

PRIMEIRA DETECÇÃO DE *Infectious Spleen and Kidney Necrosis Virus* (ISKNV) EM CULTIVO DE ESPÉCIES NATIVAS

Francisco Eduardo Pereira ROCHA^{1,2}, João Vitor Godoy TAKASHE¹, Leonardo Mantovani FAVERO¹, Artur Roberto da COSTA¹, Ulisses de Pádua PEREIRA¹

¹ Laboratório de Bacteriologia de Peixes, Universidade Estadual de Londrina – UEL, Londrina, PR, Brasil.

² Endereço: Laboratório de Bacteriologia em Peixes. R. Chuva de Ouro, s/n, Campus Universitário, Universidade Estadual de Londrina – UEL, CEP: 86.057-970, Londrina, PR, Brasil. e-mail: edu13rocha@gmail.com.

Palavras-chave: PCR; peixes Nativos; diagnóstico.

INTRODUÇÃO

A rápida expansão da piscicultura, principalmente devido a produção intensiva dos animais, tem contribuído para o surgimento e disseminação de diversas doenças infecciosas, causando um grande impacto na economia do setor (QUESADA *et al.*, 2013). Dentre estas, destacam-se doenças virais emergentes pertencentes à família *Iridoviridae* como o ISKNV – Vírus da Necrose Infecciosa de Baço e Fígado (MAGANHA, 2016).

No Brasil, o ISKNV foi detectado causando doenças em tilápias (*Oreochromis* spp.) em 2020, com uma taxa de mortalidade de até 75% em alevinos e juvenis no país. (FIGUEIREDO *et al.*, 2021). Os principais sinais clínicos dos animais afetados pelo ISKNV são natação errática, palidez de brânquias e anorexia (HE *et al.*, 2000) e as alterações internas dos animais infectados incluem hepatomegalia e esplenomegalia (KURITA e NAKAJIMA, 2012). Os métodos de diagnóstico mais utilizados são as técnicas moleculares, como a PCR e suas variações para amplificação do DNA viral e posterior análise de algumas regiões específicas do gene MCP (NOLAN *et al.*, 2015; CHINCHAR *et al.*, 2017).

Neste trabalho, demonstramos o primeiro relato de detecção de ISKNV no cultivo de peixes nativos (Tucunaré e Acará) utilizando método de diagnóstico molecular e reconstrução filogenética para identificação do vírus.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de tecidos, incluindo baço e fígado de 12 peixes nativos (10 exemplares de *Cichla ocellaris* – Tucunaré, e 2 exemplares de *Geophangus brasiliensis* - Acará Topete) foram recebidas para diagnóstico em maio de 2021 provenientes de Piraí-RJ; o proprietário relatou morte progressiva de animais no período do fim de abril até a metade do mês de maio de

2021. O DNA foi extraído utilizando aproximadamente 25 mg de tecido usando o kit PureLink Genomic DNA Mini Kit da Invitrogen conforme instruções do fabricante.

As reações em cadeia de polimerase (PCR) e Nested PCR foram realizadas usando o termociclador Qiagen QIamplifier 96 (com primers próprios para detecção do MCP e ISKNV, a partir das metodologias descritas por KURITA e NAKAJIMA (2012) (PCR-Kurita) e KURITA *et al.* (1998) (PCR- OIE). Os amplificadores foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1% em tampão tris/borato/EDTA (TEB) 1% e corados com SYBR Safe DNA (Invitrogen).

Após passarem por PCR foram purificadas por meio de kit Quick Gel Extraction & PCR Purification Combo Kit conforme indicação do fabricante para serem levadas a sequenciamento no sequenciador 3500 Genetic Analyzer Applied Biosystems.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nenhuma das amostras atestou positiva para o vírus pelo protocolo diagnóstico da OIE, porém, todos os materiais testados provaram-se positivos na PCR-Kurita. Dados do nosso laboratório mostram que a PCR da OIE consegue detectar apenas 42% dos animais positivos para ISKNV enquanto a sensibilidade da PCR Kurita é maior que 95%.

As comparações de sequências dos isolados obtidos neste estudo com as sequências previamente disponíveis na plataforma do GenBank revelou uma similaridade de 93,7% a 97,7%. Em comparação com material isolado previamente pela nossa equipe em tilápias do Nilo houve uma semelhança de 100%, indicando que a tilápia do Nilo atua como vetor de transmissão para doença nas espécies nativas. O proprietário dos animais relata a presença e mortalidade de tilápias na represa, indicando a possível fonte de transmissão.

CONCLUSÃO

Este é o primeiro relato de ISKNV em espécies de peixes nativos brasileiros, com uma possível transmissão a partir de tilápias infectadas. Os resultados desse estudo representam um avanço no entendimento da distribuição e características de agentes virais potencialmente associados a doenças graves em cultivo de peixes nativos.

REFERÊNCIAS

CHINCHAR, V.G.; HICK, P.; INCE, I.A.; JANCOVICH, J.K.; MARSCHANG, R.; QIN, Q.; SUBRAMANIAM, K.; WALTZEK, T.B.; WHITTINGTON, R.; WILLIAMS, T.; ZHANG, Q. 2017. ICTV Virus Taxonomy Profile: Iridoviridae. *Journal of General Virology*, 98(5): 890-891. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000818>.

- FIGUEIREDO, H.C.P.; TAVARES, G.C.; DORELLA, F.A.; ROSA, J.C.C.; MARCELINO, S.A.C.; PIEREZAN, F.; PEREIRA, F.L. 2021. First report of infectious spleen and kidney necrosis virus in Nile tilapia in Brazil. *Transboundary and Emerging Diseases*, 1-8. <https://doi.org/10.1111/tbed.14217>.
- HE, J.G.; WANG, S.P.; ZENG, K.; HUANG, Z.J.; CHAN, S.-M. 2000. Systemic disease caused by an iridovirus-like agent in cultured mandarin fish, *Siniperca chuatsi* (Basilewsky), in China. *Journal of Fish Diseases*, 23(3): 219-222. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.2000.00213.x>.
- KURITA, J.; NAKAJIMA, K. 2012. Megalocytiviruses. *Viruses*, 4(4): 521-538. <https://doi.org/10.3390/v4040521>.
- KURITA, J.; NAKAJIMA, K.; HIRONO, I.; AOKI, T. 1998. Polymerase chain reaction (PCR) amplification of DNA of red seabream iridovirus (RSIV). *Fish Pathology*, 33(1): 17-23. <https://doi.org/10.3147/jsfp.33.17>.
- MAGANHA, S.R.L. 2016. *Deteção e caracterização moleculares de vírus das famílias Alloherpesviridae e Iridoviridae em espécies de peixes ornamentais do Brasil*. Pirassununga. (Dissertação de Mestrado. Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo - USP). Disponível em: <<https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/74/74135/tde-01112016-162605/pt-br.php>>.
- NOLAN, D.; STEPHENS, F.; CROCKFORD, M.; JONES, J.B.; SNOW, M. 2015. Detection and characterization of viruses of the genus Megalocytivirus in ornamental fish imported into an Australian border quarantine premises: an emerging risk to national biosecurity. *Journal of Fish Diseases*, 38(2): 187-195. <https://doi.org/10.1111/jfd.12222>.
- QUESADA, S.P.; PASCHOAL, J.A.R.; REYES, F.G.R. 2013. Considerations on the aquaculture development and on the use of veterinary drugs: special issue for Fluoroquinolones - A review. *Journal of Food Science*, 78(9): R1321-R1333, 2013. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12222>.