

## ISOLAMENTO DE ESTIRPE BRASILEIRA DE *Megalocytivirus* A PARTIR DE PEIXE DA ESPÉCIE *Poecilia reticulata*\*

Samara Rita de Lucca MAGANHA <sup>1,2</sup>, Pedro Henrique Magalhães CARDOSO <sup>3</sup>, Simone de Carvalho BALIAN <sup>3</sup>, Loiane Sampaio TAVARES <sup>1</sup>, Thaís Camilo CORRÊA <sup>1</sup>, Silvia Helena Seraphin de GODOY<sup>1</sup>, Andrezza Maria FERNANDES <sup>1</sup> e Ricardo Luiz Moro de SOUSA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade de São Paulo, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da USP - FZEA/USP.

<sup>2</sup> Endereço: Avenida Duque de Caxias Norte, 225 - Campus da USP, CEP: 13635-900 - Pirassununga, SP - Brasil. E-mail: samara.maganha@usp.br.

<sup>3</sup> Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - FMVZ/USP.

\*Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

**Palavras chave:** peixes ornamentais; cultivo celular; vírus; *Iridoviridae*.

### INTRODUÇÃO

A Aquicultura é uma prática antiga que envolve o cultivo de diversas espécies de organismos aquáticos (OTTINGER *et al.*, 2016). Sua rápida expansão está relacionada à crescente demanda mundial por alimentos à base de peixes (BÉNÉ *et al.*, 2015) mas como qualquer setor com crescimento acelerado, a aquicultura está sujeita a ocorrência de doenças que podem ocasionar graves perdas econômicas.

Entre as principais famílias virais de interesse na aquicultura mundial está a família *Iridoviridae*, subfamília *Alphairidovirinae*, que compreende os gêneros *Ranavirus*, *Megalocytivirus* e *Lymphocystivirus* sendo que os três gêneros virais são compostos por vírus grandes de DNA fita dupla que infectam animais vertebrados de sangue frio (CHINCHAR *et al.*, 2017). O gênero *Megalocytivirus* acomete uma ampla variedade de espécies de peixes e encontra-se mundialmente distribuído, sendo descrito inclusive em peixes ornamentais brasileiros (MAGANHA *et al.*, 2018). Os surtos em decorrência desse gênero viral podem causar a morte de 100% dos animais acometidos, causando graves perdas econômicas para o setor aquícola mundial (KODA *et al.*, 2018). Os peixes acometidos apresentam sintomatologia pouco específica sendo, portanto, uma infecção de difícil diagnóstico; dessa forma, preconiza-se para o diagnóstico a realização da técnica molecular de reação em cadeia da polimerase (PCR), bem como o isolamento viral em cultivo celular (OIE, 2018).

### MATERIAL E MÉTODOS

Um *pool* de tecidos (fígado, baço e rins) oriundo de peixe da espécie *Poecilia reticulata* sabidamente positivo ao diagnóstico molecular para *Megalocytivirus* foi submetido ao isolamento viral em células da linhagem BF-2. O isolamento foi realizado conforme protocolo descrito pela OIE (OIE, 2012). Foram realizadas 2 passagens sucessivas com intervalo de sete dias cada até o aparecimento de efeito citopático. A partir da 2ª passagem do inóculo viral foram realizadas 3 passagens sucessivas em garrafas a fim de se aumentar o título viral. A partir da 5ª passagem do inóculo viral, foi realizada a extração do DNA contido na amostra seguido pela reação de *nested*-PCR utilizando 2 pares de *primers* visando à amplificação sequencial de fragmentos de 1.362pb e 369pb do gene MCP de *Megalocytivirus*, de acordo com CHOI *et al.* (2006). O amplicon obtido na eletroforese em gel de agarose foi purificado e enviado para sequenciamento nucleotídico na empresa HELIXXA em Campinas-SP. A pesquisa de similaridade entre a sequência obtida neste estudo e outras sequências do gênero descritas na literatura foi realizada no programa BLAST versão 2.0.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Apenas a amostra referente ao *pool* de tecidos da espécie *Poecilia reticulata* apresentou efeito citopático em placa após a segunda passagem, sendo que o efeito observado caracterizou-se pelo arredondamento celular, despreendimento das células da superfície da placa e posteriormente morte celular. KODA *et al.* (2018), ao realizarem o isolamento de uma estirpe de *Megalocytivirus* em células GF, também observaram a presença de células citomegálicas arredondadas. A confirmação do isolamento foi realizada a partir da quinta passagem do inóculo viral. A eletroforese em gel de agarose contendo os amplicons obtidos no *nested*-PCR, visando à amplificação do gene MCP de *Megalocytivirus*, revelou a presença de uma banda de 900pb, não compatível com o tamanho de fragmento esperado de 369pb. A sequência nucleotídica obtida, a partir do produto de 900pb, apresentou 93% de identidade com a sequência do gene MCP de *Infectious spleen and Kidney necrosis virus* (AB666346), espécie tipo do gênero *Megalocytivirus*. A sequência obtida no estudo realizado por KODA *et al.* (2018) também apresentou valor de identidade elevado (92,4%) quando comparada com a sequência do gene MCP de *Infectious spleen and Kidney necrosis virus*.

## REFERÊNCIAS

- BÉNÉ, C.; BARANGE, M.; SUBASINGHE, R.; PINSTRUP-ANDERSEN, P.; MERINO, G.; HEMRE, G-H.; WILLIAMS, M. 2015 Feeding 9 billion by 2050 – Putting fish back on the menu. *Food security*, Dordrecht, 7: 261-274.
- 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.Y. 2017 ICTV virus taxonomy profile: *Iridoviridae*. *Journal of General Virology*, London, 98: 890–891.
- CHOI, S. K. KWON, S.R.; NAM, Y.K.; KIM, S.K.; KIM, K.H. 2006 Organ distribution of red sea bream iridovirus (RSIV), DNA in asymptomatic yearling and fingerling rock bream (*Oplegnathus fasciatus*) and effects of water temperature on transmission of RSIV into acute phase. *Aquaculture*, Amsterdam, 256: 23-26.
- KODA, S.A.; SUBRAMANIAM, K; FRANCIS-FLOYD, R.; YANONG, R.P.; FRASCA JR., S.; GROFF, J.M.; POPOV, V.L.; FRASER, W.A.; YAN, A.; MOHAN, S.; WALTZEK, T.B. 2018 Phylogenomic characterization of two novel members of the genus *Megalocytivirus* from archived ornamental fish samples. *Diseases of Aquatic Organisms*, Oldendorf, 130: 11–24.
- MAGANHA, S.R.L.; CARDOSO, P.H.M., BALIAN, S.C.; ALMEIDA-QUEIROZ, S.R.; FERNANDES, A.M.; SOUSA, R.L.M. 2018 Molecular detection and phylogenetic analysis of megalocytivirus in Brazilian ornamental fish. *Archives of Virology*, Wien, 163:2225-2231.
- OTTINGER, M.; CLAUSS, K.; KUENZER, C. 2016 Aquaculture: relevance, distribution, impacts and spatial assessments: a review. *Ocean & Coastal Management*, Bromley, 119: 244-266.
- WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH – OIE. (Ed.). 2012 Red sea bream iridoviridal disease. *Manual of diagnostic tests for aquatic animals*. Paris: Office International des epizooties. Chapter 2.3.7. p. 345-356.
- WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH – OIE. (Ed.). OIE-Listed diseases, infections and infestations in force in 2018. 2018. Disponível em:<<http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2016/>>.
- Acesso em: 08 out. 2018.