



Impacto da presença de herpesvírus em peixes e rãs provenientes de criações comerciais, experimentais e recreativas

INSTITUTO BIOLÓGICO

PÓS-GRADUAÇÃO

**Impacto da presença de herpesvírus em peixes e rãs
provenientes de criações comerciais,
experimentais e recreativas**

FABÍOLA DE SOUZA

Dissertação apresentada ao Instituto Biológico, da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, para obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de Concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agrossistema.
Orientador: Prof. Dr. Marcio Hipolito

**São Paulo
2015**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São
Paulo
Núcleo de Informação e Documentação – IB

Souza, Fabíola de.

Impacto da presença de herpesvírus em peixes e rãs provenientes de criações comerciais, experimentais e recreativas./ Fabíola de Souza.– São Paulo, 2015.

61 p.

Dissertação (Mestrado). Instituto Biológico (São Paulo).

Programa de Pós-Graduação.

Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.

Linha de pesquisa: Gestão sanitária e ambiental na produção animal.

Orientador: Marcio Hipolito.

Versão do título para o inglês:

Impactofthepresenceofherpesviruses in fishandfrogsfromcommercial, experimental andrecreationalcreations.

1. Herpesvírus2. Microscopia eletrônica de transmissão3. Histopatologia 4. Peixe 5. Rã-touroI. Souza, Fabíola de II.Hipolito, Marcio III. Instituto Biológico (São Paulo). IV. Título

IB/Bibl./2015/015



SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO BIOLÓGICO
Pós-Graduação
Av. Cons. Rodrigues Alves 1252
CEP 04014-002 - São Paulo - SP
secretariapg@biologico.sp.gov.br



FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do candidato: Fabíola de Souza

Título: Impacto da presença de herpesvírus em peixes e rãs provenientes de criações comerciais, experimentais e recreativas

Orientador: Marcio Hipolito

Dissertação apresentada ao Instituto Biológico da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios para obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de Concentração: Segurança e Sanidade no Agrossistema

Aprovada em: 03 / Junho / 2015

Banca Examinadora

Assinatura:

Marcio Hipolito

*Prof. (a) Dr.(a):

MARCIO HIPOLITO

*Instituição:

INSTITUTO BIOLÓGICO

Assinatura:

Cláudia Maris Ferreira Mostero

*Prof. (a) Dr.(a):

CLAUDIA MARIS FERREIRA MOSTERO

*Instituição:

INSTITUTO DE PESCA

Assinatura:

Antonio M. Antonucci

*Prof. (a) Dr.(a):

ANTONIO MATARESI ANTONUCCI

*Instituição:

FMVZ/FAEF - GARÇA



*Dedico este trabalho a mim.
Por acreditar que vale a pena
soprar bolhas de sabão....*



AGRADECIMENTOS

Ao concluir essa etapa, recordo-me de tantas pessoas a quem ressalto reconhecimento, pois, esta conquista concretiza-se com a contribuição de cada uma delas, seja direta ou indiretamente. No decorrer dos dias, vocês colocaram gotas de amor e esperança para que neste momento findasse essa etapa tão importante para mim.

Agradeço em primeiro lugar a Deus pela oportunidade que é a vida e pela eterna mensagem... *vamos soprar bolhas de sabão e sentir todo o vento, vamos soltar as pipas no ar e com elas nos vamos sonhar, vamos fazer a terra girar... com a força do seu coração o menino alcança a imensidão e em verdade sentimos.*

À minha família, cuja simples existência me proporcionou a segurança e a tranquilidade em saber que eu poderia contar com ela em todos os momentos.

Ao meu pequeno urso, Bernardo... agora eu sei a razão da gente estar aqui.

À Magali D'Angelo, uma homenagem póstuma àquela que me abriu as portas para essa oportunidade e me deixou a mensagem especial de amor à vida.

Ao Prof. Dr. Marcio Hipolito, por ter me acolhido como sua orientada, por compartilhar seu conhecimento e experiência e por sempre ter acreditado na realização deste trabalho. Agradeço também pela compreensão de meus limites e ousadias, auxiliando-me com sua competência, paciência e disposição. Serei eternamente grata por me auxiliar nessa grande conquista.

À Dr. Marcia Catroxo, uma pessoa fantástica da qual sou grata não somente pelas longas horas dedicadas à orientação, mas pela amizade, construída através de muitas conversas. Nunca vou me esquecer das suas palavras que na sua simplicidade, passou uma lição de competência e humanidade, a qual herdo para o restante de minha vida profissional e pessoal. Muito obrigada por tudo!

À Dr. Ana Maria Cristina não só pelas observações histopatológicas realizadas, mas por trazer leveza aos momentos de dificuldade, sempre com seu bom humor e alegria.

Ao meu companheiro e grande amigo Rodrigo cujo exemplo de vida me fizeram acreditar que esse sonho seria possível. Obrigada pelas lições especiais de força e determinação, quando aparentemente nada mais parecia justificar o esforço... *que me dê serenidade para agir de forma consciente e equilibrada. Tal como suas águas doces – que seguem desbravadoras no curso de um rio, entrecortando pedras e se precipitando*

numa cachoeira, sem parar nem ter como voltar atrás, apenas seguindo para encontrar o mar – assim seja”.

À minha amiga e querida companheira de jornada, Christiane, por me dar força nos momentos de dificuldade, onde a fé e a perseverança foram os maiores incentivadores. Ter você como amiga é como o sol brilhando, ilumina o caminho da gente, tornando-o mais alegre. Obrigada por você existir.

À minha velha-nova amiga Luara, por mostrar que amigos não só caminham juntos, mas que também correm juntos.

Aos membros da banca de defesa e qualificação Dra. Adriana Sacioto Marcantônio, Dr. Antonio Mataresio Antonucci, Dra. Claudia Maris Ferreira Mostério e a Dra. Eliana Villalobos pelas sugestões que foram de grande contribuição para o enriquecimento do trabalho.

À turma de Pós-graduação 2013 - 2015 do Instituto Biológico por ser uma turma sempre unida.

Ao Instituto Biológico, por abrir suas portas e permitir a realização desse curso. Foram valiosas suas contribuições para o meu crescimento intelectual e pessoal. A essa instituição, devo minha vida acadêmica.

À Fundação CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – pelo apoio financeiro concedido durante o curso de Mestrado.

No encerramento de uma etapa muito especial, em que a alegria por estar terminando se junta ao cansaço, torna-se difícil lembrar-me de todos aqueles que participaram comigo dessa jornada, mas de uma maneira sincera, agradeço a todos que de uma forma ou de outra colaboraram para a realização dessa dissertação.

Meus sinceros agradecimentos!



*Pra quê soprar bolhas de
sabão se dissolvem ao vento?*



SOUZA, F. IMPACTO DA PRESENÇA DE HERPESVÍRUS EM PEIXES E RÃS PROVENIENTES DE CRIAÇÕES COMERCIAIS, EXPERIMENTAIS E RECREATIVAS. São Paulo. 2015. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental do Agronegócio) – Instituto Biológico.

RESUMO

A aquicultura cresce com maior rapidez que todos os demais setores de produção de alimentos de origem animal e gera benefícios nutricionais, sociais e econômicos significativos, como empregos e promovendo o desenvolvimento econômico em várias regiões. Fatores biológicos como as enfermidades infecciosas causadas por vírus provocam danos à viabilidade econômica das atividades aquícolas. Estas patologias ocorrem majoritariamente em animais confinados, e podem comprometer o desenvolvimento dos animais e até mesmo causar a morte. Os herpesvírus que infectam peixes e rãs fazem parte da ordem *Herpesvirales* e família *Alloherpesvirus*. Nessas espécies, os diferentes tipos de herpesvírus podem causar tumores como adenocarcinoma e lesões cutâneas. Este estudo teve por objetivo detectar a presença de herpesvírus em rã-touro e peixes de interesse comercial como, bagre, bagre-africano, carpa, garoupa, robalo, peixe-citrinelo e tilápia, provenientes de criações comerciais, experimentais e recreativas do Estado de São Paulo, Minas Gerais e Goiás, visando conhecer seu impacto, prevalência, grau de lesão e comprometimento da saúde geral dos animais. Fragmentos de lesões e órgãos internos como fígado, rins e baço foram coletados e enviados ao Instituto Biológico. No Laboratório Interinstitucional de Sanidade em Aquicultura foi realizada a técnica de coloração hematoxilina-eosina e no Laboratório de Microscopia Eletrônica as de contração negativa e inclusão em resina. Pela microscopia eletrônica de transmissão, através da técnica de contração negativa, foram observadas partículas virais com morfologia semelhante à herpesvírus em 86,8% dos peixes e em 46,9% dos anfíbios analisados e pela técnica de inclusão em resina, em cortes ultrafinos, partículas imaturas de herpesvirus medindo 90-110nm de diâmetro, localizadas nos núcleos e completas medindo 160nm. Na histopatologia, lesões associadas ao vírus como corpúsculos de inclusão, papilomas, lesões dérmicas e nas branquias, foram observadas em 27 peixes e 14 rãs-touro. As técnicas avaliadas mostraram-se eficientes para a rápida detecção do herpesvírus nas amostras examinadas.

Palavras-chave: herpesvírus, microscopia eletrônica de transmissão, histopatologia, peixe e rã-touro.

SOUZA, F. IMPACT OF THE PRESENCE OF HERPESVIRUSES IN FISH AND FROGS FROM COMMERCIAL, EXPERIMENTAL AND RECREATIONAL CREATIONS. São Paulo, 2015. Dissertation (Master in Health, Food Safety and Environmental Agribusiness) - Biological Institute.

ABSTRACT

Aquaculture grows faster than all other sectors of production of food of animal origin and has caused significant nutritional, social and economic benefits, creating jobs and promoting economic development in various regions . Biological factors such as infectious viral diseases can cause disorders to the economic viability of aquaculture activities. These diseases occur mainly in confined animals, and can cause serious infectious processes affecting the development of animals and even cause death. Herpesviruses that infect fish and frogs belong to the *Herpesvirales* order and *Alloherpesvirus* family. In these species, the different types of herpesvirus can cause tumors, adenocarcinoma and skin lesions. This study aims to detect the presence of herpesvirus in bullfrogs and fish of commercial interest as tilapia, carp, trout, tambaqui or pacu, from commercial, recreational or experimental creations of the state of São Paulo, and in due from other states, aiming at understanding its impact, prevalence, degree of injury and impaired general health of the animals. In the Health Interinstitutional Laboratory Aquaculture (LISA) was performed hematoxylin-eosin staining technique and in the Electron Microscopy Laboratory (LME) was performed of the negative staining and inclusion in resin techniques. By transmission electron microscopy through negative staining technique, were observed herpes virus-like particles in 86,8% of the fishes and in 46,9% of analyzed amphibians and through embedding resin technique, in ultrathin sections were visualized herpes virus immature particles, measuring 90-110nm in diameter, located in the nuclei and complete particles measuring 160nm. In the histopathology technique, lesions associated with the virus as corpuscles inclusion, papillomas, and dermal lesions and in the gills were observed in 27 fishes and 14 amphibians. The evaluated techniques of TEM and the histopathology were effective for the rapid detection of herpesvirus in the examined samples.

Keywords: herpesviruses, transmission electron microscopy, histopathology, fish, bullfrog

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Representação do ciclo de vida de uma rã-touro. Fonte: Fundação Instituto de Pesca do Rio de Janeiro (FIPERJ), 2014.....10
- Figura 2 - Cadeia produtiva da ranicultura ilustrada com as instalações de um ranário. Inicia-se no ranário, onde se processam todas as fases do ciclo de vida das rãs, a desova, a fase de desenvolvimento do girino até a metamorfose e a recria (processo de engorda dos animais). Concluída a recria, as rãs são levadas para o abate nas indústrias de processamento especializadas (abatedouros), seguindo rigorosamente as normas higiênico-sanitárias definidas pelos organismos de saúde pública. Processada e embalada, a carne é enviada para o mercado consumidor. Fonte: LIMA & AGOSTINHO, 1992.....12
- Figura 3 - Esquema do ICHV-1 (*Ictalurid herpesvirus*) indicando com as setas suas principais estruturas. Fonte: ViralZone.....14
- Figura 4 - Representação do ciclo de replicação de um herpesvírus. Fonte: QIAGEN – Sample & Assay Technologies.....16
- Figura 5 - Representação da reativação viral. (A) os herpesvírus entram no organismo através da pele ou mucosas; (B) após a infecção inicial, o vírus instala-se em nervos perto da coluna vertebral, mantendo-se em latência; diante de fatores estressantes ocorre a reativação do vírus (C) provocando um novo surto, o herpesvírus retorna, através dos nervos, para a pele, onde ocorre a formação de bolhas. Fonte: Profº Ledy Oliveira.....17
- Figura 6 - Fluxograma utilizado para o processamento das amostras de anfíbios. Procedimentos de anestesia, eutanásia, coleta de fragmentos de órgãos e destinação dos materiais fracionados e carcaças. Fonte: Adaptado de Neves (2012).....23
- Figura 7 - Fluxograma utilizado para o processamento das amostras de peixes. Procedimentos de anestesia, eutanásia, coleta de fragmentos de órgãos e destinação dos materiais fracionados e carcaças. Fonte: Adaptado de Neves (2012).....23
- Figura 8 - Lesões macroscópicas observadas em peixes. Exoftalmia e distensão abdominal em carpa (A). Lesões de pele hemorrágicas em pacú (B), bagres-africanos (C e D) e em tilápias (E e F).....27
- Figura 9 - Lesões macroscópicas observadas em rãs-touro. Lesões cutâneas e dedo de rã-touro.....28

- Figura 10 - Eletromicrografia de partícula envelopada de Herpesvírus (seta) em suspensão de fígado de carpa. Barra: 140 nm.....29
- Figura 11 - Eletromicrografia mostrando nucleocápsides virais (seta preta) em suspensão de fígado de carpa. Barra: 120 nm.....29
- Figura 12 - Partículas de herpesvírus, envelopada (seta maior) e não envelopada (seta menor) em suspensão de fígado de rã-touro. Barra: 150 nm.....30
- Figura 13 - Partículas de herpesvírus, envelopadas, em suspensão de fígado de rã-touro, mostrando capsômeros individualizados (seta). Barra 140 nm.....31
- Figura 14 - Eletromicrografia de cortes ultrafinos de cérebro de robalo indicando a presença de partículas incompletas de herpesvírus (seta menor) e extensivas proliferações da membrana nuclear produzindo extensões digitiformes (seta maior). Barra: 800 nm.....32
- Figura 15 - Eletromicrografia de cortes ultrafinos de cérebro de robalo indicando a presença de partículas incompletas de herpesvírus (seta menor) e inclusões amorfas localizadas próximo ao núcleo (seta maior). Barra: 800 nm.....32
- Figura 16 - Fotomicrografia de corte histológico de fígado de bagre-africano, indicando corpúsculo de inclusão basofílico nuclear sugestivo de herpesvírus (seta preta). Coloração HE. Barra 20 μm40
- Figura 17 - Fotomicrografia de corte histológico de fígado de carpa, indicando corpúsculo de inclusão basofílico nuclear sugestivo de herpesvírus (seta preta). Coloração HE. Barra 20 μm40
- Figura 18 - Fotomicrografia de corte histológico de baço de rã-touro, indicando corpúsculo de inclusão basofílico nuclear sugestivo de herpesvírus (seta preta). Coloração HE. Barra 20 μm41

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Gráfico representativo da procedência das atividades da espécies písceas e anfíbias.	22
Gráfico 2 – Principais alterações histopatológicas observadas nos fígado de peixes e número de animais afetados.....	33
Gráfico 3 – Principais alterações histopatológicas observadas em rins de peixes e número de animais afetados.....	34
Gráfico 4 – Principais alterações histopatológicas observadas em baço de peixes e número de animais afetados.....	34
Gráfico 5 – Principais alterações histopatológicas observadas em hepatopâncreas de peixes e número de animais afetados.....	35
Gráfico 6 – Principais alterações histopatológicas observadas em brânquias de peixes e número de animais afetados.....	35
Gráfico 7 – Principais alterações histopatológicas observadas em pâncreas de peixes e número de animais afetados.....	36
Gráfico 8 – Principais alterações histopatológicas observadas em pele de peixes e número de animais afetados.....	36
Gráfico 9 – Principais alterações histopatológicas observadas em SNC de peixe e número de animais afetados.....	37
Gráfico 10 – Principais alterações histopatológicas observadas em fígado de rã-touro e número de animais afetados.....	37
Gráfico 11 – Principais alterações histopatológicas observadas em rim de rã-touro e número de animais afetados..	38
Gráfico 12 – Principais alterações histopatológicas observadas em baço de rã-touro e número de animais afetados.....	38
Gráfico 13 – Principais alterações histopatológicas observadas em pele de rã-touro e número de animais afetados.....	39

Gráfico 14 – Principais alterações histopatológicas observadas em pulmão de rã-touro e número de animais afetados.....39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Produção total, continental e marinha da aquicultura do Brasil nos anos de 2009, 2010 e 2011.....	06
Tabela 2 - Produção de pescado (t) da aquicultura continental por espécie nos anos de 2010 e 2011.....	08
Tabela 3 - Espécies de vírus que acometem peixes e anfíbios.....	13
Tabela 4 - Herpesvírus associados a surtos de doença em peixes e anfíbios.....	18
Tabela 5 - Espécies de peixes utilizadas no estudo.....	21
Tabela 6 - Espécies de anfíbios utilizados no estudo.	21
Tabela 7 - Série gradual de álcool e xilol para desidratação e diafanização dos tecidos.....	25
Tabela 8 - Série gradual para desparafinização, hidratação, coloração, desidratação e diafanização dos cortes de tecido.....	26

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1 - Resultados da técnica de contrastação negativa dos peixes utilizados no estudo	57
Anexo 2 - Resultado da técnica de contrastação negativa dos anfíbios utilizados no estudo	59
Anexo 3 – Certificado da Comissão de Ética na Experimentação Animal – CETEA-IB, protocolo n° 137/14.	61

SUMÁRIO

RESUMO	IX
ABSTRACT	X
LISTA DE FIGURAS	XI
LISTA DE GRÁFICOS	XIII
LISTA DE TABELAS	XV
LISTA DE ANEXOS	XVI
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1. Aquicultura	5
3.2. Piscicultura	7
3.3. Ranicultura	9
3.4. Herpesvírus	13
3.4.1. Morfologia	13
3.4.2. Propriedades do genoma	14
3.4.3. Replicação viral	15
3.4.4. Latência	16
3.4.5. Disseminação	17
3.4.6. Sintomas	18
3.4.7. Herpesvírus em peixes e rãs	18
4. MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1. Coleta de amostras	21
4.2. Técnica de contrastação negativa	24
4.3. Técnica de inclusão em resina	24
4.4. Técnica histológica hematoxilina-eosina	24
4.4.1. Desidratação e diafanização	25
4.4.2. Emblocagem em parafina	25
4.4.3. Seccionamento	25
4.4.4. Montagem das lâminas	25
4.4.5. Coloração	26
5. RESULTADOS	27
5.1. Sintomas e sinais clínicos	27
5.2. Técnica de contrastação negativa	28
5.2.1. Peixes	28

5.2.2. Anfíbios.....	30
5.3. Técnica de inclusão em resina.....	31
5.4. Técnica histológica hematoxilina-eosina	33
6. DISCUSSÃO	42
7. CONCLUSÕES	47
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
9. ANEXO	57
9.1. Anexo 1.....	57
9.2 Anexo 2.....	59
9.3 Anexo 3.....	61

1. INTRODUÇÃO

A percepção dos oceanos como fonte inesgotável de recursos para suprir as necessidades humanas, principalmente em termos de alimentos, tem afetado significativamente os ecossistemas marinhos. A estagnação das capturas da pesca e o crescimento da demanda por pescados não deixam dúvidas que a produção de alimentos de origem marinha é insuficiente para atender as necessidades globais. Em vista disso, a aquicultura, que é o cultivo de organismos aquáticos, é considerada como um dos caminhos mais eficientes para a redução do déficit entre a demanda e a oferta de pescado no mercado. Não é surpresa, portanto, que a participação da aquicultura na produção mundial de pescado venha aumentando nas últimas décadas (CAVALLI & FERREIRA, 2010).

De acordo com Sidonio et al. (2012), o pescado é a carne mais demandada mundialmente. Porém, no Brasil, seu consumo ainda é baixo, mesmo tendo aumentado nos últimos anos para 11,17 kg por habitante por ano (MPA, 2013), valor ainda abaixo do mínimo recomendado pela Organização Mundial de Saúde, que é de 12 kg por habitante por ano (FAO, 2012), mas 14,5% a mais do que em relação ao ano anterior (MPA, 2010).

Esse crescimento do consumo é provocado pelo aumento da conscientização quanto à necessidade de mudança de hábitos alimentares; pelo desenvolvimento tecnológico zootécnico, com redução de custos de produção dos preços de venda; pela diminuição ou estabilização dos estoques pesqueiros naturais, incapazes de suprir as altas taxas de aumento da demanda; pela degradação dos ecossistemas aquáticos litorâneos e continentais; e pela natural necessidade de se manter a captura nos limites da sustentabilidade. No contexto atual, a aquicultura cresce com maior rapidez que todos os demais setores de produção de alimentos de origem animal e gera benefícios nutricionais, sociais e econômicos significativos, como empregos e o desenvolvimento econômico em várias regiões. Definitivamente é um ótimo negócio no presente e no futuro (SEBRAE, 2012).

A aquicultura, em franco desenvolvimento, vem se impondo como atividade pecuária, embora ainda seja considerada por muitos como um apêndice do setor pesqueiro. Praticada em todos os estados brasileiros, a aquicultura abrange principalmente as seguintes criações, de peixes (piscicultura), camarões (carcinicultura), rãs (ranicultura) e moluscos, ostras (ostreicultura) mexilhões

(mitilicultura). Outros cultivos aquáticos, como o cultivo de algas, são praticados em menor escala (SCORVO-FILHO, 2013).

Segundo Iwana (1993) em qualquer sistema de criação é inevitável o estresse aos animais e do mesmo modo ocorre na aquicultura. Ferreira et al. (2001) indicam que os agentes estressores neste caso podem ser resultantes de sistemas não apropriados de criação, manejos inadequados (físico, profilático, sanitário e alimentar), alterações ambientais como temperatura e luminosidade, problemas na qualidade física e química da água, bem como presença de outros animais, pessoas, dentre outros.

Todas as grandes concentrações de animais constituem sempre um fator que favorece o aparecimento de doenças, com isto, cria-se um ambiente favorável para surtos epizooticos, devido à presença de diferentes organismos patogênicos, que em condições naturais teriam expressão mínima (PAVANELLI et al., 2002).

De acordo com Toranzo et al. (2004), as enfermidades infecciosas causadas por vírus podem causar danos à viabilidade econômica das atividades aquícolas. Estas patologias ocorrem majoritariamente em animais confinados, e podem desenvolver sérios processos infecciosos comprometendo o desenvolvimento dos animais e até mesmo causar a morte.

Os herpesvírus fazem parte da ordem *Herpesvirales*, dividido em três famílias, *Alloherpesvirus*, *Herpesviridae* e *Malacoherpesvirus*, englobando vírus que ocorrem em diversas espécies animais, como moluscos, peixes, anfíbios, répteis, aves e mamíferos (ICTV, 2013). A família *Herpesviridae* mantém os vírus de mamíferos, aves e répteis, a família *Alloherpesviridae* incorpora os vírus de peixes e rãs, e a família *Malacoherpesviridae* contém o vírus de bivalves (DAVISON et al., 2009).

Hipolito (2008) cita 4 tipos de herpesvírus que infectam anfíbios, o tipo 1 – agente causador do tumor viral de Lucke das rãs leopardo, sendo a primeira confirmação de um processo tumoral causado por vírus transmissível; o tipo 2, isolado de urina de rã com adenocarcinoma, porém não transmissível e o tipo 3, associado a lesão de pele. Existem ainda as partículas virais “Like” herpesvírus, causando papiloma de pele de salamandra e a hepatite necrótica nos hilídeos.

Os vírus afetam principalmente as primeiras fases de vida dos peixes e, portanto, ovos, larvas e alevinos são mais susceptíveis. Os ovos infectados podem produzir larvas, recém-eclodidos, com sinais clínicos da enfermidade, enquanto os

peixes adultos ao se infectarem podem ou não apresentar qualquer sintoma (MARTINS et al., 2011). Dentro da família dos herpesvírus, pode-se destacar o herpesvírus do papiloma dos ciprinídeos (SCHUBERT, 1996), o herpesvírus do peixe gato e herpesvírus dos salmonídeos (WOLF, 1983).

O diagnóstico definitivo das viroses pode ser feito pelo isolamento ou detecção do vírus nos órgãos afetados, mas as manifestações clínicas, testes sorológicos, citologia e principalmente os achados histológicos ajudam no diagnóstico e conduta terapêutica. Não existe tratamento efetivo para as infecções virais em organismos aquáticos (RITCHIE, 1995). As pesquisas de agentes virais estão sendo realizadas não apenas por PCR, mas também por técnicas de microscopia eletrônica e de anticorpos através do método de ELISA (ZUPANOVIC et al., 1998).

A necessidade de um conhecimento mais detalhado e profundo dos danos ocasionados pelo herpesvírus na aquicultura, em especial na ranicultura e piscicultura, conduziu-nos a essa pesquisa. A relação patológica versus agente etiológico envolvendo estes animais ainda não é bem estabelecida, já que no Brasil não existe um levantamento sobre as herpesviroses píscea e anfíbia, sendo seus relatos esporádicos e oportunistas, dependendo do envio de amostras a um centro de diagnóstico, por isso todos os estudos na área tornam-se importantes, pois os vírus podem permanecer latentes em animais saudáveis ou dizimar plantéis inteiros em uma criação animal, inviabilizando uma produção.

O trabalho também visa disseminar informações e conhecimentos que poderão ser adotados por diferentes instituições, contribuindo para o fortalecimento da comunidade científica, com aplicações para o setor produtivo, para que possa promover o avanço do setor aquícola como um componente importante do agronegócio nacional.

2. OBJETIVO

2.1 Geral:

Esse trabalho teve por objetivo detectar a presença de herpesvírus a partir de fragmentos de órgãos de peixes e rãs provenientes de criações comerciais, experimentais e recreativas, tanto do Estado de São Paulo, Minas Gerais e Goiás, visando conhecer seu impacto, prevalência, grau de lesão e comprometimento da saúde geral dos animais.

2.2 Objetivos Específicos:

- Avaliar as técnicas já utilizadas de diagnóstico (rotina H&E e contrastação negativa para microscopia eletrônica de transmissão);
- Analisar em qual das espécies, píscea e anfíbia houve maior prevalência do herpesvírus;
- Analisar quais órgãos apresentaram maior prevalência do herpesvírus.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. AQUICULTURA

Segundo o MPA (2011a), aquicultura é o cultivo de organismos cujo ciclo de vida em condições naturais se dá totalmente ou parcialmente em meio aquático. Assim como o homem aprendeu a criar aves, suínos e bovinos, bem como a plantar milho e trigo, também aprendeu a cultivar pescado. Desta forma, assegurou produtos para o consumo com mais controle e regularidade.

O setor é dividido em carcinicultura (criação de camarão, caranguejo, siri e caramujo), piscicultura (criação de peixe), ranicultura (criação de rã), ostreicultura (criação de ostras), malacocultura (criação de molusco), mitilicultura (criação de mexilhão) e algocultura (criação de algas) (MEC, 2006).

A aqüicultura é uma prática tradicional de longa data, encontrada em várias culturas pelo mundo. Há registros históricos evidenciando a técnica em documentos e manuscritos chineses datados de séculos remotos, e chega a ser mencionada até em hieróglifos egípcios. Este sistema incluía, de forma simplificada, o armazenamento de exemplares imaturos de diversas espécies de peixes, seu desenvolvimento condicionado a um ambiente propício, que não demandava adição de muitos insumos ou recursos externos, e por fim seu consumo pelas populações, sendo uma importante fonte alimentar (OLIVEIRA, 2009).

O Brasil tem grande potencial para a aquicultura, pelas condições naturais, pelo clima favorável e pela sua matriz energética. Este potencial está relacionado à sua extensão costeira de mais de oito mil quilômetros, à sua zona econômica exclusiva (ZEE) de 3,5 milhões de km² e à sua dimensão territorial, que dispõe de, aproximadamente, 13% da água doce renovável do planeta. Em relação às águas continentais, fazem parte desse volume as áreas alagadas artificialmente pela construção de barragens, contidas em reservatórios de usinas hidrelétricas, bem como áreas particulares para produção em viveiros de terra escavados. Entre elas, destaca-se a possibilidade de utilização das águas da União, tanto as de reservatórios de hidrelétricas, como as de estuários para a instalação de parques aquícolas (ROCHA et al., 2013).

Diante da crescente importância no cenário mundial e nacional, a aquicultura passou a ser considerada estratégica para o Governo Brasileiro. Assim, em 2003, de

um pequeno departamento ligado ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, foi criada a Secretaria Especial de Aquicultura e Pesca da Presidência da República (Seap/PR), transformada, em 2009, em Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA). O MPA é responsável pela implantação e desenvolvimento da política nacional pesqueira e aquícola, o que fez com que o setor produtivo recebesse mais atenção e, assim, foi estabelecido um marco de governança adequado às suas necessidades (ROCHA et al., 2013).

Segundo dados estimados pelo Ministério da Pesca e Aquicultura (2011b), a produção aquícola nacional atingiu em 2011 628.704,3 toneladas, apresentando um incremento de aproximadamente 31,1% em relação a 2010. Comparando-se a produção atual com o montante produzido em 2009 (415.649,0 t), fica evidente o crescimento do setor no país, com um incremento de 51,2% na produção durante o triênio 2009-2011(Tabela 1).

Tabela 1. Produção total, continental e marinha da aquicultura do Brasil nos anos de 2009, 2010 e 2011.

Aquicultura	Produção em toneladas		
	2009	2010	2011
Total	415.649,4	479.398,6	628.704,3
Continental	337.352,2	394.340,0	544.490,0
Marinha	78.296,4	85.058,6	84.214,3

Fonte: Adaptado de MPA (2010) e MPA (2011b).

Em 2011 a aquicultura cresceu forte em todas as regiões brasileiras. O maior percentual apresentado foi o da região Norte, onde a aquicultura cresceu em média 126% em relação ao ano anterior, ao passar a produção de 41.839 toneladas para 94.718 toneladas. Este salto foi percentualmente mais acentuado ainda em Roraima, que passou a produção aquícola de pouco mais de quatro mil toneladas para pouco mais de 25 mil toneladas (518,6%). Outro desempenho expressivo foi o estado do Amazonas. Ali a produção cresceu 132% em 2011, passando de 11.892 toneladas para 27.604 toneladas (MPA, 2011b).

Na região Nordeste, o salto foi de 35%. A produção passou de 146 mil toneladas para 199 mil toneladas de pescado, entre 2010 e 2011. Na região Sudeste, a aquicultura apresentou uma média de crescimento de 21%, passando a produção de 71.770 toneladas para 86.919 toneladas. Minas Gerais surpreendeu. Ali a produção

passou de 11.618,1 para 25.917,9 toneladas, crescimento de 123%. Na região Sul a produção aumentou em média 15%, saindo de uma base de 150 mil toneladas para 172.463 toneladas. Já a região Centro-Oeste apresentou outro desempenho expressivo, embora percentualmente menor de 8%; A produção, que era 69.840,1 toneladas, passou a 75.107,9 toneladas (MPA, 2011b).

O acentuado crescimento na última década tornou a aquicultura um importante agronegócio na escala mundial. De acordo com a FAO (2013), a produção de pescado já proporciona mais de 15% do suprimento total de proteína animal na alimentação humana.

Atualmente, a aquicultura já contribui com aproximadamente 36% do pescado consumido no planeta e deve contribuir muito mais, com o aumento das taxas de crescimento do setor, enquanto a captura encontra-se com improváveis possibilidades de incremento (SEBRAE, 2012).

3.2. PISCICULTURA

A criação de peixes é realizada pelo ser humano há mais de 1000 anos, sendo praticada, desde que se tem registro, pelos chineses, onde há vários séculos o comércio de ovos de peixes destinados à criação piscícola é registrado, sendo esse um dos motivos que levaram a China a possuir grande tradição nesse ramo sendo o único país a possuir uma produção aquícola maior que a de pesca extrativista (SEBRAE, 2006).

A piscicultura teve início no Brasil aproximadamente em 1904 com Carlos Botelho, Secretário de Agricultura de Estado de São Paulo daquela época, mas foi com Rodolfo Von Lhering que intensificou os estudos sobre a piscicultura por volta de 1927, quando iniciou em Pirassununga, Piracicaba e Salto do Itu, com diversos colaboradores, trabalhos com espécies brasileiras como curimatá (*Prochilodus lineatus*), dourado (*Salminus maxillosus*), piracanjuba (*Brycon lundii*), mandi guaçu (*Pimelodus aculatus*) e outras, que foram as espécies que viabilizaram o desenvolvimento da piscicultura nacional (SILVA, 2005; SOUSA & TEIXEIRA FILHO, 2007).

Uma característica importante da piscicultura brasileira é o grande número de espécies criadas. Hoje, utilizam-se mais de 30 espécies, com os mais variados hábitos

alimentares e ambientes de vida. Vão desde espécies de clima tropical (em sua grande maioria) até espécies de clima temperado e frio. E as que oferecem maior produção, em ordem de importância, são as tilápias, os peixes redondos (pacu, *Piaractus*; tambaqui, colossoma e seus híbridos) e as carpas (comum e chinesas). Outras espécies, porém, como os grandes bagres brasileiros (pintado, surubim e pirara), o dourado e os Bricons (matrinxã, piracanjuba, piraputanga e piabanha), começam a despertar o interesse de criadores não apenas pelo seu valor para a pesca esportiva como também pela facilidade de comercialização (SCORVO-FILHO, 2013).

Dentre as espécies exóticas já introduzidas na piscicultura brasileira, a carpa comum (*Cyprinus carpio*) e a tilápia (*Oreochromis niloticus*) apresentam grandes vantagens competitivas em relação às espécies nativas. Em grande parte, isso pode ser explicado não só pela rusticidade que caracteriza tais espécies, como também pelo fato de que já existem informações bem detalhadas sobre suas principais características biológicas e zootécnicas, que podem assim ser aproveitadas em condições de cultivo (OSTRENSKY et al., 2008).

Na piscicultura continental, em 2011, a tilápia e o tambaqui foram as espécies mais cultivadas (Tabela 2), as quais somadas representaram 67,0% da produção nacional de pescado desta modalidade. Merece destaque também a produção de tambacu, carpa e pacu, que juntas representaram 20,1% da produção (MPA, 2011a).

Tabela 2. Produção de pescado (t) da aquicultura continental por espécie nos anos de 2010 e 2011.

ESPÉCIE	2010	2011
Total	394.340,0	544.490,0
Bagre	4.073,4	7.048,1
Carpa	94.579,0	38.079,1
Cascudo	37,1	58,0
Curimatã	5.226,0	7.143,1
Jundiá	1.274,3	1.747,3
Matrinxã	2.981,9	5.702,1
Pacu	21.245,1	21.689,3
Piau	7.227,6	4.309,3
Piraracu	10,4	1.137,1
Pirapitinga	783,6	9.858,7
Piraputanga	1.365,0	265,0
Pintado	2.486,5	8.824,3

Tambacu	21.621,4	49.818,0
Tambaqui	54.313,1	111.084,1
Tambatinga	4.915,6	14.326,4
Tilápia	155.450,8	253.824,1
Traíra	266,3	926,5
Truta	5.122,7	3.277,2
Outros	11.359,6	5.372,2

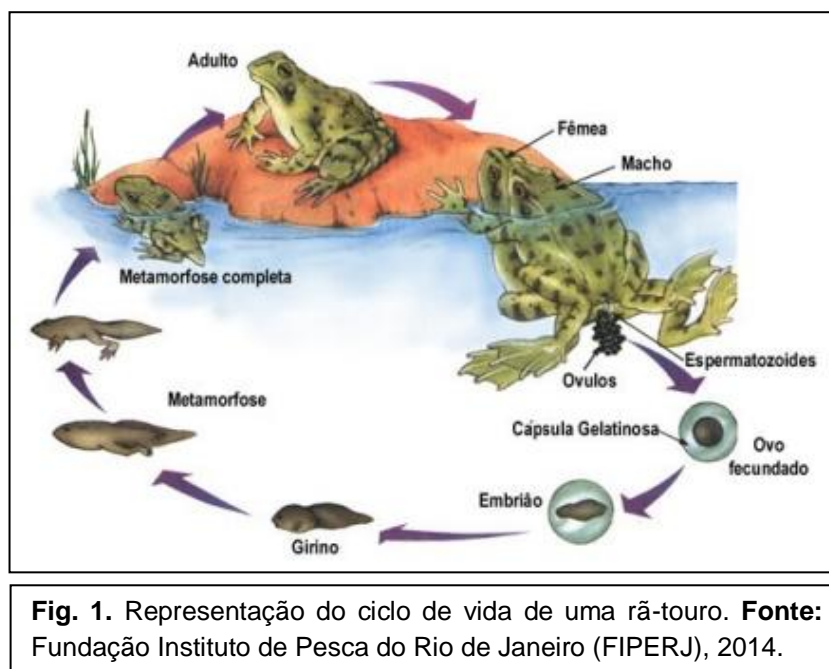
Fonte: Adaptado de MPA (2010) e MPA (2011).

O Brasil é um país com um enorme potencial para o desenvolvimento da piscicultura, pois possui condições ambientais favoráveis, com grande disponibilidade de água; abriga 12% de água doce do mundo e 5,5 milhões de hectares de águas propícias ao desenvolvimento da piscicultura, distribuídas entre reservatórios, rios e barragens; além de desfrutar de um clima favorável (SEBRAE, 2014).

O mercado consumidor por pescados vem crescendo a cada ano, elevando o consumo *per capita* dos brasileiros por pescados de 6,6kg em 2005 para 9,5kg em 2010, apesar de ainda ser considerado abaixo da média mundial que é de 18 kg. Devido a esses fatores, a piscicultura é uma atividade com elevada taxas de crescimento anual e representa uma excelente oportunidade do agronegócio para os pequenos empreendedores (SEBRAE, 2014)

3.3. RANICULTURA

As rãs são animais anfíbios que possuem dois tipos de vida bem distintos (Fig.1): a aquática (girinos) e a terrestre. Para se adaptarem ao segundo ambiente, sofrem uma metamorfose, transformando-se de girino a imago (rãzinha). Tal processo consiste na mudança da forma do corpo, que adquire membros articulados, do hábito alimentar (herbívoro, iliófago ou onívoro para carnívoro) com drásticas modificações no tubo digestivo (passa a ser monogástrico) e do sistema respiratório, passando de branquial para pulmonar e cutânea, possibilitando assim que respire o ar atmosférico (LIMA, 2014).



A criação comercial de anfíbios anuros (rãs) é denominada ranicultura (FERREIRA et al, 2002). E vem cada vez mais se firmando como uma atividade viável e de grande potencial. Isto se deve, entre outros fatores, à qualidade nutricional da carne de rã, que possui um adequado balanceamento de aminoácidos e baixo nível de gordura e colesterol (CASALI et al., 2005).

A atividade zootécnica de criação de rãs engloba a produção de girinos até a metamorfose e a engorda dos animais metamorfoseados (adultos). Esta atividade permite a comercialização de carne, animais vivos para laboratórios e pesquisa, couro e algumas vísceras e gorduras, que são utilizadas na fabricação de cosméticos (COSTA, 1992). Alguns estudos atuais procuram viabilizar ainda mais a produção criando produtos e subprodutos com as carnes e vísceras de rãs (LIMA et al., 1999). Vê-se atualmente um crescente comércio destas rãs no mercado de animais de companhia, o chamado “pet” (ANTONUCCI, 2009).

No Brasil, a ranicultura teve início em 1935 com a chegada de 300 casais de rãs-touro, provenientes do Canadá, e mantidos em um empreendimento denominado Ranário Aurora no estado do Rio de Janeiro. Em 1939, parte destes animais foi trazida para o estado de São Paulo pela Secretaria de Agricultura e instalada no município de Pindamonhangaba (VIANA, 1993; FERREIRA et al., 2002).

Na década de 1980, a valorização da carne de rã no mercado nacional, a perspectiva de exportação e a proliferação de informações fantasiosas acerca da

rentabilidade da ranicultura, atraíram a atenção de investidores rurais, elevando o número de ranários no país (cerca de 2000 unidades em 1988). Porém, devido à inadequação das instalações e técnicas de manejo, muitos destes novos produtores foram obrigados a abandonar a atividade (LIMA & AGOSTINHO, 1995).

Segundo Ferreira et al. (2002) a ranicultura no Brasil tem como principal espécie de criação a rã-touro (*Lithobates catesbeianus*). Outras espécies, nativas de nosso país, como a rã-pimenta, a rã-manteiga e a paulistinha, também podem ser criadas, mas em comparação à rã-touro apresentam um menor desempenho produtivo (baixa prolificidade), maiores dificuldades técnicas (poucos estudos) e burocráticas (grande número de autorizações).

A produção e desenvolvimento dessa espécie no Brasil apresentam-se superiores as do seu país de origem (EUA), ou seja, em média não ultrapassam sete meses de duração para as fases de girino e engorda. Em algumas regiões da América do Norte, este mesmo desempenho chega a durar cerca de quatro anos (FERREIRA et al., 2002).

Os ranários comerciais são setorizados (Fig. 2) para abrigar as diversas fases do desenvolvimento do animal, apresentando uma variação na estrutura e condição das instalações. Estes são divididos em setor de reprodução, desenvolvimento embrionário, girinagem/metamorfose, pré-engorda e engorda, eventualmente algumas criações possuem o setor de estocagem (LIMA & AGOSTINHO, 1995; FERREIRA et al., 2002).

O setor de reprodução é a área do ranário onde os animais reprodutores (matrizes) devem permanecer durante os períodos não reprodutivos. Isto, porque vários ranários comerciais trabalham com baias (tanques) de manutenção, ou repouso sexual, onde os reprodutores são colocados nas épocas mais frias do ano ou, ainda, para se recuperarem do esforço reprodutivo. Nestes locais, eles são separados por sexo e tamanho, alimentados adequadamente e tratados quando apresentam algum dano externo ou fisiológico (FERREIRA et al., 2002).

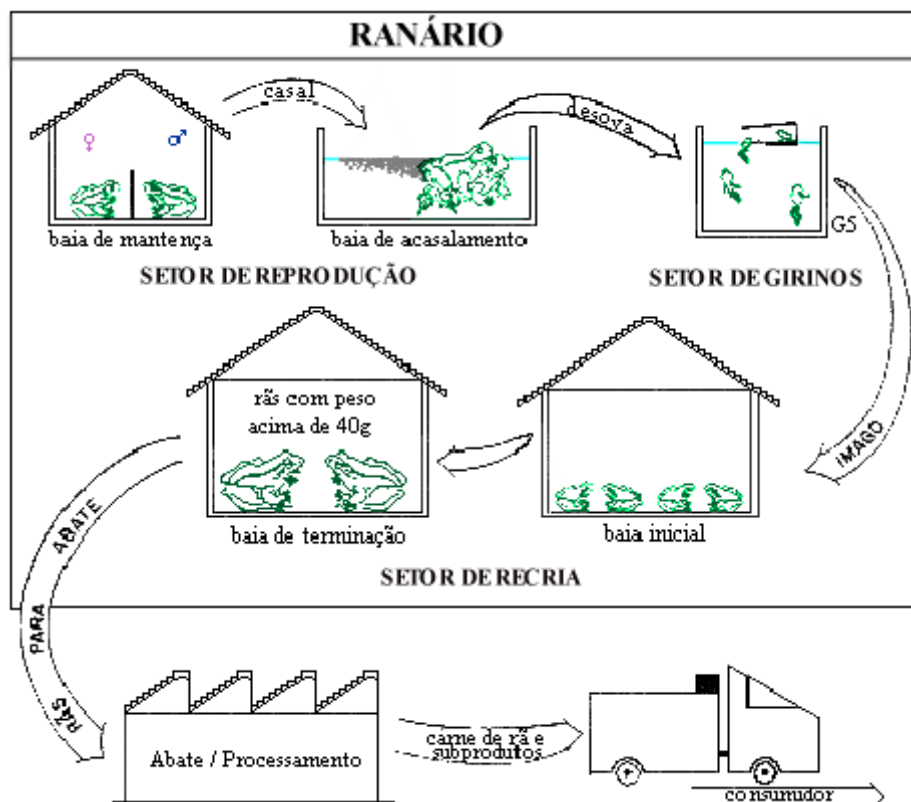


Fig. 2 – Cadeia produtiva da ranicultura ilustrada com as instalações de um ranário. Inicia-se no ranário, onde se processam todas as fases do ciclo de vida das rãs, a desova, a fase de desenvolvimento do girino até a metamorfose e a recria (processo de engorda dos animais). Concluída a recria, as rãs são levadas para o abate nas indústrias de processamento especializadas (abatedouros), seguindo rigorosamente as normas higiênico-sanitárias definidas pelos organismos de saúde pública. Processada e embalada, a carne é enviada para o mercado consumidor **Fonte:** LIMA & AGOSTINHO, 1992.

A ranicultura possui uma série de especificidades biológicas e técnicas em relação às demais atividades pecuárias (FEIX et al., 2006). Com a geração de conhecimentos sobre manejo e alimentação, a ranicultura transformou-se numa atividade superintensiva, com altas densidades de população e dependendo estritamente dos alimentos artificiais balanceados. Entretanto, a esses fatores se associa maior suscetibilidade às doenças de diversas etiologias o que ameaça à viabilidade técnica e econômica dos criatórios de organismos aquáticos, fato que também ocorre em outras atividades produtivas (AUSTIN, 1984).

A eficácia e lucratividade da atividade dependem do bom gerenciamento da produção e da adoção de medidas sanitárias adequadas, tanto preventivas quanto curativas (HIPOLITO, 2004; MARTINS, 2004).

3.4. HERPESVÍRUS

Herpesvírus são vírus que infectam uma ampla gama de vertebrados e invertebrados, incluindo os seres humanos e os animais domésticos (DAVISON et al., 2005). A taxonomia do herpesvírus foi atualizada pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV), onde estão inseridos na ordem *Herpesvirales* e divididos em três famílias, *Alloherpesviridae* (vírus de peixes e rãs) (Tabela 3), *Malacoherpesviridae* (vírus bivalve) e *Herpesviridae* (vírus de mamíferos, aves e répteis) (ICTV, 2013).

Tabela 3. Espécies de vírus que acometem peixes e anfíbios.

Família	Gênero	Espécies
<i>Alloherpesviridae</i>	<i>Bratochovirus</i>	<i>Ranid herpesvirus 1</i>
		<i>Ranid herpesvirus 1</i>
	<i>Cyprinivirus</i>	<i>Anguillid herpesvirus 1</i>
		<i>Cyprinid herpesvirus 1</i>
		<i>Cyprinid herpesvirus 2</i>
		<i>Cyprinid herpesvirus 3</i>
	<i>Ictalurivirus</i>	<i>Acipenserid herpesvirus 2</i>
		<i>Ictalurid herpesvirus 1</i>
		<i>Ictalurid herpesvirus 2</i>
	<i>Salmonivirus</i>	<i>Salmonid herpesvirus 1</i>
<i>Salmonid herpesvirus 2</i>		
<i>Salmonid herpesvirus 3</i>		

Fonte: Dados brutos ICTV (2014). SS: Sem subfamília.

3.4.1 MORFOLOGIA

Os herpesvírus são um grupo de grandes vírus de DNA, que possuem vírions com uma arquitetura muito particular. Dessa forma, historicamente, entre os anos 60 e 80 a designação de um herpesvírus era feita primeiramente com base na morfologia da partícula viral (MCGEOCH et al., 2006). Embora esse fator tenha sido atualmente suplantado pelas sequências protéicas e nucleotídicas (DAVISON, 2002), ele ainda é um fator determinante para a classificação dos herpesvírus. Tipicamente, um vírion é formado por quatro partes, o envelope viral, o tegumento, o capsídeo e o “core”

(OLIVEIRA, 2011). A figura mostra um esquema das principais estruturas de um herpesvírus.

O “core” – também chamado de núcleo, dentro do qual está localizado o genoma viral (OLIVEIRA, 2011), está envolto por um capsídeo icosaédrico de aproximadamente 100 a 110 nm de diâmetro, contendo 162 capsômeros ordenados e côncavos, dos quais 12 são pentaméricos e 150 hexaméricos (THIRY et al., 2006; ROIZMANN & PELLETT, 2007). Entre o envelope e o capsídeo encontra-se uma camada eletrodensa, denominada tegumento, composta por um material amorfo e assimétrico (TIKOO et al., 1995). Na superfície do vírus encontra-se o envelope de dupla camada de glicoproteínas, alvos preferenciais para a resposta imune do hospedeiro (MUYLKENS et al. 2007; ROIZMANN & PELLETT, 2007). Todo este conjunto forma um vírion pleomórfico de 150 a 200 nm de diâmetro (TIKOO et al., 1995).

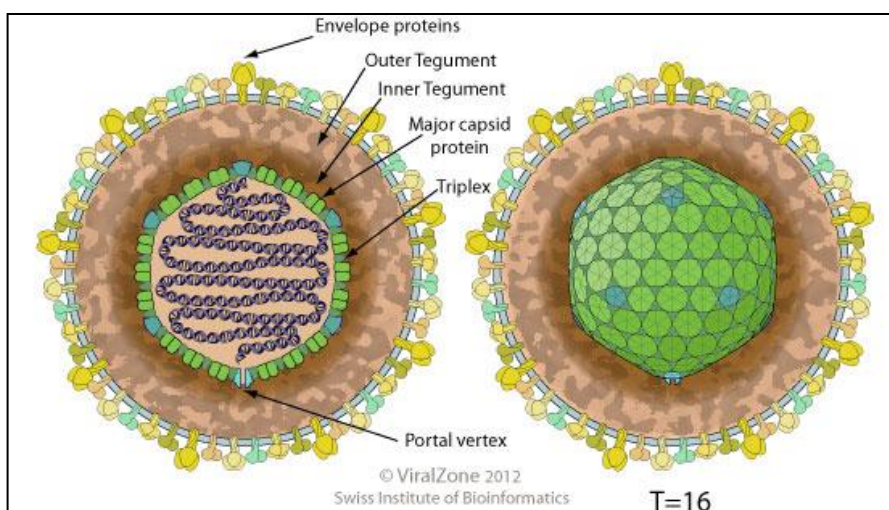


Figura 3 – Esquema do IcHV-1 (*Ictalurid herpesvirus*) indicando com as setas suas principais estruturas. **Fonte:** ViralZone

3.4.2 PROPRIEDADES DO GENOMA

Os herpesvírus apresentam uma fita dupla linear de DNA (dsDNA) (FENNER et al., 1993), podendo variar muito em tamanho, de 124 kbp para o vírus da varicela Simian, a mais de 250 kbp. Esta variação também está presente na família *Alloherpesviridae*, onde IcHV-1 apresenta o menor genoma de 134 kbp, e AngHV-1 e CyHV-3 representam os maiores de 249 e 295 Kbp, respectivamente (BEURDEN & ENGLELSMA, 2012). O teor de G + C varia entre 32 e 75% no interior da família

Herpesviridae (MCGEOCH et al., 2006), parece ser mais restrita entre os membros da família *Alloherpesviridae* (52,8-59,2%), e bastante baixa para OsHV-1 (38,7%) com peso molecular (PM) de 95-150 x 10⁶ Daltons (Da) (FENNER et al., 1993).

3.4.3 REPLICAÇÃO VIRAL

O processo de replicação se inicia com o encontro do vírus com uma célula com receptores de superfície apropriados, que após interagirem com as glicoproteínas do envelope viral, permitem a fusão desses com a membrana plasmática celular. O capsídeo é então transportado ao poro nuclear, onde é liberado o genoma viral. Em neurônios sensoriais, o resultado da entrada no núcleo é a repressão da expressão do genoma viral, com exceção dos genes relacionados com latência (gene LAT). Nas demais células, uma série de eventos conduz à transcrição sequencial dos genes virais, à supressão das respostas imunológicas do hospedeiro à infecção viral e, por fim, à síntese e montagem da progênie viral (ROIZMAN et al., 2005) (Fig. 4).

Na transcrição, três classes de genes virais são transcritos e traduzidos em proteínas imediatas, mediatas e tardias; as proteínas imediatas-primárias participam na transcrição adicional. A replicação ocorre por meio das proteínas mediatas, que sintetizam novas moléculas de DNA virais utilizando o DNA de entrada circulante como modelo. A montagem e aquisição de capsídeos, e saída nuclear ocorrem por meio das proteínas tardias, que montam o capsídeo, e incorporam o DNA viral recém-replicado. Após esta etapa, nucleocapsídeos deixam o núcleo por brotamento através da membrana nuclear interna (em um processo denominado envelopamento) para o espaço perinuclear. Finalmente, por meio de um complexo processo de perda e reaquisição do envelope, as partículas do vírus maduro alcançam as vesículas exocíticas, que se fundem com a membrana plasmática e partículas de novos vírus são liberadas no espaço extracelular (SILVA, 2014).

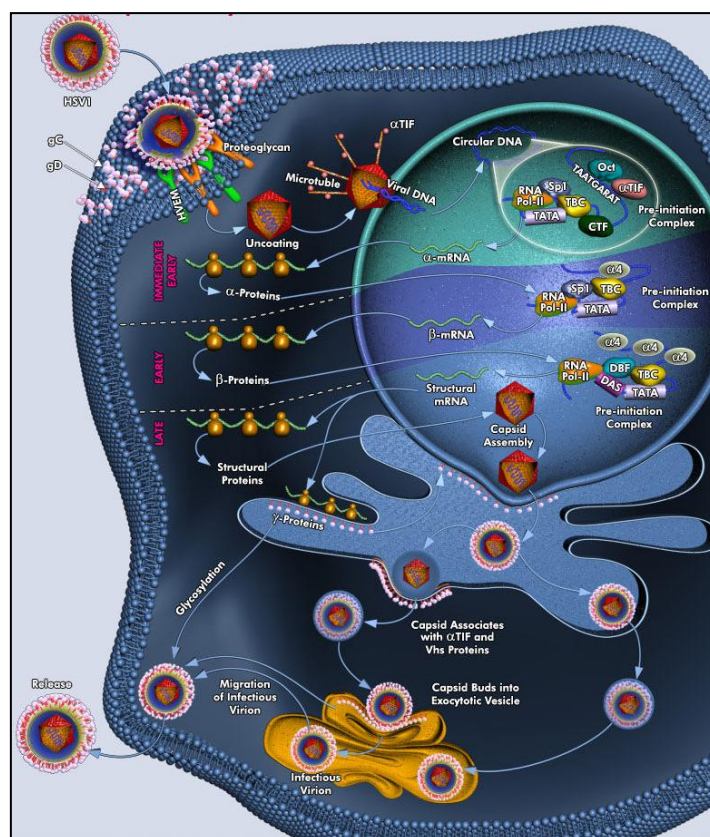


Fig 4. Representação do ciclo de replicação de um herpesvírus. **Fonte:** QIAGEN – Sample & Assay Technologies.

3.4.4 LATÊNCIA

Estudos genéticos atribuem a co-evolução deste grupo viral com seus hospedeiros onde ocorrem infecções latentes, sem causarem doenças graves com alta mortalidade, favorecendo assim, a disseminação dos herpesvírus (FRANCO & ROECHE, 2007). A latência pode ser definida como uma persistência viral na qual o vírus permanece dentro das células em uma forma não patogênica, apresentando períodos intermitentes de reativação e eliminação (AHMED et al., 1996). Todo animal portador latente é potencial fonte de infecção, pois, em situações de baixa resistência, o vírus volta a multiplicar-se e a ser eliminado pelas secreções, favorecendo a disseminação da doença (SILVA, 2011).

Durante a latência, o genoma viral epissemal torna-se circular, e a expressão de genes é limitada. A reativação da infecção (Fig. 5) está associada com vários fatores estressantes como, transporte, condições atmosféricas adversas, superlotação e infecções intercorrentes (QUINN et al., 2005). Dessa forma, segundo Catroxo et al.

(2003) alguns animais podem ser portadores assintomáticos de viroses e quando expostos a uma queda de imunidade, podem desencadear um processo viral, mesmo que a presença viral não possa ser relacionada com a causa *mortis* do animal e não se sabe se a quantidade de partículas virais encontradas contribuem ou não para a piora do quadro.

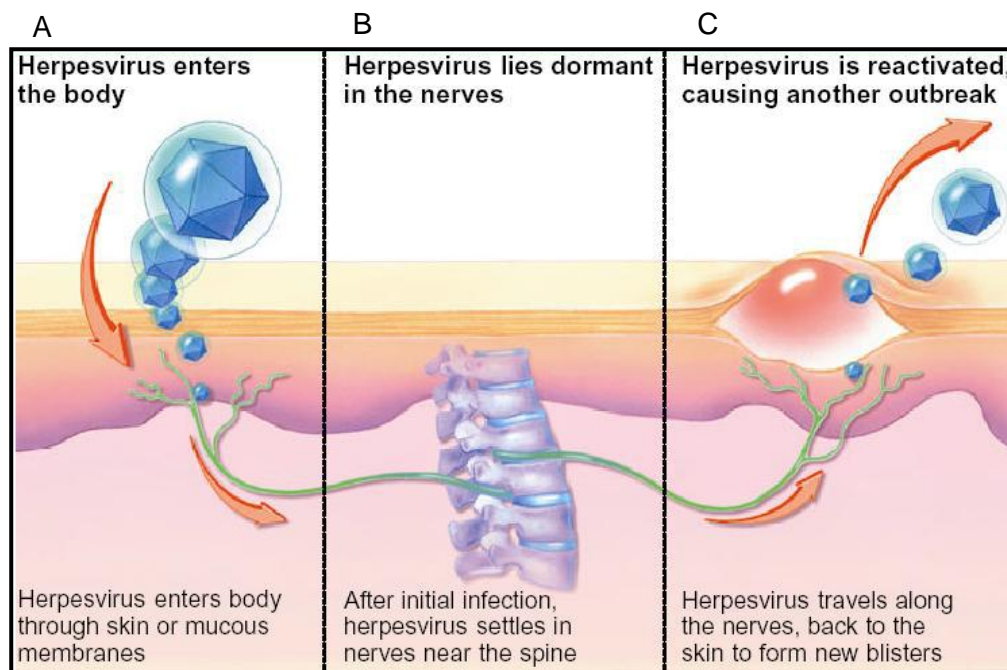


Figura 5 - Representação da reativação viral. (A) os herpesvírus entram no organismo através da pele ou mucosas; (B) após a infecção inicial, o vírus instala-se em nervos perto da coluna vertebral, mantendo-se em latência; diante de fatores estressantes ocorre a reativação do vírus (C) provocando um novo surto, o herpesvírus retorna, através dos nervos, para a pele, onde ocorre a formação de bolhas. **Fonte:** Prof^o Ledy Oliveira.

3.4.5 DISSEMINAÇÃO

A disseminação da infecção provavelmente acontece por três diferentes vias, célula-célula, sangue e sistema nervoso. A transmissão célula-a-célula é característica dos herpesvírus e ocorre sem fase extracelular, por pontes intercelulares, inacessíveis à ação de anticorpos neutralizantes específicos presentes no sangue e nos fluidos intersticiais. O vírus também penetra nas terminações das células nervosas locais e é transportado intraaxonalmente aos sítios de latência, que podem ser os neurônios dos gânglios dos nervos trigêmeo ou sacral dependendo do local de entrada. A disseminação do vírus pela corrente sanguínea (linfócito) é importante, embora o

período de viremia seja curto, pois dessa forma o agente atinge ovários e útero (PASTORET et al., 1982; MEYER, 2001), porém, praticamente não existem informações desse comportamento em animais de sangue frio.

3.4.6 SINTOMAS

A maioria das infecções por herpesvírus são assintomáticas ou podem causar uma doença leve em condições naturais, mas se for um hospedeiro com sistema imune comprometido, anômalo ou em um ambiente que promove a transferência de altas doses de vírus para um hospedeiro, o vírus pode ser altamente patogênico (HANSON et al., 2011).

3.4.7 HERPESVÍRUS EM PEIXES E RÃS

Mais de 14 herpesvírus conhecidos são associados a surtos de doenças em peixes e rãs (Tabela 4). No entanto, a especificidade de hospedeiro e tecido de muitos herpesvírus dificulta a cultura de células. Assim, há muitos mais herpesvírus que causam doenças e que ainda não foram caracterizados (HANSON et al., 2011).

Tabela 4. Herpesvírus associados a surtos de doença em peixes e anfíbios.

VÍRUS (ABREVIÇÃO)	FAMÍLIA E GÊNERO	NOME COMUM (ABREVIÇÃO)	HOSPEDEIRO	DOENÇA
Anguillid HV 1 (AngHV1)	<i>Alloherpesviridae</i>	HV anguillae (HVA)	Enguia-japonesa (<i>Anguilla japonica</i>) Enguia-europeia (<i>A. Anguilla</i>)	Hemorragias da pele, barbatanas, guelras e fígado
Cyprinid HV 1 (CyHV1)	<i>Alloherpesviridae</i> (<i>Cyprinivirus</i>)	HV cyprini, carp pox HV, carp HV (CHV)	Carpa comum <i>Cyprinus carpio</i>	Altas perdas com exoftalmia e hemorragias Os sobreviventes apresentam papilomas
Cyprinid HV 2 (CyHV2)	<i>Alloherpesviridae</i> (<i>Cyprinivirus</i>)	Goldfish hematopoietic necrosis virus (GFHNV)	Peixinho-dourado (<i>Carassius auratus</i>)	Alta mortalidade em todas as idades. Necrose do tecido hematopoiético, baço, pâncreas e intestino.
Cyprinid HV 3 (CyHV3)	<i>Alloherpesviridae</i> (<i>Cyprinivirus</i>)	Koi HV (KHV), carp nephritis	Carpa comum (<i>Cyprinus</i>)	Inflamação, hiperplasia e

		and gill necrosis virus (CNGV)	<i>carpio</i>)	necrose branquial, necrose do tecido hematopoiético, alta mortalidade em 18-26°C, em todas as idades.
Ictalurid HV 1 (IcHV1)	<i>Alloherpesviridae</i> (<i>Ictalurivirus</i>)	channel catfish virus (CCV), Channel catfish herpesvirus	Bagre- americano (<i>Ictalurus</i> <i>punctatus</i>)	Necrose no rim, fígado e intestinal, hemorragias, alta mortalidade in peixes jovens acima de 27°C.
Ictalurid HV 2 (IcHV2)	<i>Alloherpesviridae</i> (<i>Ictalurivirus</i>)	Ictalurus melas HV (IcmHV)	Black bullhead (<i>Ameiurus</i> <i>melas</i>)	Necrose no rim, hemorragias, alta mortalidade em todas as idades.
Acipenserid HV 1 (AciHV1)	<i>Alloherpesviridae</i>	White sturgeon HV 1	Esturjão- branco (<i>Acipenser</i> <i>transmontanus</i>)	Dermatites difusas e altas perdas em juvenis.
Acipenserid HV 2 (AciHV2)	<i>Alloherpesviridae</i> (<i>Ictalurivirus</i>)	White sturgeon HV 2	Esturjão- branco (<i>Acipenser</i> <i>transmontanus</i>)	Hiperplasia epitelial.
Salmonid HV 1(SalHV1)	<i>Alloherpesviridae</i> (<i>Salmonivirus</i>)	HV salmonis (HPV) Steelhead herpesvirus (SHV)	Truta-arco-íris (<i>Oncorhynchus</i> <i>mykiss</i>)	Perdas moderadas até 10°C. Nos adultos, vírus no fluído ovariano. Sem sinais da doença.
Salmonid HV 2(SalHV2)	<i>Alloherpesviridae</i> (<i>Salmonivirus</i>)	Oncorhynchus masou virus (OMV)	Salmão- japonês (<i>O. masou</i>) Salmão- prateado (<i>O. kisutch</i>) Salmão- vermelho (<i>O. nerka</i>) Salmão-cão (<i>O. keta</i>) Truta-arco-íris (<i>O. mykiss</i>)	Viremia, hemorragia externa, exoftalmia, necrose hepática com elevadas perdas nos jovens. Sobrevivente com papiloma oral, elimina o vírus no fluído

				ovariano. Hiperplasia epitelial, hipertrofia, hemorragia nos olhos e mandíbula. Altas perdas nos juvenis entre 6-15°C.
Salmonid HV 3 (SalHV3)	<i>Alloherpesviridae</i> (<i>Salmonivirus</i>)	Epizootic epitheliotropic disease virus (EEDV)	Truta-do-lago (<i>Salvelinus namaycush</i>) Truta-do-lago x brook trout (<i>S. fontinalis</i> hybrids)	
<i>Gadid herpesvirus</i> 1 (GaHV1)	<i>Alloherpesviridae</i>	<i>Atlantic cod herpesvirus</i> (ACHV)	Bacalhao-do-atlântico (<i>Gadus morhua</i>)	Hipertrofia das células nas brânquias. Elevadas perdas em adultos.
Ranid HV 1 (RaHV1)	<i>Alloherpesviridae</i> (<i>Batrachovirus</i>)	<i>Lucké tumor HV</i> (LTHV)	Rã-leopardo (<i>Rana pipiens</i>)	Adenocarcinoma renal.
Ranid HV 2 (RaHV2)	<i>Alloherpesviridae</i> (<i>Batrachovirus</i>)	<i>Frog virus 4</i> (FV-4)	Rã-leopardo (<i>Rana pipiens</i>)	Nenhuma doença conhecida.
Pilchard HV	<i>Alloherpesviridae</i>		Sardinha-chilena (<i>Sardinops sagax</i>)	Grandes perdas com inflamação nas brânquias, hiperplasia epitelial e hipertrofia.
Tilápia HV	Possível <i>Herpesviridae</i>	Tilapia larvae encephalitis virus (TLEV)	Tilápia-azul (<i>Oreochromis aureus</i>)	Encefalite e altas perdas em larvas.
Percid HV 1 (PeHV1)	_____	HV vitreum, walleye HV	Picão-verde (<i>Stizostedion vitreum</i>)	Hiperplasia epidérmica difusa.

Fonte: Adaptado de HANSON et al. (2011).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Coleta de amostras

A coleta de material foi realizada a partir de amostras recebidas para exames pelo Laboratório Interinstitucional de Sanidade em Aquicultura e pelo Laboratório de Microscopia Eletrônica, ambos do Instituto Biológico de São Paulo.

As amostras foram provenientes de criações comerciais, experimentais e recreativas (Gráfico 1) do Estado de São Paulo, Minas Gerais e Goiás. As espécies de peixes utilizadas em nosso estudo estão descritas na Tabela 5. As espécies de anfíbios que utilizamos em nosso estudo estão descritas na Tabela 6.

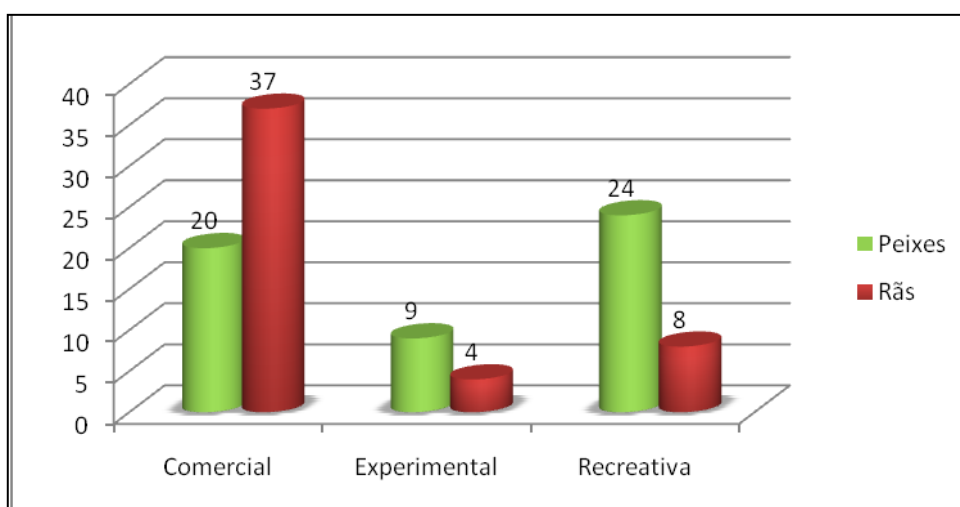
Tabela 5. Espécies de peixes utilizadas no estudo.

NOME POPULAR	NOME CIENTÍFICO	QUANTIDADE
Bagre	<i>Bagre sp</i>	3
Bagre-africano	<i>Clarias gariepinus</i>	2
Bijupira	<i>Rachycentron canadum</i>	3
Carpa	<i>Ciprinus carpio</i>	14
Garoupa	<i>Epinephelus marginatus</i>	1
Jacundá	<i>Crenicichla lenticulata</i>	1
Pacu	<i>Piaractus mesopotamicus</i>	3
Peixe-citrinelo	<i>Cichlassoma citrinellum</i>	1
Piranha-vermelha	<i>Serrasalmus nateteri</i>	1
Robalo	<i>Centropomus parallelus</i>	1
Tambaqui	<i>Colossoma macropomum</i>	1
Tilápia	<i>Oreochromis niloticus</i>	22
Total		53

Tabela 6. Espécies de anfíbios utilizados no estudo.

NOME POPULAR	NOME CIENTÍFICO	QUANTIDADE
Rã-touro	<i>Lithobates catesbeianus</i>	42
Sapo-de-chifre	<i>Proceratophrys boiei</i>	1
Sapo-flecha	<i>Adelphobates galactonotus</i>	2
Rã-do-riacho	<i>Hylodes asper</i>	2
Rãzinha	<i>Leptodactylus podicipinus</i>	2
Total		49

Gráfico 1. Gráfico representativo da procedência das atividades das espécies píceas e anfíbias.



Foram utilizados 202 fragmentos de órgãos como fígado, rim, baço, intestino, pulmão, brânquias, coração, cérebro e lesões de pele de 53 peixes e 211 fragmentos de órgãos e lesões de 49 rãs-touro.

Quando vivos, os animais foram anestesiados por imersão em água com cloridrato de benzocaína (4:1) e eutanasiados por meio de secção da coluna cervical logo abaixo na cabeça e em seguida pesados. Os sacrifícios realizados no presente projeto foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto Biológico (CETEA-IB) registrado sob o número de protocolo 137/14 (Anexo 3). O material extraído de cada animal foi fracionado em 3 porções. As duas primeiras porções foram colocadas em microtubos de 1,5 mL, sendo uma parte congelada para realização da técnica de contrastação negativa e a outra parte preservada em glutaraldeído para a realização da técnica de inclusão em resina. O restante do material colhido foi preservado em coletores universais de 80 mL parcialmente preenchidos com formalina 10% tamponada pH 7,4 para a realização dos cortes histológicos (figuras 6 e 7).

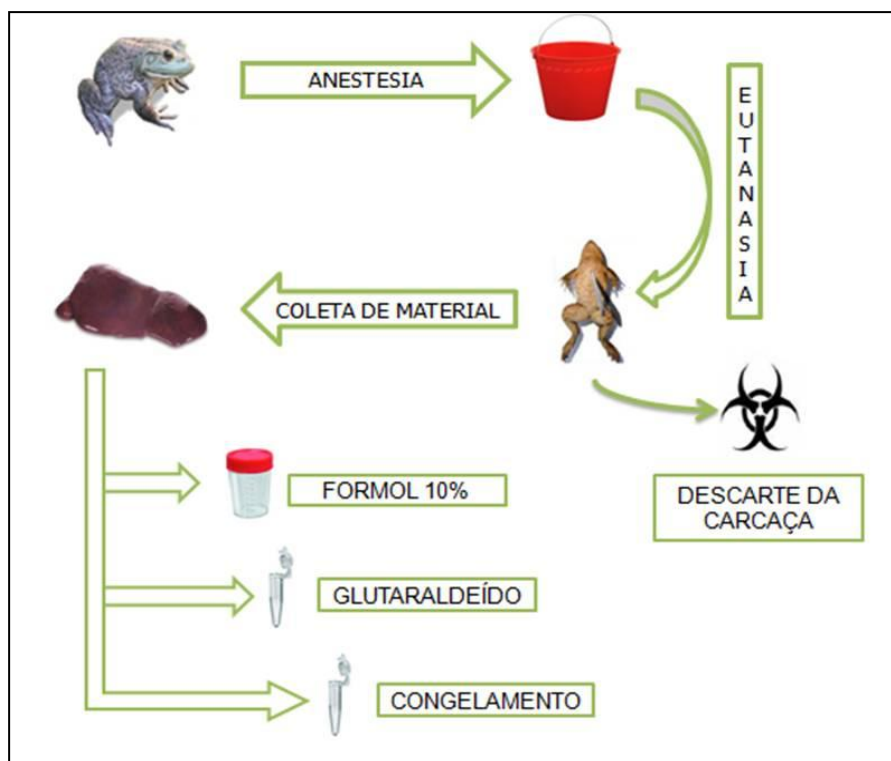


Figura 6 - Fluxograma utilizado para o processamento das amostras de anfíbios. Procedimentos de anestesia, eutanásia, coleta de fragmentos de órgãos e destinação dos materiais fracionados e carcaças. **Fonte:** Adaptado de Neves (2012).

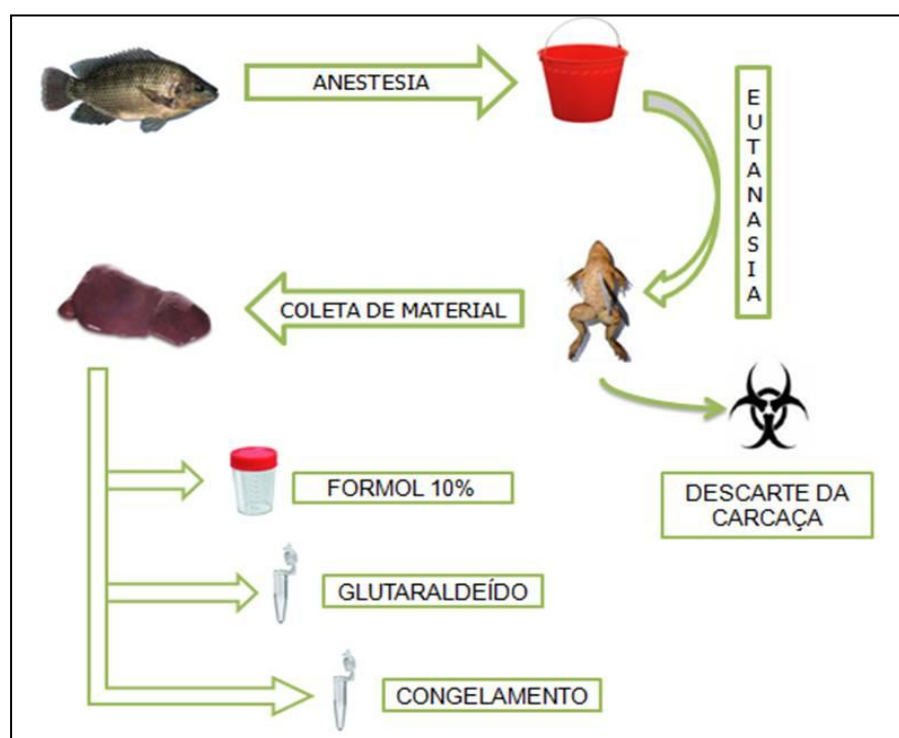


Figura 7 - Fluxograma utilizado para o processamento das amostras de peixes. Procedimentos de anestesia, eutanásia, coleta de fragmentos de órgãos e destinação dos materiais fracionados e carcaças. **Fonte:** Adaptado de Neves (2012).

4.2 Técnica de contrastação negativa

As amostras foram processadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto Biológico de São Paulo. Os fragmentos de órgãos e lesões de pele foram macerados em tampão fosfato 0,1M pH 7,0, obtendo-se uma suspensão do material. Com uma pipeta automática foi colhida uma gota dessa suspensão e colocada sobre um pedaço de parafilm já aderido a uma placa de petri. Sobre cada gota foi depositada uma tela de cobre, previamente coberta com filme de colódio e metalizada com carbono, deixando-se incubar por 10 minutos. Sequencialmente, as telas foram contrastadas negativamente com molibdato de amônio e drenadas com papel filtro (BRENNER & HORNE, 1959).

As telas foram examinadas em Microscópio Eletrônico Philips EM 208 deste laboratório.

4.3 Técnica de inclusão em resina

As amostras foram processadas de acordo com os procedimentos usuais de inclusão em resina, baseando-se nos métodos de Luft (1961) e Gonzalez-Santander, (1969) no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto Biológico.

As amostras de órgãos foram cortadas em fragmentos menores (3 mm) e fixados em glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato 0,1M e pH 7,0, pós-fixados em tetróxido de ósmio a 2% em tampão fosfato 0,2M, pH 7,0, contrastadas *in blocos* por acetato de uranila a 0,5%, desidratados em série cetônica crescente (50 a 100%) e incluídos em resina Spurr. Após ultraseccionamento dos blocos, os cortes ultrafinos (200 Å) obtidos foram corados positivamente pelo tratamento sequencial de acetato de uranila (WATSON, 1958) e citrato de chumbo (REINOLDS, 1963).

4.4. Técnica histológica Hematoxilina-Eosina

As amostras foram processadas no Laboratório Interinstitucional de Sanidade em Aquicultura do Instituto Biológico de São Paulo. A histotécnica (desidratação, diafanização, emblocagem em parafina, microtomia e coloração hematoxilina/eosina) foi realizada segundo Michalany (1980).

4.4.1 Desidratação e diafanização

Após a fixação em formaldeído 10%, as amostras foram cortadas em fragmentos menores, depositadas em cassetes histológicos e submetidas a duas lavagens por imersão em tampão por um período de 10 minutos. Seguiu-se a desidratação em série crescente de etanol nas concentrações 70% a 100%, durante 25 minutos cada passagem; logo após a desidratação o material foi imerso em banhos de xilol para a diafanização durante 30 minutos (Tabela 7).

Tabela 7 – Série gradual de álcool e xilol para desidratação e diafanização dos tecidos.

REAGENTES	TEMPO
Álcool 70%	1h
Álcool 80%	1h
Álcool 95% I	0,5h
Álcool 95% II	0,5h
Álcool Absoluto I	1h
Álcool Absoluto II	1h
Xilol I	1h
Xilol II	1h
Xilol III	1h
Parafina	<i>overnight</i>

4.4.2 Emblocagem em parafina

As amostras foram colocadas em parafina líquida e mantidas em estufa 60° *overnight*. Posteriormente, as amostras foram incluídas em parafina em moldes plásticos apropriados.

4.4.3 Seccionamento

O bloco foi cortado ao micrótomo Zeiss Hyrax M55®, obtendo-se os cortes com 4µm de espessura e estendidos em banho-maria (60°), para posterior montagem das lâminas.

4.4.4 Montagem das lâminas

Os cortes de material parafinado foram montados em lâminas de vidro tratadas previamente com gelatina ultrapura para facilitar a adesão do corte histológico na lâmina. Para a montagem da lâmina e lamínula foi empregada a resina sintética Entellan (Merck®) e em seguida, a lâmina foi colocada em estufa 63°C *overnight*.

4.4.5 Coloração

A coloração consiste em desparafinização das amostras com xilol, lavagem em álcool absoluto, hidratação em soluções hidroalcoólicas, coloração pela HE, desidratação em álcoois e diafanização em xilol modificado por Michalany (1980) (Tabela 10). A observação das lâminas foi realizada sob microscópio de luz Carl-Zeiss Axio Scope.A1® e o registro das imagens, a partir de um *software* de captura de imagem ZEN®.

Tabela 8. Série gradual para desparafinização, hidratação, coloração, desidratação e diafanização dos cortes de tecido.

Reagentes	Tempo
Xilol I	5 minutos
Xilol II	5 minutos
Álcool absoluto	2 minutos
Álcool 95%	2 minutos
Álcool 80%	2 minutos
Álcool 70%	1 minuto
Água corrente	Imersão rápida
Hematoxilina	3 minutos
Diferenciador de Hematoxilina	Imersão rápida
Eosina	2 minutos

5. RESULTADOS

5.1 Sintomas e sinais clínicos

Os sintomas e sinais clínicos observados nos peixes foram caracterizados por incoordenação em robalo, carpas, peixe-citrinelo, piranha-vermelha, pacu, jacundá e tambaqui; letargia, exoftalmia e distensão abdominal em carpas; lesões hemorrágicas espalhadas pelo corpo, principalmente nas barbatanas de bagres-africanos, pacus e tilápias; fígado alterado em cor em consistência, além de nódulos hepáticos em bijupiras, tilápias e pacus e morte súbita em carpas e garoupa (figura 8).

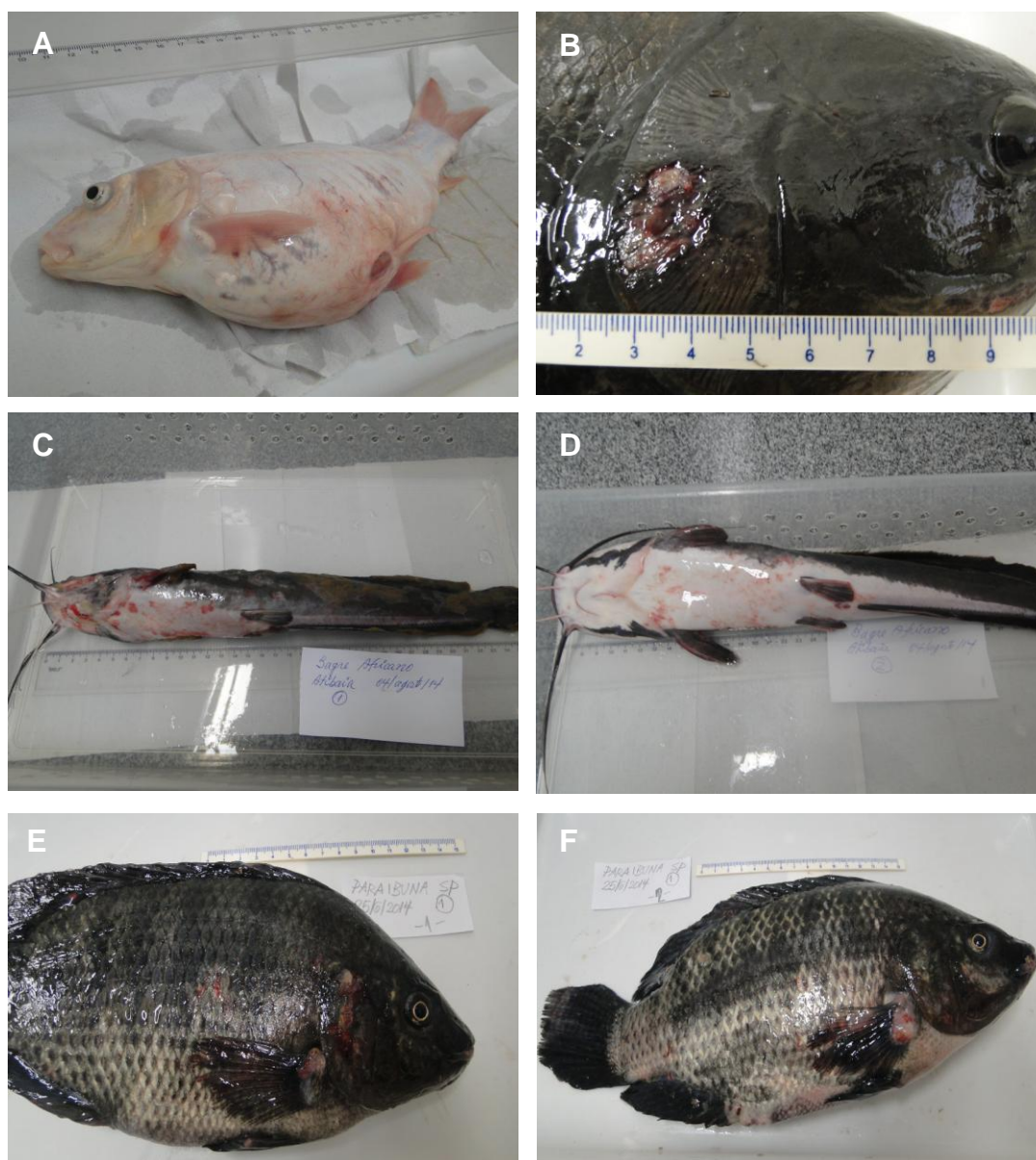


Figura 8 - Lesões macroscópicas externas observadas em peixes. Exoftalmia e distensão abdominal em carpa (A). Lesões de pele hemorrágicas em pacú (B), bagres-africanos (C e D) e em tilápias (E e F).

Nas rãs-touro, observamos lesões cutâneas e nos dedos (figura 9).

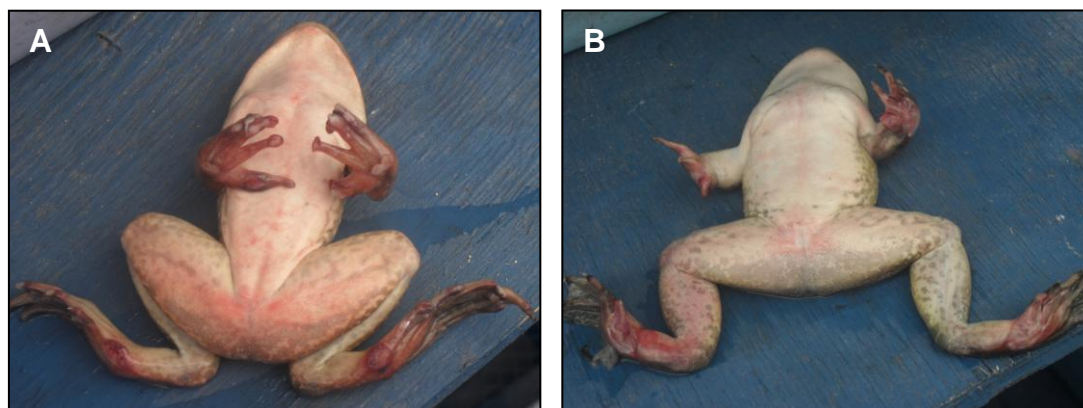


Figura 9 – Lesões macroscópicas externas observadas em rã-touro. Lesões cutâneas (A) e nos dedos (B) de rã-touro.

5.2 Técnica de contrastação negativa

5.2.1 Peixes

Um total de 202 amostras de fragmentos de órgãos (fígado, rim, baço, intestino, hepatopâncreas, brânquias, coração, SNC e lesões de pele) de 53 peixes (Anexo 1) foram processadas separadamente para observação ao microscópio eletrônico de transmissão, utilizando a técnica de contrastação negativa (preparo rápido). Ao microscópio eletrônico de transmissão Philips EM 208, 46 (86,8%) animais apresentaram-se positivos para partículas com morfologia semelhante à herpesvírus, pleomórficas, algumas envelopadas, medindo entre 120 e 200 nm de diâmetro (Fig. 10 e 11), sendo 3 bagres (*Bagre sp*), 2 bagres-africanos (*Clarias gariepinus*), 3 bijupira (*Rachycentron canadum*), 14 carpas (*Ciprinus carpio*), 1 garoupa (*Epinephelus marginatus*), 1 jacunda (*Crenicichla lenticulata*), 3 pacus (*Piaractus mesopotamicus*), 1 peixe-citrinelo (*Cichlassoma citrinellum*), 1 piranha-vermelha (*Serrasalmus nateteri*), 1 robalo (*Centropomus parallelus*), 1 tambaqui (*Colossoma macropomum*) e 15 tilápias (*Oreochromis niloticus*). Um total de 7 (13,2%) animais foram negativos para herpesvírus, sendo todos tilápias (*O. niloticus*).



Figura 10 - Eletromicrografia de partícula envelopada de Herpesvírus (seta) em suspensão de fragmento de fígado de carpa. Barra: 140 nm



Figura 11 - Eletromicrografia mostrando nucleocápsides virais (seta) em suspensão de fígado de carpa. Barra: 120 nm

5.2.2 Anfíbios

Foram processadas para observação ao microscópio eletrônico de transmissão Philips EM 208, utilizando a técnica de contrastação negativa (preparo rápido), 211 amostras de fragmentos de órgãos (fígado, rim, baço, intestino, pulmão, coração, cérebro e lesões de pele) de 49 anfíbios (Anexo 2). Desses 49 anfíbios, 23 (46,9%) animais apresentaram-se positivos para herpesvírus (Fig. 12 e 13), sendo 16 rãs-touro (*Lithobates castebeianus*), 1 sapo-de-chifre (*Proceratophrys boiei*), 2 rãs-do-riacho (*Hylodes asper*), 2 rãzinhas (*Leptodactylus podicipinus*) e 2 sapos-flechas (*Adelphobates galactonotus*). As partículas eram pleomórficas, icosaédricas, algumas envelopadas, medindo entre 120 e 200 nm de diâmetro. Um total de 26 (53,1%) animais foram negativos para herpesvírus, sendo todos rã-touro (*L. catesbeianus*).

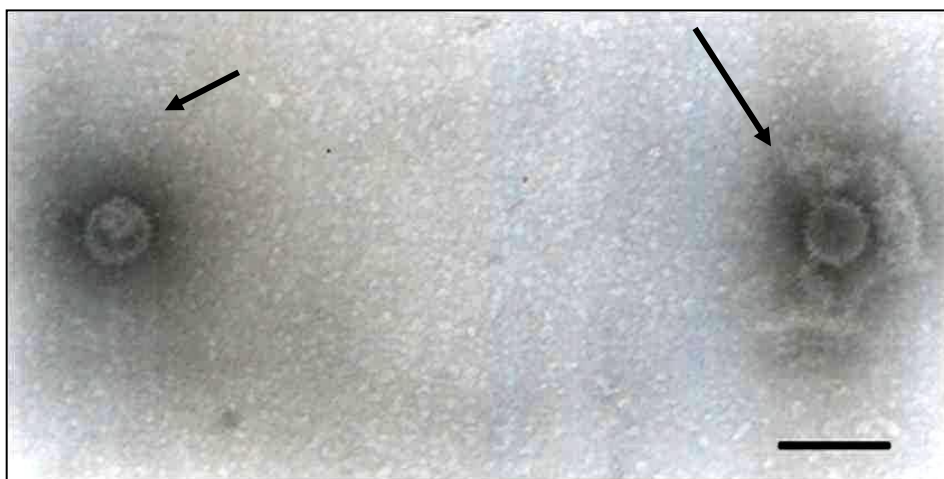


Figura 12 - Partículas de herpesvírus, envelopada (seta maior) e não envelopada (seta menor) em suspensão de fígado de rã-touro. Barra: 150 nm.

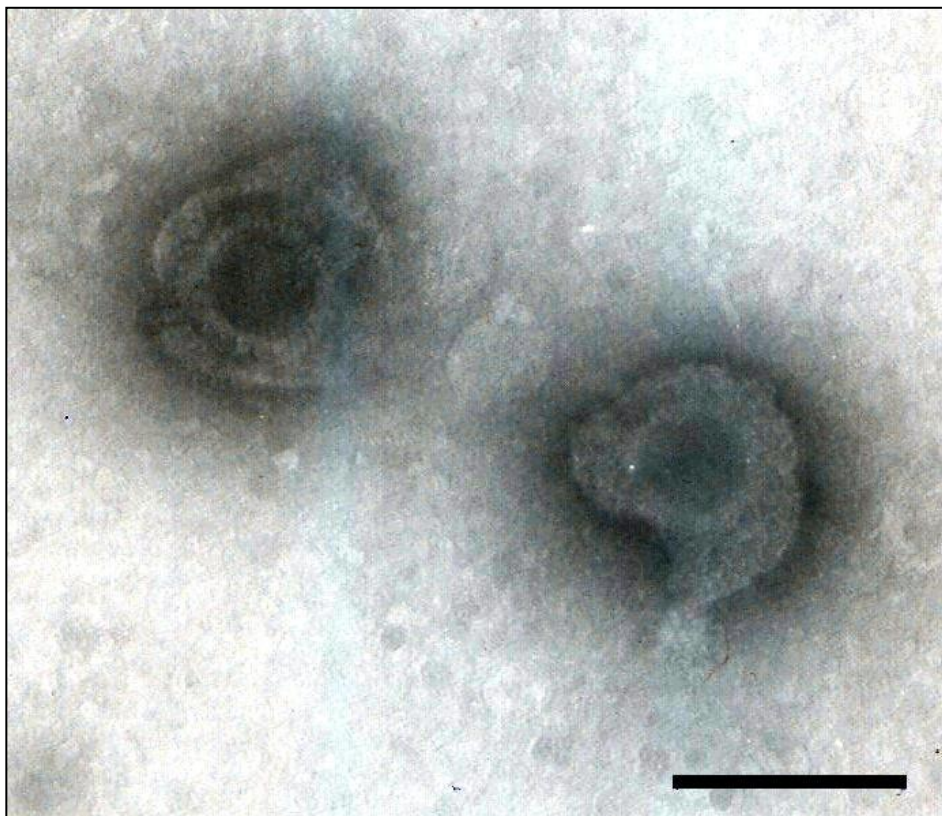


Figura 13 – Partículas de herpesvírus, envelopadas, em suspensão de fígado de rã-touro, mostrando capsômeros individualizados (seta). Barra 140 nm.

5.3 Técnica de inclusão em resina

Todas as amostras de fragmentos de fígado, cérebro e de pele de peixes e rãs positivas pela TCN foram submetidas à TIR.

Ao microscópio eletrônico de transmissão foram visualizadas em cortes ultrafinos corados positivamente pela combinação de acetato de uranila a 2% e citrato de chumbo, partículas de herpesvírus, imaturas, localizadas intranuclearmente, medindo entre 90 a 110 nm e completas com 160 nm de diâmetro. Observamos também, extensas proliferações da membrana nuclear produzindo extensões digitiformes (Fig. 14) e inclusões amorfas localizadas próximo ao núcleo (Fig. 15).

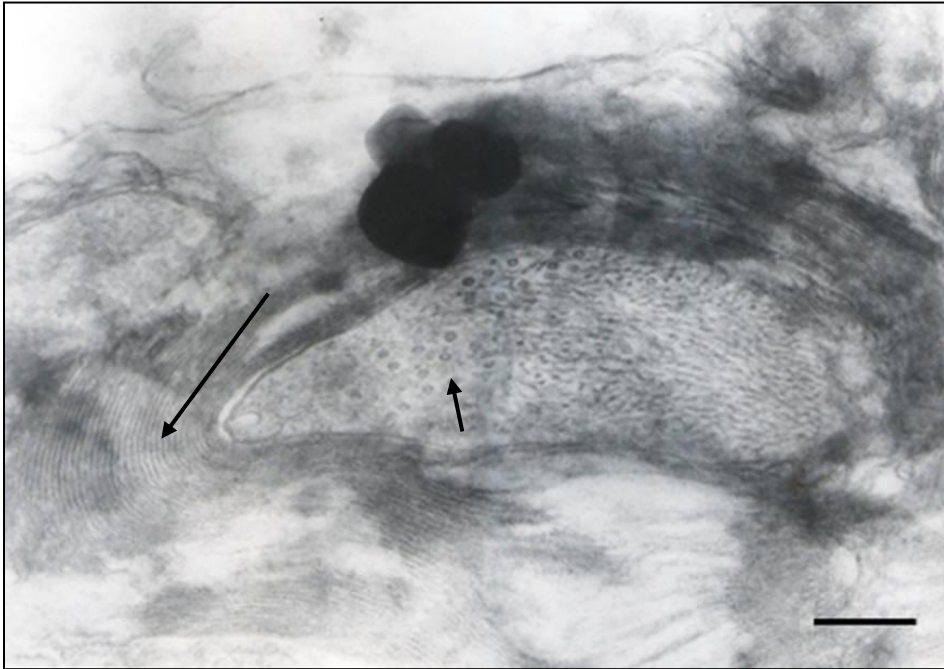


Figura 14 - Eletromicrografia de cortes ultrafinos de cérebro de robalo indicando a presença de partículas incompletas de herpesvírus (seta menor) e extensas proliferações da membrana nuclear produzindo extensões digitiformes (seta maior). Barra: 800 nm.

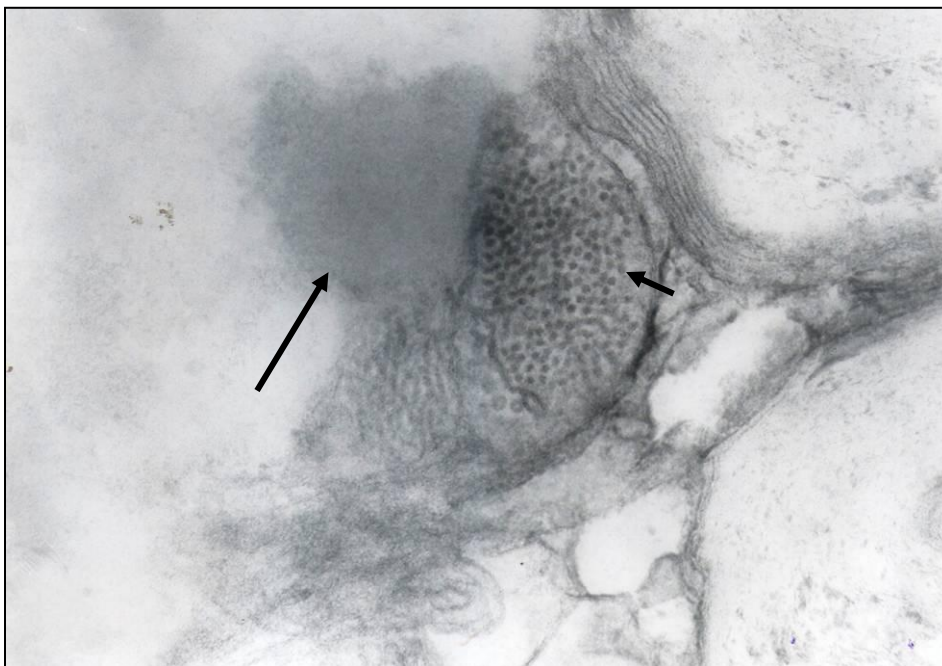


Figura 15 - Eletromicrografia de cortes ultrafinos de cérebro de robalo indicando a presença de partículas incompletas de herpesvírus (seta menor) e inclusões amorfas localizadas próximo ao núcleo (seta maior). Barra: 800 nm.

5.4 Técnica histológica Hematoxilina – Eosina

Foram analisadas pela técnica de H&E, amostras positivas pela técnica de microscopia eletrônica de 27 peixes, sendo 13 carpas, 8 tilápias, 2 bagres-africanos, 1 tambaqui, 1 piranha vermelha, 1 garoupa e 1 peixe-citrinelo e de 14 rãs-touro. As alterações que observamos nos peixes estão descritas nos gráficos 2 a 9 e as lesões que observamos na rãs-touro, nos gráficos 10 ao 14. As figuras 16, 17 e 18 ilustram os corpúsculos de inclusão sugestivos de herpesvírus. Nas amostras de SNC e de coração de rãs-touro não foram observadas alterações.

Gráfico 2. Principais alterações histopatológicas observadas em fígado de peixes e número de animais afetados.

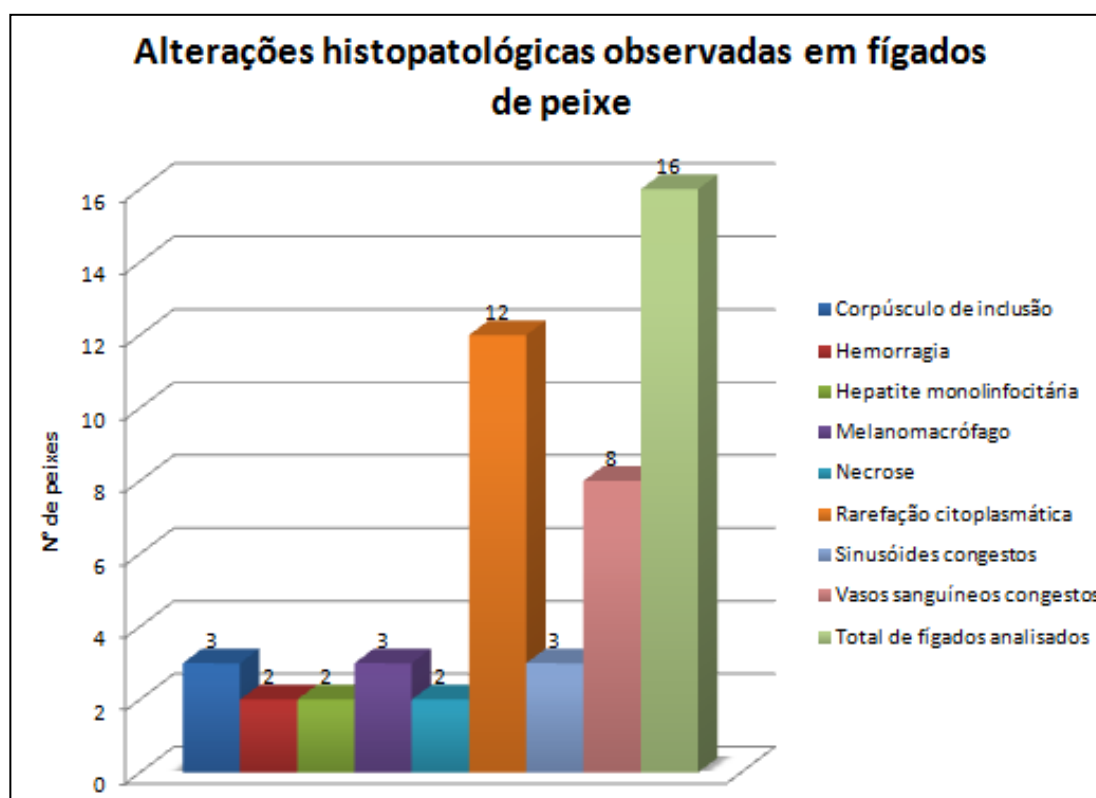


Gráfico 3. Principais alterações histopatológicas observadas em rins de peixes e número de animais afetados.

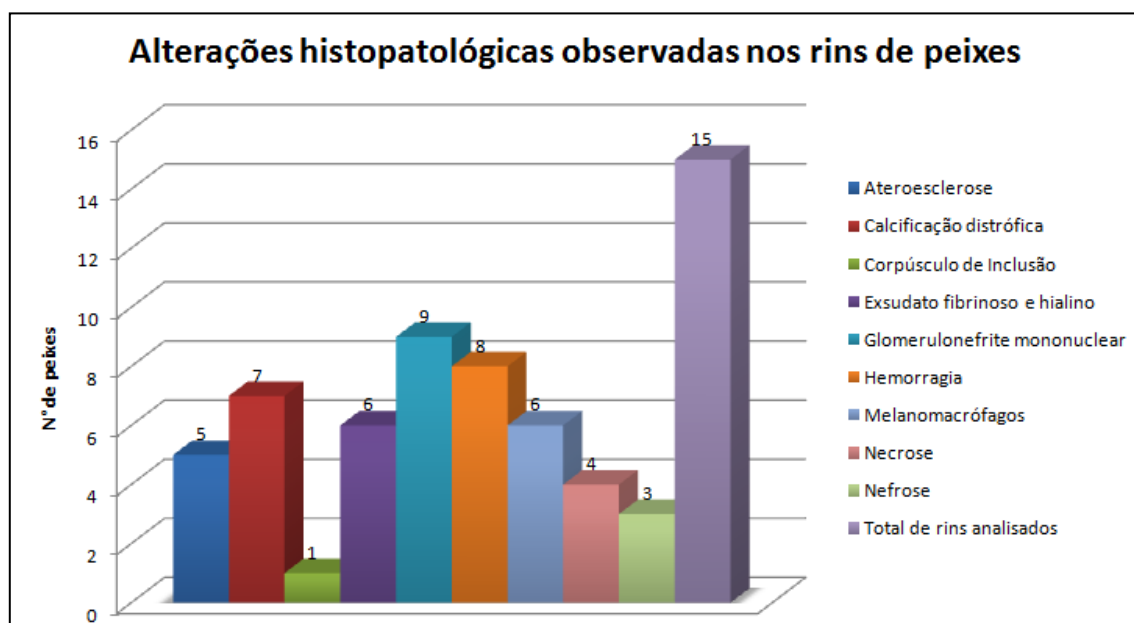


Gráfico 4. Principais alterações histopatológicas observadas em baço de peixes e número de animais afetados.

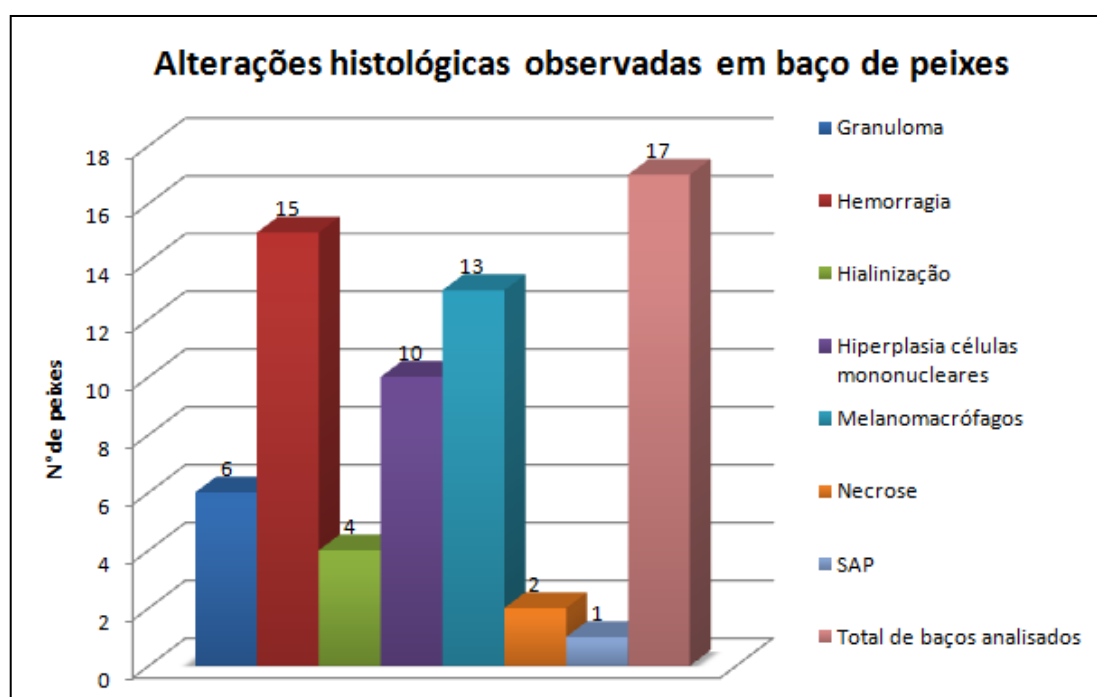


Gráfico 5. Principais alterações histopatológicas observadas em hepatopâncreas de peixes e número de animais afetados.

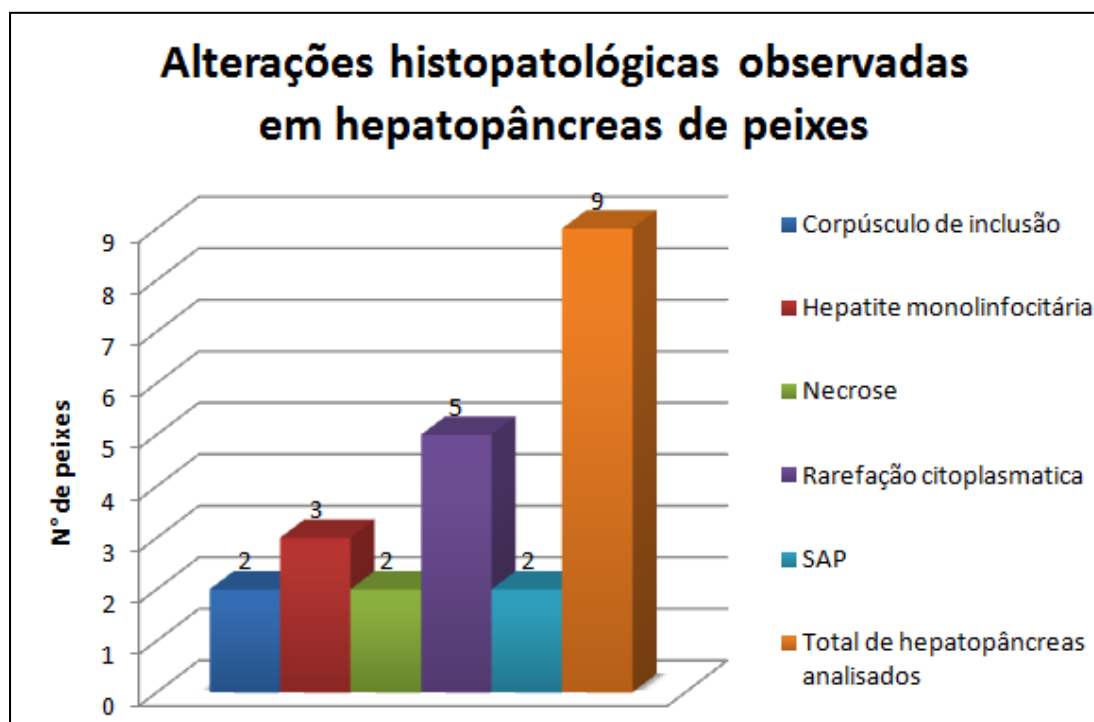


Gráfico 6. Principais alterações histopatológicas observadas em brânquias de peixes e número de animais afetados.

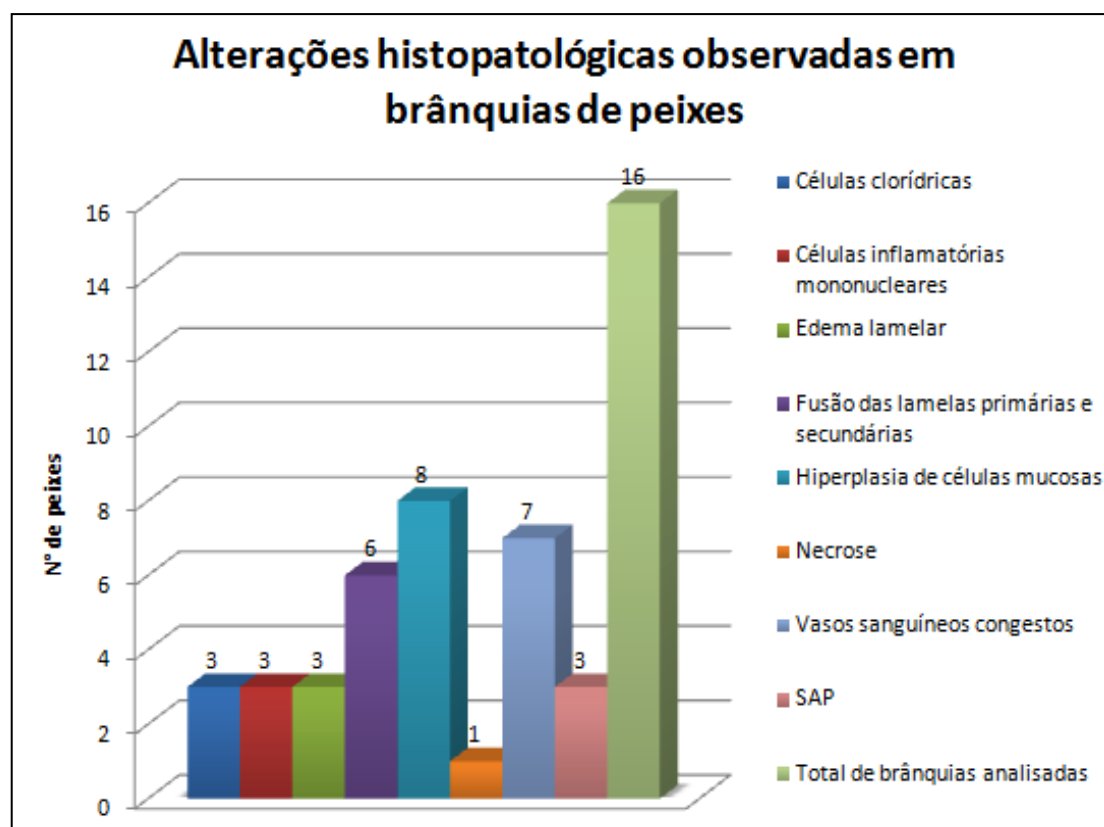


Gráfico 7. Principais alterações histopatológicas observadas em pâncreas de peixes e número de animais afetados.

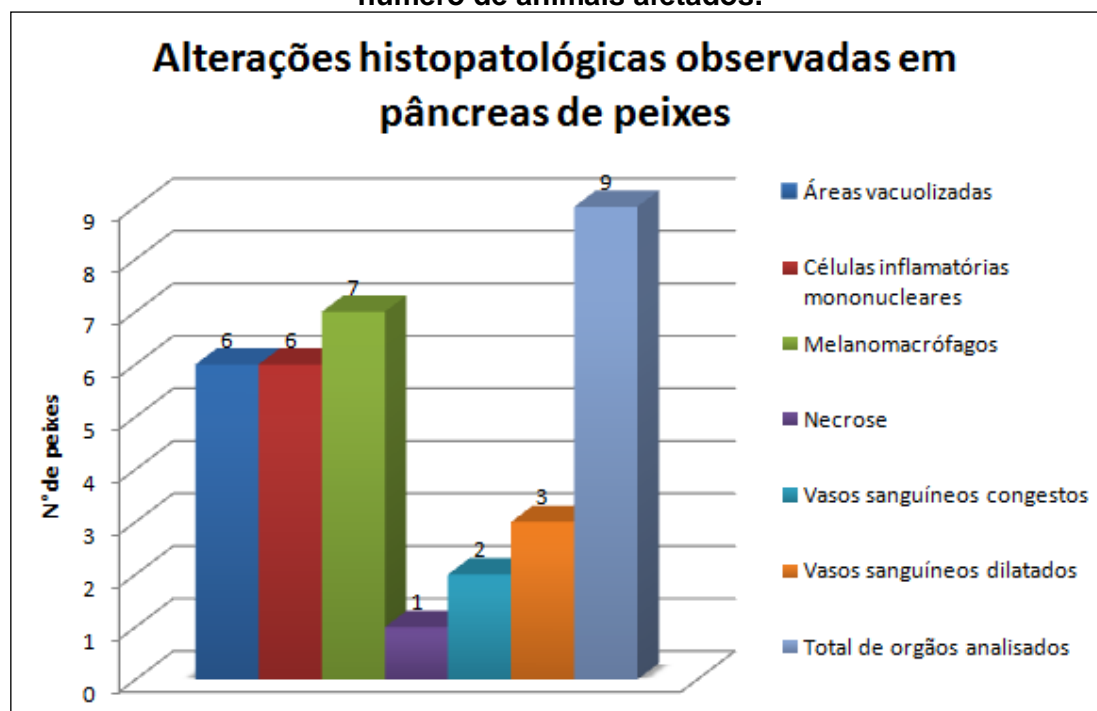


Gráfico 8. Principais alterações histopatológicas observadas em pele de peixes e número de animais afetados.

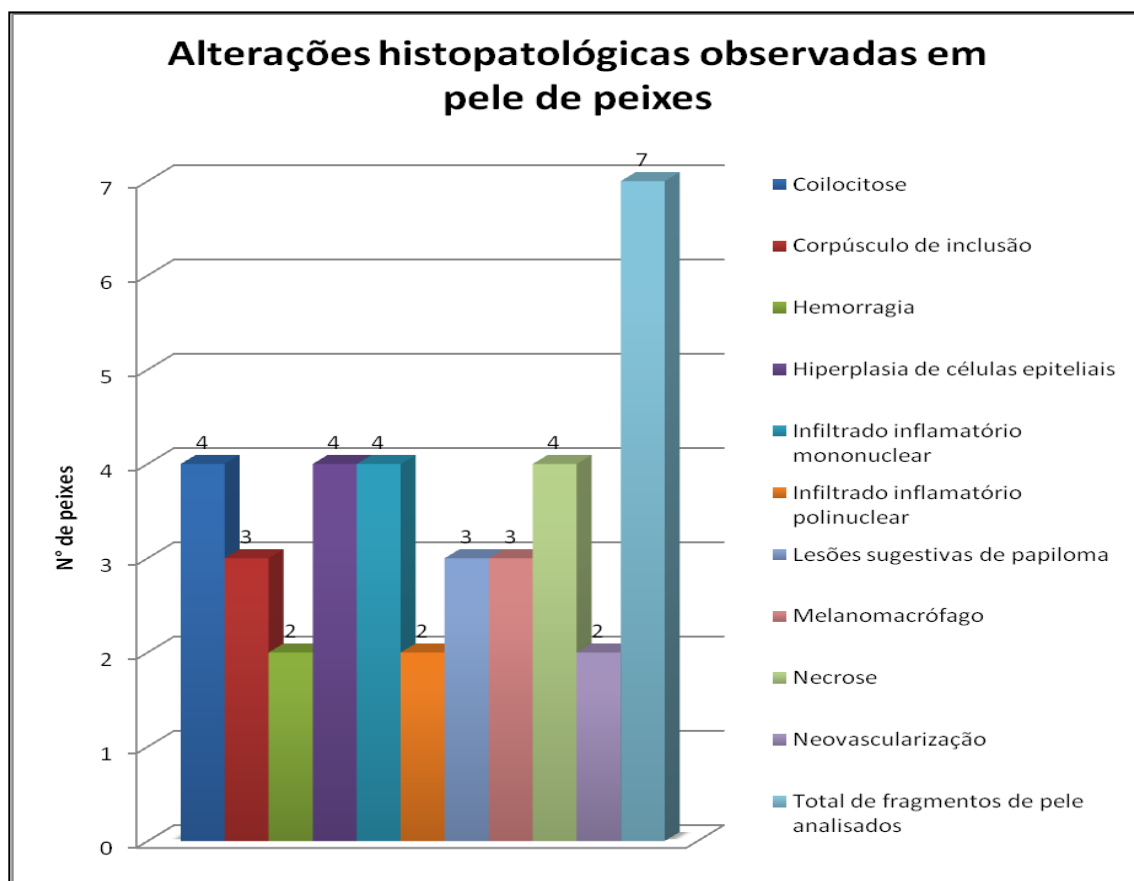


Gráfico 9. Principais alterações histopatológicas observadas em SNC de peixes e número de animais afetados.

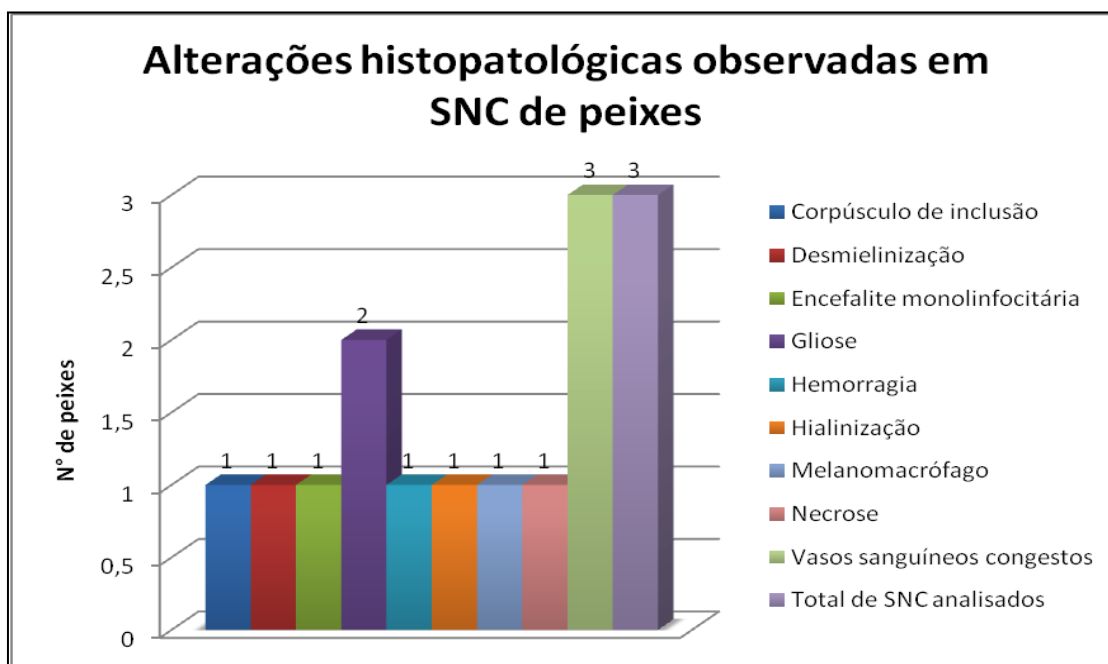


Gráfico 10. Principais alterações histopatológicas observadas em fígado de rãs-touro e número de animais afetados .

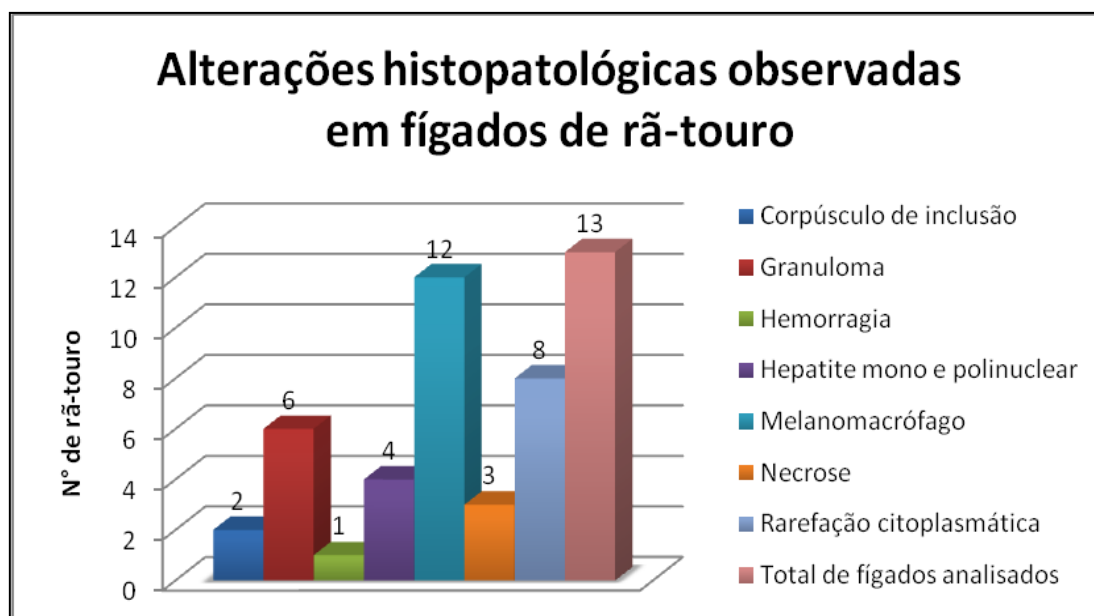


Gráfico 11. Principais alterações histopatológicas observadas em rins de rãs-touro e número de animais afetados.

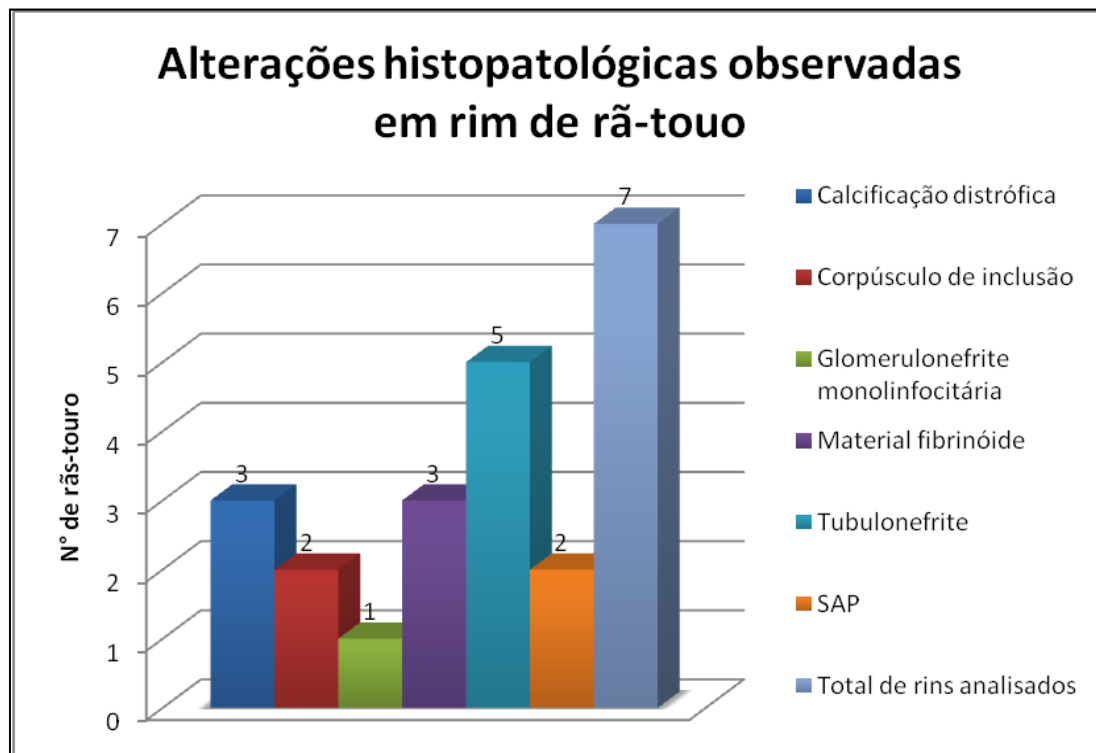


Gráfico 12. Principais alterações histopatológicas observadas em baços de rãs-touro e número de animais afetados.

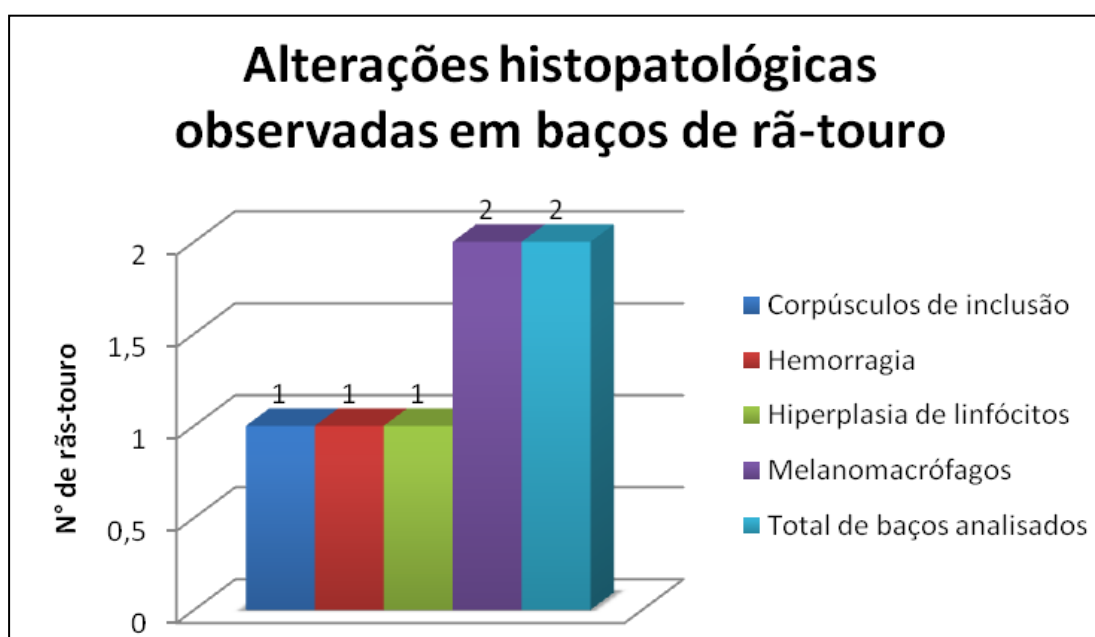


Gráfico 13. Principais alterações histopatológicas observadas em pele de rãs-touro e número de animais afetados.

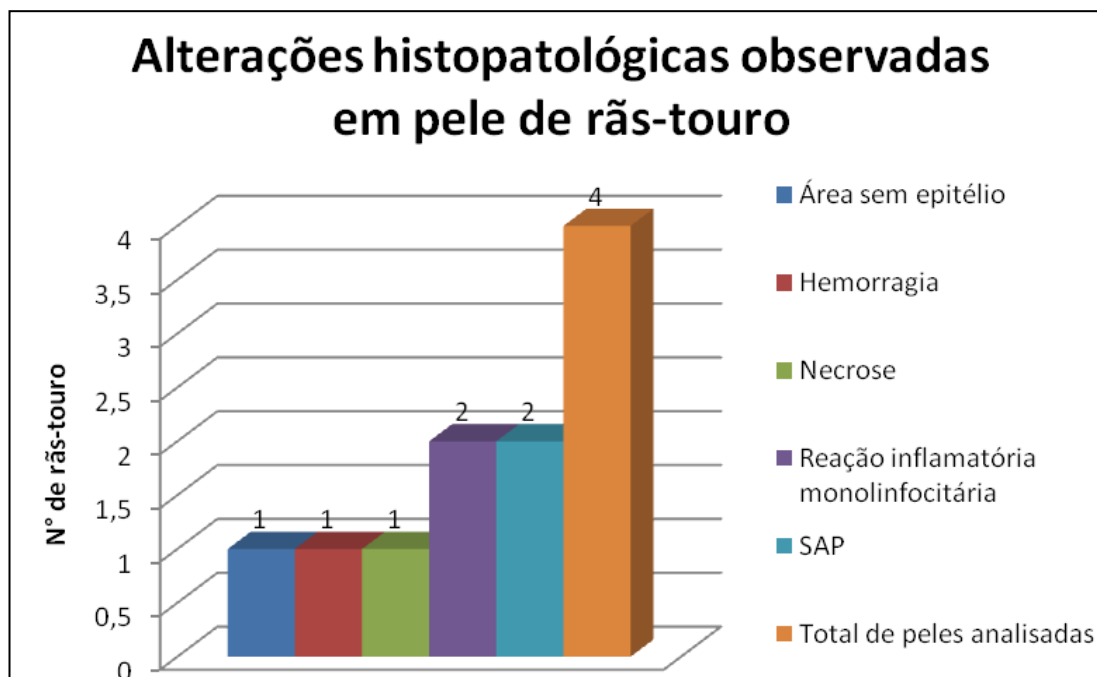
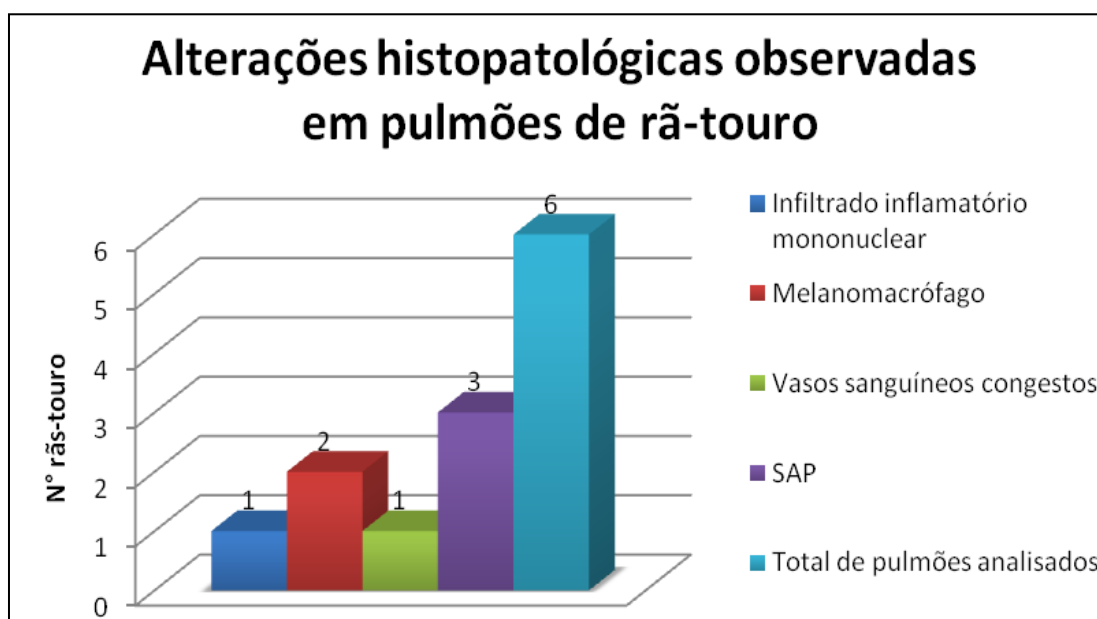


Gráfico 14. Principais alterações histopatológicas observadas em pulmões de rãs-touro e número de animais afetados.



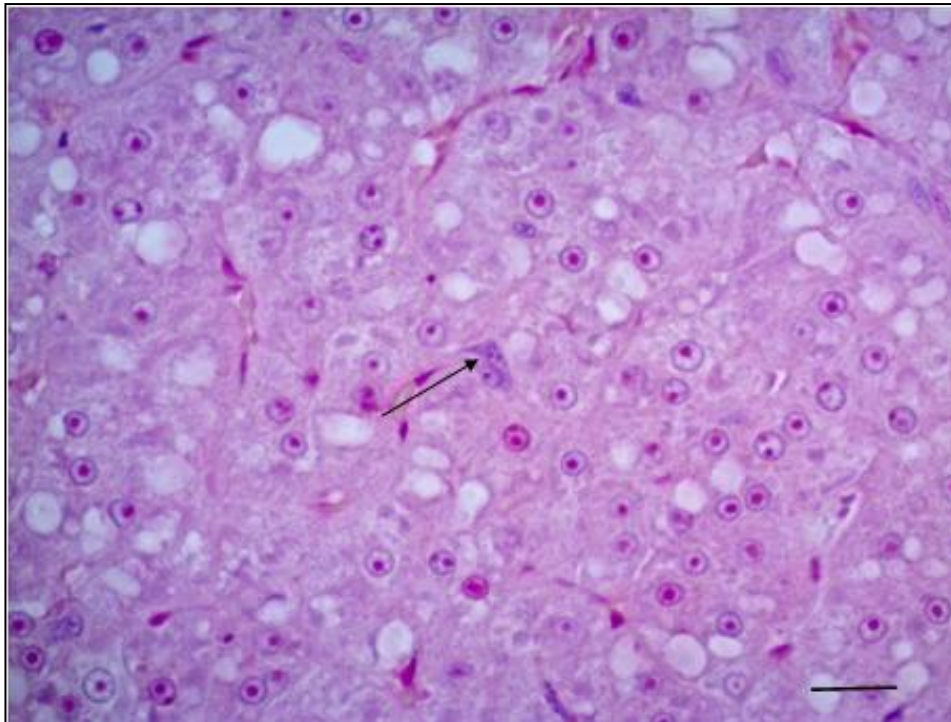


Figura 16 - Fotomicrografia de corte histológico de fígado de bagre-africano, indicando corpúsculo de inclusão basofílico nuclear sugestivo de herpesvírus (seta preta). Coloração HE. Barra 20 μ m.

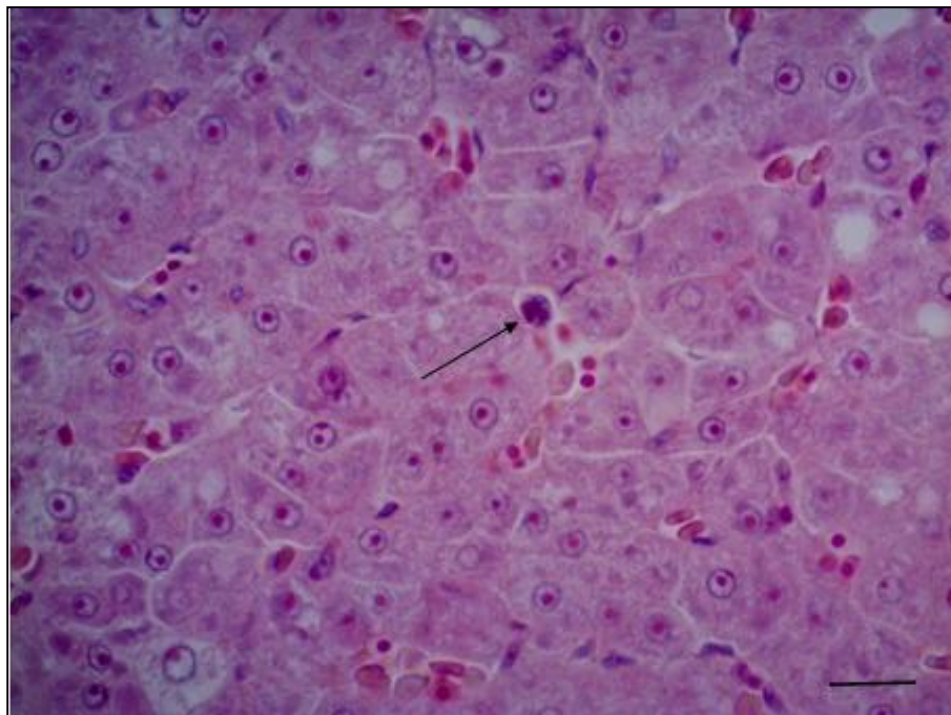


Figura 17 - Fotomicrografia de corte histológico de fígado de carpa, indicando corpúsculo de inclusão basofílico nuclear sugestivo de herpesvírus (seta preta). Coloração HE. Barra 20 μ m.

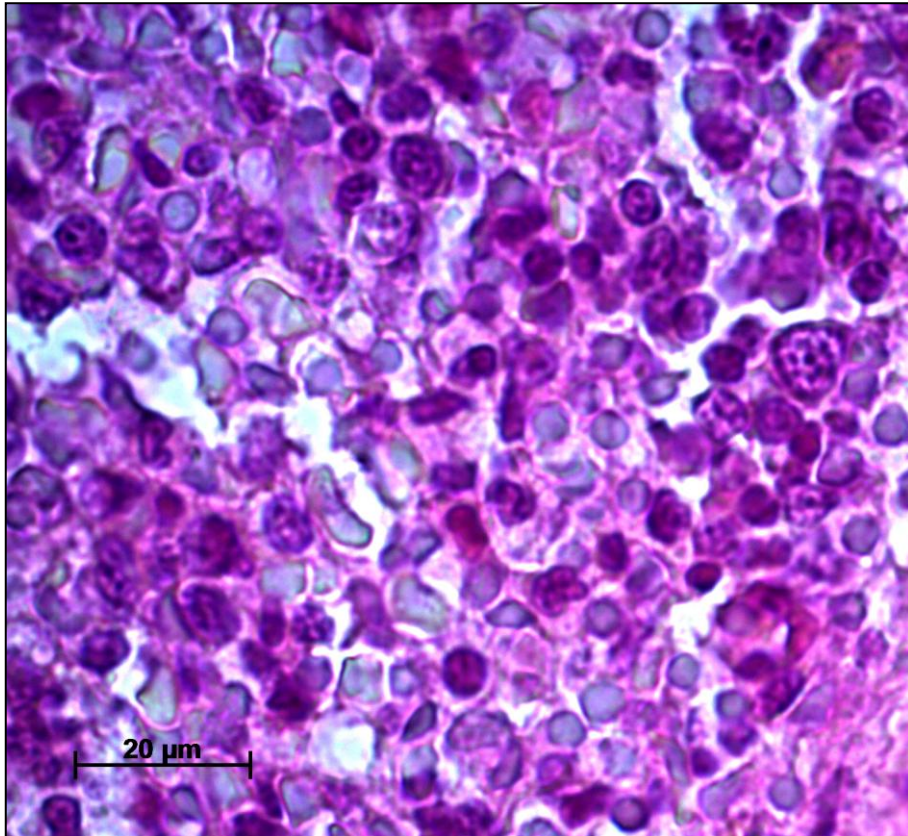


Figura 18 - Fotomicrografia de corte histológico de baço de rã-touro, indicando corpúsculo de inclusão basofílico nuclear sugestivo de herpesvírus (seta preta). Coloração HE. Barra 20 μm .

6. DISCUSSÃO

Em nosso trabalho, 202 amostras de fragmentos de órgãos de 53 peixes, foram processadas pela técnica de contrastação negativa para microscopia eletrônica de transmissão. Destes 53 peixes, 46 (86,8%) apresentaram-se positivos para herpesvírus.

Estudos ao redor do mundo apontam uma taxa de mortalidade de 80 a 100% em criações de carpas infectadas tanto pelo CyHV-2 e CyHV-3 (BRETZINGER et al., 1999; HEDRICK et al., 2000; HOFFMANN, 2000; GOODWIN et al., 2006a; Garver et al., 2010), quanto pelo ICHV-1 que infecta o bagre do canal (PLUMB, 1973), os 3 tipos de herpesvírus písceos de maior ocorrência.

Partículas com morfologia semelhante à herpesvírus, pleomórficas, icosaédricas, algumas envelopadas, medindo entre 120 e 200 nm de diâmetro, foram visualizadas ao microscópio eletrônico de transmissão, em todas as amostras dos 46 peixes positivos.

Estas características morfológicas também foram descritas por outros autores em estudos com herpesvírus efetuado em larvas de tilápias (SHLAPOBERSKY et al., 2010), em *Osmerus eperlanus* (ANDERS, 1988) e em *Ictalurus nebulosus* (WOLF & DARLINGTON, 1971).

Observamos em cortes ultrafinos de cérebro de robalo, partículas de herpesvírus incompletas ou nucleocápsides e completas localizadas intranuclearmente.

Em células tumorais de *Osmerus eperlanus*, as partículas de herpesvírus foram visualizadas no citoplasma (ANDERS, 1988).

A técnica de inclusão em resina também foi aplicada para estudar aspectos ultraestruturais do herpesvírus em células infectadas pelo CyHV-3 (HENDRICK et al., 2000; HOTORAN et al., 2005; MIWA et al., 2007; METTENLEITER et al., 2009; Raj et al., 2011) e do Koi herpesvírus (KHV) infectando carpas (*Cyprinus carpio*) (MIYAZAKI et al., 2008).

Wolf & Darlington (1971) utilizaram a técnica de inclusão em resina em cortes semifinos para estudar aspectos biológicos e morfológicos do CCV (channel catfish vírus) em uma espécie de bagre (*Ictalurus nebulosus*). A partir dessa técnica foram visualizadas partículas de herpesvírus em todos os estágios de desenvolvimento no núcleo, corpos granulares contendo partículas de vírus; estruturas lamelares e membrana nuclear alterada, além de numerosas partículas virais presentes do citoplasma.

Esta técnica aplicada em lesões de baço e de rim, efetuada em *Carassius auratus* dourado por Lovy & Friend (2014) confirmou a presença do herpesvírus no núcleo e no citoplasma de células necróticas. O núcleo apresentava cromatina marginalizada.

Observamos que as partículas incompletas mediam entre 90 e 110 nm, enquanto as completas mediam em média 160 nm de diâmetro.

Sano et al. (1985b) relataram que as nucleocápsides do CyHV-1, mediam 113 nm e as partículas envelopadas maduras 190 nm, enquanto que Hedrick et al. (1990) afirmaram que estas partículas mediam 109 e 157 nm respectivamente.

Partículas imaturas do CyHV-2, medindo 100 nm (JEFFERY et al., 2007) e maduras envelopadas medindo de 170 a 220 nm, localizadas no citoplasma e no espaço extracelular foram descritas por Jung & Miyasaki (1995).

Nos peixes de nosso estudo, os sintomas e sinais clínicos mais comumente observados foram incoordenação, letargia, morte súbita, lesões na pele (barbatana e boca), nódulos hepáticos e alterações hepáticas e intestinais.

Estes sintomas e sinais também foram descritos em peixes infectados pelos CyHV-2 e CyHV-3 e ICHV-1 (JUNG & MIYAZAKI, 1995; GOODWIN et al., 2006; HEDRICK et al., 2000; DAVIDOVICH et al., 2007; FIJAN et al., 1970; WOLF et al., 1971; SHLAPOBERSKY et al., 2010).

Encontramos lesões semelhantes a papilomas em pele de 3 tilápias.

Lesões do tipo petequiais ou papilomatosas espalhadas pelo corpo, boca, córnea, mandíbula e rins, foram relatadas em peixes infectados pelo herpesvírus dos salmões (KIMURA et al., 1981b, 1983; SANO et al., 1983; YOSHIMIZU et al., 1987). Lesões semelhantes a papilomas também foram observadas em infecção pelo CyHV-1 (SCHUBERT, 1964; SANO et al., 1985a,b).

Em peixes infectados pelo CyHV-3, as lesões mais comumente encontradas eram localizadas nas brânquias (HEDRICK et al., 2000; PERELBERG et al., 2003; RONEN et al., 2003; PIKARSKY et al., 2004; MIYAZAKI et al., 2008).

Com relação à histopatologia, em 5 carpas e 1 bagre-africano de nosso estudo verificamos lesões branquiais, tais como a fusão das lâminas primárias e secundárias.

Exames histopatológicos realizados por Lovy & Friend (2014) em peixinho-dourado (*Carassius auratus*), também mostraram a presença de fusão dos filamentos branquiais em todos os peixes positivos para herpesvírus examinados em seu estudo. Este achado foi atribuído à hiperplasia epitelial, ao infiltrado de células eosinofílicas e ocasionalmente à necrose difusa.

Pikarsky et al. (2004) ainda incluíram como lesões no arco brânquial sugestivas de herpesvírus, um aumento subepitelial, inflamação e congestão dos vasos

sanguíneos, em carpas, lesões estas, também encontradas por nós, em garoupa, tilápia e carpa.

Nos rins de bagre, carpa e tilápia foram observados focos com hemorragia e à luz de muitos túbulos foi visualizado material fibrinóide e hialino, áreas em necrose, e presença de melanomacrófagos. Observou-se principalmente acentuada glomerulonefrite mononuclear, bem como calcificação distrófica (deposição de cálcio).

Plumb et al. (1974) e Wolf et al. (1972) observaram em seus estudos realizados em bagre americano (*Ictalurus punctatus*), a presença de edema extenso, inflamação e necrose dos túbulos renais. Pikarsky et al. (2004) encontraram vasos sanguíneos congestos em carpas infectadas por herpesvírus, enquanto que Lovy & Friend (2014) verificaram presença de necrose e vasos sanguíneos dilatados em peixinho-dourado (*Carassius auratus*).

Em tilápia (*Oreochromis niloticus*) e bagre (*Bagre sp*) o tecido hepático, em geral, apresentou rarefação citoplasmática (deficiência proteico mineral), inúmeros melanomacrófagos, focos de hepatite monolinfocitária e necrose.

Plumb et al. (1974) e Wolf et al. (1972) citam a necrose focal, hemorragia e edema como as principais lesões encontradas no fígado de animais infectados por herpesvírus dos Ictaluridae (IcHV1).

No baço de bagre, carpa e tilápia, as lesões mais significativas que encontramos foram áreas hemorrágicas, presença de melanomacrófago, hiperplasia de células mononucleares, além de necrose.

Esses achados também foram verificados por Lovy & Friend (2014) em peixinho dourado. Por outro lado, Plumb et al. (1974) e Wolf et al. (1972) constataram em seus estudos, além das alterações observadas em nosso trabalho, vasos sanguíneos congestos.

Em nosso estudo verificamos a presença de corpúsculos de inclusão na pele de 2 tilápias e 1 bagre, em hepatopâncreas de 1 tilápia e 1 carpa, no fígado de 1 bagre e 2 carpas, no rim de uma tilápia e no SNC de 1 peixe-citrinelo.

Gibson-Kueh et al. (2012) também encontraram estes corpúsculos de inclusão no baço, rim, fígado e coração em seus estudos em percas gigantes (*Lates calcarifer*), infectadas com herpesvírus.

De acordo com Yamamoto et al. (1983) e Elias et al. (2004) a presença de corpúsculos de inclusão basofílico constitui a principal alteração histopatológica característica de presença de herpesvírus.

Com relação aos anfíbios, um total de 211 amostras de fragmentos de órgãos de 49 animais, foi processado pela técnica de contrastação negativa (preparo rápido). Destes, 23 (48,9%) animais apresentavam-se positivos para herpesvírus.

Pesquisa semelhante realizada em intestino delgado de rãs-touro por Antonucci et al. (2014) relatou a presença de herpesvírus em 7 (15,5%) de 45 animais de seu estudo.

Os sintomas e sinais clínicos mais comumente encontrados nos anfíbios de nosso estudo foram morte súbita e presença de lesões de pele e dedo.

Hipólito et al. (2003) através da técnica de contrastação negativa, encontraram partículas de herpesvírus em 3 animais com lesões hepáticas, em 5 que apresentavam nódulos no músculo da perna e dorso e no fígado e líquido ascítico de 6 animais.

A ocorrência do tumor de Lucké, caracterizado por adenocarcinoma renal, causado por herpesvírus, foi descrito em rãs-leopardo (*Rana pipiens*) (Mc KINNEL & CUNNINGHAM, 1982; CARLSON et al., 1994), sendo que a metástase pode ser mediada sob baixa temperatura (TWEEDDELL, 1989).

O exame ao microscópio eletrônico de transmissão revelou em 23 anfíbios, a presença de partículas com morfologia semelhante à herpesvírus, pleomórficas, icosaédricas, algumas envelopadas, medindo entre 120 e 200 nm de diâmetro.

Partículas morfológicamente idênticas foram visualizadas em outros estudos realizados com rãs-touro provenientes de ranários do Estado de São Paulo (HIPÓLITO et al., 2003; ANTONUCCI et al., 2014).

Chinchar et al. (2001) utilizaram a técnica de contrastação negativa para estudar a infectividade do Frog vírus 3.

Cortes ultrafinos de lesão de pele de rãs-touro mostraram no núcleo das células, partículas de herpesvírus imaturas, medindo de 80 a 110 nm e completas com 160 nm de diâmetro.

Outros autores utilizaram esta técnica para estudar aspectos ultraestruturais do herpesvírus em casos de tumor de Lucké em rins de rãs-leopardo (LUNGER, 1964a,b; LUNGER et al., 1965; TOPLIN et al., 1971; TWEEDDELL, 1989; ESBAUER & AHNE, 2001).

Com relação à histopatologia de rãs, a alteração mais importante que observamos, todas de rã-touro (*L. castebianus*), foi a presença de corpúsculos de inclusão no fígado, rim, baço e ovário.

Estes achados corroboram com os de outros autores que estudaram a presença de tumor de Lucké em rã-leopardo (*Rana pipiens*) (McKIMMEL, 1973; GRANOFF, 1983; CARLSON et al., 1994).

Observamos também hemorragia no fígado, baço, e pele, além de inflamação linfocitária no rim, baço e necrose no fígado, hepatopâncreas, músculo e lesão de dedo.

Esses achados também foram relatados por Carlson et al. (1994) somente no rim de rã-leopardo (*Rana pipiens*).

Por outro lado, as outras alterações que encontramos, tais como, presença de melanomacrófago no fígado, baço e pulmão, tubulonefrite nos rins e reação inflamatória monolinfocitária na pele, não foram relatadas na literatura.

A variação de espécies positivas afetadas sugere que vários tipos de herpesvírus podem ocorrer no Brasil.

De acordo com Tweedell (1989) a microscopia eletrônica e a histopatologia constituem as principais ferramentas para o diagnóstico do tumor de Lucké

Quando a análise histológica sugere a ocorrência de uma doença de origem viral, a microscopia eletrônica de transmissão constitui um método extremamente útil para a identificação do agente etiológico. Um grande número de herpesvírus causadores de doenças em peixes e rãs que não puderam ser isolados com êxito em cultura de células foi detectado por microscopia eletrônica (HANSON et al., 2011).

Agentes estressores resultantes de sistemas não apropriados de criação, tais como, manejo inadequados (físico, profilático, sanitário ou alimentar), alterações ambientais como temperatura e luminosidade, confinamento, entre outros, constituem os principais fatores que levam ao desenvolvimento súbito de doenças, principalmente as de origem viral em qualquer tipo de criação (IWANA, 1993; FERREIRA et al., 2001).

O estresse causado pela temperatura pode reativar a infecção latente, sendo considerado por ser um iniciador de mortalidade em massa de carpas selvagens causada pelo CyHV-3 (GARVER et al., 2010; EIDE et al., 2011). As carpas sobreviventes podem excretar o vírus especialmente após atividades de estresse como a nidificação (BERGMANN & KEMPTER, 2011), ocasionando perdas animais e originando grandes prejuízos econômicos às criações.

A adoção de medidas de biossegurança, boas práticas de manejo, além do desenvolvimento de vacinas, devem ser instituídos com o intuito de contribuir para a melhoria e desempenho produtivo no cultivo comercial de rãs e de peixes.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- As técnicas de Microscopia Eletrônica utilizadas no presente estudo mostraram-se eficazes no diagnóstico da presença do herpesvírus, possibilitando a visualização do agente, devendo ser amplamente difundida.
- A técnica histopatológica de rotina (H&E) também foi eficiente na visualização das lesões sugestivas do agente viral, como a presença de corpúsculos de inclusão. Além disso, possibilitou realizar a análise da situação geral do animal, indicando que a qualidade da criação pode torná-lo susceptível à infecção pelo herpesvírus.
- Os exames de histopatologia e microscopia eletrônica devem ser complementares, pois nem sempre o material enviado é propício para ambos os exames. Para as técnicas de microscopia eletrônica o material deve ser enviado a fresco mantido apenas no gelo, já para os exames histopatológicos, deve ser conservado em formol 10%.
- As lesões associadas à presença do herpesvírus não foram diferentes daquelas já descritas na literatura.
- A prevalência de positividade para herpesvírus entre os dois grupos foi de 86,8% nos peixes e 46,9% nos anfíbios, pela microscopia eletrônica.
- A espécie píscea que apresentou maior positividade para herpesvírus foi a carpa.
- Nos animais positivos pela técnica de contração negativa, não houve predileção por órgãos, pois as partículas virais estavam presentes em todos os órgãos examinados. Na técnica histológica de rotina hematoxilina-eosina, o órgão mais afetado foi o fígado. Pode-se escolher o fígado por ser de fácil acesso e relativamente grande em relação ao animal.

8. REFERÊNCIAS

ADAMEK, M.; STEINHAGEN, D.; IRNAZAROW, I.; HIKIMA, J-I.; JUNG, T.S.; AOKI, T. Biology and host response to Cyprinid herpesvirus 3 infection in common carp.

Develop. Comp. Immunol., v.43, p.151-159, 2014.

AHMED, R.; MORRISON L.A.; KNIPE D.M. Persistence of viruses. In: FILDS, B.N.; KNIPED.M.; HOWLEY P.M. **Virology**. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, cap.8, p.219-249, 1996.

ALMEIDA, J.D. Uses and abuses of diagnostic electron microscopy. **Curr. Top.**

Microbiol. Immunol., 104:147-58, 1983.

ANDERS, K. **Biology of tumor-and tumor-like diseases of fish from the lower.**

Elber River. Moller Publication, Kiel (In German), 1988.

ANTONUCCI, A.M. **Caracterização de agentes patogênicos virais e metazoários em rãs-touro, *Lithobates catesbeianus*, provenientes de ranários comerciais do Vale do Paraíba, no estado de São Paulo, Brasil.** 75 f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura e Pesca) – Instituto de Pesca, São Paulo, 2009.

ANTONUCCI, A.M.; CATROXO, M.H.B.; HIPOLITO, M.; TAKEMOTO, R.M.; MELO, N.A.; FRANÇA, F.M.; TEIXEIRA, P.C.; FERREIRA, C.M. Tracking viral particles in the intestinal contents of the American bullfrog, *Lithobates catesbeianus*, by transmission electron microscopy. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**, v.66, n.2, 2014.

AUSTIN, B. The future of bacterial fish vaccines. **Vaccine.**, London, v.2, n. 4, p. 249-254, 1984.

BERGMANN, S.M.; KEMPTER, J. Detection of koi herpesvirus (KHV) after reactivation in persistently infected common carp (*Cyprinus carpio* L.) using non-lethal sampling methods. **Bulletin of the European Association of Fish Pathologists**, v.31, p.92-100, 2011.

BEURDEN, S. & ENGELSMA, M. Herpesviruses of Fish, Amphibians and Invertebrates, Herpesviridae - **A Look Into This Unique Family of Viruses**, Dr. George Dimitri Magel (Ed.), ISBN: 978-953-51-0186-4, InTech, 2012.

BRENNER S, HORNE RW. A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. **Biochim Biophys Acta.**, 34:103–110, 1959.

BRETZINGER, A.; FISCHER-SCHERL, T.; OUMOUMA, R.; HOFFMANN, R.; TRUYEN, U. Mass mortalities in koi, *Cyprinus carpio*, associated with gill and skin disease. **Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.**, v.19, p.182–185, 1999.

CARLSON, D.L.; SAUERBIER, W.; ROLLINS-SMITH L.A. MCKINNELL, R.G. The presence of DNA sequences of the Lucke herpesvirus normal and neoplastic kidney tissue of *Rana pipiens*. **J. Comp. Pathol.**, v.110, p.349-355, 1994.

CASALI, A.P.; MOURA, O.M. de; LIMA, S.L. Rações comerciais e o rendimento de carcaça e subprodutos de rã-touro. **Cienc. Rural**, v.35, n.5, p. 1172-1178, 2005.

CATROXO, M.H.B.; GADOY, S.N.; MILANELO, L.; CURI, N.A. Detecção de partículas semelhantes ao coronavírus em intestino delgado de quati (*Nosua nosua*) por microscopia eletrônica de transmissão. **Arq. Inst. Biol.** v.70 supl. 3, 2003.

- CAVALLI, R.O. & FERREIRA, J.F. O futuro da pesca da aquicultura marinha no Brasil: a maricultura. **Cienc. Cult.**, 2010, v.62, n.3, p.38-39. ISSN 0009-6725.
- CHINCHAR, V.G.; WANG, J.; MURTI, G.; CAREY, C.; ROLLINS-SMITH, L. Inactivation of frog virus 3 and channel catfish virus by esculentin-2P and ranatuverin-2P, two antimicrobial peptides isolates from frog skin. **Viol.**, v.288, p.351-357, 2001.
- COSTA, C.L.S. **Desenvolvimento do aparelho reprodutor e fatores associados ao ciclo reprodutivo da rã-touro no sistema anfigranja**. Tese. Universidade Federal de Viçosa. 98p. 1992.
- DAVIDOVICH, M.; DISHON, A.; ILOUZE, M.; KOTLER, M. Susceptibility of cyprinid cultured cells to cyprinid herpesvirus 3. **Arch. Virol.**, v.152, p.1541–1546, 2007.
- DAVISON, A.J. Evolution of the herpesviruses. **Vet. Microbiol.**, Netherlands, v.86, p.69-88, 2002.
- DAVISON, A.J.; EBERLE, R.; EHLERS, B.; HAYWARD, G.S.; MCGEOCH, D.J.; MINSON, A.C.; PELLETT, P.E.; ROIZMAN, B.; STUDDERT, M.J.; THIRY, E. The order Herpesvirales. **Arch. Virol.**, v.154, n. 1, p. 171-177, 2009.
- DAVISON, A.J.; EBERLE, R.; HAYWARD, G.S.; MCGEOCH, D.J.; MINSON, A.C., PELLET, P.E., ROIZMAN, B., STUDDERT, M.J. & THIRY, E. **Herpesviridae**, In: *Virus Taxonomy: VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, C.M. Fauquet, M.A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger & L.A. Ball, pp. 193-212, Elsevier Academic Press, Amsterdam, 2005.
- EIDE, K.E.; MILLER-MORGAN, T.; HDEIDEL, J.R.; KENT, M.L.; BILDFELL, R.J.; LAPATRA, S.; WATSON, G.; JIN, L. Investigation of koi herpesvirus latency in koi. **J. Virol.**, v.85, n.4954–4962, 2011.
- ELIAS, F.; SCHILD, A.L.; RIET-CORREA, F. Meningoencefalite e encefalomalacia pro herpesvírus bovino-5: distribuição das lesões no sistema nervoso central de bovinos naturalmente infectados. **Pesq. Vet. Bras**, v.24, p.123-131, 2004.
- ESSBAUER, S. & AHNE, W. Viruses of lower vertebrates. **J. Vet. Med. Infect. Dis. Et. Pub. Health**, v.48, p.401-476, 2001.
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Aquaculture only way to fill the coming "fish gap"**. 19 November 2007, Rome. Disponível em: <<http://www.fao.org/newsroom/en/news/2007/1000701/index.html>> Acesso em: 12 de dezembro de 2013.
- FEIX, R.D.; ABDALLAH, P.R.; FIGUEIREDO, M.R.C. 2006 **Resultado econômico da criação de rã em regiões de clima temperado, Brasil**. *Informações Econômicas*, São Paulo, 36(3):70-80.
- FENNER, F.J.; GIBBS, E.P.J.; MURPHY, F.A.; ROTT, R.; STUDDERT, M.J.; WHITE, D.O. **Veterinary Virology**, 2 ed. San Diego: Academic Press, 666 p, 1993.
- FERREIRA, C.M.; DIAS, D.C.; FRANÇA, F.M.; BARBOSA, C.J.S. **Estresse e sistemas de criação**. In: ENCONTRO NACIONAL DE RANICULTURA 11. Bragança Paulista, 16-19/jul 2001. Anais... São Paulo: Academia Brasileira de Estudos Técnicos em Ranicultura. p.37-40, 2001
- FERREIRA, C.M.; PIMENTA, A.G.C.; PAIVA-NETO, J.S. Introdução à Ranicultura. **Boletim Técnico do Instituto de Pesca**, São Paulo, v.33: p.1-15, 2002.

FIJAN, N.N.; WELBORN, T.L.J.; NAFTEL, J.P. **An Acute Viral Disease of Channel Catfish**; Technical bulletin No. 43; U. S. Fish and Wildlife Service: Washington, D.C., 1970.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). **The state of world fisheries and aquaculture 2012**. Rome: FAO, 2012. 209p.

FRANCO, A.C. & ROECHE, P.M. Herpesviridae. In: Flores, E.F. **Virologia Veterinária**. UFMS. Santa Maria, p. 433-488, 2007.

GARVER, K.A.; AL-HUSSINEE, L.; HAWLEY, L.M.; SCHROEDER, T.; EDES, S.; LEPAGE, V.; CONTADOR, E.; RUSSELL, S.; LORD, S.; STEVENSON, R.M.; SOUTER, B.; WRIGHT, E.; LUMSDEN, J.S. Mass mortality associated with koi herpesvirus in wild common carp in Canada. **J. Wildl Dis.**, v.46, n.4, p.1242-1251, 2010.

GIBSON-KUEH, S.; CHEE, D.; CHEN, J.; WANG, Y.H.; TAY, S.; LEONG, L.N.; NG, M.L.; JONES, J.B.; NICHOLLS, P.K.; FERGUSON, H.W. The pathology of 'scale drop syndrome' in Asian seabass, *Lates calcarifer* Bloch, a first description. **J. Dis.**, v.35, p.19-27, 2012.

GONZALES-SANTANDER, R. Técnicas de microscopia eletrônica en biología. Madrid, **Aguilar**, 1969.

GOODWIN, A.E.; KHOO, L.; LAPATRA, S.E.; BONAR, C.; KEY, D.W.; GARNER, M.; LEE, M.V.; HANSON, L. Goldfish hematopoietic necrosis herpesvirus (cyprinid herpesvirus 2) in the USA: Molecular confirmation of isolates from diseased fish. **J. Aquat. Anim. Health** ., v.8, p.11–18, 2008.

GOODWIN, A.E.; MERRY, G.E.; SADLER, J. Detection of the herpesviral hematopoietic necrosis disease agent (cyprinid herpesvirus 2) in moribund and healthy goldfish: Validation of a quantitative PCR diagnostic method. **Dis. Aquat. Org.**, v.69, p.137–143, 2006.

GRANOFF, A. (1983). Amphibian herpesvirus. In: Roizmann, B. (ed.) The herpesviruses. Plenum Publ. Corp., p. 367-384

HANSON, L.; DISHON, A.; KOTLER, M. Herpesviruses that infect fish. **Viruses**, 3, 2160-2191, 2011.

HEDRICK, R.P.; GILAD, O.; YUN, S.; SPANGENBERG, J.V.; MARTY, G.D.; NORDHAUSEN, R.W.; KEBUS, M.J.; BERCOVIER, H.; ELDER, A. A herpesvirus associated with mass mortality of juvenile and adult koi, a strain of common carp. **J. Aquat. Anim. Health**.,v.12, p.44–57, 2000.

HEDRICK, R.P.; GROFF, J.M.; MCDOWELL, T.S.; WINGFIELD, W.H. An iridovirus from the integument of white sturgeon. **Dis. Aquat. Org.**, v. 8, n.39–44, 1990.

HIPOLITO, M. 2004. Manejo sanitário no cultivo de rã. In: RANZANI-PAIVA, M.J.T.; TAKEMOTO, R.M.; LIZAMA, M.L.A.P. **Sanidade de organismos aquáticos**. Editora Varela, São Paulo. p. 333-353.

HIPOLITO, M. **Doenças em anfíbios – uma visão geral**. Boletim informativo. ABRAPOA – Associação Brasileira de Patologistas de Organismos Aquáticos. Edição 31, ano 19, 2008.

HIPOLITO, M.; CATROXO, M.H.B.; CURI, N.A.; FERREIRA, C.M.; BACH, E.E. 2003. Detecção ao microscópio eletrônico de transmissão de partículas semelhantes ao grupo iridovírus em rã-touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802) criadas comercialmente, primeiras observações no Brasil. **Arq. Inst. Biol.**, v.70, n.1, p.107-111, jan./mar., 2003.

HOFFMANN, R. (2000): Eine Koiseuche bedroht die Karpfenteichwirtschaft. **Fischer und Teichwirt** 11: 432.

HUTORAN, M.; RONEN, A.; PERELBERG, A.; ILOUZE, M.; DISHON, A.; BEJERANO, I.; CHEN, N.; KOTLER, M. Description of an as yet unclassified DNA virus from diseased cyprinus carpio species. **J. Virol.**, v. 79, p.1983–1991, 2005.

International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). 2013. **Virology Division – IUMS**. Disponível em: <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>. Acesso em: 12 de dezembro de 2013.

IWANA, G.K. 1993 **Intensive Fish Production: Course Manual UBC Access Guided Independent Study**. Vancouver: The University of British Columbia. p.130.

JEFFERY KR, BATEMAN K, BAYLEY A, Feist SW and others (2007) Isolation of a cyprinid herpesvirus (CyHV-2) from goldfish *Carassius auratus* (L.), in the UK. **J Fish Dis** 30: 649–656

JUNG, S.J.; MIYAZAKI, T. Herpesviral haematopoietic necrosis of goldfish, *carassius auratus* (L.). **J. Fish Dis.**, v.18, p.211–220, 1995.

KIMURA, T.; SUZUKI, S.; YOSHIMIZU, M. 1983. In vivo antiviral effect of 9- (2-hydroxyethoxymethyl) guanine on experimental infection of chum salmon (*Oncorhynchus keta*) fry with *Oncorhynchus masou* virus (OMV). **Res.**, v.3, p.103-108.

KIMURA, T.; YOSHIMIZU, M.; TANAKA, M. 1981B. **Fish Viroses: Tumor induction in *Oncorhynchus keta* by the herpesvirus**. In: DAWE, C.J.; HARSHBARGER, J.C.; KONDO, S.; SUGIMURA, T.; TAKAYAMA, S. EDS. Phylogenetic approaches to cancer. Japanese Scientific Society Press, Tokyo, p.59-68.

LIMA, S.L. & AGOSTINHO, C.A. **A tecnologia da criação de rãs**. 2ª.ed. Viçosa (MG): Imprensa Universitária. 170p, 1995.

LIMA, S.L. A ranicultura. 2014. **Panorama da Aquicultura**. Disponível em: <http://www.panoramadaaquicultura.com.br/paginas/revistas/28/Ranicultura.asp>. Acesso em: 16 de março de 2014.

LIMA, S.L.; CRUZ, T.A.; MOURA, O.M. **Ranicultura: análise da cadeia produtiva**. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa: 172p, 1999.

LOVY, J. & FRIEND, S.E. Cyprinid herpesvirus-2 causing mass mortality in goldfish: applying electron microscopy to histological samples for diagnostic virology. **Dis Aquat Org.**, v.108, p.1–9, 2014

LUFT, J. A. Improvements in an epoxy resin embedding methods. **Journal of Biophysics, Biochemistry and Cytology**, v. 9, p. 409-414, 1961.

LUNGER, P.D. The isolation and morphology of the Lucké frog kidney tumor virus. **Virol.**, v.24, p.138-145, 1964.

LUNGER, P.D.; DARLINGTON, R.W.; GRANOFF, A. Cell-virus relationships in the lucké renal adenocarcinoma: An ultrastructure study. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v.126, p.289–314, 1965.

MARTINS, A.M.C.R.P.F.; HIPOLITO, M.; CATROXO, M.H.B. **A importância da piscicultura e algumas doenças virais e bacterianas píceas**. Comunicado técnico, Instituto Biológico, Centro de pesquisa e desenvolvimento sanidade animal, n° 156, 2011. Disponível em: http://www.biologico.sp.gov.br/artigos_ok.php?id_artigo=156. Acesso em: 03 de fevereiro de 2014.

MARTINS, A.M.C.R.P.F.; HIPOLITO, M.; CATROXO, M.H.B. **A importância da piscicultura e algumas doenças virais e bacterianas píceas**. Comunicado técnico, Instituto Biológico, Centro de pesquisa e desenvolvimento sanidade animal, n.156, 2011. Disponível em: http://www.biologico.sp.gov.br/artigos_ok.php?id_artigo=156. Acesso em: 03 de fevereiro de 2014.

MARTINS, M.L. 2004. Manejo sanitário na piscicultura. In: RANZANI-PAIVA, M.J.T.; TAKEMOTO, R.M.; LIZAMA, M.L.A.P. **Sanidade de organismos aquáticos**. Editora Varela, São Paulo. p. 323-332, 2004

MCGEOCH, D.J.; RIXON, F.J.; DAVISON, A.J. Topics in herpesvirus genomics and evolution. **Virus Res.**, Netherlands, v.117, p. 90-104, 2006.

MCKINNELL, R.G.; CUNNINGHAM, W.P. Herpesviruses in metastatic Lucké renal adenocarcinoma. **Differentiation.**, v.22, n.1, p.41-6, 1982.

METTENLEITER, T.C.; KLUPP, B.G.; GRANZOW, H. Herpesvirus assembly: An update. **Virus Res.**,v.143, p.222–234, 2009.

MEYER, A.D. **Deteção do Herpesvírus Bovino 1 (BHV-1) em amostras de sêmen através da reação em cadeia pela polimerase (PCR)**. 36 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo – SP, 2001.

MICHALANY, J., 1980, **Técnica histológica em anatomia patológica**. Editora Pedagógica e Universitária Ltda., São Paulo, 277p.

Ministério da Educação (MEC). **Aquicultura**. Brasília, 2006. Disponível em http://portal.mec.gov.br/setec/arquivos/pdf/cartilha_aquicultura.pdf. Acesso em: 12 de dezembro de 2013.

Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA). **Boletim estatístico da pesca e aquicultura: Brasil 2010**. Brasília: MPA, 2010. 128p. a.

Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA). **Consumo de pescado no Brasil aumenta 23,7% em dois anos**. 2013. Disponível em: <http://www.mpa.gov.br/index.php/imprensa/noticias/2226-consumo-de-pescado-no-brasil-aumenta-237-em-dois-anos>>. Acesso em: 12 dezembro de 2013.

Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA). **MPA lança boletim estatístico da pesca e aquicultura – 2011**. 2011b. Disponível em: <http://www.mpa.gov.br/index.php/imprensa/noticias/2140-mpa-lanca-boletim-estatistico-da-pesca-e-aquicultura-2011>. Acesso em: 26 de janeiro de 2014.

Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA). **MPA lança boletim estatístico da pesca e aquicultura – 2010**. 2010. Disponível em:

http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Informacoes_e_Estatisticas/Boletim%20Estat%20C3%ADstico%20MPA%202010.pdf. Acesso em: 26 de janeiro de 2014.

Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA). **O que é aquicultura**. 2011a. Disponível em: <http://mpa.gov.br/index.php/aquiculturampa/informacoes/o-que-e>. Acesso em: 12 dezembro de 2013.

MIWA, S.; ITO, T.; SANO, M. Morphogenesis of koi herpesvirus observed by electron microscopy. **J. Fish Dis.**, v. 30, p.715–722, 2007.

MIYAZAKI, T.; KUZUYA, Y.; YASUMOTO, S.; YASUDA, M.; KOBAYASHI, T. Histopathological and ultrastructural features of koi herpesvirus (KHV) –infected carp *Cyprinus carpio*, and the morphology and morphogenesis of KHV. **Dis. Aquat. Org.**, v.80, n.1-11, 2008.

MUYLKENS, B.; THIRY, J.; KIRTEN, P.; SCHYNTS, F.; THIRY, E. Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis. **Vet. Res.**, v.38, n.2, p.181-209, 2007.

NEVES, P.V. **Presença de Ranavírus em rã-touro, *Lithobates catesbeianus*, provenientes de ranários da região sudeste do Brasil**. Dissertação (Mestrado em Aquicultura e Pesca) Instituto de Pesca. 2012.

OLIVEIRA, M.T. **Deteção de herpesvírus bovino tipo I (BoHV-1) e tipo 5 (BoHV-5) em amostras de sêmen e construção de um BoHV-5 com uma deleção do gene UL49.5. Porto Alegre, 2011**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e Meio Ambiente) Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

OLIVEIRA, R.C. O panorama da aqüicultura no Brasil: a prática com foco na sustentabilidade. **Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, v.02, n.1, 2009.

OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J. R.; SOTO, D. (Ed.). **Aqüicultura no Brasil: o desafio é crescer**. Brasília, DF: Secretaria Especial de Aqüicultura e Pesca: FAO, 276 p, 2008.

PASTORET, P.P.; THIRY, E.; BROCHIER, B.; DERBOVEN, G. Bovid herpesvirus 1 infection of cattle: pathogenesis, latency, consequences of latency. **Annales Recherches Vétérinaires**, v.13, n.3, p.221-235, 1982.

PAVANELLI, G.C.; EIRAS, J.C.; TAKEMOTO, R.M. **Doença de Peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento**. 2º Edição, UEM, Maringá. 305p, 2002.

PERELBERG A, SMIRNOV, M, HUTORAN, M, DIAMANT, BEJERANO Y, KOTLER M (2003) Epidemiological description of a new viral disease afflicting cultured *Cyprinus carpio* in Israel. **Isr J Aquacult Bamidgeh** 55:5–12

PIKARSKY, E.; RONEN, A.; ABRAMOWITZ, J.; LEVAVI-SIVAN, B.; HUTORAN, M.; SHAPIRA, Y.; STEINITZ, M.; PERELBERG, A.; SOFFER, D.; KOTLER, M. Pathogenesis of acute viral disease induced in fish by carp interstitial nephritis and gill necrosis virus. **J. Virol.**, v.78, p.9544–9551, 2004.

PLUMB, J.A. Effects of temperature on mortality of fingerling channel catfish (*ictalurus punctatus*) experimentally infected with channel catfish virus. **J. Fish. Res. Board Can.**, v.30, p.568–570, 1973.

- PLUMB, J.A.; GAINES, J.L.; MORA, E.C.; BRADLEY, G.G. Histopathology and electron microscopy of channel catfish virus in infected channel catfish, *ictalurus punctatus* (rafinesque). **J. Fish. Biol.**, v., 6, p.661–664, 1974.
- QUINN, P.J.; MARKEY, B.K.; CARTER, M.E.; DONNELLY, W.J.; LEONARD, F.C. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infeciosas**. Ed. Artmed, 2005.
- RAJ, V.S.; FOURNIER, G.; RAKUS, K.; RONSMANS, M.; OUYANG, P.; MICHEL, B.; DELFORGES, C.; COSTES, B.; FARNIR, F.; LEROY, B.; WATTIEZ, R.; MELARD, C.; MAST, J.; LIEFFRIG, F.; VANDERPLASSCHEN, A. Skin mucus of *Cyprinus carpio* inhibits cyprinid herpesvirus 3 binding to epidermal cells. **Vet Res.**, v.42, p.9, 2011.
- REYNOLDS, E. S. The use of the lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. **J.Cell Biol.**, v.17, p. 208, 1963.
- RITCHIE, B.W. Avian Viruses: Function and Control. **Lake Worth, FL**, Wingers Publishing, 1995.
- ROCHA, C.M.C.; RESENDE, E.K.; ROUTLEDGE, E.A.B. Avanços na pesquisa e no desenvolvimento da aquicultura brasileira. **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, v.48, n.8, p.iv-vi, 2013.
- ROIZMAN, B.; GU, H.; MANDEL, G. The first 30 minutes in the life of a virus – unrest in the nucleus. **Cell Cycle**, United States, v.4, n.8, p.1019-1021, 2005.
- ROIZMANN, B. & PELLETT, P.E., The family Herpesviridae: a brief introduction. In: KNIPE, M.D.; HOWLEY, P.M., **Field's Virology**, 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, v.2, p.2480-2497, 2007.
- RONEN, A.; PERELBERG, A.; ABRAMOWITZ, J.; HUTORAN, M.; TINMAN, S.; BEJERANO, I.; STEINITZ, M.; KOTLER, M. Efficient vaccine against the virus causing a lethal disease in cultured *cyprinus carpio*. **Vaccine**, v.21, p.4677–4684, 2003.
- SANO, T.; FUKUDA, H.; FURUKAWA, M. *Herpesvirus cyprini*: Biological and oncogenic properties. **Fish Pathol.**, v. 20, p.381–388, 1985a.
- SANO, T.; FUKUDA, H.; FURUKAWA, M.; HOSOYA, H.; MORIYA, Y.1985b. **A herpesvirus isolated from carpa papiloma in Japan**. In: ELLIS, A.E. ed. Fish and shellfish pathology. Academic Press, London, p.307-311.
- SANO, T.; FUKUDA, H.; OKAMOTO, N.; KANETO, F. Yamane tumor virus: lethality and oncogenicity. **Bull. Jap. Soc. Scient. Fish.**, v.49, p.1159-1163, 1983.
- SCHUBERT, G. Elektronenmikroskopische untersuchungen zur pockenkrankheit des karpfens. **Z Naturforsch.**, v.19b, p.675-682, 1964.
- SCHUBERT, G.H. The infective agent in carp pox. *Bulletin Office of International Epizootics*, p.1011-1022, 1966.
- SCORVO-FILHO, J.D. **Panorama da aquicultura nacional**. In: Textos técnicos - Instituto de Pesca. Disponível em: ftp://ftp.sp.gov.br/ftppesca/panorama_aquicultura.pdf Acesso em: 22 de agosto de 2013.

Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas (SEBRAE). **Aquicultura: um negócio rentável**. Boletim do Serviço brasileiro de apoio às micro e pequenas empresas. 2012.

Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas (SEBRAE). **Diagnóstico da cadeia produtiva da tilápia na Bahia**. Salvador, 2006.

Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas (SEBRAE). **Piscicultura – Criação de Peixes**. Idéias de negócios para 2014. 2014.

SHLAPOBERSKY, M.; SINYAKOV, M.S.; KATZENELLENBOGEN, M.; SARID, R.; DON, J.; AVTALION, R.R. Viral encephalitis of tilapia larvae: Primary characterization of a novel herpes-like virus. **Viol.**, v.399, n.239–247, 2010.

SIDONIO, L.; CAVALCANTI, I.; CAPANEMA, L.; MORCH, R.; MAGALHÃES, G.; LIMA, J.; BURNS, V.; ALVES JÚNIOR, A.J.; MUNGIOLI, R. Panorama da aquicultura no Brasil: desafios e oportunidades. **BNDES Setorial**, v.35, p.421-463, 2012.

SILVA, A. A. **Gestão sanitária do abortamento e mortalidade perinatal em equinos: leptospira e herpesvírus equino - 1 como agentes causais**. 133 f. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio – Instituto Biológico), 2014.

SILVA, M.C.O.P. **SOROPREVALÊNCIA DO HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 1 E 5 NO ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL**. São Paulo. Dissertação (Mestrado em Sanidade Animal, Segurança Alimentar e o Ambiente) Instituto Biológico, 2011.

SILVA, N. J. R. **Dinâmicas de desenvolvimento da piscicultura e políticas públicas no Vale do Ribeira / SP e Alto Vale do Itajaí / SC – Brasil**. Universidade Estadual Paulista. Centro de Aquicultura – CAUNESP, École Nationale Supérieure Agronomique De Rennes, Département Halieutique. Tese de doutorado realizada em co-tutelle. Jaboticabal – São Paulo – Brasil, 2005

SOUSA, E.C.P.M. & TEIXEIRA FILHO, A.R. **Piscicultura Fundamental**. São Paulo: Nobel, 2007. TAKAGI, J. S. Diagnóstico de Piscicultura no Município de Dourados/MS. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2007.

THIRY, J.; KEUSER, V.; MUYLKENS, B.; MEURENS, F.; GOGEV, S.; VANDERPLASSCHEN, A.; THIRY, E. Ruminant Alphaherpesvirus related to bovine Herpesvirus 1. **Vet. Res.**, v.37, p.169-190, 2006.

TIKOO, S.K. CAMPOS, M.; BABIUK, L.A. Bovine Herpesvirus 1 (BHV-1): biology, pathogenesis, and control. **Advances in Virus Research**, v.45, p.191-223, 1995.

TOPLIN, I.; MIZELL, M.; SOTTONG, P.; MONROE, J. Zonal centrifuge applied to the purification of herpesvirus in the Lucke frog kidney Tumor. **Appl. Microbiol.**, v. 21, n. 1, p. 132-139, 1971.

TORANZO, A.E.; BARJA, J.L.; DOPAZO, C.P. & ROMALDE, J.L. 2004. Enfermedades bacterianas y víricas de peces marinos. In: RANAZANI-PAIVA, M.J.T.; TAKEMOTO, R.M.; LIZAMA, M.L.A. **Sanidade de Organismos Aquáticos**. Editora Varela, São Paulo. p.3-49. 2004.

TWEDELL, K.S. 1989. Herpesviruses. Interaction with frog renal cells. In: AHNE W. KURSTAK, E. Eds. Viruses of lower vertebrates. Heidelberg Springer-Verlag. P.13-29.

UNIVERSITY OF GEORGIA – **College of Veterinary Medicine and Georgia Center for Continuing Education. Immunohistochemistry and in situ hybridization: a short course.** July 18-19, Athens, Georgia: University of Georgia, 1998.

VIANA, M.I. **Rã touro gigante: características e reprodução.** 4ª edição. Infotec. São Paulo: 80p, 1993.

WATSON, M. L. 1958. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. **Journal of Biophysics and Biochemistry Citology** 4: 475.

WOLF, K. & DARLINGTON, R.W. Channel Catfish Virus: a New Herpesvirus of Ictalurid Fish. **J. Virol.**, v.8, n.4, p. 525-533, 1971.

WOLF, K. Biology and properties of fish and reptilian herpesviruses. In: **The Herpesviruses.** v.2 (Roizman, b., ed.). Plenum Press: New York. p.319-366, 1983.

YAMAMOTO, T.; KELLY, R.K.; NIELSEN, O. Epidermal hyperplasias of Northern Pike (*Esox lucius*) associated with herpesvirus and c-type particles. **Arch. Virol.**, v. 79, p.255-272, 1983.

YOSHIMIZU, M.; TANAKA, M.; KIMURA, T. Oncorhynchus masou vírus (OMV): Incidence of tumor development among experimentally infected representative salmonid species. **Fish Pathol.**, v.22, p.7-10, 1987.

ZUPANOVIC, Z.; LOPEZ, G.; HYATT, A.D.; GREEN, B.; BARTRAN, G.; PARKES, H.; WHITTINGTON, R.J.; SPEARE, R. Giant toads *Bufo marinus* in Australia and Venezuela have antibodies against "ranaviruses". **Disf. Aquatic Organ**, v.32, p.1-8, 1998.

9. ANEXOS

9.1 ANEXO 1

Resultados da Técnica de contrastação negativa dos peixes analisados.

Nº ANIMAL	ESPÉCIE		Nº ÓRGÃOS ANALISADOS	RESULTADO
	Nome popular	Nome científico		
1	Bagre	<i>Bagre sp</i>	3	Positivo
2	Bagre	<i>Bagre sp</i>	3	Positivo
3	Bagre	<i>Bagre sp</i>	1	Positivo
4	Bagre-africano	<i>Clarias gariepinus</i>	9	Positivo
5	Bagre-africano	<i>Clarias gariepinus</i>	9	Positivo
6	Bijupira	<i>Rachycentron canadum</i>	3	Positivo
7	Bijupira	<i>Rachycentron canadum</i>	4	Positivo
8	Bijupira	<i>Rachycentron canadum</i>	3	Positivo
9	Carpa	<i>Ciprinus carpio</i>	2	Positivo
10	Carpa	<i>Ciprinus carpio</i>	2	Positivo
11	Carpa	<i>Ciprinus carpio</i>	2	Positivo
12	Carpa	<i>Ciprinus carpio</i>	2	Positivo
13	Carpa	<i>Ciprinus carpio</i>	2	Positivo
14	Carpa	<i>Ciprinus carpio</i>	2	Positivo
15	Carpa	<i>Ciprinus carpio</i>	2	Positivo
16	Carpa	<i>Ciprinus carpio</i>	2	Positivo
17	Carpa	<i>Ciprinus carpio</i>	2	Positivo
18	Carpa	<i>Ciprinus carpio</i>	2	Positivo
19	Carpa	<i>Ciprinus carpio</i>	1	Positivo
20	Carpa	<i>Ciprinus carpio</i>	5	Positivo
21	Carpa	<i>Ciprinus carpio</i>	1	Positivo
22	Carpa	<i>Ciprinus carpio</i>	6	Positivo
23	Garoupa	<i>Epinephelus marginatus</i>	6	Positivo
24	Jacundá	<i>Crenicichla lenticulata</i>	2	Positivo
25	Pacu	<i>Piaractus mesopotamicus</i>	6	Positivo
26	Pacu	<i>Piaractus mesopotamicus</i>	6	Positivo
27	Pacu	<i>Piaractus mesopotamicus</i>	2	Positivo
28	Peixe-citrinelo	<i>Cichlassoma citrinellum</i>	2	Positivo

29	Piranha-vermelha	<i>Serrasal mus nateteri</i>	2	Positivo
30	Robalo	<i>Centropomus parallelus</i>	7	Positivo
31	Tambaqui	<i>Colossoma macropomum</i>	2	Positivo
32	Tilápia	<i>Oreochromis niloticus</i>	1	Negativo
33	Tilápia	<i>Oreochromis niloticus</i>	1	Negativo
34	Tilápia	<i>Oreochromis niloticus</i>	1	Negativo
35	Tilápia	<i>Oreochromis niloticus</i>	1	Negativo
36	Tilápia	<i>Oreochromis niloticus</i>	1	Negativo
37	Tilápia	<i>Oreochromis niloticus</i>	1	Negativo
38	Tilápia	<i>Oreochromis niloticus</i>	1	Negativo
39	Tilápia	<i>Oreochromis niloticus</i>	6	Positivo
40	Tilápia	<i>Oreochromis niloticus</i>	6	Positivo
41	Tilápia	<i>Oreochromis niloticus</i>	6	Positivo
42	Tilápia	<i>Oreochromis niloticus</i>	5	Positivo
43	Tilápia	<i>Oreochromis niloticus</i>	6	Positivo
44	Tilápia	<i>Oreochromis niloticus</i>	6	Positivo
45	Tilápia	<i>Oreochromis niloticus</i>	6	Positivo
46	Tilápia	<i>Oreochromis niloticus</i>	6	Positivo
47	Tilápia	<i>Oreochromis niloticus</i>	7	Positivo
48	Tilápia	<i>Oreochromis niloticus</i>	7	Positivo
49	Tilápia	<i>Oreochromis niloticus</i>	7	Positivo
50	Tilápia	<i>Oreochromis niloticus</i>	6	Positivo
51	Tilápia	<i>Oreochromis niloticus</i>	6	Positivo
52	Tilápia	<i>Oreochromis niloticus</i>	6	Positivo
53	Tilápia	<i>Oreochromis niloticus</i>	6	Positivo

9.2 ANEXO 2

Resultado da Técnica de contrastação negativa em anfíbios analisados.

Nº ANIMAL	ESPÉCIE		Nº DE ORGÃOS ANALISADOS	RESULTADO
	NOME COMUM	NOME CIENTÍFICO		
1	Rã-touro	<i>Lithobates catesbeianus</i>	1	Positivo
2	Rã-touro	<i>Lithobates catesbeianus</i>	1	Positivo
3	Rã-touro	<i>Lithobates catesbeianus</i>	2	Positivo
4	Rã-touro	<i>Lithobates catesbeianus</i>	2	Negativo
5	Rã-touro	<i>Lithobates catesbeianus</i>	2	Negativo
6	Rã-touro	<i>Lithobates catesbeianus</i>	2	Negativo
7	Rã-touro	<i>Lithobates catesbeianus</i>	2	Negativo
8	Rã-touro	<i>Lithobates catesbeianus</i>	2	Negativo
9	Rã-touro	<i>Lithobates catesbeianus</i>	4	Positivo
10	Rã-touro	<i>Lithobates catesbeianus</i>	4	Positivo
11	Rã-touro	<i>Lithobates catesbeianus</i>	4	Positivo
12	Rã-touro	<i>Lithobates catesbeianus</i>	2	Negativo
13	Rã-touro	<i>Lithobates catesbeianus</i>	2	Negativo
14	Rã-touro	<i>Lithobates catesbeianus</i>	7	Negativo
15	Rã-touro	<i>Lithobates catesbeianus</i>	7	Negativo
16	Rã-touro	<i>Lithobates catesbeianus</i>	7	Negativo
17	Rã-touro	<i>Lithobates catesbeianus</i>	7	Negativo
18	Rã-touro	<i>Lithobates catesbeianus</i>	7	Negativo
19	Rã-touro	<i>Lithobates catesbeianus</i>	7	Negativo
20	Rã-touro	<i>Lithobates catesbeianus</i>	7	Negativo
21	Rã-touro	<i>Lithobates catesbeianus</i>	6	Negativo
22	Rã-touro	<i>Lithobates catesbeianus</i>	7	Negativo
23	Rã-touro	<i>Lithobates catesbeianus</i>	8	Negativo
24	Rã-touro	<i>Lithobates catesbeianus</i>	8	Negativo
25	Rã-touro	<i>Lithobates catesbeianus</i>	8	Negativo
26	Rã-touro	<i>Lithobates catesbeianus</i>	1	Negativo
27	Rã-touro	<i>Lithobates catesbeianus</i>	1	Negativo
28	Rã-touro	<i>Lithobates catesbeianus</i>	1	Negativo
29	Rã-touro	<i>Lithobates catesbeianus</i>	7	Positivo
30	Rã-touro	<i>Lithobates catesbeianus</i>	7	Positivo
31	Rã-touro	<i>Lithobates catesbeianus</i>	7	Positivo
32	Rã-touro	<i>Lithobates catesbeianus</i>	7	Positivo
33	Rã-touro	<i>Lithobates catesbeianus</i>	8	Positivo
34	Rã-touro	<i>Lithobates catesbeianus</i>	5	Positivo
35	Rã-touro	<i>Lithobates catesbeianus</i>	5	Positivo

36	Rã-touro	<i>Lithobates catesbeianus</i>	5	Positivo
37	Rã-touro	<i>Lithobates catesbeianus</i>	3	Positivo
38	Rã-touro	<i>Lithobates catesbeianus</i>	4	Positivo
39	Rã-touro	<i>Lithobates catesbeianus</i>	8	Negativo
40	Rã-touro	<i>Lithobates catesbeianus</i>	5	Negativo
41	Rã-touro	<i>Lithobates catesbeianus</i>	5	Negativo
42	Rã-touro	<i>Lithobates catesbeianus</i>	6	Negativo
43	Sapo-de-chifre	<i>Proceratophrys boiei</i>	2	Positivo
44	Rã-do-riacho	<i>Hylodes asper</i>	2	Positivo
45	Rã-do-riacho	<i>Hylodes asper</i>	2	Positivo
46	Rãzinha	<i>Leptodactylus podicipinus</i>	1	Positivo
47	Sapo-flecha	<i>Adelphobates galactonotus</i>	1	Positivo
48	Sapo-flecha	<i>Adelphobates galactonotus</i>	1	Positivo
49	Rãzinha	<i>Leptodactylus podicipinus</i>	1	Positivo




SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO BIOLÓGICO

COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL – CETEA-IB

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 137/14** sobre o projeto: “**Impacto na presença de herpesvírus em peixes e rãs provenientes de criações comerciais, experimentais e recreativas**” sob a responsabilidade de **Márcio Hipólito**, está de acordo com os princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL/COBEA), pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos (DBCA).

São Paulo, 26 de setembro de 2014


Ricardo Spaccagna Jordão
Coordenador da CETEA-IB



SECRETARIA DE
AGRICULTURA E ABASTECIMENTO



GOVERNO DO ESTADO DE
SÃO PAULO
TRABALHANDO POR VOCÊ