitívirus são amplamente distribuídos na Ásia e sua ocorrência em outras regiões era aparentemente contida. Contudo, há relatos do acometimento por megalocitívirus em stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) no Canadá em 2008 (WALTZEK et al., 2012) e, mais recentemente em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) na Tailândia (DONG et al., 2015), nos EUA em 2016 (SUBRAMANIAM et al., 2016), na África em 2019 (RAMÍREZ-PAREDES et al., 2020) e Brasil em 2020 (FIGUEIREDO et al., 2021). Peixes na fase de engorda são susceptíveis, mas a doença é mais grave em animais jovens (alevinos e juvenis), onde a taxa de mortalidade pode chegar a 100% em alguns ambientes de aquicultura intensiva (KURITA; NAKAJIMA, 2012). A transmissão horizontal conforme relatado, pode ocorrer a partir do trânsito de animais infectados que irão coabitar com animais saudáveis, pela utilização de utensílios e/ ou estruturas sem a devida desinfecção e também pelo compartilhamento do fluxo da água. A transmissão por coabitação entre espécies susceptíveis foi demonstrada em ensaios de infecção experimental (GO; WHITTINGTON, 2019). Da mesma forma, a confirmação da transmissão vertical (SUEBSING et al., 2016) reforça a necessidade de estratégias de controle mais rígidas para conter a propagação do vírus.

3.5.2.2 Patologia

O achado anatomopatológico mais comum nas infecções por megalocitívirus é a presença de megalócitos observados preferencialmente nos tecidos renal e esplênico, com ou sem degeneração e necrose. Os megalócitos são células hipertrofiadas que contêm corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos basofílicos, que distendem fortemente o citoplasma e deslocam o núcleo para a periferia da célula, sendo esse um sinal característico (KIBENGE; GODOY, 2016; KURITA; NAKAJIMA, 2012).

Megalócitos estão presentes em grande número nos tecidos de peixes clinicamente afetados, particularmente aqueles infectados com RSIV. No entanto, podem ser raros ou ausentes em alguns casos. Essas células podem se localizar em áreas perivasculares podendo bloquear o fluxo sanguíneo e assim, levar a focos de necrose isquêmica nos órgãos afetados (GO; WHITTINGTON, 2006).

A morfologia distorcida das células, durante algum tempo prejudicou a identificação do tipo de célula alvo, mas evidências recentes sugerem que são leucócitos. O tamanho e forma dos leucócitos infectados no tecido sanguíneo apresentam semelhança com células infectadas nos órgãos, o que também reforça o entendimento de que essas células migraram da circulação para esses tecidos. Esta interpretação é compatível com a observação de que a atividade dos macrófagos é negativamente afetada durante a infecção por megalocitívirus. (LEE et al., 2009).

3.5.2.3 Métodos de diagnóstico

Atualmente os métodos de diagnóstico das infecções causadas por megalocitívirus vão além dos achados histopatológicos característicos, incluindo a utilização de técnicas moleculares como a PCR convencional e a PCR em tempo real (qPCR) (CHINCHAR et al., 2017; NOLAN et al., 2015). A utilização da técnica de PCR em tempo real (qPCR) tem se mostrado mais vantajosa que a PCR convencional, pois além da rapidez na obtenção do diagnóstico, como aspecto importante para a eficácia na prevenção e controle de doenças infecciosas, demanda menos recursos humanos, é facilmente automatizada e oferece alto grau de sensibilidade e especificidade nos ensaios. Outra vantagem da tecnologia da qPCR é oferecer análises quantitativas dos alvos, a partir da detecção óptica da intensidade de fluorescência emitida por sondas durante a amplificação do DNA alvo (BUSTIN, 2010).

A detecção de patógenos usando ensaios baseados em ácido nucléico é o método de referência para laboratórios de diagnóstico de doenças animais. A PCR é um método simples e poderoso para a amplificação enzimática de DNA *in vitro* usando um termociclador. A técnica consiste em ciclos repetitivos de três reações simples (desnaturação, anelamento e extensão) na presença de DNA polimerase termoestável e um par de oligonucleotídeos iniciadores específicos. A amplificação seletiva de pequenas quantidades de DNA alvo presente em uma amostra complexa fornece o método mais sensível para a detecção de ácidos nucléicos. Para detecção de transcritos de vírus com um genoma de RNA (vírus de RNA), a amplificação por PCR requer que o RNA primeiro seja copiado pela enzima transcriptase reversa para cDNA e então usado em PCR. Esta técnica é referida como transcrição reversa PCR (RT-PCR). Os ensaios de PCR multiplex são mais difíceis de serem estabelecidos do que PCR ou RT-PCR singleplex porque os conjuntos de iniciadores podem diferir nas condições ideais de reação, e as misturas complexas de primer têm maior probabilidade de resultar em interações inespecíficas reduzindo a sensibilidade e a especificidade do ensaio (KASLOW; STANBERRY; LE DUC, 2014).

De acordo com a OIE, o método de detecção molecular para RISV e ISKNV recomendado é um ensaio de PCR convencional (KURITA, 1998). No entanto, atualmente os ensaios de PCR em tempo real (qPCR) são desejáveis para aumentar a sensibilidade e acomodar testes para fins de certificação. O ensaio validado por Rimmer e colaboradores (2012) detectou DGIV (cepa tipo ISKNV) com maior sensibilidade em comparação com o ensaio de PCR convencional (RIMMER et al., 2012). Ensaios LAMP (*Loop-mediated isothermal amplification* - LAMP) foram descritos para ISKNV (SUEBSING et al., 2016) e para TRBIV (ZHANG et al., 2009).

Existem inúmeras outras técnicas disponíveis para confirmar a presença do vírus, e diferentes diretrizes de diagnóstico são fornecidas no Manual de Testes de Diagnóstico para Animais Aquáticos (OIE, 2021b). Para um diagnóstico mais preciso, as melhores amostras são aquelas coletadas de peixes moribundos, sendo o baço o principal órgão. Outros os tecidos relevantes incluem o rim, brânquias, coração, fígado e intestino. No caso de detecção viral em peixes subclínicos, um número maior de amostras deve ser considerado para testes. Anticorpos monoclonais estão disponíveis para testes de imunofluorescência demonstrando a presença do vírus em lâminas histopatológicas ou culturas de células (KIBENGE; GODOY, 2016).

Análise de células infectadas por vírus usando esfregaços de impressão do baço corados com Giemsa tem sido comumente usada para o diagnóstico rápido de peixes infectados com RSIV. No entanto, esse método fornece apenas um diagnóstico presuntivo e não confirma a presença de RSIV. Em contrapartida, o isolamento do vírus em cultura de células usando linhas de células susceptíveis, como BF-2 (*Bluegill Fry-2*), KRE-3 (*Kelp and red spotted grouper embryo-3*) e GF (*Grunt Fin*), é demorado e pode levar semanas para ser concluído. Portanto, um anticorpo monoclonal que reconhece uma proteína não estrutural induzida por vírus de 180–230 kDa foi selecionado e usado para o desenvolvimento de um teste rápido para detecção de RSIV. Este ensaio pode ser usado, não apenas com esfregaços de impressão do baço de peixes infectados, mas também com culturas de células infectadas e seções de tecido. O uso do anticorpo monoclonal M10 é descrito no Manual de Métodos de Diagnóstico para Animais Aquáticos publicado pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE, 2021b) e é aplicável a RSIV e ISKNV (KURITA; NAKAJIMA, 2012).

O isolamento do vírus era considerado o método mais sensível disponível para diagnóstico de doenças virais em peixes até pouco tempo (CRANE, 2008). Com o advento dos métodos moleculares, essa sensibilidade passou ser superada por técnicas como qPCR ou RT-qPCR, sendo o isolamento viral um ensaio confirmatório. Para a maioria dos regulamentos de inspeção para apoiar o comércio interestadual ou internacional de peixes vivos os métodos moleculares são os recomendados para demonstrar a ausência dos vírus (GOODWIN; MERRY; ATTOUI, 2010). A cultura de células para isolamento viral tem a vantagem de fornecer material para estudos adicionais e permitir novos conhecimentos sobre patogênese e a imunidade. No entanto, nenhuma cultura de linhagem celular pode suportar o crescimento de todos os vírus de peixes. Assim, os laboratórios de diagnóstico têm que manter diferentes linhagens celulares (LAKRA; SWAMINATHAN; JOY, 2011).

A aplicação da técnica de microscopia eletrônica (ME) depende da amostra de interesse. Em um cenário de diagnóstico, a necessidade de fazer ME pode surgir de duas situações principais: em um ensaio de cultura de células virais, onde ocorre um padrão único de efeito citopático (ECP) e o teste para vírus conhecidos provou ser inconclusivo, ou quando o exame histopatológico revelou lesões que são sugestivas de um vírus, ou seja, necrose de tecido/célula e/ou a presença de corpos de inclusão intracitoplasmáticos. Em muitos casos, a necessidade de fazer ME surge depois que todos os tecidos foram fixados e processados e a capacidade de usar esses tecidos processados para diagnóstico viral poderá ser considerada (LOVY, 2014). A microscopia eletrônica pode apresentar maior rapidez na obtenção do

diagnóstico, particularmente para amostras contendo um grande número de partículas de vírus, como líquido vesicular, extratos fecais e soro (GOLDSMITH; MILLER, 2009). O uso de anti-soro específico para agregar vírions aumenta a sensibilidade e a precisão do diagnóstico por microscopia eletrônica. Essa técnica é conhecida como microscopia imunoelétrica (IEM). Outros métodos rotineiramente usados para aumentar a visualização do vírus em amostras clínicas são a ultracentrifugação e a difusão em gel de ágar. O seccionamento fino do tecido infectado também é usual para o diagnóstico por microscopia eletrônica. A principal limitação do diagnóstico de vírus por corte fino é que se a infecção for focal, a amostragem pode perder a área contendo o vírus (GOLDSMITH; MILLER, 2009).

3.5.2.4 Prevenção e controle

A prevenção e o controle de doenças virais são de modo geral, influenciados pelas características da propriedade produtora, como fatores ambientais, presença de hospedeiros reservatórios, susceptibilidade da espécie hospedeira, bem como a dinâmica de transmissão e patogenicidade do vírus. Além disso, a contenção da propagação viral em sistemas de aquicultura semiabertos, onde as espécies cultivadas estão no mesmo ambiente que outros peixes de vida livre é especialmente mais difícil, em contraste com o ambiente terrestre onde maiores níveis de biossegurança são mais fáceis de serem implementados como, por exemplo, na avicultura comercial. Medidas eficazes de biossegurança em ambientes aquáticos são mais prontamente aplicáveis em sistemas fechados de cultivo, onde os fatores podem ser controlados (KIBENGE; GODOY, 2016).

Medidas de biossegurança referem-se a ações que evitem a introdução, transmissão e disseminação de agentes infecciosos em regiões definidas ou instalações de unidades produtoras. Inclui também a biocontenção, ou o controle de uma doença que já esteja presente em uma determinada área ou instalação evitando a propagação do agente para novas áreas. Uma das principais preocupações em biossegurança são os potenciais portadores do agente infeccioso da doença, que incluem hospedeiros infectados, portadores biológicos não hospedeiros e objetos inanimados contaminados. Para garantir a biossegurança na aquicultura, medidas estritas de biossegurança devem ser implementadas em todas as fases do ciclo de produção (LOTZ, 1997).

As larviculturas servem como pontos de partida de disseminação devido ao seu papel no fornecimento de formas jovens para a piscicultura de engorda. Algumas das medidas de

biosseguridade realizadas em larviculturas e alevinagens para evitar a transferência vertical de patógenos incluem a realização rotineira de testes de laboratórios para a identificação e remoção de peixes infectados, de forma que apenas peixes livres de doenças sejam comercializados (KIBENGE; GODOY, 2016).

Para garantir a consistência na implementação de medidas de biosseguridade nas pisciculturas, é importante que procedimentos operacionais padrão (POPs) sejam preparados e incluam as medidas de controle dentro do manejo de rotina em todas as etapas de produção na unidade. Os POPs devem incluir detalhes sobre o projeto da instalação, fluxo dentro da instalação para funcionários, insumos, veículos e equipamentos, mostrando áreas restritas e não restritas, deve conter ainda orientações sobre os procedimentos de desinfecção de pessoal, água de entrada, gestão de águas residuais, regimes de alimentação e outros procedimentos. Além disso, os POPs devem fornecer protocolos para coleta de amostra usada na triagem de rotina de doenças virais, diretrizes para lidar com surtos de doenças e relatórios de doenças notificáveis às instituições veterinárias nacionais reguladoras (KIBENGE; GODOY, 2016).

Como medidas preventivas contra a doença causada por megalocitívirus, assim como por outros agentes virais, ações de biosseguridade como a prevenção da exposição ao agente, juntamente com a adoção de tecnologias de diagnóstico rápidas e precisas, continuam a ser o método mais eficaz para controlar a doença. Além das ações e medidas de biosseguridade supracitadas, o despovoamento seguido da desinfecção das instalações ou a eliminação de peixes infectados, bem como a utilização de vacinação de rotina, asseguram o aumento dos padrões de biossegurança e são ações fundamentais no controle da disseminação do iridovírus e na prevenção de surtos da doença.

Vacinas seguras e eficazes são essenciais para controlar doenças virais e sustentar o desenvolvimento da indústria de aquicultura. Existem quatro conceitos básicos de vacina usados para o desenvolvimento de vacinas virais: vacinas vivas ou atenuadas, vacinas com o vírus inteiro inativado (IWV), subunidades purificadas (proteínas ou glicoproteínas) do patógeno e vacinas de DNA (FU et al., 2014).

As vacinas com o vírus inativado ou “morto” representam a maior proporção de vacinas usadas atualmente na aquicultura. A principal limitação dessa estratégia vacinal é que elas não induzem a resposta pela imunidade celular, ou fazem de forma muito limitada, bem como a resposta imune humoral induzida por essas vacinas é de curta duração. Portanto, é necessário a utilização de adjuvantes para formar um depósito no local da aplicação e

promover a liberação mais lenta do antígeno e assim, prolongar a duração da resposta imune (GUDDING et al., 2014).

Desde os primeiros relatos do acometimento de douradas (*Pagrus major*) por RSIV, no Sudoeste do Japão na década de 1990, a doença tem causado surtos com mortalidade significativa em diversas espécies de peixes marinhos cultivados. Ainda no ano de 1999, Kazuhiro Nakajima e colaboradores (1999) empreenderam esforços de pesquisa para estabelecer medidas de controle para a doença do iridovírus da dourada (RSIVD), a partir da avaliação da eficácia de uma vacina viral inativada com formalina em um ensaio de campo. Dois grupos, cada um deles com 1000 juvenis de douradas do mar foram inoculados intraperitonealmente (vacinados e não vacinados). Após a vacinação, os peixes foram mantidos por uma semana em ambiente controlado, e posteriormente transferidos para tanques-rede marinhos e monitorados durante 12 semanas. A mortalidade acumulada causada por RSIV nos grupos vacinado e não vacinado foram 19,2% e 68,5% respectivamente. Além disso, a presença do DNA viral no tecido esplênico dos animais foi investigada e o peso corporal foi registrado nas semanas 6 e 12. No grupo vacinado, o antígeno viral não foi detectado e o aumento no peso corporal dos peixes vacinados foi significativamente maior ($p < 0,05$) do que o dos peixes do grupo controle (não vacinados). Esses resultados sugerem que a vacina contra RSIVD foi eficaz nesse primeiro ensaio realizado (NAKAJIMA et al., 1999).

Novas tecnologias de vacinas em avaliação incluem uma vacina de DNA para ISKNV em peixe-mandarim (*Siniperca chautsi*) (FU et al., 2014). Além disso, uma nova abordagem para investigar a manifestação da doença envolve a vacinação de garoupa por exposição ao RSIV em temperatura mais baixa, não permissiva, onde a infecção não é capaz de expressar a doença (OH et al., 2014).

Até o momento, a única vacina comercialmente disponível contra megalocitívirus é a AQUAVAC® IridoV (MSD). Uma vacina viral inativada com formalina e preparada para combater infecções causadas por ISKNV, administrada por injeção intraperitoneal (IP) como dose de injeção única em peixes com peso não inferior a 5g. Segundo o fabricante, MSD Animal Health, a vacina promove proteção de longo prazo, efeitos colaterais mínimos e está disponível em uma formulação monovalente que pode ser combinada com outras vacinas AQUAVAC. No entanto, paralelamente, a comunidade científica está ativamente envolvida no desenvolvimento de novos agentes vacinais eficazes e de alta tecnologia, capazes de induzir elevados níveis de respostas humoral e celular no combate às doenças causadas por megalocitívirus.

O desenvolvimento de um imunobiológico contra o ISKNV, frente ao grave prejuízo econômico causado para a indústria aquícola mundial e à evidente aceleração em sua propagação, é um ponto chave na prevenção e controle da doença.

Em estudo recente conduzido por Ruoyun Zeng e colaboradores (2021), foi desenvolvida uma vacina atenuada contra o ISKNV com baixa patogenicidade e alta proteção, a partir do rastreamento e análise das sequências de aminoácidos das estruturas de leitura abertas do ISKNV (ORFs). A vacina com o vírus atenuado com a deleção do gene ORF022L replicou bem em células de peixe mandarim (*Siniperca chautsi*) e mostrou estrutura semelhante com ISKNV de tipo selvagem. No entanto, a patogenicidade foi significativamente menor, pois 98% dos peixes mandarim infectados com o vírus atenuado (DORF022L) sobreviveram, ao passo que todos aqueles infectados com ISKNV de tipo selvagem morreram. O resultado de maior importância desse estudo foi que em 100% dos peixes vacinados houve indução da resposta por anticorpo específico contra o ISKNV e não houve mortalidade após o desafio com o vírus original. Esses resultados mostram um grande passo na obtenção de um agente vacinal eficaz contra o ISKNV (ZENG et al., 2021).

3.6 INFECÇÃO POR ISKNV EM TILÁPIAS

O vírus da necrose infecciosa do rim e do baço (ISKNV) é um vírus de distribuição global e causador de graves perdas econômicas para a indústria aquícola. O ISKNV está associado a surtos de alta mortalidade em diversas espécies de peixes marinhos e de água doce. Durante os últimos anos, registros importantes de tilapiculturas acometidas por megalocitivírus, em diferentes regiões do mundo tiveram identificação positiva para ISKNV (figura 3) (SUBRAMANIAM et al., 2016).

O primeiro relato de tilápias cultivadas acometidas pelo ISKNV ocorreu em 2015 na Tailândia, durante a investigação de surtos anuais de mortalidades em fazendas de tilápias cultivadas em tanques-rede ao longo do rio Mekong, na província de Nong Khai. Produtores locais relatavam que a doença era responsável pela perda anual de até 50% da produção de peixes. No entanto, os agentes causais eram desconhecidos e os animais apresentavam sinais clínicos externos semelhantes aos de infecção bacteriana por *Flavobacterium columnare*, como necrose branquial, erosão de nadadeiras e úlceras na pele. Além disso, durante exames de necropsia, os pesquisadores observaram sinais não compatíveis com columnariose, como o fígado hemorrágico, pálido e com áreas de necrose, bem como congestão intestinal, vesícula

biliar aumentada e ascite. Testes de PCR específico confirmaram a infecção pelos dois agentes (DONG et al., 2015).

No ano seguinte, os resultados de investigações sobre mortalidade entre 50% e 75%, ocorrida entre os meses de Novembro e Dezembro de 2012, em fazendas de tilápias, no centro-oeste dos Estados Unidos confirmaram o ISKNV como agente causador. Os peixes afetados, juvenis de 3,5 a 7,6 cm, eram mantidos em pequenos tanques de aproximadamente 200 L com fluxo de água constante. A administração de florfenicol (FFC) incorporado na ração não surtiu efeito e os animais moribundos exibiam sinais de letargia, palidez branquial e distensão abdominal com presença de líquido ascítico. Avaliações histopatológicas e por microscopia eletrônica das amostras de tecidos revelaram a disseminação de megalócitos com inclusões intracitoplasmáticas principalmente na lâmina própria do intestino, assim como nos tecidos de baço e rim. Análises molecular e de sequenciamento genético revelaram 100% de identidade com o ISKNV anteriormente reportado em peixes mandarim (SUBRAMANIAM et al., 2016).

O surto mais severo de ISKNV acometendo tilápias cultivadas, chegando à interrupção da produção ocorreu de Setembro de 2018 a Março de 2019, quando casos da doença com níveis muito altos de morbidade e mortalidade entre 60% e 90% foram reportados em fazendas de cultivo de tilápias em tanques-rede no Lago Volta, em Gana, na África. No final de Setembro de 2018, uma fazenda localizada abaixo da barragem inferior na região de Asutsuare foi a primeira a sofrer episódios de mortalidades massivas. Aproximadamente uma semana após o primeiro relato, uma segunda fazenda localizada na região de Akuse, aproximadamente 5 km a montante de Asutsuare, acima da barragem, também reportou o surto com mortalidade massiva. Em meados de outubro, várias outras fazendas produtoras em tanques-rede, localizadas ainda mais a montante do local do primeiro surto relataram perda de mais de 10 toneladas de peixes por dia. No final de 2018, a maioria dos produtores de tilápia no Lago Volta relataram perdas por mortalidades que não puderam ser contidas com o aumento da produção de alevinos ou tratamento com antibióticos. Os eventos de mortalidade continuaram ao longo de 2019. O padrão incomum na propagação da doença despertou a suspeita do derramamento de algum agente tóxico na bacia do lago. Contudo, autoridades sanitárias locais descartaram a possibilidade após análise da água.

Este foi o primeiro relato de vírus infeccioso da necrose do baço e do rim em tilápia cultivada na África. Um fato importante foi a constatação de que muitos peixes diagnosticados positivos para ISKNV apresentavam intensa coinfeção por *Streptococcus*

agalactiae e outros patógenos bacterianos, relacionando a coinfeção à alterações no curso da doença, bem como no aumento da letalidade do processo. No entanto, as correlações observadas entre os eventos de mortalidade, histopatologia e cargas virais nos tecidos sugerem que o ISKNV foi uma das principais causas de mortalidade durante os surtos.

Produtores continuaram a relatar mortalidades, mas com um impacto menor sobre os peixes em fase de engorda, agora observadas predominantemente em animais bem jovens com 1-5 g de peso. A mortalidade juvenil relatada como sendo de natureza episódica, ocorria alguns dias após o processo de masculinização do alevino e transporte para os tanques-rede no lago, durando até 3-4 semanas. As taxas de sobrevivência até o estágio de crescimento, naquela época, foram estimadas em 5% a 20%. Esses surtos de mortalidade desencadeados pelo estresse podem ser indicativos da persistência generalizada do vírus no ambiente ou de um estágio latente do ISKNV. Embora a origem do vírus na bacia do Lago Volta ainda seja incerta, a principal suspeita recai sobre a introdução de animais positivos através do trânsito de lotes de peixes infectados pelo vírus. (RAMÍREZ-PAREDES et al., 2020).



Figura 3 - Ocorrência mundial do Vírus da necrose infecciosa do baço e do rim (ISKNV) no cultivo de tilápias.

No Brasil até 2018, casos de infecção por ISKNV haviam sido reportados acometendo apenas algumas espécies de peixes ornamentais, tais como peixe-anjo de água doce (*Pterophyllum scalare*), o platy comum (*Xiphophorus maculatus*) e o gourami anão (*Trichogaster lalius*) (MAGANHA et al., 2018).

O primeiro caso de acometimento de tilápias cultivadas em tanques-rede no Brasil, na represa de São Simão em Goiás, em Junho de 2020, foi relatado por Figueiredo e colaboradores (2021). Nesse relato não foi observado um quadro de mortalidade massiva. Os peixes foram adquiridos de uma piscicultura comercial com aproximadamente 25 g e já vacinados contra *Streptococcus agalactiae*. Após o período de dois meses de crescimento, os animais com aproximadamente 250 g foram classificados (biometria) e realocados em novos tanques. Alguns dias após a ação de manejo houve o início do registro de mortalidade diária atípica atingindo o máximo de 6,4%. Os sinais clínicos observados em peixes moribundos amostrados incluíam anorexia, melanose, hipersecreção de muco, hemorragia de tegumento, ascite e palidez branquial. Durante exames de necropsia foram observados hepatomegalia, esplenomegalia, vísceras hemorrágicas, músculo friável e presença de líquido na cavidade celomática e, em alguns peixes, as vísceras foram liquefeitas, especialmente o fígado e baço. Os peixes amostrados foram também submetidos a exames bacteriológicos e resultados positivos foram confirmados para *Streptococcus agalactiae*, *Edwardsiella tarda* e *Aeromonas hydrophila*. Durante o referido período de crescimento não houve a introdução de novos peixes nos lotes e a temperatura média da água esteve em 24,5°C.

Foram realizados exames histopatológicos, de detecção viral por técnica molecular e microscopia eletrônica num total de 23 peixes amostrados com aproximadamente 250 g. Todos os animais amostrados foram confirmados positivos para ISKNV através de técnicas de PCR específico e sequenciamento genético. Os achados histopatológicos, como a presença de megalócitos em muitos tecidos e a visualização de partículas virais no baço, de forma semelhante descrita em outros estudos (Ramírez-Paredes et al., 2020; Subramaniam et al., 2016), confirmaram o ISKNV como um dos agentes etiológicos.

A análise filogenética da sequência do gene MCP mostrou que a cepa encontrada no Brasil pertence ao mesmo grupo filogenético do ISKNV já isolado em espécies de peixes marinho e de água doce em diferentes regiões geográficas, como Japão, China, países do Sudeste Asiático, Estados Unidos e África. No entanto, o significado dessas relações com a ocorrência do ISKNV no Brasil é incerto (FIGUEIREDO et al., 2021).

Após a notificação e o conhecimento por autoridades sanitárias, o Governo Brasileiro, através de órgãos ligados à Secretaria de Defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) elaborou o Plano de Investigação, Prevenção e Controle de Infecção por ISKNV (MAPA, 2020). Esse objetivou mapear a ocorrência de infecção por ISKNV, estabelecer o controle das condições sanitárias dos juvenis que são fornecidos aos criatórios e subsidiar medidas de prevenção e controle em regiões infectadas. Outra medida adotada pelo MAPA, juntamente com as Agências de Defesa Estaduais foi o início de campanhas de coleta e investigações epidemiológicas com o objetivo de determinar a origem, a abrangência e o real quadro da disseminação do vírus no território brasileiro. Ainda de acordo com o MAPA, os estados de Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, São Paulo, Bahia, Alagoas e Pernambuco já são confirmados como áreas positivas para o vírus (figura 4). Até o presente momento foram identificados casos positivos em tilapiculturas localizadas em 89 municípios nos estados supramencionados. Além disso, novos casos suspeitos nos estados do Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Tocantins e Distrito Federal estão em monitoramento, mas até o momento apresentaram resultados negativos para ISKNV. Ainda de acordo com o serviço veterinário oficial, com base nos inquéritos epidemiológicos realizados, não é possível relacionar a ocorrência da doença ao trânsito de peixes vivos (infectados) entre as regiões. No entanto, a detecção de animais positivos em propriedades que não apresentam relação epidemiológica ou contato direto com outra área sabidamente positiva e que recentemente receberam juvenis para povoamento, reforça a suspeita de que a movimentação de lotes de peixes vivos seja a principal maneira de como a propagação do ISKNV esteja ocorrendo no país (LEAL; FRANÇA, 2021).

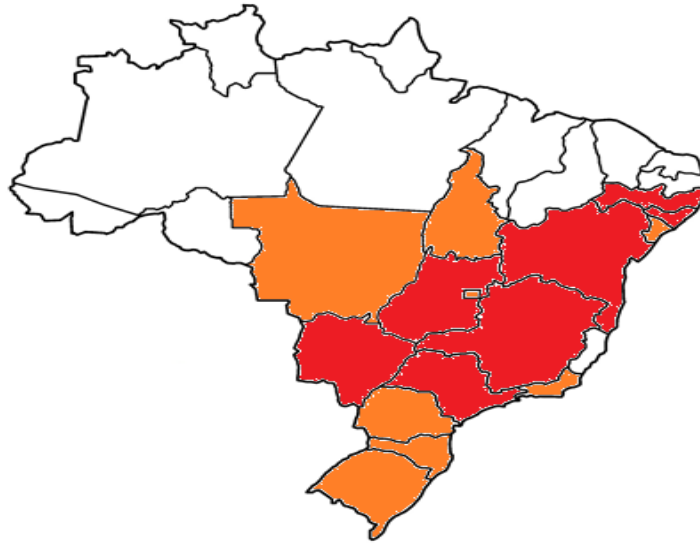


Figura 4 - Distribuição geográfica do ISKNV no Brasil: estados com diagnóstico confirmado de ISKNV (vermelho) e com risco elevado/evidência da circulação da doença (laranja).

Atualmente, a forma de transmissão da doença majoritariamente descrita e aceita cientificamente é a horizontal, através da coabitação de peixes infectados com peixes sadios e que a evolução e duração variam dependendo da espécie infectada, do estágio de desenvolvimento e da temperatura da água do tanque (GO; WHITTINGTON, 2019). Por exemplo, em peixes-mandarim inoculados com ISKNV e mantidos em várias temperaturas, os grupos mantidos a 20°C não sofreram mortalidade, enquanto aqueles mantidos a 25°C sofreram 100% de mortalidade com um tempo médio de morte de 15 dias, e aqueles mantidos a 28°C sofreram 100% de mortalidade com um tempo médio de nove dias. A temperatura de 28°C é consistente com a usada em outros estudos experimentais de transmissão envolvendo ISKNV. No entanto, a importância dessa diferença de temperatura relativamente pequena requer uma investigação mais profunda (HE et al., 2002).

A confirmação da transmissão por coabitação, inclusive entre peixes de ambientes marinho e de água doce, podendo acometer espécies de peixes nativos e assim, disseminar a doença por toda a unidade hidrográfica, bem como a capacidade de transmissão vertical (SUEBSING et al., 2016), reforçam o potencial de virulência do ISKNV e a necessidade de esforços contínuos na melhoria da biossegurança no cultivo de espécies de interesse comercial (GO; WHITTINGTON, 2019).

3.7 EFEITO DA TEMPERATURA NA PATOGENICIDADE DE VÍRUS DE ANIMAIS AQUÁTICOS

A doença é o resultado de uma interação complexa entre o hospedeiro, seu ambiente e os patógenos. Nesse contexto, a temperatura da água é considerada um dos fatores de risco mais importantes, pois influencia o metabolismo, a alimentação, o crescimento, sobrevivência e a resposta imunológica do hospedeiro (YOU et al., 2010).

Estratégias de prevenção e controle de doenças virais em peixes utilizando variações na temperatura da água de cultivo têm sido estudadas para diversas espécies cultivadas. Os organismos aquáticos reagem de uma maneira mais sensível às mudanças físicas ou químicas que ocorrem no ambiente. Tais mudanças podem alterar significativamente a função imunológica normal de organismos heterotérmicos como os peixes. Alterações nos aspectos das respostas imunes, inata e adaptativa, por fatores estressores como mudanças de temperatura, foram avaliadas em várias espécies de peixes (PROPHETE et al., 2006).

A temperatura da água do cultivo afeta diretamente a habilidade que o vírus tem de infectar uma célula hospedeira. Estudos conduzidos por Gilad e colaboradores (2004), sobre a patogenicidade do Koi herpesvirus (KHV), reconhecido mundialmente como patógeno causador de mortalidade entre populações de carpas, demonstraram através da infecção experimental de carpas (*Cyprinus carpio koi* e *Cyprinus carpio carpio*) mantidas em diferentes temperaturas, que a influência da temperatura é um fator chave na replicação do vírus (GILAD et al., 2004), tanto na cultura de células quanto nos tecidos de peixes infectados. As concentrações de DNA de KHV foram avaliadas em diferentes tecidos dos peixes expostos ao vírus e mantidos a temperaturas de água de 13, 18, 23 e 28°C. Análises realizadas por PCR em tempo real detectaram o DNA viral entre os animais expostos ao vírus em todas as quatro temperaturas da água, mas a mortalidade somente foi observada entre os peixes aos 18, 23, e 28°C concluindo que o tempo de exposição ao vírus, a temperatura e suas interações afetaram diretamente as concentrações de DNA viral detectado nos tecidos das carpas expostas ao KHV (GILAD et al., 2004).

Estudos realizados por You e colaboradores (2010), avaliaram os efeitos da temperatura da água na mortalidade de juvenis do camarão japonês (*Marsupenaeus japonicus*) infectados experimentalmente pelo Vírus da síndrome da mancha branca (WSSV) mantidos a temperaturas de 27°C e 31°C. A mortalidade de juvenis infectados com o WSSV foi amplamente reduzida a 31°C em comparação a 27°C. Análises por qPCR mostraram que a

carga viral no tratamento de alta temperatura foi significativamente menor. O efeito da alta temperatura da água inibiu a infectividade do vírus, evitando assim a manifestação da doença e a ocorrência de mortalidade (YOU et al., 2010).

A rápida mudança de temperatura é uma das principais causas de estresse fisiológico em peixes e também um fator crítico no desenvolvimento de imunidade específica e não específica do hospedeiro. Basicamente, a primeira linha do sistema imunológico inato dos peixes contra infecções virais é baseada na expressão do interferon tipo I (IFN-I). Essa citocina induz a expressão de vários genes do tipo ISG (*interferon stimulated genes* - ISGs), que exibem efeitos antivirais. Embora a temperatura seja conhecida por afetar o sistema imunológico do hospedeiro, alterando os níveis de expressão de fatores antivirais, o efeito da temperatura na resposta imune mediada por IFN-I ainda é pouco conhecido (PROPHETE et al., 2006).

Com base nos monitoramentos relacionados junto a empresas no Brasil, os surtos de ISKNV têm ocorrido com maior frequência nas estações de transição de temperatura (Primavera e Outono), quando a temperatura geralmente é mais variável, aumentando, ou estando alta, cai rapidamente. Estudos sobre alguns membros do gênero *Megalocytivirus*, como o ISKNV, RSIV e TRBIV revelaram que os sinais clínicos e mortalidade do hospedeiro foram observados geralmente dentro de uma faixa determinada de temperatura. Não há relatos da ocorrência do ISKNV em tilápias em temperatura inferior a 20°C (ZHANG; SUN, 2017).

Técnicos ganeses relatam, de forma empírica, o sucesso na aplicação do tratamento térmico como medida preventiva na fase de pré-povoamento dos tanques, contra possíveis novos surtos de ISKNV, como os que recentemente assolaram a indústria aquícola africana. No entanto, não há disponibilidade de dados científicos que apoiem essa medida preventiva, ainda que relatada como comprovadamente exitosa. Isso gera uma demanda junto à comunidade científica, na medida em que a ratificação do uso de alta temperatura na água de cultivo como medida protetiva contra manifestação e a propagação do ISKNV no cultivo de tilápias, representaria um importante passo para o controle da doença.

A aplicação do método de tratamento térmico é uma prática comum e comprovadamente eficaz na prevenção de doenças virais na carcinicultura. De acordo com o Manual de Boas Práticas de Manejo e Biossegurança para a Carcinicultura Marinha Nacional da Associação Brasileira de Criadores de Camarão (ABCC), o tratamento térmico preventivo é essencial para a eliminação do Vírus da mancha branca. Para tanto, é recomendado, ainda no laboratório ou, alternativamente, durante a quarentena no berçário intensivo, a elevação

gradual da temperatura da água em 1°C a cada 30 minutos, até que a temperatura se estabilize em 32°C. Aquecedores elétricos, caldeiras térmicas, aquecedores solares e o sistema de *Greenhouse*, popularmente conhecido como invernadeiros ou estufas, podem ser utilizados para a efetivação deste tratamento preventivo (ABCC, 2012).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 AMOSTRAS DE ISKNV

Para a realização do estudo foram utilizados alevinos de tilápia do Nilo previamente diagnosticados como positivos para ISKNV. Para tanto, peixes apresentando sinais clínicos da infecção por ISKNV foram coletados durante surtos em fazendas com histórico positivo para a doença e previamente notificadas para o MAPA. Esses animais foram submetidos ao diagnóstico laboratorial através de exames parasitológico, bacteriológico e qPCR para ISKNV. Amostras positivas de rim e baço foram coletadas assepticamente e armazenadas a -80°C, até o uso na preparação do homogenato viral que foi utilizado para a infecção experimental.

4.2 EXTRAÇÃO DE DNA

A extração de DNA total de aproximadamente 20mg do *pool* de órgãos (baço + rim) dos peixes coletados a campo e provenientes dos estudos de infecção experimental foi realizada utilizando o kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega, EUA) seguindo o protocolo do fabricante. O DNA extraído foi dosado por espectrofotometria no equipamento NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, EUA) e armazenado a -80°C até ser necessário.

4.3 PCR EM TEMPO REAL (qPCR)

As reações de qPCR para detecção e quantificação do ISKNV foram realizadas de acordo com Mohr e colaboradores (2015), com modificações. A qPCR foi realizada seguindo as recomendações do MIQE guidelines (BUSTIN, 2010). Para as reações, foi utilizado o kit GoTaq® Probe Master Mix (Promega, EUA) para volume final de 25µl. As condições da reação de qPCR foram compostas por: passo inicial 95°C durante 20 segundos; 40 ciclos de 95°C por 1 segundo e 60°C durante 20 segundos. Os iniciadores de RSIV (*Red seabream Iridovirus*) forward (5'- TGA CCA GCG AGT TCC TTG ACT T -3') e reverse (5'- CAT AGT CTG ACC GTT GGT GAT ACC-3') foram adquiridos da empresa Integrated DNA

Technologies (IDT, EUA). A sonda de RSIV duplamente marcada com o fluoróforo (FAM) na extremidade 5' e quencher (BHQ-1) na extremidade 3'(FAM-AAC GCC TGC ATG ATG CCT GGCTAMRA) foi adquirida da empresa Sigma-Aldrich (EUA). As amostras foram avaliadas em triplicata e foram consideradas positivas quando a média de ciclos de quantificação (Cq) foi menor que 35.

4.4 DESENVOLVIMENTO DE MODELO DE INFECÇÃO EXPERIMENTAL

4.4.1 Peixes

Nessa primeira etapa, foram utilizados 44 juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com peso médio de 5g adquiridos de uma piscicultura comercial devidamente registrada na Secretária de Aquicultura e Pesca do MAPA (SAP/MAPA). Foram coletados aleatoriamente quatro peixes para a realização de exames parasitológico, bacteriológico e qPCR específico para ISKNV. Os demais animais foram separados em dois grupos de 20 peixes cada. Os animais foram aclimatados por 10 dias em aquários de 57L, a taxa de renovação da água mantida em 2L/h, temperatura a 26°C e aeração suplementar constante. Os peixes foram alimentados com ração comercial contendo 45% de proteína bruta (PB), em uma taxa de 2% do peso vivo (PV) duas vezes ao dia. Todos os experimentos realizados com animais na presente dissertação foram previamente aprovados pela Comissão de ética no uso de animais (CEUA) da UFMG (Protocolo CEUA/UFMG nº 101/2021).

4.4.2 Preparação do homogenato viral

A preparação do homogenato viral foi realizada de acordo com Go e Whittington, (2006, 2019) com modificações. Para isto, foi realizado um *pool* composto por aproximadamente 0,1g de rim e baço oriundos de animais doentes (item 4.1) após a confirmação da infecção por ISKNV por qPCR (item 4.3). O material foi acondicionado em microtubos de 1,5 ml contendo 900µl de meio essencial mínimo (MEM, Sigma-Aldrich, EUA) na proporção de 1:9. Em seguida, os tecidos foram macerados com uso de pistilo estéril até a completa disruptura. Os microtubos foram então homogeneizados em agitador vórtex, durante 30 segundos e posteriormente centrifugados a 1000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e diluído em MEM na proporção de 1:1. O volume total foi duplamente filtrado em membranas de 0,45 µm e 0,22 µm (Jetbiofil, China). Para a inoculação dos grupos controle, metade do volume do total do homogenato viral

filtrado foi inativada a 65°C por uma hora em termobloco. Os volumes, ativo e inativo, foram então armazenados a -80°C até o uso. Duas horas antes do desafio, os homogenatos foram resfriados a 4°C e homogeneizados em agitador vórtex. Foram também separados 100 µl do homogenato viral ativo para a extração total de DNA seguido de detecção e quantificação da carga viral por qPCR.

4.4.3 Infecção experimental

Os animais foram anestesiados via banho em uma solução de benzocaína a 100mg / L (Sigma-Aldrich, EUA). Os animais do grupo teste foram inoculados por via intraperitoneal (IP) com 50 µl de homogenato viral ativo ($4,3 \times 10^4$ vírus/peixe). Os peixes do grupo controle foram inoculados com 0,1 ml do homogenato viral termicamente inativado.

Após a infecção, os animais foram monitorados por um período de 15 dias. Durante o período experimental, dos animais mortos foram coletadas amostras de rim e baço para análise por qPCR para ISKNV.

Ao final do período experimental, todos os animais sobreviventes foram eutanasiados por overdose de benzocaína (250 mg/L) e amostras de rim e baço foram coletadas para qPCR para ISKNV.

4.5 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA TEMPERATURA NA VIRULÊNCIA DO ISKNV EM TILÁPIA

4.5.1 Peixes

Para o experimento, foram utilizados 110 juvenis de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com peso médio de 5g adquiridos de uma piscicultura comercial devidamente registrada na Secretária de Aquicultura e Pesca do MAPA (SAP/MAPA). Os animais foram aclimatados por 10 dias em aquário de 120L, sendo coletados aleatoriamente 10 peixes para a realização de exames parasitológico, bacteriológico e molecular a fim de confirmar a ausência de patógenos (especialmente ISKNV). A taxa de renovação da água mantida em 2L/h, temperatura a 28°C e aeração suplementar constante. Os animais foram alimentados com ração comercial contendo 45% de proteína bruta (PB), em uma taxa de 2% do peso vivo (PV) duas vezes ao dia.

4.5.2 Grupos experimentais

Após a confirmação da ausência de patógenos nos animais, os indivíduos foram divididos homogeneamente em dez aquários de 57L (10 peixes por aquário) e as temperaturas ajustadas de acordo com os diferentes grupos experimentais. Os seguintes grupos experimentais foram avaliados (tabela 5): grupo inoculado com homogenato viral e temperatura de água mantida a 26°C (G1-I); grupo controle inoculado com homogenato viral inativado e temperatura de água mantida a 26°C (G1-C); grupo inoculado com homogenato viral e temperatura de água mantida a 28°C (G2-I); grupo controle inoculado com homogenato viral inativado e temperatura de água mantida a 28°C (G2-C); grupo inoculado com homogenato viral e temperatura de água mantida a 30°C (G3-I); grupo controle inoculado com homogenato viral inativado e temperatura de água mantida a 30°C (G3-C); grupo inoculado com homogenato viral e temperatura de água mantida a 32°C (G4-I); grupo controle inoculado com homogenato viral inativado e temperatura de água mantida a 32°C (G4-C); e finalmente grupo inoculado com homogenato viral e temperatura de água mantida a 34°C (G5-I) e grupo controle inoculado com homogenato viral inativado e temperatura de água mantida a 34°C (G5-C).

Tabela 5 - Grupos experimentais, desafio e temperatura da água.

| Grupo experimental | Nº de peixes por grupo | Desafio com ISKNV | Temperatura da água (Aquário) |
|---------------------------|-------------------------------|----------------------------|--------------------------------------|
| G1-I | 10 | Homogenato viral | 26°C |
| G1-C | 10 | Homogenato viral inativado | 26°C |
| G2-I | 10 | Homogenato viral | 28°C |
| G2-C | 10 | Homogenato viral inativado | 28°C |
| G3-I | 10 | Homogenato viral | 30°C |
| G3-C | 10 | Homogenato viral inativado | 30°C |
| G4-I | 10 | Homogenato viral | 32°C |
| G4-C | 10 | Homogenato viral inativado | 32°C |
| G5-I | 10 | Homogenato viral | 34°C |
| G5-C | 10 | Homogenato viral inativado | 34°C |

4.5.3 Infecção experimental

Os homogenatos virais ativo e inativado foram preparados de acordo com o descrito no item 4.4.2. Os animais foram anestesiados via banho em uma solução de benzocaína a 100mg / L (Sigma-Aldrich, EUA). Os grupos desafiados foram inoculados com 50µl do homogenato filtrado ($4,3 \times 10^4$ vírus/peixe), enquanto os grupos controles foram inoculados com 50µl do homogenato termicamente inativado. O ensaio de infecção experimental teve duração de 15 dias. Diariamente os aquários foram monitorados para avaliação dos sinais clínicos e coleta de animais mortos. Os peixes mortos foram imediatamente submetidos à necropsia, para coleta de rim e baço. As amostras foram fracionadas e parte foi armazenada a -80°C , para posterior extração de DNA (item 4.2) e análises de detecção e quantificação por qPCR (item 4.3). A outra parte foi fixada em formol 10% tamponado para a realização de análises histológicas.

4.6 ANÁLISES HISTOPATOLÓGICAS

Seções transversais dos tecidos de baço e rim foram coletadas de todos os peixes experimentais e fixadas em formol 10% tamponado por 48 horas antes da preservação em etanol 70%. Posteriormente os fragmentos de 2-3 mm foram incluídos em parafina histológica, cortados em micrótomo rotativo Leica RM-2245 (Leica Biosystems Nussloch GmbH) com espessura de 3-4 µm, montados em lâminas de vidro e coradas com hematoxilina e eosina (H&E) e corante de Shorr de acordo com o protocolo padrão para exame histológico em microscopia óptica. Amostras que continham lesões características de células hipertrofiadas com presença de corpúsculos intracitoplasmáticos em um ou mais tecidos foram classificadas como positivas.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As taxas de mortalidade final entre os grupos controle e infectado foram comparadas usando o teste de Qui-Quadrado, sendo considerados estatisticamente diferentes os resultados que apresentaram $P < 0,05$. Para a avaliação do efeito da temperatura na mortalidade foi utilizado o cálculo da Redução do Risco Relativo (RRR) pelo método de Mantel-Haenszel, com intervalo de confiança de 95%. As análises foram realizadas por meio do software GraphPad Prism Version 7.05 (GraphPad Software Inc, USA).

5. RESULTADOS

5.1 MODELO DE INFECÇÃO EXPERIMENTAL

No grupo controle não foram observados sinais clínicos de doenças infecciosas e parasitárias ou mortalidades durante todo o período experimental. Todos os animais apresentaram resultado negativo para ISKNV na qPCR ao final do período experimental.

A doença foi reproduzida com sucesso no grupo desafiado com o homoetato ativo. Os primeiros sinais clínicos da doença, como a apatia, letargia (animais no fundo do aquário), anorexia e melanose foram observados ao terceiro dia pós-infecção (dpi). Os peixes doentes apresentaram outros sinais clínicos como letargia, melanose, ascite e exoftalmia (figura 5). Durante a necropsia dos animais foi observado vísceras pálidas, exsudato na cavidade celomática, palidez branquial e redução do baço (figura 6).

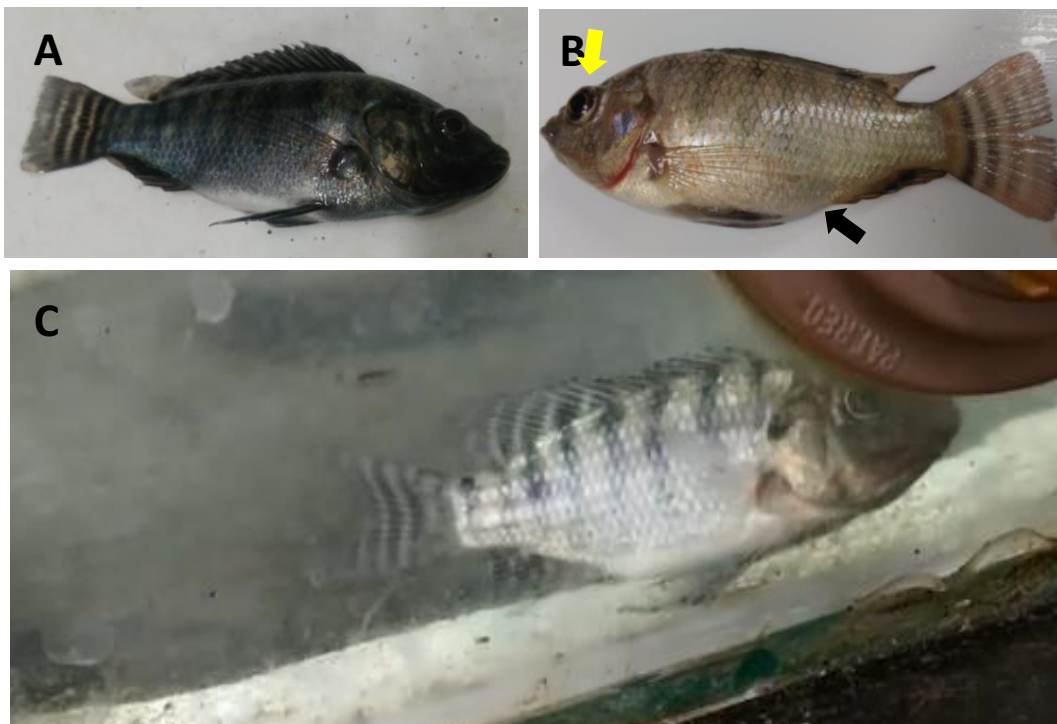


Figura 5 - Animais moribundos do grupo infectado apresentando melanose (A); exoftalmia e ascite (setas; B); peixe em estado letárgico no fundo do aquário (C).

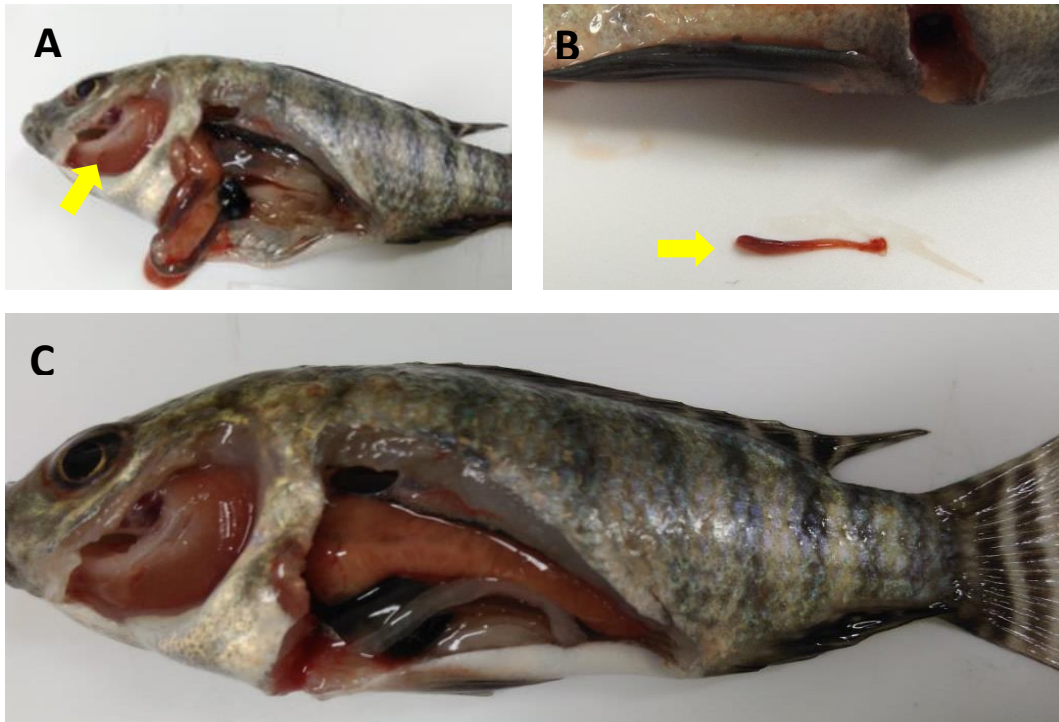


Figura 6 - Animais moribundos do grupo infectado apresentando palidez branquial (seta;A), redução do baço (seta; B) e palidez visceral com presença de exsudato (C).

Na figura 7 é apresentado um gráfico da mortalidade diária durante o período experimental. O primeiro registro de morte ocorreu no quinto dia pós-infecção, marcando também o pico da mortalidade diária com 11 peixes mortos (55%). Dois animais mortos ao sexto dia (65%), um ao oitavo dia (70%) e um ao 11º dia (75%). As análises de qPCR para ISKNV, para todos os animais do grupo infectado com o homogenato ativo, mortos e sobreviventes, os testes de qPCR apresentaram resultados positivos para o vírus.

A infecção experimental por inoculação via intraperitoneal com 50ul do homogenato viral ativo (ISKNV), produziu ao término do experimento uma taxa de mortalidade de 75%.

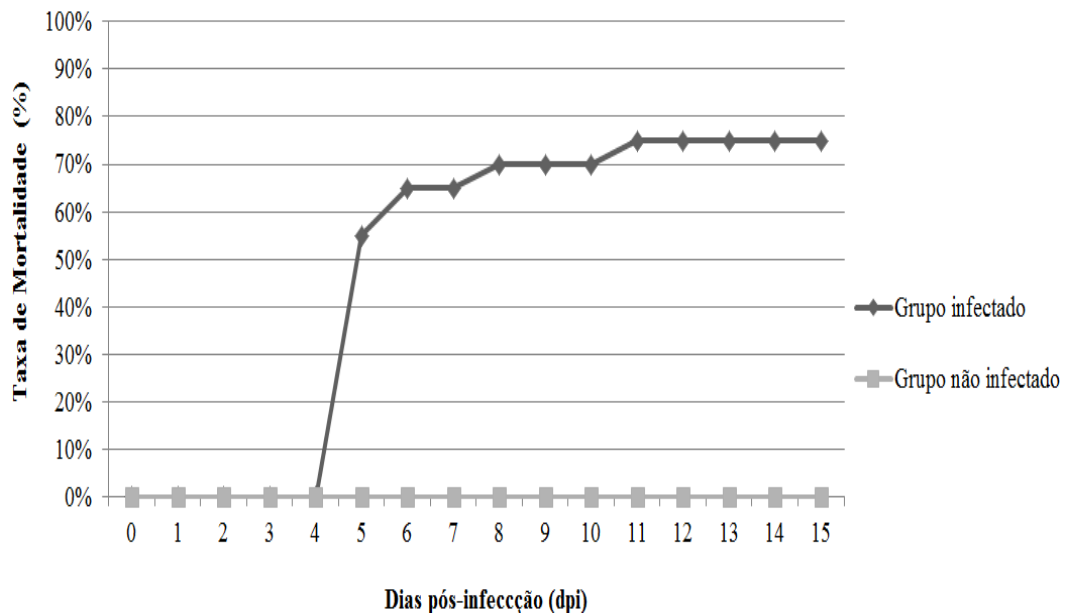


Figura 7 - Mortalidade acumulada em juvenis de tilápia durante período de infecção experimental por ISKNV.

5.2 EFEITO DA TEMPERATURA NA VIRULÊNCIA DO ISKNV

Nos grupos controles não foram observados sinais clínicos de doenças infecciosas e parasitárias ou mortalidades durante todo o período experimental. Todos os animais apresentaram resultado negativo para ISKNV em testes de qPCR ao final do período experimental.

A doença foi reproduzida com sucesso nos grupos desafiados e efeito pronunciado da temperatura foi verificado. No grupo de peixes infectado e mantido a 26°C foram registrados seis peixes mortos (60%), todos com resultado positivo em teste de qPCR para o vírus. Dos quatro animais sobreviventes desse grupo dois testaram positivo (portadores) e dois testaram negativo. No grupo infectado e mantido a 28°C foram registrados quatro peixes mortos (40%), todos com resultado positivo em teste de qPCR. Dos seis peixes sobreviventes desse grupo apenas um testou positivo (portador) e cinco testaram negativo em teste de qPCR para o vírus. No grupo de peixes infectado e mantido a 30°C foram registrados três animais mortos (30%), todos com resultado positivo para o vírus. Dos sete peixes sobreviventes desse grupo dois testaram positivo para o vírus (portadores) e cinco testaram negativo em teste de qPCR. No grupo infectado e mantido a 32°C não houve registro de mortalidade e todos os peixes ao término do período testaram negativo para o vírus em teste de qPCR, da mesma forma, não houve registro de mortalidade no grupo infectado e mantido a 34°C. No entanto, dois peixes

sobreviventes testaram positivos para o ISKNV. Na tabela 6 são apresentados o RR, RRR, IC_{95%} e resultado do teste de Qui-quadrado para os grupos infectados comparados ao grupo 26°C, considerado controle positivo no presente estudo.

Tabela 6 - Mortalidade e análises estatísticas dos grupos experimentais submetidos a diferente temperatura da água.

| Grupo Experimental | Mortalidade | | | | | | | | Sobreviventes | | |
|--------------------|-------------|----|-----|-----|-----------------|----------------|--------------------------------|----------------|---------------|------|----|
| | Sim | | Não | | RRR | | | P ⁴ | Total | qPCR | |
| | n | % | n | % | RR ¹ | % ³ | IC _{95%} ² | | | + | - |
| G1-I (26°C) | 6 | 60 | 4 | 40 | --- | --- | --- | --- | 4 | 2 | 2 |
| G2-I (28°C) | 4 | 40 | 6 | 60 | 0,67 | 33,33 | 0,328- | 0,0046 | 6 | 1 | 5 |
| G3-I (30°C) | 3 | 30 | 7 | 70 | 0,50 | 50 | 0,492- | 0,00002 | 7 | 2 | 5 |
| G4-I (32°C) | 0 | 0 | 10 | 100 | 0 | 100 | --- | >0,00001 | 10 | 0 | 10 |
| G5-I (34°C) | 0 | 0 | 10 | 100 | 0 | 100 | --- | >0,00001 | 10 | 2 | 8 |

IC 95%: Intervalo de confiança; P value: Qui-Quadrado (X²); RR: Risco Relativo; RRR: redução do Risco Relativo.

5.3 HISTOPATOLOGIA

Na avaliação histopatológica do baço dos animais doentes foi possível identificar uma predominância de polpa branca, majoritariamente composta por células linfoides e macrófagos com presença de degeneração hialina. Em algumas células linfoides é possível observar o aumento do volume citoplasmático (megalócitos), com presença de corpúsculos basofílicos intracitoplasmáticos (sugestivos de partículas virais) rechaçando o núcleo perifericamente (figura 8). Adicionalmente, foi possível identificar raras figuras de apoptose em linfócitos.

Na avaliação dos fragmentos histológicos de rim foi possível observar áreas com degeneração tubular predominantemente hialina (figura 8 e figura 9), com presença de corpúsculos intracitoplasmáticos preenchendo totalmente o citoplasma das células do epitélio tubular. Associado, foi possível identificar a presença discreta de degeneração hidrópica e figuras de apoptose em túbulos renais, reação de células mesangiais em raros glomérulos renais.

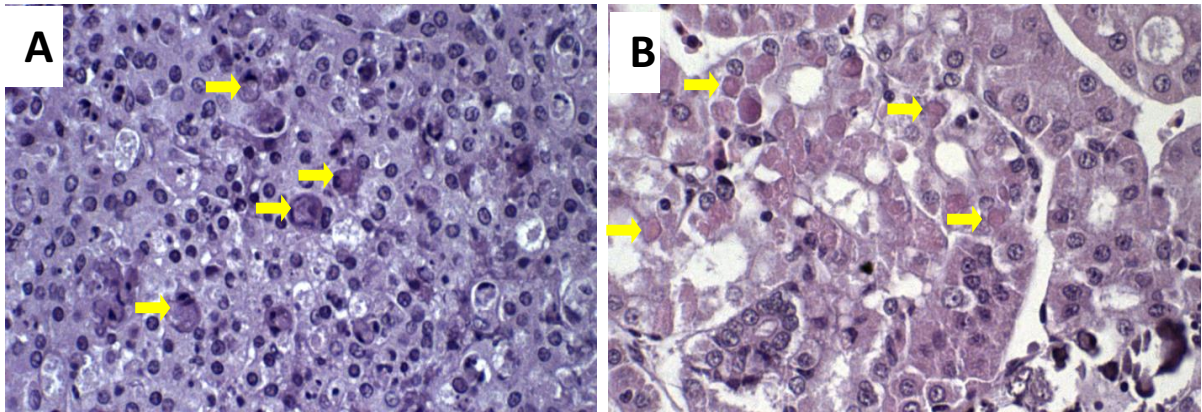


Figura 8 - (A): Baço, peixe G2-P7 (*Oreochromis niloticus*) experimentalmente infectado com ISKNV. Fragmento histológico apresentando área de polpa branca com presença predominante de células linfóides e macrófagos com presença de degeneração hialina. Em algumas células linfóides é possível observar o aumento do volume citoplasmático (megalócitos), com presença de corpúsculos basofílicos intracitoplasmáticos (sugestivos de partículas virais) rechaçando o núcleo periféricamente (setas). Técnica de coloração em Hematoxilina e Eosina (H&E), aumento de 600x. (B): Rim, peixe G2-P7 (*Oreochromis niloticus*) experimentalmente infectado com ISKNV. Fragmento histológico apresentando região de córtex renal, representado principalmente por túbulos renais com presença de degeneração hialina. Em algumas células do epitélio tubular renal é possível observar aumento de volume citoplasmático, com presença de corpúsculos eosinofílicos intracitoplasmáticos. Técnica de coloração em Hematoxilina e Eosina (H&E), aumento de 600x.

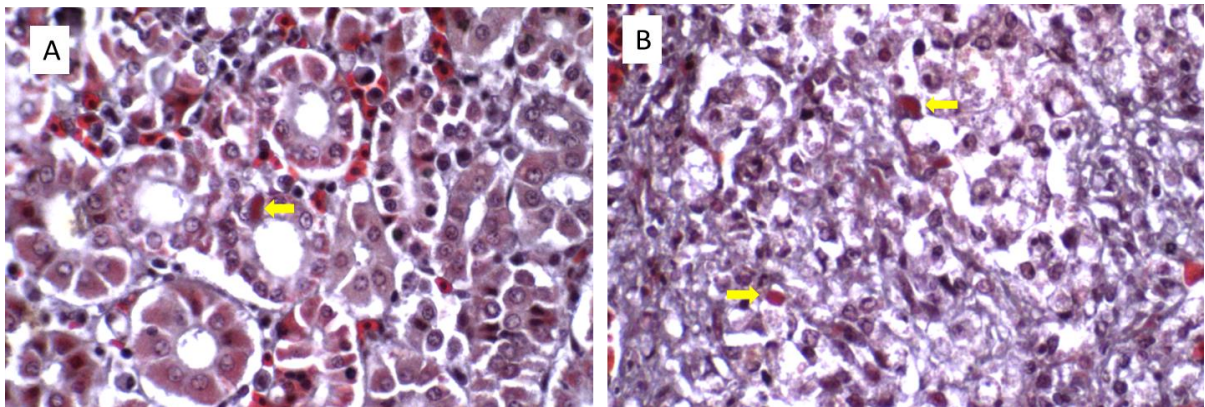


Figura 9 - (A): Rim, peixe G2-P6 (*Oreochromis niloticus*) experimentalmente infectado com ISKNV. Fragmento histológico apresentando células do epitélio tubular renal com degeneração hialina e presença de corpúsculo de inclusão intracitoplasmático sugestivo de partículas virais (seta). Técnica de coloração em corante de Shorr, aumento de 600x. (B): Baço, peixe G2-P6 (*Oreochromis niloticus*) experimentalmente infectado com ISKNV. Fragmento histológico apresentando células linfóides aumentadas com inclusão de corpúsculo intracitoplasmático sugestivo de partículas virais (setas). Técnica de coloração em corante de Shorr, aumento de 600x.

6. DISCUSSÃO

Embora o ISKNV tenha sido reportado já na década de 1990 acometendo peixes marinhos na Ásia, a evolução do vírus nos últimos anos possibilitou o aumento do seu espectro de espécies susceptíveis, bem como a sua distribuição geográfica. As tilápias representam o terceiro grupo de peixes mais cultivados no mundo e, por esse motivo, tem grande importância econômica e social, principalmente em regiões em que a produção do pescado é a mais importante atividade econômica, bem como a principal fonte de proteína de origem animal para o consumo humano. Os surtos de ISKNV acometendo tilápias cultivadas, que de forma emergente foram relatados a partir de 2015 na Tailândia, e rapidamente se espalharam para outros países, como Gana, Estados Unidos e, de maneira especial para o Brasil onde temos observado um rápido avanço na propagação do vírus, reforça a ameaça que o ISKNV representa ao desenvolvimento da atividade e nos impõe a necessidade de buscar mitigar esse problema.

Para uma melhor compreensão da dinâmica que envolve o surgimento e o desenvolvimento da doença é essencial a utilização de modelos de infecção experimental. Esses protocolos permitem a observação de aspectos da patogênese viral e de como efetivamente pode ocorrer o processo de transmissão do vírus. Além disso, possibilita também experimentalmente o desenvolvimento de métodos de prevenção e controle da doença. No entanto, a obtenção do agente viral para aplicação nos modelos de infecção experimental com o ISKNV não é tarefa simples. O isolamento do vírus a partir de peixes de água doce é laborioso e difícil. Assim, o principal método alternativo utilizado é a inoculação de homogenato viral obtido a partir do tecido de animais naturalmente infectados com o vírus.

Experimentos conduzidos por Go e Whittington (2006), obtiveram sucesso ao testar a hipótese de que um surto de ISKNV que acometeu o cultivo de alevinos do bacalhau Murray (*Maccullochella peelii*) em 2003, na Austrália, possa ter surgido através da introdução do vírus por gouramis ornamentais (*Colisa lalia*) importados do Sudeste Asiático. Nesse estudo, a utilização de um modelo de infecção experimental para o bacalhau Murray possibilitou avanços do conhecimento sobre a patogênese e formas de transmissão da doença. A inoculação intraperitoneal em alevinos do bacalhau Murray usando homogenato viral filtrado de tecido de gourami anão com resultado positivo para o vírus, em teste realizado por PCR específico, resultou em mortalidade superior a 90% dos alevinos do bacalhau Murray. A mortalidade também foi induzida pela coabitação entre alevinos de bacalhau Murray e o

gourami não infectado. Durante o experimento também foi confirmada a transmissão através do compartilhamento do fluxo de água entre as duas espécies que estavam em aquários separados. Esses achados confirmaram que o bacalhau Murray é altamente suscetível ao megalocitivirus presente em peixes ornamentais importados do Sudeste Asiático, bem como a possibilidade da transmissão do vírus entre regiões epidemiológicas relacionadas pelo compartilhamento de águas.

O presente estudo obteve êxito na proposição de um modelo de infecção experimental em juvenis de tilápia do Nilo, a partir da adaptação do protocolo de infecção por via de injeção intraperitoneal de homogenato viral obtido de tecidos de tilápias positivas para o vírus em testes de PCR específico. Os primeiros sinais clínicos da infecção puderam ser observados a partir do terceiro dia pós- infecção (dpi), como a perda do apetite e a permanência de alguns peixes no fundo do aquário. Sinais importantes como melanose e perda do equilíbrio também foram observados. No quarto dpi os peixes mais sintomáticos já não reagem a estímulos de fuga, permanecendo no fundo do tanque. A mortalidade teve início no quinto dia pós- infecção, marcando também o pico da mortalidade diária com 11 peixes mortos (55%) chegando a 75% ao término do experimento. No grupo controle não houve mortalidade e os animais alimentavam-se normalmente. Observações semelhantes foram registradas por Go e colaboradores (2006) com mortalidade a partir do oitavo dpi, e comportamentos como perda do apetite, permanência no fundo, melanose e frequência respiratória alterada.

Regimes de exposição ao Koi herpesvirus (KHV) em temperaturas permissivas seguidas por mudanças para temperaturas mais altas (30°C), tem sido utilizado para carpa koi (*Cyprinus carpio koi*) e carpa comum (*Cyprinus carpio carpio*) destinadas à exportação em Israel (RONEN et al., 2003). Esses tratamentos de temperatura reduzem significativamente a mortalidade e os peixes que sobrevivem ao processo são comercializados como "imunes". Testes de PCR convencional em tecidos de peixes "imunes" não detectaram o DNA viral, e quando expostos novamente ao vírus apresentaram mortalidade consideravelmente reduzida (39% em comparação com 80 - 90% nos controles). Por último, relata-se que a coabitação de peixes "imunes" com peixes não expostos ao vírus não resulta na transmissão da doença (RONEN et al., 2003).

Resultados e benefícios semelhantes também foram relatados por You e colaboradores (2010), quando seus estudos demonstraram que a alta temperatura da água reduziu significativamente a mortalidade do camarão japonês (*Marsupenaeus japonicus*) infectado experimentalmente pelo Vírus da síndrome da mancha branca (*White spot syndrome virus* -

WSSV) mantidos a temperaturas de 27°C e 31°C. A mortalidade de juvenis infectados com o WSSV foi amplamente reduzida a 31°C em comparação a 27°C. Análises por qPCR mostraram que a carga viral no tratamento de alta temperatura foi significativamente menor. O efeito da alta temperatura da água inibiu a infectividade do vírus, evitando assim a manifestação da doença e a ocorrência de mortalidade. Esses resultados fornecem aplicações práticas para o controle de WSSV na carcinicultura (YOU et al., 2010).

Pesquisas relacionando faixa de temperatura ótima para a replicação viral e a região climática original da espécie hospedeira mostram certa complexidade. Assim, ainda que de modo geral, as doenças virais que acometem peixes de clima temperado sejam favorecidas pelo aumento da temperatura, as doenças virais em peixes tropicais nem sempre são potencializadas pela queda na temperatura, conforme observado em relatos de ocorrência de TiLV, VNN e TiPV, que estão entre os principais vírus que acometem tilápias e apresentam potencial infectividade em uma faixa mais ampla de temperatura 25-30°C. Tomando por exemplo a solha (*Paralichthys olivaceus*), um peixe de clima temperado, que mostra uma alta taxa de mortalidade pelo Vírus da septicemia hemorrágica viral (*Viral hemorrhagic septicemia virus-VHSV*) sob baixas temperaturas no inverno e na primavera, mas não apresenta mortalidade em temperatura acima de 20°C e, de modo oposto, a tilápia (*Oreochromis niloticus*), um peixe de clima tropical, que tem sofrido mortalidade massiva quando acometida pelo Vírus da tilápia do lago (*Tilapia lake virus – TiLV*), também conhecido como “Síndrome da mortalidade de verão” e que tem sua infectividade potencializada com o aumento da temperatura.

Durante a etapa do presente experimento onde foi avaliado o efeito da temperatura da água sobre a manifestação da doença causada pelo ISKNV, bem como sobre a carga viral remanescente nos peixes infectados e submetidos aos diferentes tratamentos de temperatura (26, 28, 30 32 e 34°C), foi constatado que os juvenis de tilápia experimentalmente infectados com o vírus e mantidos em temperatura de 32 e 34°C não sofreram mortalidade e testes de qPCR específico para o ISKNV em 15 dpi mostraram significativa redução da presença do DNA viral nos tecidos desses animais. De modo contrário, os peixes mantidos nas temperaturas mais baixas 26, 28 e 30°C, desenvolveram a doença e sofreram mortalidade evidenciando a infectividade do vírus nessa faixa de temperaturas. Esses resultados são semelhantes aos verificados para outros animais aquáticos e patógenos virais. Os experimentos de You e colaboradores (2010) demonstraram uma inibição na infectividade do WSSV em camarões, bem como redução na carga viral a 31°C. De forma semelhante,

resultados de Ronen e colaboradores (2003), que estudaram carpas infectadas com o KHV, chegaram a classificar como imunes as que sobrevivem ao tratamento de temperatura de 30°C.

Investigando alterações de expressão gênica de fatores relacionados à resposta imune, pesquisadores concluíram que uma resposta imune apoptótica mais eficaz foi crucial na sobrevivência do hospedeiro em temperaturas mais altas. Esse fenômeno de patogenicidade dependente da temperatura tem sido relatado em diversos casos de infecções virais em peixes cultivados. A apoptose mediada predominantemente por caspases é conhecida por controlar efetivamente a replicação viral. Um efeito favorável à inibição da replicação viral em função da dependência da temperatura na resposta imune de peixes, foi relatado durante o experimento de infecção por VHSV em linguado (*Paralichthys olivaceus*) (AVUNJE et al., 2012), com a constatação de uma elevada expressão de MHC classe I (*Histocompatibility complex class I* - MHC-I) e células citotóxicas T CD8 no estágio inicial de infecção do grupo tratado com alta temperatura. Essa expressão permaneceu elevada durante o período de recuperação cerca de duas vezes maior que os níveis observados no grupo tratado com baixa temperatura. Os antígenos virais que são apresentados via MHC I são reconhecidos por células T CD8 virgens que então se proliferam para se tornar células T efetoras que reconhecem as células infectadas por vírus e secretam um conjunto de indutores de morte celular, como granzima e perforina para iniciar apoptose (CHÁVEZ-GALÁN et al., 2009).

Outra pesquisa recente sobre o efeito da temperatura modulando a resposta imunológica por expressão gênica antiviral foi realizada por Wang e colaboradores (2020). Esse estudo avaliou o efeito da temperatura na infecção do linguado (*Paralichthys olivaceus*) pelo Hirame novirhabdovirus (HIRRV), também denominado Vírus da Septicemia Hemorrágica Viral ou Rhabdovirus do Linguado, pertencente à família *Rhabdoviridae*, que infecta várias espécies de peixes, com ampla distribuição geográfica. O experimento foi realizado em grupos infectados e mantidos em temperaturas de 10°C e 20°C. Os resultados mostraram que após a infecção com HIRRV, nos dois grupos, os genes diferencialmente expressos no baço foram aumentados em vias inflamatórias relacionadas ao sistema imunológico, como a via de sinalização do receptor Toll-like (*Toll-like receptors* - TLR), via de sinalização do receptor do tipo RIG-I (*Retinoic acid-inducible gene I*), que é um receptor de reconhecimento de padrão citosólico (*Pattern recognition receptor* - PRR) responsável pela resposta do interferon tipo 1 (IFN1) e também houve aumento na expressão de fagócitos, lisossomas e genes relacionados à endocitose. No entanto, em comparação com o grupo

infectado a 10°C, alguns genes da via de sinalização de RLRs (*RIG-I-like receptors* - RLRs) foram significativamente aumentados a 20°C. Assim, os pesquisadores especulam que a via de RLRs pode estar relacionada à resposta anti-HIRRV do linguado, visto que testes de qRT-PCR detectaram padrões de expressão mais altos de genes-chave da via de sinalização de RLRs, incluindo MDA5, LGP2, IRF3, IRF7, IFN I-3 e IFN- γ (WANG et al, 2020)

A proposição da aplicação a campo de um tratamento térmico preventivo contra o ISKNV em juvenis de tilápia considera o histórico dos resultados obtidos nas diversas pesquisas realizadas com outras espécies de peixes de cultivo no enfrentamento de doenças virais. A padronização desse tratamento a campo já é prática de rotina no cultivo de camarões peneídeos, na prevenção da infecção do WSSV, e pode de forma muito similar, ser implementado em larviculturas de tilápia ou em fazendas de engorda que recebam as formas jovens em estruturas de pré-povoamento. Equipamentos ou estruturas para o aquecimento da água podem ser adotados de acordo com as especificidades das instalações da unidade produtora. Aquecedores elétricos ou solares podem ser utilizados em estruturas menores, por exemplo, tanques elevados ou caixas de polipropileno, que em larviculturas podem receber alevinos, durante quarentena antes do envio ou juvenis na etapa de pré-povoamento dos tanques em propriedades de engorda. Para a aplicação do tratamento térmico preventivo onde a produção requer instalações maiores, como tanque escavado, existe a possibilidade da montagem de coberturas, usualmente denominadas por estufas ou sistemas de *greenhouse*. Essas estruturas podem cobrir tanques de médio ou grande porte. As principais diferenças nos projetos de estufas envolvem o tipo e a qualidade dos materiais de construção. A durabilidade desses projetos vai depender da forma de execução e do tipo de manutenção que irá receber. Estruturas montadas com concreto e hastes metálicas são mais caras, porém mais resistentes e duráveis.

Em estudo realizado pelo Centro Nacional de Aquicultura e Investigações Marinhas, no Equador (CENAIM), os pesquisadores registraram entre Setembro de 2002 a Agosto de 2003, a variação entre as temperaturas de tanques cobertos com o sistema de *greenhouse* e tanques abertos (CALDERÓN, J.; SONNENHOLZNER, 2004). A diferença de temperatura entre os tanques variou de 3,5°C a 5°C em média, dependendo da estação e das condições meteorológicas diárias. A curva de temperatura da água seguiu um padrão anual, atingindo valores entre 32°C e 34°C de Dezembro a Junho. As temperaturas mais baixas ocorreram durante o inverno, que é caracterizado no Equador pela prolongada nebulosidade. No entanto, durante esse período mais frio, as temperaturas dos tanques cobertos se mantiveram próximas

a 30°C. Esses dados reforçam a possibilidade da aplicação a campo do tratamento térmico na prevenção do ISKNV no cultivo de tilápia no Brasil, pois uma condição térmica ideal para a eficácia do tratamento seria facilmente alcançada, uma vez que o país é naturalmente favorecido pela predominância de climas quentes.

7. CONCLUSÕES

A reprodução da infecção do ISKNV em condições experimentais em juvenis de tilápia do Nilo foi realizada com sucesso. Isso possibilitará novas pesquisas no sentido de ampliar o conhecimento sobre aspectos da transmissão, patogênese da doença, bem como avaliar estratégias de prevenção e controle. Concordantemente, a eficiência do modelo de infecção experimental proposto para juvenis de tilápia do Nilo nesse estudo, possibilitou a investigação sobre os efeitos da temperatura no desenvolvimento da doença e a demonstração da ausência da replicação do ISKNV em juvenis de tilápia infectados e mantidos em temperatura acima de 30°C.

Embora não tenham sido investigadas nesse estudo, as alterações nos níveis de expressão de fatores envolvidos na relação da resposta imunológica antiviral e a temperatura, os resultados corroboram com os demais estudos citados sobre a importância da temperatura na sobrevivência de espécies de peixes infectados por doenças virais. Assim, a possível indicação do tratamento com alta temperatura na contenção da manifestação da doença e da mortalidade de juvenis de tilápia do Nilo infectados pelo ISKNV é factível, a exemplo do que acontece no controle do WSSV na carcinicultura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABCC. Boas práticas de manejo e biossegurança para a carcinicultura marinha nacional, 2012. Disponível em: https://abccam.com.br/wp-content/uploads/2012/02/BPMS_E_BIOSSEGURANA_-_ABCC_FEVEREIRO_2012.pdf. Acessado em: 09 abr. 2021.
- ADAMS, M. J. et al. Changes to taxonomy and the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch. Virol.*, v.162, p.2505-2538, 2017.
- ARIEL, E.; OWENS, L. Epizootic mortalities in tilapia *Oreochromis mossambicus*. *Dis. Aquat. Org.*, v. 29, p. 1–6, 1997.
- AVUNJE, S. et al. Temperature-dependent viral replication and antiviral apoptotic response in viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV)-infected olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish Shellfish Immunol.*, v. 32, n. 6, p. 1162–1170, 2012.
- BARROSO, R.M.; MUÑOZ, A.E.P.; CAI, J. Social and economic performance of tilapia 663 farming in Brazil. *FAO Fisheries and Aquaculture*, Circular No. 1181. Rome, FAO. 664 Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO, 2019.
- BASRI, L. et al. Co-infections of tilapia lake virus, *Aeromonas hydrophila* and *Streptococcus agalactiae* in farmed red hybrid tilapia. *Animals*, v. 10, n. 11, p. 1–12, 2020.
- BIGARRÉ, L. et al. Outbreak of betanodavirus infection in tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), in fresh water. *J. Fish Dis.*, v. 32, n. 8, p. 667–673, 2009.
- BUSTIN, S. A. Why the need for qPCR publication guidelines?-The case for MIQE. *Methods*, v. 50, n. 4, p. 217–226, 2010.
- CALDERÓN, J.; SONNENHOLZNER, S. Greenhouse systems a promising technique against WSSV in Ecuador. *Glob. aquacult. advocate*, p. 64-65, 2004.
- CHAPUT, D. L. et al. The segment matters: Probable reassortment of tilapia lake virus (TiLV) complicates phylogenetic analysis and inference of geographical origin of new isolate from Bangladesh. *Viruses*, v. 12, n. 3, p. 1–17, 2020.
- CHÁVEZ-GALÁN, L. et al. Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes. *Cell. Mol. Immunol.*, v. 6, n. 1, p. 15–25, 2009.
- CHINCHAR, V. G. et al. Ranaviruses (family *Iridoviridae*): emerging cold-blooded killers. *Arch. Virol.*, v. 147, p. 447–470, 2002.
- CHINCHAR, V. G. et al. ICTV virus taxonomy profile: *Iridoviridae*. *J. Gen. Virol.*, v. 98, n. 5, p. 890–891, 2017.
- CONTRERAS, H. et al. First report of tilapia lake virus emergence in fish farms in the department of Córdoba, Colombia. *Vet. World*, v. 14, n. 4, p. 865–872, 2021.
- CRANE, M. S. J.; WILLIAMS, L. N. Viruses of salmonids: Virus isolation in fish cell lines. *Australian and New Zealand Standard Diagnostic Procedure*, 2008. Disponível em: <https://www.awe.gov.au › anzsdp>. Acessado em: 14 nov. 2021.

- CULLEN, B. R.; OWENS, L.; WHITTINGTON, R. J. Experimental infection of Australian anurans (*Limnodynastes terraereginae* and *Litoria latopalmata*) with Bohle iridovirus. *Dis. Aquat. Org.*, v. 23, n. 2, p. 83–92, 1995.
- DONG, H. T. et al. Naturally concurrent infections of bacterial and viral pathogens in disease outbreaks in cultured Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) farms. *Aquaculture*, v. 448, p. 427–435, 2015.
- DONG, H. T. et al. Fish & Shellfish Immunology Infectious spleen and kidney necrosis disease (ISKND) outbreaks in farmed barramundi (*Lates calcarifer*) in Vietnam. *Fish Shellfish Immunol.*, v. 68, p. 65–73, 2017.
- EYNGOR, M. et al. Identification of a novel RNA virus lethal to tilapia. *J. Clin. Microbiol.*, v. 52, n. 12, p. 4137–4146, 2014.
- FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action. 689 Rome, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.4060/ca9229>. Acessado em: 30 ago. 2021.
- FATHI, M. et al. Identification of Tilapia Lake Virus in Egypt in Nile tilapia affected by ‘summer mortality’ syndrome. *Aquaculture*, v. 473, n. 2016, p. 430–432, 2017.
- FERGUSON, H. W. et al. Syncytial hepatitis of farmed tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.): A case report. *J. Fish Dis.*, v. 37, n. 6, p. 583–589, 2014.
- FIGUEIREDO, H. C. P. et al. First report of infectious spleen and kidney necrosis virus in Nile tilapia in Brazil. *Transbound. Emerg. Dis.*, n/n, p. 1–8, 2021.
- FIGUEIREDO, H. C. P.; LEAL, C. A. G. Tecnologias aplicadas em sanidade de peixes. *Rev. Bras. de Zootec.*, v. 37, p. 8–14, 2008.
- FU, X. et al. Protective immunity against infectious spleen and kidney necrosis virus induced by immunization with DNA plasmid containing mcp gene in Chinese perch *Siniperca chuatsi*. *Fish Shellfish Immunol.*, v. 40, p. 259–266, 2014.
- GILAD, O. et al. Concentrations of a Koi herpesvirus (KHV) in tissues of experimentally infected *Cyprinus carpio koi* as assessed by real-time TaqMan PCR. *Dis. Aquat. Org.*, v. 60, n. 3, p. 179–187, 2004.
- 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*) in Australia. *Aquaculture*, v. 258, n. 1–4, p. 140–149, 2006.
- GO, J.; WHITTINGTON, R. Australian bass *Macquaria novemaculeata* susceptibility to experimental megalocytivirus infection and utility as a model disease vector. *Dis. Aquat. Org.*, v. 133, n. 2002, p. 157–174, 2019.
- GOLDSMITH, C. S.; MILLER, S. E. Modern uses of electron microscopy for detection of viruses. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 22, n. 4, p. 552–563, 2009.
- GOODWIN, A. E.; MERRY, G. E.; ATTOUI, H. Detection and prevalence of the Nonsyncytial American grass carp reovirus Aquareovirus G by quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction. *J. Aquat. Anim. Health*, v. 22, n. 1, p. 8–13, 2010.
- GUDDING, R.; GOODRICH, T.; LILLEHAUG, A.; EVENSEN, O. (Eds). *Fish Vaccination*.

United Kingdom: Wiley Blackwell, 2014. 400p.

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

HE, J. G. et al. Experimental transmission, pathogenicity and physical-chemical properties of infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV). *Aquaculture*, v. 204, n. 1–2, p. 11–24, 2002.

HEDRICK, R. P. et al. Characteristics of Four Birnaviruses Isolated from Fish in Taiwan. *Fish Pathol.*, v. 18, n. 2, p. 91–97, 1983.

ICTV. Virus Taxonomy: 2020 Release, 2020. Disponível em: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>. Acessado em: 01 fev. 2021.

JANCOVICH, J. K. et al. Family *Iridoviridae*. In: *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. p. 193 – 210. KING, A. M. Q.; ADAMS, M. J.; CARSTENS, E. B.; LEFKOWITZ, E. J. (Eds). Elsevier Academic Press. USA: San Diego, CA. 2012. 1327p.

JOON, B. J. et al. Outbreaks and risks of infectious spleen and kidney necrosis virus disease in freshwater ornamental fishes. *Dis. Aquat. Org.*, v. 78, n. 3, p. 209–215, 2008.

KASLOW, R. A.; STANBERRY, L. R.; LE DUC, J. W. (Eds). *Viral infections of humans: Epidemiology and control*. USA: Springer Science, 2014, p. 39-45.

KIBENGE, F. S. B. et al. Countermeasures against viral diseases of farmed fish. *Antivir. Res.*, v. 95, n. 3, p. 257–281, 2012.

KIBENGE, F. S. B.; GODOY, M. G. (Eds). *Aquaculture virology*. United Kingdom: Academic Press, 2016, p.525.

KURITA, J. et al. Polymerase chain reaction (PCR) amplification of DNA of red sea bream iridovirus (RSIV). *Fish Pathol.*, v. 33, n. 1, p. 17–23, 1998.

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

LAKRA, W. S.; SWAMINATHAN, T. R.; JOY, K. P. Development, characterization, conservation and storage of fish cell lines: A review. *Fish Physiol.*, v. 37, n. 1, p. 1–20, 2011.

LANGDON, J. S.; HUMPHREY, J. D. Epizootic haematopoietic necrosis, a new viral disease in redfin perch, *Perca fluviatilis* L., in Australia. *J. Fish Dis.*, v. 10, n. 4, p. 289–297, 1987.

LAPATRA, S. E. et al. Case report: Concurrent herpesviral and presumptive iridoviral infection associated with disease in cultured shortnose sturgeon, *Acipenser brevirostrum* (L.), from the Atlantic coast of Canada. *J. Fish Dis.*, v. 37, n. 2, p. 141–147, 2014.

LEAL, C. A. G.; FRANÇA, T. M. ISKNV no Brasil. Um ano após o primeiro relato, o que sabemos e aprendemos até aqui. *Panorama da Aqüicultura*, v. 31, n. 184, p. 12 – 21, 2021.

LEE, N. S. et al. Characterization of Virus Distribution in Rock Bream (*Oplegnathus fasciatus*; Temminck and Schlegel) Infected with Megalocytivirus. *J. Comp. Pathol.*, v. 141, n. 1, p. 63–69, 2009.

- LI, Q. et al. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of lymphocystis disease virus. *J. Virol. Methods*, v. 163, n. 2, p. 378–384, 2010.
- LIU, W. et al. Determination of a novel parvovirus pathogen associated with massive mortality in adult tilapia. *PLoS Pathog.*, v. 16, n. 9, p. 1–23, 2020.
- LIU, Y. et al. Elucidating the diversity of aquatic *Microdochium* and *Trichoderma* species and their activity against the fish pathogen *Saprolegnia diclina*. *Int. J. Mol. Sci.*, v. 17, p. 1-15, 2016.
- LOTZ, J. M. Viruses, biosecurity and specific pathogen-free stocks in shrimp aquaculture. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, v. 13, n. 4, p. 405–413, 1997.
- LOVY, J. General Procedures for Electron Microscopy Applications in Diagnostic Virology, 2014. Disponível em: <https://units.fisheries.org/fhs/wp-content/uploads/sites/30/2017/08/2.1.2-Electron-Microscopy-for-Virology.pdf>. Acessado em: 28 out. 2020.
- MACHIMBIRIKE, V. I. et al. Viral infections in tilapines: More than just tilapia lake virus. *Aquaculture*, v. 503, p. 508–518, 2019.
- MAGANHA, D. L. et al. Molecular detection and phylogenetic analysis of megalocytivirus in Brazilian ornamental fish. *Arch. Virol.*, v. 163, p. 2225–2231, 2018.
- MAPA. Plano de Investigação, Prevenção e Controle de Infecção por ISKNV, 2020. Disponível em: <http://www.indea.mt.gov.br/documents/363967/8519906/Plano+ISKNV+-+MAPA.pdf/2e5aefe4-81e2-5986-e1d3-1fd6b7c0d2af>. Acessado em: 08 ago. 2020.
- MOHR, P. G. et al. Molecular confirmation of infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) in farmed and imported ornamental fish in Australia. *Dis. Aquat. Org.*, v. 116, n. 2, p. 103–110, 2015.
- NAKAJIMA, K. et al. Effectiveness of a vaccine against red sea bream iridoviral disease in a field trial test. *Dis. Aquat. Org.*, v. 36, n. 1, 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. *J. Fish Dis.*, v. 38, n. 2, p. 187–195, 2015.
- OH, S. Y.; OH, M. J.; NISHIZAWA, T. Potential for a live red seabream iridovirus (RSIV) vaccine in rock bream *Oplegnathus fasciatus* at a low rearing temperature. *Vaccine*, v. 32, n. 3, p. 363–368, 2014.
- OIE. OIE Aquatic Animal Health Strategy 2021–2025, 2021a. Disponível em: <https://www.oie.int/en/document/oie-aquatic-animal-health-strategy-2021-2025/>. Acessado em: 20 jan. 2021
- OIE. Epizootic Haematopoietic necrosis. In: Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals, 2021b. Disponível em: <https://www.oie.int/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/aquatic-code-online-access/>. Acessado em: 30 jun. 2021.

- PAPERNA, I. Lymphocystis in fish from east african lakes. J. Wildl. Dis., v. 9, p. 331–335, 1973.
- PEIXE-BR. Anuário Peixe BR da Piscicultura 2021, 2021. Disponível em: <https://www.peixebr.com.br/anuario-2021/>. Acessado em: 24 out. 2020.
- PROPHETE, C. et al. Effects of elevated temperature and nickel pollution on the immune status of Japanese medaka. Fish Shellfish Immunol., v. 21, n. 3, p. 325–334, 2006.
- RAMÍREZ-PAREDES, J. G. et al. First detection of infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) associated with massive mortalities in farmed tilapia in Africa. Transbound Emerg Dis., n/n, p. 1–14, 2020.
- RIMMER, A. E. et al. Development of a quantitative polymerase chain reaction (qPCR) assay for the detection of dwarf gourami iridovirus (DGIV) and other megalocytiviruses and comparison with the Office International des Epizooties (OIE) reference PCR protocol. Aquaculture, v. 358–359, p. 155–163, 2012.
- 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*). Prev. Vet. Med., v. 122, n. 1–2, p. 181–194, 2015.
- RONEN, A. et al. Efficient vaccine against the virus causing a lethal disease in cultured *Cyprinus carpio*. Vaccine, v. 21, n. 32, p. 4677–4684, 2003.
- SHETTY, M., MAITI, B., SHIVAKUMAR SANTHOSH, K. et al. Betanodavirus of Marine and Freshwater Fish: Distribution, Genomic Organization, Diagnosis and Control Measures. Indian J. Virol., v. 23, p. 114–123, 2012.
- SHLAPOBERSKY, M. et al. Viral encephalitis of tilapia larvae: Primary characterization of a novel herpes-like virus. Virology, v. 399, n. 2, p. 239–247, 2010.
- SINYAKOV, M. S. et al. Vertical and horizontal transmission of tilapia larvae encephalitis virus: The bad and the ugly. Virology, v. 410, n. 1, p. 228–233, 2011.
- SONG, J. Y. et al. Genetic variation and geographic distribution of megalocytiviruses. J. Microbiol., v. 46, n. 1, p. 29–33, 2008.
- SUBRAMANIAM, K. et al. Megalocytivirus infection in fish. Rev Aquac., v. 4, n. 4, p. 221–233, 2012.
- SUBRAMANIAM, K. et al. Detection and molecular characterization of infectious spleen and kidney necrosis virus from major ornamental fish breeding states in Peninsular Malaysia. J. Fish Dis., v. 37, n. 7, p. 609–618, 2014.
- SUBRAMANIAM, K. et al. Megalocytivirus infection in cultured Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. Dis. Aquat. Org., v. 119, n. 3, p. 253–258, 2016.
- SUEBSING, R. et al. Detection of natural infection of infectious spleen and kidney necrosis virus in farmed tilapia by hydroxynaphthol blue-loop-mediated isothermal amplification assay. J. Appl. Microbiol., v. 121, n. 1, p. 55–67, 2016.
- TAHA, E. et al. Emergence of viral nervous necrosis is associated with mass mortality in

- hatchery-reared tilapia (*Oreochromis niloticus*) in Egypt. *Aquac Int.*, v. 28, n. 5, p. 1811–1823, 2020.
- TIDONA, C. A.; DARAI, G. Molecular anatomy of lymphocystis disease virus. *Arch. Virol.*, v. 13, p. 49–56, 1997.
- TSAI, J.; HUANG, S. PCR Detection and Phylogenetic Analysis of Megalocytivirus Isolates in Farmed Giant Sea Perch. *Viruses*, v. 12, n. 6, p. 1 – 19, 2020.
- WALTZEK, T. B. et al. Systemic iridovirus from threespine stickleback *Gasterosteus aculeatus* represents a new megalocytivirus species (family *Iridoviridae*). *Dis. Aquat. Org.*, v. 98, n. 1, p. 41–56, 2012.
- WANG, H. et al. Transcriptome analysis reveals temperature-dependent early immune response in flounder (*Paralichthys olivaceus*) after HIRRV infection. *Fish Shellfish Immunol.*, v. 107, p. 367-378, 2020.
- WANG, Y. Q. et al. Molecular epidemiology and phylogenetic analysis of a marine fish infectious spleen and kidney necrosis virus-like (ISKNV-like) virus. *Arch. Virol.*, v. 152, n. 4, p. 763–773, 2007.
- WATSON, L. R.; MILANI, A.; HEDRICK, R. P. Effects of water temperature on experimentally-induced infections of juvenile white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) with the white sturgeon iridovirus (WSIV). *Aquaculture*, v. 166, n. 3–4, p. 213–228, 1998.
- WEI, J. Z.; LI, H.; YU, H. Ichthyophthiriasis: emphases on the epizootiology. *Lett. Appl. Microbiol.*, v. 57, p. 90-101, 2013.
- WHITTINGTON, R. J.; BECKER, J. A.; DENNIS, M. M. Iridovirus infections in finfish-critical review with emphasis on ranaviruses. *J. Fish Dis.*, v. 33, n. 2, p. 95–122, 2010.
- XU, L.; FENG, J.; HUANG, Y. Identification of lymphocystis disease virus from paradise fish *Macropodus opercularis* (LCDV-PF). *Arch. Virol.*, v. 159, n. 9, p. 2445–2449, 2014.
- YAMKASEM, J. et al. Uncovering the first occurrence of Tilapia parvovirus in Thailand in tilapia during co-infection with Tilapia tilapinevirus. *Transbound. Emerg. Dis.*, v. 68, n/n, p. 3136-3144, 2021.
- YE, Y. W. et al. Characterization of *Aeromonas hydrophila* from hemorrhagic diseased freshwater fishes in Anhui Province, China. *Int. Food Res. J.*, v. 20, p. 1449-1452, 2012.
- YOU, X. et al. Effect of high water temperature on mortality, immune response and viral replication of WSSV-infected *Marsupenaeus japonicus* juveniles and adults. *Aquaculture*, v. 305, n. 1–4, p. 133–137, 2010.
- ZENG, R. et al. Development of a gene-deleted live attenuated candidate vaccine against fish virus (ISKNV) with low pathogenicity and high protection. *iScience*, v. 24, n. 7, p. 1-24, 2021.
- ZHANG, J.; SUN, L. Transcriptome analysis reveals temperature-regulated antiviral response in turbot *Scophthalmus maximus*. *Fish Shellfish Immunol.*, v. 68, p. 359–367, 2017.
- ZHANG, Q. et al. Rapid diagnosis of turbot reddish body iridovirus in turbot using the loop-mediated isothermal amplification method. *J. Virol. Methods*, v. 158, n. 1–2, p. 18–23, 2009.