



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

FRANCISCO EDUARDO PEREIRA ROCHA

**COMPARAÇÃO DE DIFERENTES
MÉTODOS MOLECULARES NA DETECÇÃO DO VÍRUS DA
NECROSE INFECCIOSA DO BAÇO E DO RIM (ISNVK) EM
PEIXES NATIVOS BRASILEIROS CULTIVADOS**
**TÍTULO DO
TRABALHO**

Londrina
2023

FRANCISCO EDUARDO PEREIRA ROCHA

**COMPARAÇÃO DE DIFERENTES MÉTODOS
MOLECULARES NA DETECÇÃO DO VÍRUS DA NECROSE
INFECCIOSA DO BAÇO E DO RIM (ISNVK) EM PEIXES
NATIVOS BRASILEIROS CULTIVADOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Ulisses de Pádua Pereira

Londrina
2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

R672c Rocha, Francisco Eduardo Pereira.
Comparação de diferentes métodos moleculares na detecção do vírus da necrose infecciosa do baço e do rim (ISNVK) em peixes nativos brasileiros cultivados / Francisco Eduardo Pereira Rocha. - Londrina, 2023.
57 f. : il.

Orientador: Ulisses Pádua Pereira.
Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2023.
Inclui bibliografia.

1. Aquicultura - Tese. 2. Doenças em Peixes - Tese. 3. Diagnóstico Molecular - Tese. 4. Tucunaré - Tese. I. Pereira, Ulisses Pádua . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

CDU 63

FRANCISCO EDUARDO PEREIRA ROCHA

**COMPARAÇÃO DE DIFERENTES MÉTODOS MOLECULARES NA
DETECÇÃO DO VÍRUS DA NECROSE INFECCIOSA DO BAÇO E DO
RIM (ISNVK) EM PEIXES NATIVOS BRASILEIROS CULTIVADOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Ulisses de Pádua Pereira
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Elis Lorenzetti
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Alais Maria Dall Agnol
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 21 de dezembro de 2023.

Dedico este trabalho a minha família, minha namorada e todos que me deram suporte e apoio nessa caminhada!

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha profunda gratidão a todas as pessoas que tornaram possível a realização deste trabalho, contribuindo de maneiras únicas, significativas e marcantes.

À minha amada namorada, Lauanda, que esteve ao meu lado com amor, paciência e compreensão, sendo minha fonte constante de inspiração e apoio.

À minha família que mesmo de longe sempre se preocupou e ajudou no que dava nessa caminhada.

À psicóloga Keyse, cujas perspectivas enriquecedoras e apoio emocional foram fundamentais para meu equilíbrio durante os desafios deste percurso.

Ao meu orientador, prof Ulisses, pela orientação, paciência incansável e pelo compartilhamento do conhecimento, que foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.

À minha digníssima coorientadora Alais, cujos insights valiosos e comprometimento contribuíram significativamente para a qualidade e caminhar desta pesquisa.

Às queridíssimas e maravilhosas amigas de labbe Nat, Rafaelle, Larissa, Ellen que ajudaram no que podiam, deixavam o clima mais serenos e sempre um segurando no braço do outro pra não desistir, ter vocês nessa caminhada foram incríveis, marcantes e maravilhosas, obrigado por cada almoço, café, cervejinha gelada ou drink, jogos juntos hahah foi bom demais viver a vida com vocês

Ao pessoal dos diversos laboratórios, que transformaram os momentos de pesquisa em experiências colaborativas e divertidas.

Agradeço também ao Programa Ciência Animal, pela oportunidade e suporte oferecidos ao longo desta jornada acadêmica.

Não poderia deixar de mencionar a gratidão a minha família do Tribos são muitos então resolvi resumir no que são para mim FAMÍLIA, por proporcionarem momentos de fortes emoções e nova vivência haha e amizade que equilibraram as exigências do mundo acadêmico.

Cada um de vocês desempenhou um papel vital nesta conquista, e por isso, meu mais sincero obrigado.

Combativo, aguerrido, vibrante e forte!
(Jackson de Carvalho)

RESUMO

ROCHA, Francisco Eduardo Pereira **Comparação de diferentes métodos moleculares de detecção na detecção do vírus da necrose infecciosa do baço e do rim (ISNVK) em peixes nativos brasileiros cultivados.** 2023. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal – Área de Concentração: Sanidade Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2023.

Tucunaré (*Cichla ocellaris*) e o acará (*Geophagus brasiliensis*) são ciclídeos sul-americanos muito desejados por pescadores e aquaristas. No Brasil, desde 2017, há um número crescente de surtos de vírus da necrose infecciosa do baço e do rim (ISKNV) na produção de tilápia. Neste estudo, relatamos a detecção de ISKNV em tucunaré e acará-pérola cultivados e a caracterização filogenética da sequência parcial do gene MCP de ambos os espécimes. Para isso, 12 peixes (dez tucunarés e dois acarás-pérola) de uma piscicultura que relatou um pico incomum de mortalidade afetando juvenis e adultos foram submetidos a análises bacteriológicas e virais. Fragmentos de baço, fígado, cérebro e rim de cada peixe foram semeados em Ágar Sangue de carneiro a 5% e Ágar Cistina Coração com 1% de glicose e hemoglobina bovina. Além disso, o DNA extraído de fígado e baço de todos os animais foi submetido à detecção molecular de ISKNV usando dois protocolos de reação em cadeia da polimerase convencional (cPCR) e dois protocolos de nested-PCR (nPCR). Os amplicons obtidos foram confirmados por sequenciamento de nucleotídeos. Nenhuma bactéria foi isolada nos peixes. O DNA do ISKNV foi identificado em todos os fragmentos de fígado e baço de peixes analisados, em pelo menos dois dos protocolos de PCR usados. Até onde sabemos, este é o primeiro relato de ISKNV nessas espécies nativas brasileiras, tucunaré e acará-pérola, causando alta mortalidade. As sequências de nucleotídeos derivadas desses animais mostraram alta identidade com cepas previamente identificadas em tilápias e carpas de diferentes regiões brasileiras, indicando uma possível transmissão interespecífica do vírus. No entanto, estudos adicionais são necessários para entender melhor a patogênese viral e, assim, estabelecer medidas profiláticas assertivas para reduzir os danos causados pela infecção viral.

Palavras-Chave: Aquicultura, Doenças em Peixes, Diagnóstico Molecular, Tucunaré, Acará, Iridovirus.

ABSTRACT

ROCHA, Francisco Eduardo Pereira. **Comparison of different molecular detection methods in the detection of infectious spleen and kidney necrosis virus (ISNVK) in cultivated Brazilian native fish.** 2023. Dissertation (Masters in Animal Science – Concentration Area: Animal Health) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2023.

Peacock bass (syn.: tucunaré, *Cichla ocellaris*) and pearl cichlid (syn.: acará, *Geophagus brasiliensis*) are South American cichlids highly desired in the fish angling and aquarist community. In Brazil, there has been a crescent number of outbreaks of infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) in tilapia production since 2017. In this study, we report the detection of ISKNV in farmed peacock bass and pearl cichlid and the phylogenetic characterization of the partial sequence of MCP gene from both specimens. For this, 12 fish (ten peacock bass and two pearl cichlids) from a fish farm that reported an unusual peak in mortality affecting juveniles and adults, were subjected to bacteriological and viral analyses. Spleen, liver, brain and kidney fragments from each fish were streaked on 5% sheep blood agar and cystine heart agar with 1% glucose and bovine haemoglobin. Additionally, DNA extracted from the liver and spleen of all animals was subjected to molecular detection of ISKNV using two conventional polymerase chain reaction (cPCR) and two nested-PCR protocols (nPCR). The amplicons obtained were confirmed by nucleotide sequencing. No bacteria were isolated from the fish. ISKNV DNA was identified in all fish liver and spleen fragments analyzed, in at least two of the used PCR protocols. To the best of our knowledge, this is the first report of ISKNV in these native Brazilian species, peacock bass and pearl cichlids, causing mortality outbreaks. The nucleotide sequences derived from these animals showed high identity with strains previously identified in tilapia and carps from different Brazilian regions, indicating a possible interspecies transmission of the virus. However, additional studies are needed to better understand viral pathogenesis and thus establish assertive prophylactic measures to reduce the damage caused by viral infection.

Keywords: aquaculture, fish disease, molecular diagnostic, peacock bass, pearl cichlid, iridovirus.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

dNTP	Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
nm	Nanômetro
NT	Nucleotídeo (<i>Nucleotide</i>)
OMSA	Organização Mundial da Saúde Animal
pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>Polymerase chain reaction</i>)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	27
2	REVISÃO DE LITERATURA/ REFERENCIAL TEÓRICO	29
3	REFERÊNCIAS	38
4	OBJETIVOS	41
4.1	Objetivo geral	41
6	ARTIGO A –	42
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	16

1 1 INTRODUÇÃO

2 A aquicultura é altamente dinâmica e caracterizada pela enorme
3 diversidade, tanto da gama de espécies cultivadas como dos tipos de sistemas
4 para o cultivo (MARTINS, 2011). Nos últimos anos, com a rápida expansão do
5 setor, principalmente devido a produção intensiva dos animais, várias doenças
6 infecciosas estão surgindo e impactando diretamente a economia do setor
7 (REYS, 2013). Dentre estas, destacam-se doenças virais emergentes
8 pertencentes à família *Iridoviridae* (MAGANHA, 2016), causando alta
9 mortalidade em peixes e levam a grandes perdas produtivas e econômicas
10 (REF).

11 Dong e colaboradores (2015) no Vietnã descreveram que formas jovens
12 de barramundi (*Lates calcarifer*) são mais suscetíveis à doença, pois
13 apresentaram uma taxa de mortalidade de 71,2%, enquanto Figueiredo e
14 colaboradores (2021) observaram taxa de mortalidade de até 75% em alevinos
15 e juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) no Brasil. Os principais sinais
16 clínicos dos animais afetados pelo ISKNV são nado irregular, palidez de
17 brânquias e anorexia (HE et al, 2000) e as alterações internas dos animais
18 infectados incluem hepatomegalia e esplenomegalia (KURITA; NAKAJIMA,
19 2012).

20 Os métodos de diagnóstico das infecções causadas por *Megalocytivirus*
21 inicialmente eram baseados em achados histopatológicos característicos da
22 doença (Kurita; Nakajima 1998). Atualmente, a detecção molecular baseada em
23 técnicas de PCR são as mais utilizadas devido a sua praticidade e acurácia
24 (NOLAN et al, 2015). O primeiro diagnóstico molecular por PCR convencional
25 descrito para este vírus foi no final da década de 1990 (Kurita, 1998). Contudo,
26 posteriormente, os mesmos pesquisadores mostraram que essa técnica possuía
27 ampliações inespecíficas e assim descreveram novos *primers* que corrigiram
28 esse problema (Kurita 2012). Adicionalmente, dois protocolos de *nested*-PCR já
29 foram descritos com elevada detecção

30 Pattanayak et al., 2020; Rimmer et al., 2012). A PCR quantitativa (qPCR)
31 está cada vez mais sendo utilizada no contexto de programas oficiais de
32 diagnóstico de doenças infecciosas e se destaca por ser possível quantificar a

1 carga viral ([FRANS et al., 2008](#)). Para ISKNV já foi descrito que a PCR
2 convencional possui menor sensibilidade que a qPCR, enquanto a *nested*-PCR
3 e qPCR tiveram sensibilidade semelhantes. Porém, há uma escassez de estudos
4 recentes e comparativos com um número maior de métodos de diagnóstico que
5 possam inferir qual destes métodos possuem melhor acurácia e poder de
6 detecção.

1 2 REVISÃO DE LITERATURA/ REFERENCIAL TEÓRICO

2 2.1 Aquicultura

3 A aquicultura, prática milenar que engloba o cultivo de organismos
4 aquáticos, desempenha um papel vital na segurança alimentar global e na
5 economia de diversos países. No contexto específico da aquicultura, a
6 tilapicultura, centrada na criação de tilápias, emerge como uma atividade
7 aquática de grande relevância.

8 A aquicultura experimentou um crescimento notável nas últimas décadas,
9 consolidando-se como uma fonte essencial de proteína animal. De acordo com
10 dados da FAO (*Food and Agriculture Organization* - Organização das Nações
11 Unidas para Agricultura e Alimentação), a produção aquícola global atingiu mais
12 de 82 milhões de toneladas em 2019, com uma contribuição significativa de
13 espécies cultivadas, incluindo peixes, moluscos e crustáceos (FAO, 2021).

14 A aquicultura desempenha um papel crucial na produção de alimentos e na
15 economia global. No contexto brasileiro, destaca-se como uma atividade
16 promissora, contribuindo para a segurança alimentar e o desenvolvimento
17 econômico. Superar desafios requer abordagens integradas e inovações que
18 promovam a sustentabilidade e a resiliência da aquicultura em escala global e
19 nacional.

20 Apesar do crescimento, a aquicultura brasileira enfrenta desafios similares aos
21 observados globalmente. Questões relacionadas à sustentabilidade, manejo de
22 recursos hídricos e sanidade aquática são prioridades na agenda do setor.
23 Iniciativas governamentais, pesquisa aplicada e parcerias público-privadas são
24 fundamentais para impulsionar a tilapicultura e a aquicultura como um todo no
25 Brasil (MAPA, 2021).

26 Dentro desse cenário, revelaram-se como uma espécie-chave na
27 produção aquícola global. Sua adaptabilidade a diferentes ambientes,
28 crescimento rápido e aceitação no mercado internacional têm impulsionado a
29 expansão da tilapicultura em várias regiões mundiais. Países como China,
30 Indonésia e Egito se destacam como grandes produtores de tilápias,

1 contribuindo significativamente para a produção mundial (FAO, 2021).

2 Apesar dos avanços, a aquicultura enfrenta desafios consideráveis,
3 incluindo questões ambientais, sanitárias e sociais. A necessidade de práticas
4 sustentáveis, manejo eficiente de recursos hídricos e controle de doenças virais,
5 como ISKNV (Vírus da Necrose infecciosa de baço e rim), destaca-se como
6 áreas críticas que demandam atenção contínua (Anderson et al., 2020).

7

8 2.2 Características do ISKNV

9 Vírus da Necrose Infecciosa de Baço e Rim (ISKNV) representa uma ameaça
10 significativa para populações de peixes em ambientes aquícolas. Compreender
11 as características distintivas do ISKNV é crucial para desenvolver estratégias
12 eficazes de detecção, controle e manejo. Este texto busca analisar as principais
13 características do ISKNV, destacando sua estrutura, patogenicidade e impacto
14 na aquicultura.

15 *Classificação Taxonômica e Estrutura:*

16 O ISKNV pertence à família *Iridoviridae*, uma família de vírus grandes de
17 DNA de fita dupla que inclui agentes patogênicos de peixes. Segundo Eaton et
18 al. (2007), a classificação taxonômica do ISKNV o posiciona dentro da ordem
19 Megalocytivirus, destacando sua natureza viral de tamanho considerável e
20 complexidade genética. Os vírus pertencentes a esta família estão divididos em
21 duas subfamílias *Alphairidovirinae* e *Betairidovirinae*. A subfamília
22 *Alphairidovirinae* é subdividida em três gêneros denominados *Ranavirus*,
23 *Lymphocystivirus*, *Megalocytivirus* (ICTV, 2020)), sendo que o último possui
24 várias espécies ocasionado surtos em diferentes espécies de peixe nos últimos
25 anos (RAMÍREZ-PAREDES et al., 2021; WANG et al., 2021; JUNG-SCHROERS
26 et al. 2016). Os vírus do gênero *Megalocytivirus* possuem genoma DNA dupla
27 fita, linear, variando de 110 a 122 kbp, capsídeo com simetria icosaédrica e
28 tamanho variável de 140 a 200 nm de diâmetro (KURITA; NAKAJIMA; 2012,
29 NOLAN et al., 2015; CHINCHAR et al., 2017).

1 O gênero *Megalocytivirus* é composto por duas espécies virais *Infectious*
2 *spleen and kidney necrosis virus* e *Scale drop disease virus*. Dentro da primeira
3 espécie, estão alocados diversos vírus dentre eles: *Red Sea Bream Iridovirus*
4 (RSIV), *Infectious Spleen and Kidney Necrosis Virus* (ISKNV), *Turbot Reddish*
5 *Body iridovirus* (TRBIV) e *Threespine Stickleback Iridovirus* (TSIV) (CHINCHAR
6 et al., 2017).

7 A estrutura do ISKNV, caracterizada por um capsídio icosaédrico, é essencial
8 para sua sobrevivência e replicação. Estudo como o de Chinchar et al. (2009),
9 evidenciando sua capacidade de infectar células do sistema imunológico de
10 tilápias.

11 *Patogenicidade e Sintomatologia:*

12 A patogenicidade do ISKNV é evidenciada por sua capacidade de causar danos
13 consideráveis aos órgãos internos das tilápias. O baço e o rim são
14 frequentemente alvo preferencial do ISKNV, resultando em necrose pancreática,
15 (Chen et al., 2019). Além disso, manifestações externas, como hemorragias e
16 lesões cutâneas, são observadas em peixes afetados.

17 A sintomatologia associada à infecção por ISKNV inclui alterações
18 comportamentais, anorexia e, em estágios avançados, mortalidade significativa.
19 Sun et al. (2015) ressaltam a importância de identificar precocemente esses
20 sinais clínicos para implementar medidas de controle e prevenção.

21 *Epidemiologia e Transmissão:*

22 A transmissão do ISKNV em peixes ocorre por meio de diversas vias, sendo um
23 processo complexo e influenciado por fatores ambientais, comportamentais e
24 genéticos, a forma direta se dá entre peixes infectados e suscetíveis, é uma das
25 vias mais comuns. Em ambientes de cultivo com alta densidade populacional, o
26 risco de transmissão direta aumenta, tornando essencial a monitorização
27 constante. Outro fator crucial é o cuidado com a água pois esta desempenha um
28 papel significativo na disseminação do ISKNV. O vírus pode ser liberado no
29 ambiente por meio das secreções corporais, fezes e urina de peixes infectados.
30 A presença do ISKNV na água cria uma fonte potencial de exposição para peixes
31 suscetíveis que compartilham o mesmo ambiente. Além da transmissão direta e
32 pela água, o ISKNV pode ser transportado por vetores mecânicos, como

1 equipamentos de manejo, redes de pesca e outros objetos que entram em
2 contato com peixes infectados. Essa forma de transmissão destaca a
3 importância da higienização adequada de equipamentos e instalações
4 aquícolas. A transmissão vertical, da reprodutora para os ovos ou larvas, é outra
5 via potencial do ISKNV. Embora menos comum, essa forma de transmissão pode
6 contribuir para a persistência do vírus em populações de peixes ao longo das
7 gerações.

8 , como observado por Wang et al. (2019).

9 ISKNV, devido à sua patogenicidade e capacidade de propagação, representa
10 um desafio significativo para a tilapicultura global. A compreensão detalhada de
11 suas características, desde a estrutura viral até os padrões epidemiológicos, é
12 crucial para o desenvolvimento de estratégias eficazes de manejo e controle.

13

14 1.1.1.1 Impacto na produção

15 A aquicultura desempenha um papel crucial na produção aquícola brasileira,
16 sendo as tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) uma espécie central nesse
17 cenário. Contudo, a presença do Vírus da Necrose Infecciosa de Baço e Rim
18 (ISKNV) representa um desafio significativo para a sustentabilidade e
19 produtividade da tilapicultura no Brasil.

20 A disseminação do ISKNV em populações de tilápias no Brasil tem sido uma
21 preocupação crescente. Estudos epidemiológicos, como os conduzidos por
22 Costa et al. (2020), destacam a prevalência variável do vírus em diferentes
23 regiões do país. Essa distribuição heterogênea influencia diretamente a
24 incidência da infecção e os impactos na produção de tilápias.

25 O impacto econômico do ISKNV na tilapicultura brasileira é evidenciado por
26 perdas significativas na produção. A mortalidade de peixes infectados, as
27 medidas de controle e a necessidade de investimentos em biossegurança
28 contribuem para custos adicionais aos produtores. Estudos como o de Ronen et
29 al. (2003) demonstram que o ISKNV pode resultar em quedas na produtividade
30 e, conseqüentemente, em impactos econômicos negativos.

1 O ISKNV impõe desafios sanitários consideráveis, exigindo abordagens eficazes
2 de manejo. Estratégias de controle, como a quarentena, vacinação e boas
3 práticas de biossegurança, tornam-se essenciais para minimizar a disseminação
4 do vírus. No entanto, a implementação dessas medidas enfrenta obstáculos
5 logísticos e custos adicionais, conforme discutido por Sun et al. (2015).:

6 As perspectivas futuras para a tilapicultura no Brasil diante do desafio do ISKNV
7 dependem da pesquisa aplicada e da inovação. Investimentos em métodos de
8 detecção mais sensíveis, vacinas eficazes e estratégias de manejo adaptativas
9 são cruciais. Estudos, como os conduzidos por Zhang et al. (2012), apontam
10 para a necessidade de uma abordagem integrada que una a pesquisa
11 acadêmica e a indústria para enfrentar os desafios do ISKNV.

12 O impacto do ISKNV na produção de tilápias no Brasil destaca a complexidade
13 dos desafios enfrentados pela tilapicultura. A busca por soluções inovadoras,
14 aliada a práticas de manejo eficazes, é essencial para garantir a sustentabilidade
15 e competitividade da tilapicultura brasileira frente à ameaça representada pelo
16 ISKNV.

17 1.1.1.2 Métodos convencionais de detecção

18 Isolamento Viral:

19

20 O isolamento viral é um método clássico utilizado para a detecção de ISKNV,
21 envolvendo a inoculação de amostras em culturas celulares. Ronen et al. (2003)
22 empregaram essa abordagem para estabelecer um sistema modelo de estudo
23 do ISKNV em carpas, permitindo a observação de efeitos citopáticos
24 característicos da infecção.

25

26 Testes Sorológicos:

27

28 Testes sorológicos, como o ensaio de imunoabsorção enzimática (Enzyme-
29 Linked Immunosorbent Assay - ELISA), têm sido empregados para detectar a
30 presença de anticorpos específicos contra ISKNV. Sun et al. (2015) destacam a
31 sensibilidade desses testes na identificação de animais previamente expostos

1 ao vírus, fornecendo insights valiosos sobre a prevalência da infecção.

2

3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR):

4

5 A PCR é uma ferramenta molecular amplamente utilizada na detecção do
6 ISKNV. Zhang et al. (2012) aplicaram a PCR para identificar o material genético
7 do vírus em amostras de tilápias, proporcionando resultados rápidos e sensíveis
8 mesmo em estágios iniciais da infecção.

9

10 Imunofluorescência Indireta (IFI):

11

12 A Imunofluorescência Indireta (IFI) é uma técnica convencional que utiliza
13 fluorescência para identificar a presença do ISKNV em tecidos. Wang et al.
14 (2019) destacam a utilidade da IFI na visualização direta do vírus em amostras,
15 contribuindo para diagnósticos rápidos e específicos.

16

17 Técnicas de Hibridização:

18

19 Técnicas de hibridização, como a hibridização in situ, têm sido empregadas para
20 localizar o material genético do ISKNV em tecidos infectados. Ke et al. (2021)
21 exploraram essa abordagem para analisar a distribuição espacial do vírus em
22 amostras histológicas, fornecendo informações valiosas sobre a patologia
23 associada à infecção.

24

25

26 Os métodos convencionais de detecção do ISKNV desempenham um papel
27 crucial na identificação e compreensão da infecção em populações de tilápias. A
28 combinação dessas abordagens, considerando suas respectivas vantagens e
29 limitações, contribui para uma abordagem abrangente no estudo do ISKNV e na
30 implementação de estratégias eficazes de controle.

31

1 1.1.1.3 Métodos moleculares de detecção

2 A aplicação de métodos moleculares na detecção de ISKNV em tilápias do Nilo
3 tem se destacado como uma abordagem eficaz e sensível.

4

5 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR):

6

7 A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) permanece uma ferramenta
8 fundamental na detecção do ISKNV. Zhang et al. (2012) destacam a aplicação
9 da PCR na amplificação do material genético do vírus, possibilitando a
10 identificação rápida e sensível do ISKNV mesmo em estágios iniciais da
11 infecção.

12

13 PCR em Tempo Real (qPCR):

14

15 A PCR em Tempo Real (qPCR) aprimora a sensibilidade e especificidade da
16 detecção, permitindo a quantificação em tempo real da carga viral. Sun et al.
17 (2015) ressaltam a utilidade da qPCR na avaliação da progressão da infecção
18 por ISKNV em populações de tilápias, oferecendo insights valiosos sobre a
19 dinâmica viral.

20

21 Nested PCR

22 A Nested PCR é uma técnica que envolve duas etapas consecutivas de
23 amplificação do material genético, utilizando dois pares de primers. Essa
24 abordagem é comumente utilizada para aumentar a sensibilidade e
25 especificidade da detecção de sequências específicas de DNA. Inserir trabalhos
26 que usaram essa técnica.

27

28 Reverse Transcription PCR (RT-PCR):

29

30 A RT-PCR é empregada na detecção do RNA do ISKNV, sendo crucial para a
31 identificação de material genético viral em estágios específicos da infecção.
32 Ronen et al. (2003) utilizaram a RT-PCR para analisar a expressão gênica do
33 ISKNV, contribuindo para a compreensão da patogênese do vírus.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31

Sequenciamento Genético:

O sequenciamento genético fornece informações detalhadas sobre a composição genômica do ISKNV. Estudos, como o de Chinchar et al. (2009), exploram essa abordagem para analisar a variabilidade genética do ISKNV, contribuindo para estudos filogenéticos e epidemiológicos.

A detecção precoce e precisa do Vírus da Necrose Infecciosa de baço e rim (ISKNV) é fundamental para o manejo eficaz e controle da infecção em populações de tilápias do Nilo.

1.1.1.4 Perspectivas futuras

Apesar das vantagens dos métodos moleculares, desafios persistem, como a necessidade de adaptação constante às novas variantes do ISKNV. Inovações recentes incluem a aplicação de técnicas como Sequenciamento de próxima geração (Next-Generation Sequencing - NGS) para uma análise mais abrangente do genoma viral (Ke et al. (2021).

O desenvolvimento de métodos diagnósticos eficazes é crucial para a detecção precoce, manejo adequado e controle da disseminação do vírus. Este texto aborda as perspectivas futuras dos métodos diagnósticos do ISKNV, explorando avanços tecnológicos e estratégias inovadoras.

Avanços Tecnológicos em Diagnóstico Molecular:

A aplicação de técnicas moleculares, como a Nested-PCR, qPCR, e sequenciamento genético, continua a evoluir. A utilização de plataformas de NGS permite uma análise genômica mais abrangente do ISKNV, proporcionando *insights* sobre sua diversidade genética e mutações. Esses avanços oferecem perspectivas promissoras para diagnósticos mais precisos e uma compreensão mais profunda da variabilidade do vírus (Ke et al., 2021; Sun et al., 2015).

Técnicas Imunológicas e Biomarcadores:

1 O desenvolvimento de técnicas imunológicas avançadas, incluindo ensaios de
2 detecção de antígenos e biomarcadores específicos, apresenta potencial para
3 simplificar e acelerar os diagnósticos. A incorporação de biomarcadores na
4 detecção do ISKNV pode oferecer uma abordagem mais rápida e específica,
5 contribuindo para estratégias de vigilância eficazes (Chen et al., 2019).

6 *Integração de Sensores e Biossensores:*

7 A implementação de sensores e biossensores, como dispositivos de
8 microfluídica e biossensores eletroquímicos, pode representar o futuro da
9 detecção rápida e portátil de ISKNV. Essas tecnologias inovadoras têm o
10 potencial de fornecer resultados em tempo real, facilitando a vigilância em campo
11 e reduzindo o tempo necessário para tomada de decisões (Zhang et al., 2012).

12 *Abordagens Integradas e Diagnóstico Remoto:*

13 Perspectivas futuras também incluem abordagens integradas, onde múltiplos
14 métodos são combinados para aumentar a sensibilidade e especificidade. Além
15 disso, o desenvolvimento de tecnologias de diagnóstico remoto, como a
16 utilização de imagens de satélite e análises bioinformáticas, pode oferecer uma
17 visão abrangente da disseminação de ISKNV em escala regional ou global
18 (Costa et al., 2020).

19 À medida que novas tecnologias diagnósticas emergem, é imperativo considerar
20 as implicações éticas e socioeconômicas associadas ao seu uso. Questões
21 relacionadas à acessibilidade, custo e aceitação por parte dos produtores devem
22 ser abordadas para garantir que as inovações se traduzam em benefícios
23 tangíveis para a indústria aquícola (Wang et al., 2019).

24

1 **2 REFERÊNCIAS- PADRONIZAR MODELO UEL ABNT (AGORA) FAZER**
2 **PENTE FINO 😊**

3

4 Anderson, J. L., et al. (2020). Global causes of freshwater fish declines. *Fisheries*,
5 45(11), 27-33.

6

7 Chen, Y., et al. (2019). Infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV)
8 infects flounder gill epithelial cells via clathrin-mediated endocytosis. *Virology*
9 *Journal*, 16, 101.

10

11 Chinchar, V.G., Hick, P., Ince, I.A., Jancovich, J.K., Marschang, R., Qin, Q.,
12 Subramaniam, K., Waltzek, T.B., Whittington, R., Williams, T., Zhang, Q., and
13 ICTV Report Consortium. 2017, ICTV Virus Taxonomy Profile: Iridoviridae,
14 *Journal of General Virology*, 98, 890–891.

15

16 Costa, F. A. L., et al. (2020). Molecular detection and phylogenetic analysis of
17 infectious spleen and kidney necrosis virus in farmed tilapia from Brazil.
18 *Aquaculture*, 523, 735204.

19

20 Eaton, H. E., et al. (2007). Comparative genomic analysis of the family
21 Iridoviridae: re-annotating and defining the core set of iridovirus genes. *Virology*
22 *Journal*, 4, 11.

23

24 FAO (Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação). (2021).
25 The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Recuperado de
26 <http://www.fao.org/3/ca9229en/ca9229en.pdf>

27

28 Ke, F., et al. (2021). Simultaneous detection and histopathological study of
29 infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) in farmed flounder
30 (*Paralichthys olivaceus*) by a novel real-time PCR assay. *Aquaculture*, 531,
31 73578

32

33 Ke, F., et al. (2021). Simultaneous detection and histopathological study of

- 1 infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) in farmed flounder
2 (Paralichthys olivaceus) by a novel real-time PCR assay. *Aquaculture*, 531,
3 735788.
- 4
- 5 MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). (2021).
6 AQUICULTURA E PESCA. Recuperado de [https://www.gov.br/agricultura/pt-](https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/aquicultura-e-pesca)
7 [br/assuntos/aquicultura-e-pesca](https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/aquicultura-e-pesca)
- 8
- 9 Peixe BR. (2021). Anuário Peixe BR 2021. Recuperado de
10 <https://peixebr.com.br/anuario-peixebr/>
- 11
- 12 Ronen, A., et al. (2003). Establishment of a model system for the study of
13 infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) in Israeli carp. *Diseases of*
14 *Aquatic Organisms*, 55(1), 21-28.
- 15
- 16 Ronen, A., et al. (2003). Establishment of a model system for the study of
17 infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) in Israeli carp. *Diseases of*
18 *Aquatic Organisms*, 55(1), 21-28.
- 19
- 20 Ronen, A., et al. (2003). Establishment of a model system for the study of
21 infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) in Israeli carp. *Diseases of*
22 *Aquatic Organisms*, 55(1), 21-28.
- 23
- 24 Ronen, A., et al. (2003). Establishment of a model system for the study of
25 infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) in Israeli carp. *Diseases of*
26 *Aquatic Organisms*, 55(1), 21-28.
- 27
- 28 Sun, L., et al. (2015). Development and evaluation of a real-time TaqMan PCR
29 assay for the detection of infectious spleen and kidney necrosis virus from
30 flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Journal of Virological Methods*, 212, 7-11.
- 31
- 32 Sun, L., et al. (2015). Development and evaluation of a real-time TaqMan PCR
33 assay for the detection of infectious spleen and kidney necrosis virus from
34 flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Journal of Virological Methods*, 212, 7-11.

1

2 Sun, L., et al. (2015). Development and evaluation of a real-time TaqMan PCR
3 assay for the detection of infectious spleen and kidney necrosis virus from
4 flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Journal of Virological Methods*, 212, 7-11.

5

6 Sun, L., et al. (2015). Development and evaluation of a real-time TaqMan PCR
7 assay for the detection of infectious spleen and kidney necrosis virus from
8 flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Journal of Virological Methods*, 212, 7-11.

9

10 Sun, L., et al. (2015). Development and evaluation of a real-time TaqMan PCR
11 assay for the detection of infectious spleen and kidney necrosis virus from
12 flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Journal of Virological Methods*, 212, 7-11.

13

14 Wang, X., et al. (2019). Genome-wide analysis of DNA methylation in the liver
15 and kidney of flounder (*Paralichthys olivaceus*) in response to infectious spleen
16 and kidney necrosis virus (ISKNV) infection. *Fish & Shellfish Immunology*, 94,
17 430-439.

18

19 Wang, X., et al. (2019). Genome-wide analysis of DNA methylation in the liver
20 and kidney of flounder (*Paralichthys olivaceus*) in response to infectious spleen
21 and kidney necrosis virus (ISKNV) infection. *Fish & Shellfish Immunology*, 94,
22 430-439.

23

24 Feng Zhu, Zhe Shi, Chu Qin, Lin Tao, Xin Liu, Feng Xu, Li Zhang, Yang Song,
25 Xianghui Liu, Jingxian Zhang, Bucong Han, Peng Zhang, Yuzong Chen,
26 Therapeutic target database update 2012: a resource for facilitating target-
27 oriented drug discovery, *Nucleic Acids Research*, Volume 40, Issue D1, 1
28 January 2012, Pages D1128–D1136

29

30

6 ARTIGO A –

First report of Infectious Spleen and Kidney Necrosis Virus (ISKNV) in native Brazilian farmed fish

Primeiro relato do vírus da necrose infecciosa do baço e do rim (ISKNV) em peixes nativos brasileiros cultivados

Highlights

- 1- Detection of ISKNV in Brazilian native fish species
- 2- High similarity between ISKNV strains identified in tilapia and native fish
- 3- PCR protocol for ISKNV recommended by WOAHP has a low detection rate

Resumo

Tucunaré (*Cichla ocellaris*) e o acará (*Geophagus brasiliensis*) são ciclídeos sul-americanos muito desejados por pescadores e aquaristas. No Brasil, desde 2017, há um número crescente de surtos de vírus da necrose infecciosa do baço e do rim (ISKNV) na produção de tilápia. Neste estudo, relata-se a detecção de ISKNV em um surto de mortalidade tucunaré e acará-pérola cultivados e a caracterização filogenética da sequência parcial do gene da proteína do capsídeo maior (MCP) de ambos os espécimes. Para isso, 12 peixes (dez tucunarés e dois acarás-pérola) provenientes de uma piscicultura com relatos de alta mortalidade afetando juvenis e adultos foram submetidos a análises bacteriológicas e virais. Fragmentos de baço, fígado, cérebro e rim de cada peixe foram semeados em Ágar Sangue de carneiro a 5% e Ágar Cistina Coração com 1% de glicose e hemoglobina bovina. Além disso, o DNA extraído de fígado e baço de todos os animais foram submetidos à detecção molecular de ISKNV usando dois protocolos de reação em cadeia da polimerase convencional (cPCR) e dois protocolos de nested-PCR (nPCR). Os *amplicons* obtidos foram confirmados por sequenciamento Sanger de nucleotídeos. Nenhuma bactéria foi isolada nos peixes. O DNA amplificado do ISKNV foi identificado em todas as amostras de fígado e baço dos peixes analisados, em pelo menos dois dos protocolos de PCR utilizados. Acredita-se que este é o primeiro relato de ISKNV nessas espécies nativas brasileiras, tucunaré e acará-pérola, causando alta mortalidade. As sequências de nucleotídeos derivadas desses animais

1 mostraram alta identidade com cepas previamente identificadas em tilápias e
2 carpas de diferentes regiões brasileiras, indicando uma possível transmissão
3 interespécies do vírus. No entanto, estudos adicionais são necessários para
4 entender melhor a patogênese viral nessas novas espécies de peixe e, assim,
5 estabelecer medidas profiláticas assertivas para reduzir os danos causados pela
6 infecção viral.

7 **Palavras-Chave:** Aquicultura, Doenças em Peixes, Iridovirus, Diagnóstico
8 Molecular, Tucunaré, Acará.

9 **Abstract**

10 Peacock bass (syn.: tucunaré, *Cichla ocellaris*) and pearl cichlid (syn.: acará,
11 *Geophagus brasiliensis*) are South American cichlids highly desired in the fish
12 angling and aquarist community. In Brazil, there is an increasing number of
13 outbreaks of infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) in tilapia
14 production since 2017. In this study, we report the detection of ISKNV in from
15 farmed peacock bass and pearl cichlid that were experiencing high mortality, and
16 the phylogenetic characterization of the partial sequence of major capsid protein
17 (MCP) gene from both specimens. For this, 12 fish (ten peacock bass and two
18 pearl cichlids) from a fish farm that reported a high mortality affecting juveniles
19 and adults, were subjected to bacteriological and viral analyses. Spleen, liver,
20 brain, and kidney fragments from each fish were streaked on 5% sheep blood
21 agar and cystine heart agar with 1% glucose and bovine haemoglobin.
22 Additionally, DNA extracted from the liver and spleen of all animals was subjected
23 to molecular detection of ISKNV using two conventional polymerase chain
24 reaction (cPCR) and two nested-PCR protocols (nPCR). The amplicons obtained
25 were confirmed by Sanger nucleotide sequencing. No bacteria were isolated from
26 the fish. ISKNV DNA was identified in all fish liver and spleen analyzed samples,
27 in at least two of the used PCR protocols. This is believed to be the first report
28 this is the first report of ISKNV in these native Brazilian species, peacock bass
29 and pearl cichlids, from a mortality outbreak event. The nucleotide sequences
30 derived from these animals showed high identity with strains previously identified
31 in tilapia and carps from different Brazilian regions, indicating a possible
32 interspecies transmission of the virus. However, additional studies are needed to
33 better understand the viral pathogenesis in these new host species and establish
34 assertive prophylactic measures to reduce the damage caused by this viral

1 infection.

2 **Keywords:** aquaculture, fish disease, iridovirus, molecular diagnostic, peacock
3 bass, pearl cichlid.

4

5 **1. Introduction**

6 Peacock bass (syn.: tucunaré, *Cichla ocellaris*), and pearl cichlid (syn.:
7 acará, *Geophagus brasiliensis*) are two South American cichlids highly sought-
8 after by anglers and aquarists alike (Rodrigues et al., 2020). Peacock bass is
9 considered a premier game fish due to its aggressive strikes, aerial jumps, and
10 fighting spirit. In 2021, Brazil produced approximately 101 ton of peacock bass to
11 support this industry (IBGE 2022). Pearl cichlid is a popular aquarium fish and an
12 important game fish as well (de Azevedo et al., 2006). However, the optimal
13 production of these fishes is hindered by knowledge gaps in fish husbandry,
14 nutrition, health, and emergent infectious diseases (Valladão et al., 2018). To
15 date, several parasites have been reported in peacock bass and pearl cichlid,
16 including cestodes, digeneans, monogeneans, nematodes, coccidia, and
17 copepods (Békési and Molnár 1991, de Azevedo et al., 2012, Januário et al.,
18 2019, Lacerda et al., 2018, Madi and Ueta 2009, Pavanelli et al., 2018, Pozza et
19 al., 2018, Rassier et al., 2015, Rocha et al., 2015, Scholz et al., 1996).

20 Infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) is a double-stranded
21 DNA virus that belongs to the family *Iridoviridae*, subfamily *Alphairidovirinae* and
22 genus *Megalocyttivirus*. Other important aquaculture pathogens in this genus
23 include Red Sea Bream Iridovirus (RSIV) and Turbot Reddish Body iridovirus
24 (TRBIV), and scale drop disease virus (ICTV 2022). Since 2017, there has been
25 an increasing number of ISKNV outbreaks in tilapia production in Brazil
26 (Figueiredo et al., 2022, Fonseca et al., 2022). To date, the virus has also been
27 reported in the country in red piranha, ornamental fishes, and Brazilian catfish
28 (*Pseudoplatystoma corruscans*) (de Lucca Maganha et al., 2018, Fonseca et al.,
29 2022).

30 The clinical signs of ISKNV are nonspecific, such as lethargy, irregular
31 swimming, pale gills, ascites, and anorexia, which makes clinical diagnosis
32 difficult (Dong et al., 2015; Johan and Zainathan, 2020; Subramaniam et al.,
33 2016). Molecular assays targeting the major capsid protein (MCP) gene are
34 widely used for detection of ISKNV (Kurita and Nakajima 2012).

1 In this study, the detection of ISKNV in farmed peacock bass and pearl
2 cichlid is reported, as well as the phylogenetic characterization of the partial
3 sequence of MCP gene from both specimens.

4 5 **2. Materials and Methods**

6 *2.1 Outbreak description*

7 An excavated pond fish farm in Rio de Janeiro state contacted us to report
8 an unusual increase in mortality within their peacock bass in late April 2021. The
9 farmer stated that the number of dead animals increased from six per day to more
10 than 200 per day within 11 days, affecting both juveniles and adults. Ten peacock
11 bass and two recently dead pearl cichlid (from the same farm) were collected for
12 laboratory analysis. The dam where the farm is located belongs to a sports club
13 and contains several other fish species such as *Astyanax* spp., trahira (*Hoplias*
14 spp.), *Leporinus* spp., and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). None of the other
15 species showed any mortality at the time, but increased Nile tilapia mortality was
16 reported a few days later. In May 2021, 12 fish (ten peacock bass and two pearl
17 cichlid) were packed in isothermal boxes with ice and sent for laboratory
18 diagnosis. Transport between the farm and the laboratory took eight hours. In the
19 laboratory, the fish were immediately necropsied.

20 21 *2.2 Bacterial isolation and identification*

22 Fragments of spleen, liver, brain, and kidney were aseptically collected
23 and streaked on 5% sheep blood agar and cystine heart agar with 1% glucose
24 and bovine hemoglobin. The plates were incubated for bacterial isolation at 28
25 °C for up to 96 h. Liver and spleen fragments were also collected and frozen in -
26 20 °C for further molecular diagnostic.

27 28 *2.3 Detection of ISKNV DNA*

29 DNA extraction from liver and spleen fragments from each sampled fish
30 was performed using a PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen™ Life
31 Technologies, Carlsbad, CA, USA) following the manufacturer's protocol. DNA
32 extracts from all animals were then screened for ISKNV using two conventional
33 polymerase chain reaction (cPCR) protocols (Kurita and Nakajima 2012, Kurita
34 et al., 1998), and two nested PCR (nPCR) protocols (Pattanayak et al., 2020;

1 Rimmer et al., 2012) (Table S1 and S2). PCR products were subjected to
2 electrophoresis in a 1% agarose gel stained with SyBR Safe DNA (Invitrogen® Life
3 Technologies, Carlsbad, CA, USA). Aliquots of sterile ultrapure water were included
4 as negative controls in all procedures and biological samples previously known
5 as positive were included as positive controls.

6

7 *2.4 Sequence analysis*

8 To confirm the specificity of the ISKNV MCP gene, PCR amplicons from
9 four different positive samples were randomly selected for nucleotide sequencing
10 analysis. The amplicons of the expected size were purified using PureLink™
11 Quick Gel Extraction & PCR Combo Kit (Invitrogen® Life Technologies, Carlsbad,
12 CA, USA) and their concentration was determined using a Nanodrop
13 spectrophotometer (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Direct
14 sequencing was performed using a BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing
15 Kit (Applied Biosystems®, Foster City, CA, USA) in both directions, using the
16 primers described above on a 3500 Genetic Analyzer sequencer. The sequence
17 data were aligned using MEGA software, version 7.0.26 (Kumar, Stetcher, Li,
18 Knyaz & Tamura 2018). BLASTN analysis was performed using the edited and
19 assembled sequences (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). A Maximum Likelihood
20 phylogenetic analysis was performed using MEGA software version 7.0.26 using
21 Kimura-2 model (Kimura, 1980), with 1000 non-parametric standard bootstraps
22 to test the robustness of the clades (Efron et al., 1996). The nucleotide sequence
23 identity matrix was constructed using BioEdit software version 7.2.5

24

25 **3. Results and Discussion**

26 No bacteria were isolated from the 12 analyzed fish. ISKNV DNA was
27 identified in all liver and spleen fragments analyzed in more than one diagnosis
28 PCR protocol (Table 1). Different results (negative or positive amplification) were
29 observed among the four different PCR protocols used in this study. The PCR
30 protocol developed by Kurita & Nakajima (2012) and the n-PCR described by
31 Rimmer et al. (2012) were able to amplify the virus DNA in all evaluated fish
32 samples, while the PCR protocol developed by Kurita et al. (1998) was not able
33 to amplify the laminin-like protein and phosphatase ISKNV partial gene in any of
34 the evaluated samples. The n-PCR protocol developed by Pattanayak et al.

1 (2020) amplified ISKNV DNA in all peacock bass samples, but only amplified
2 ISKNV DNA in one of the two pearl cichlids samples.

3 The specificity of ISKNV amplicons obtained from different fish samples
4 were confirmed through phylogenetic analysis and nucleotide sequence identity
5 matrix obtained with the assay designed by Kurita and Nakajima (2012).
6 Comparative analysis of the sequences of the partial MCP gene obtained in this
7 study with 17 representative strains of ISKNV was performed. The ISKNV strains
8 identified from pearl cichlids were named BRA/RJ-Acar1/2021 and BRA/RJ-
9 Acar2/2021 (GenBank accession numbers: OQ875186 and OQ875187). The
10 strains derived from peacock bass were named BRA/RJ-Tucunar4/2021 and
11 BRA/RJ-Tucunar6/2021 (GenBank accession numbers: OQ875188 and
12 OQ875189). Phylogenetic analysis grouped these sequences with other ISKNV
13 strains from Nile tilapia and Carpe from different Brazilian regions (BRA/PR-
14 Til1/2021, BRA/PR-Til3/2021, BRA/PR-Til4/2021, BRA/PR-Carpe1/2021)
15 (unpublished data) and other sequences obtained from GenBank at the NCBI
16 (Figure 1). Comparative analysis of the strains identified in peacock bass and
17 pearl cichlids revealed 100% nucleotide identity, and the same percentage of
18 identity was observed when compared to other ISKNV sequences from different
19 fish species, including the prototype ISKNV strain (AF371960).

20 In this study, we report the first identification of ISKNV DNA in these two
21 native fish species (peacock bass and pearl cichlids) in Brazil. The virus has
22 previously been reported in Brazil in tilapia, red piranha, ornamental fishes, and
23 Brazilian catfish (Figueiredo et al., 2022; Fonseca et al., 2022). Four different
24 protocols for viral detection were used in this study, two of which were based on
25 conventional PCR and two nested-PCR. Nested-PCR is known to have greater
26 sensitivity than conventional PCR methods. The protocol developed by Kurita et
27 al. (1998), was not able to amplify ISKNV DNA in any sample, while the protocol
28 by Kurita & Nakajima (2012), which is also a conventional PCR, was able to
29 identify the virus in all evaluated samples from animals. This could indicate that
30 this novel ISKNV strain might have significant mutations in the laminin-like protein
31 and phosphatase gene that it might dramatically inhibit the PCR DNA
32 amplification. The lower detection power/sensibility of the Kurita protocol has
33 been previously reported (Rimmer et al., 2012). Despite this, the Kurita protocol
34 is the only one recommended by World Organization for Animal Health (WOAH).

1 Therefore, our study reinforces the need to update the WOAHA-recommended
2 diagnostic protocol for ISKN in order to improve the identification of infected
3 animals.

4 Mortality of tilapias from the same dam has also been reported, however,
5 the etiology of this mortality could not be investigated due logistic limitation and
6 degradation of samples. The high frequency of native fish in search of food scraps
7 in aquaculture facilities, which use floating cages in large lakes or dams, is well-
8 known (Azevedo-Santos et al., 2011, Casimiro et al., 2018). Additionally, tilapia
9 often escape from fish farming tanks, which can be a source of pathogen infection
10 for other species. These interactions are responsible for the transfer of pathogens
11 between species and, even in some cases, for the introduction of exotic
12 pathogens into the native fauna (da Costa et al., 2021). Both species in this study,
13 peacock bass and pearl cichlids, are cichlids from the same tilapia family. This
14 similarity can facilitate transmission of the virus between the species. Although
15 there were native fish from other families in the dam, none of them showed
16 mortality or clinical signs of disease. Therefore, it is not yet known whether ISKNV
17 can be transmitted to native non-cichlid fish, or what its effect on them might be.
18 However, it has already been demonstrated that other viruses, members of the
19 *Megalocytivirus* genus, can be detected in diseased native fish, such as Brazilian
20 catfish (*Pseudoplatystoma corruscans*) (Fonseca et al., 2022).

21 The phylogenetic analysis of the strains revealed a high degree of
22 similarity between the different strains of ISKNV identified in different countries.
23 The strains identified in native fish in this study were highly similar to the strains
24 identified in Brazilian tilapia and carp, suggesting that transmission between
25 these species is possible through ponds, water tanks, and horizontal
26 transmission between these different fish species (Swaminathan et al., 2022).

27 Disease outbreaks in aquaculture that cause significant morbidity or
28 mortality always led to significant economic losses, such as feed conversion,
29 increased mortality, and treatment costs. This problem can be exacerbated when
30 outbreaks are caused by the introduction of an exogenous pathogen to a region
31 and/or country. Therefore, biosecurity measures in aquaculture are essential for
32 both controlling existing diseases and preventing the entry of exotic pathogens.

33

34 **4. Conclusions**

1 In this study, the presence of ISKNV was detected in two different native
2 Brazilian fish species, peacock bass and pearl cichlids, causing high mortality.
3 The authors believe that this is the first report of the virus in these native species.
4 The nucleotide sequences derived from these animals showed high identity with
5 ISKNV DNA strains previously identified in tilapia and carpe from different
6 Brazilian regions, indicating a possible interspecies transmission of the virus.
7 However, additional studies are needed to better understand the viral
8 pathogenesis and thus establish assertive prophylactic measures to reduce the
9 damage caused by the viral infection and its dispersion risk to another native fish
10 species.

11

12

13 **Ethics Committee**

14 This study was approved by the Londrina State University (UEL) Institutional
15 Ethical Committee of Animal Care and Use (CEUA/UEL Protocol Number
16 053.2020).

17

18 **Acknowledgment**

19 The authors would like to acknowledge the Postgraduate Program in Animal
20 Health and Production Science for its help and support in the research presented
21 in this manuscript. The authors thank the following Brazilian Institutes for financial
22 support: the National Council of Technological and Scientific Development
23 (CNPq). Pereira, U.P. (grant number 306857/2021-9) and Alfieri, A.A. are
24 recipients of CNPq Fellowships.

25

26 **Funding**

27 This study was supported by the National Council for Scientific and
28 Technological Development (CNPq) [Grant number 306857/2021-9].

29

30 **Data Availability Statement**

31 Data available on request from the corresponding author.

32

33 **Conflicts of Interest**

34 The authors declared no potential conflicts of interest concerning the re-search,

1 authorship, and/or publication of this article.

2

3 **References**

4 Azevedo-Santos, V.M., Rigolin-Sál, O., & Pelicice, F.M. (2011). Growing, losing or
5 introducing? Cage aquaculture as a vector for the introduction of non-native fish in Furnas
6 Reservoir, Minas Gerais, Brazil. *Neotropical Ichthyology*, 9(4), e14638.

7 Békési, L., & Molnár, k. (1991). Calyptospora tucunarensis n. sp. (Apicomplexa: Sporozoea)
8 from the liver of tucunare Cichla ocellaris in Brazil *Systematic Parasitology*, 18(127-132).
9 doi: 10.1007/BF00017665

10 Casimiro, A.C.R., Garcia, D.A.Z., Vidotto-Magnoni, A.P., Britton, J.R., Agostinho, A.A.,
11 Almeida, F.S., & Orsi, M.L. (2018). Escapes of non-native fish from flooded aquaculture
12 facilities: the case of Paranapanema River, southern Brazil. *Zoologia*, 35(e14638). doi:
13 10.3897/zoologia.35.e14638

14 da Costa, A.R., de Abreu, D.C., Torres Chideroli, R., Santo, K., Dib Gonçalves, D., Di Santis,
15 G.W., & Pádua Pereira, U. (2021). Interspecies transmission of Edwardsiella ictaluri in
16 Brazilian catfish (Pseudoplatystoma corruscans) from exotic invasive fish species.
17 *Diseases of Aquatic Organisms*, 145(197-208). doi: 10.3354/dao03610

18 de Azevedo, R.K., Abdallah, V.D., da Silva, R.J., de Azevedo, T.M., Martins, M.L., & Luque,
19 J.L. (2012). Expanded description of Lamproglena monodi (Copepoda: Lernaeyidae),
20 parasitizing native and introduced fishes in Brazil. *Brazilian Journal of Veterinary*
21 *Parasitology*, 21(3), 263-269. doi: 10.1590/S1984-29612012000300015

22 de Azevedo, R.K., Abdallah, V.D., & Luque, J.L. (2006). Community ecology of metazoan
23 parasites of the acará Geophagus brasiliensis (Quoy and Gaimard, 1824) (Perciformes:
24 Cichlidae) from the Guandu river, State of Rio de Janeiro, Brazil [in portuguese]. *Acta*
25 *Scientiarum Biological Sciences*, 28(4), 403-411.

26 de Lucca Maganha, S.R., Cardoso, P.H.M., de Carvalho Balian, S., de Almeida-Queiroz,
27 S.R., Fernandes, A.M., & de Sousa, R.L.M. (2018). Molecular detection and phylogenetic
28 analysis of megalocytivirus in Brazilian ornamental fish. *Archives of Virology*, 163(8),
29 2225-2231. doi: 10.1007/s00705-018-3834-6

30 Dong, H.T., Nguyen, V.V., Le, H.D., Sangsuriya, P., Jitrakorn, S., Saksmerprome, V.,
31 Senapin, S., & Rodkhum, C. (2015). Naturally concurrent infections of bacterial and viral
32 pathogens in disease outbreaks in cultured Nile tilapia (Oreochromis niloticus) farms.
33 *Aquaculture*, 448(427-435), 2015. doi: 10.1016/j.aquaculture.2015.06.027

- 1 Efron, B., Halloran, E., & Holmes, S. (1996). Bootstrap confidence levels for
2 phylogenetic trees. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(23), 13429-
3 13429. doi: 10.1073/pnas.93.23.13429
- 4 Figueiredo, H.C.P., Tavares, G.C., Dorella, F.A., Rosa, J.C.C., Marcelino, S.A.C., Pierezan,
5 F., & Pereira, F.L. (2022). First report of infectious spleen and kidney necrosis virus in Nile
6 tilapia in Brazil. *Transboundary and Emerging Diseases*, 69(5), 3008-3015. doi:
7 10.1111/tbed.14217
- 8 Fonseca, A.A., Jr., Laguardia-Nascimento, M., Scotá Ferreira, A.P., Pinto, C.A., Pereira
9 Freitas, T.R., Rivetti Júnior, A.V., Ferreira Homem, V.S., & Camargos, M.F. (2022).
10 Detection of megalocytivirus in *Oreochromis niloticus* and *Pseudoplatystoma corruscans*
11 in Brazil. *Diseases of Aquatic Organisms*, 149(25-32) doi: 10.3354/dao03657
- 12 IBGE, (2022). Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2022,
13 <https://cidades.ibge.gov.br/>,
- 14 ICTV, (2022). International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). 2022.
- 15 Januário, F.F., Gião, T., Azevedo, R.K., & Abdallah, V.D. (2019). Helminth parasites of *Cichla*
16 *ocellaris* Bloch & Schneider, 1801 collected in the Jacaré-Pepira River, São Paulo state,
17 Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 91(2), e20180579. doi: 10.1590/0001-
18 3765201920180579
- 19 Johan, C.A.C., & Zainathan, S.C. (2020). Megalocytiviruses in ornamental fish: A review.
20 *Veterinary World*, 13(11), 2565-2577. doi: 10.14202/vetworld.2020.2565-2577
- 21 Kurita, J., & Nakajima, K. (2012). Megalocytiviruses. *Viruses*, 4(4), 521-538. doi:
22 10.3390/v4040521
- 23 Kurita, J., Nakajima, K., Hirono, I., & Aoki, T. (1998). Polymerase Chain Reaction (PCR)
24 Amplification of DNA of Red Sea Bream Iridovirus (RSIV). *Fish Pathology*, 33(1), 17-23.
25 doi: 10.3147/jsfp.33.17
- 26 Lacerda, A.C.F., Roubledakis, K., Bereta Junior, J.G.S., Nuñez, A.P.O., Petrucio, M.M., &
27 Martins, M.L. (2018). Fish parasites as indicators of organic pollution in southern Brazil.
28 *Journal of Helminthology*, 92(3), 322-331. doi: 10.1017/S0022149X17000414
- 29 Madi, R.R., & Ueta, M.T. (2009). [The role of Ancyrocephalinae (Monogenea:
30 Dactylogyridae), parasite of *Geophagus brasiliensis* (Pisces: Cichlidae), as an
31 environmental indicator]. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*, 18(2), 38-41. doi:
32 10.4322/rbpv.01802008

- 1 Pattanayak, S., Paul, A., & Sahoo, P.K. (2020). Detection and genetic analysis of infectious
2 spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) in ornamental fish from non-clinical cases: First
3 report from India. *bioRxiv*. doi: 10.1101/2020.08.12.247650
- 4 Pavanelli, G.C., Simas, I.P.N., Gonçalves, J.E., & Castro, A.L.B.P. (2018). Ginger oil
5 (*Zingiber officinale*) in the fight against larvae of *Contracaecum* sp. that cause human
6 zoonoses. *O Mundo da Saúde, São Paulo*, 42(2), 534-547. doi: 10.15343/0104-
7 7809.20184202534547
- 8 Pozza, A., de Lima, F.O.C., Haas, M., & P.A, L. (2018). *Clinostomum* sp. (Digenea:
9 Clinostomidae) and *Ascocotyle* sp. (Digenea: Heterophyidae): metacercariae with
10 zoonotic potential in fishes from Tramandaí-- River basin, southern Brazil. *Boletim do*
11 *Instituto de Pesca*, 44(105-109). doi: 10.20950/1678-2305.2018.303
- 12 Rassier, G.L., Pesenti, T.C., Pereira Júnior, J., da Silva, D.S., Wendt, E.W., Monteiro Cde,
13 M., & Berne, M.E. (2015). Metazoan parasites of *Geophagus brasiliensis* (Perciformes:
14 Cichlidae) in Patos Lagoon, extreme south of Brazil. *Brazilian Journal of Veterinary*
15 *Parasitology*, 24(4), 447-453. doi: 10.1590/S1984-29612015075
- 16 Rimmer, A.E., Becker, J.A., Tweedie, A., & Whittington, R.J. (2012). Development of a
17 quantitative polymerase chain reaction (qPCR) assay for the detection of dwarf gourami
18 iridovirus (DGIV) and other megalocytiviruses and comparison with the Office International
19 des Epizooties (OIE) reference PCR protocol. *Aquaculture*, 358-359(155-163). doi:
20 10.1016/j.aquaculture.2012.06.034
- 21 Rocha, R.S., Pelegrinil, L.S., Camargol, A.A., Abdallah, V.D., & de Azevedo, R.K. (2015).
22 *Sphincterodiplostomum musculosum* (Digenea, Diplostomidae) in *Geophagus brasiliensis*
23 (Perciformes, Cichlidae) collected in a lake at Dois Córregos, São Paulo, Brazil. *Ciência*
24 *Rural*, 45(12), 2223-2228. doi: 10.1590/0103-8478cr20141493
- 25 Rodrigues, R.P., Pereira Júnior, J.A., Brabo, M.F., Santos, F.J.S., Aranha, T.V., & Santos,
26 M.A.S. (2020). Marine sport fishing in the Municipality of São Caetano de Odivelas, Pará
27 State, Amazon, Brazil. *Research, Society and Development*, 9(7), e835974701.
- 28 Scholz, T., de Chambrier, A., Prouza, A., & Royero, R.a. (1996). Redescription of
29 *Proteocephalus macrophallus*, a parasite of *Cichla ocellaris* (Pisces: Cichlidae) from South
30 America. *Folia Parasitologica*, 43(4), 287-291.
- 31 Subramaniam, K., Gotesman, M., Smith, C.E., Steckler, N.K., Kelley, K.L., Groff, J.M., &
32 Waltzek, T.B. (2016). Megalocytivirus infection in cultured Nile tilapia *Oreochromis*
33 *niloticus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 119(3), 253-258. doi: 10.3354/dao02985

1 Swaminathan, T.R., Johny, T.K., Nithianantham, S.R., Sudhagar, A., Pradhan, P.K.,
2 Sulumane Ramachandra, K.S., Nair, R.R., & Sood, N. (2022). A natural outbreak of
3 infectious spleen and kidney necrosis virus threatens wild pearlspot, *Etroplus suratensis*
4 in Peechi Dam in the Western Ghats biodiversity hotspot, India. *Transboundary and*
5 *Emerging Diseases*, 69(5), e1595-e1605. doi: 10.1111/tbed.14494.

6 Valladão, G.M.R., Gallani, S.U., & Pilarski, F. (2018). South American fish for continental
7 aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 10(2), 351-369. doi: 10.1111/raq.12164

8

9

1 **Table 1.** Results of ISKNV by cPCR (conventional-PCR) and nPCR (nested-
 2 PCR) diagnosis from the sampled fish

PCR protocol	Assay	Fish samples												
		T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	A1	A2	
Kurita et al., 1998	cPCR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kurita & Nakajima, 2012	cPCR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rimmer et al., 2012	nPCR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Pattanayak et al., 2020	nPCR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+

3 cPCR: conventional-PCR; nPCR: nested-PCR

4 T1-T10: peacock bass; A1-A2: pearl cichlids

5

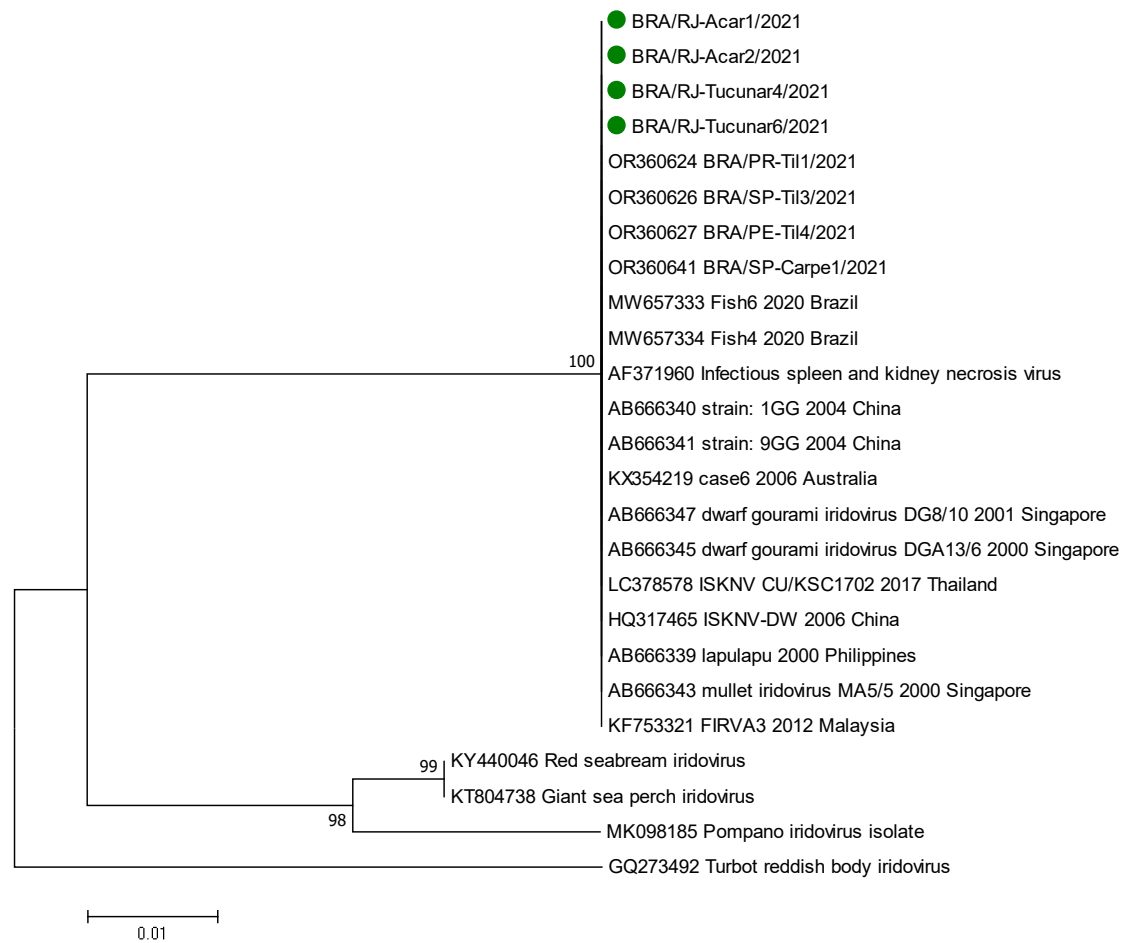


Figure 1: Phylogenetic analysis by maximum likelihood method of partial (354 nt) major capsid protein (MCP) gene of infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV). The evolutionary history was inferred by using the Kimura 2-parameter model. The tree is drawn to scale, with branch lengths measured in the number of substitutions per site. Our isolates BRA/RJ-Tucunar4/2021 and BRA/RJ-Tucunar6/2021, and BRA/RJ-Acar1/2021 and BRA/RJ-Acar2/2021 are grouped with other ISKNV isolates. Other iridovirus sequences were used as an outgroup. Evolutionary analyses were conducted in MEGA7. The ISKNV strains identified in this study are marked with green filled circles.

Supplementary Material

Table S1. Oligonucleotide, amplification techniques and amplified product size used for the diagnosis of ISKNV in fish.

Oligonucleotide name	Sequence (5'-3')	Molecular technique	Amplified product length (bp)	Protocol reference
1-F	CTCAAACACTCTGGCTCATC	PCR	570	(Kurita et al., 1998)
1-R	GCACCAACACATCTCCTATC			
MCP-spec1465-F3	GGTGGCCGGCATCACCAACGGC	PCR	415	(Kurita and Nakajima 2012)
MCP-spec1879-R	CACGGGGTGACTGAACCTG			
C1105	GGGTTTCATCGACATCTCCGCG	PCR	1075	(Pattanayak et al., 2020)
MCP-uni1108-R8	TCTCAGGCATGCTGGGCGCAAAG			
MCP-spec1465-F3	GCTGTTGCAACCATTTGAGA	N-PCR	415	(Rimmer et al., 2012)
MCP-spec1879-R3	ACGGGGTGACTGAACCTG			
C1105	GGGTTTCATCGACATCTCCGCG	PCR	430	(Rimmer et al., 2012)
C1106	AGGTCGCTGCGCATGCCAATC			
C1073	AATGCCGTGACCTACTTTGC	N-PCR	167	
C1074	GATCTTAACACGCGACCCACA			

PCR protocols	Molecular technique	Initial denaturation step	Amplification step			Number of cycles	Final extension step
			Denaturation	Annealing	Extension		
Kurita et al., 1998	PCR	94 °C, 15 m	94 °C, 30s	58 °C, 60s	72 °C, 60s	30	72 °C, 5m
Kurita & Nakajima, 2012	PCR	95 °C, 15 m	95 °C, 60s	60.5 °C, 60s	72 °C, 60s	35	72 °C, 5m
Rimmer et al., 2012	PCR	95 °C, 15 m	95 °C, 180s	55 °C, 30s	72 °C, 60s	30	72 °C, 5m
	Nested	95 °C, 15 m	95 °C, 30s	55 °C, 30s	72 °C, 60s	30	72 °C, 5m
Pattanayak et al., 2020	PCR	94 °C, 15 m	94 °C, 30s	55 °C, 30s	72 °C, 60s	30	72 °C, 5m
	Nested	94 °C, 15 m	94 °C, 30s	60,5 °C, 60s	72 °C, 60s	35	72 °C, 5m

Table S2. Convectional and nested-PCR thermocycler conditions of the different molecular methods used for the diagnosis of ISKNV in fish.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As técnicas moleculares avaliadas nesse estudo possibilitaram detectar a presença de ISKNV em peixes nativos brasileiros da espécie Acará e Tucunaré cultivados em clube de pesca. Este foi o primeiro relato do vírus nessas espécies nativas de peixes brasileiros. Além disso, as sequências de nucleotídeos identificadas nesses animais apresentaram alta identidade com cepas de DNA de ISKNV previamente identificadas em tilápias e carpas de diferentes regiões brasileiras, indicando uma possível transmissão interespecies do vírus.