Métodos para detecção de *Ranavirus* (Iridoviridae) em anfíbios

Joice Ruggeri[1*], Angélica de Almeida e Silva[1], Marcelo Candido[2], Ricardo L. M. Sousa[2], Luís Felipe Toledo[1]

1 Laboratório de História Natural de Anfíbios Brasileiros, Departamento de Biologia Animal, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, 13083-862 Campinas, SP, Brasil.
2 Laboratório de Higiene Zootécnica, Departamento de Medicina Veterinária, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, 13635-900 Pirassununga, SP, Brasil.
*Autor correspondente: E-mail: *joice.ruggeri@gmail.com*
DOI: *10.5281/zenodo.5211381*

RESUMO

Dentre os muitos fatores que impactam negativamente a biodiversidade mundial (como desmatamento, poluição e aquecimento global), as doenças infecciosas são consideradas um grande problema para a conservação da flora e fauna. Principalmente em relação aos anfíbios, que constituem o grupo de vertebrados mais ameaçado da atualidade, as doenças infecciosas já foram responsáveis por declínios e extinções de populações naturais em todos os continentes. Os principais patógenos conhecidos até o momento que apresentam maior impacto sobre esse grupo são os dois fungos causadores da quitridiomicose (*Batrachochytrium dendrobatidis* e *Batrachochytrium salamandrivorans*) e os vírus do gênero *Ranavirus*. Os vírus do gênero *Ranavirus* constituem uma ameaça não somente aos anfíbios, mas também aos peixes e répteis, e já foram relacionados a eventos de mortalidade em massa de indivíduos desses grupos em diversos países. A recente descoberta desse vírus em populações naturais de anfíbios no Brasil despertou o nosso interesse em apresentar uma revisão de protocolos para a detecção do *Ranavirus* a fim de incentivar pesquisadores a realizar diagnósticos de ranavirose em vertebrados ectotérmicos, em especial anfíbios.

INTRODUÇÃO

A ranavirose é uma doença infecciosa emergente com rápida disseminação e alta letalidade que acomete os vertebrados ectotérmicos (peixes, anfíbios e répteis), sendo cada vez relatada com mais frequência (Mazzoni et al. 2009; Duffus et al. 2015). Essa combinação entre gravidade e aumento no número de casos tornou obrigatória a sua notificação à Organização Mundial de Saúde Animal (OIE; Schloegel et al. 2009). No Brasil, a notificação deve ser feita diretamente ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) que através do Serviço Veterinário Oficial (SVO) investiga o caso e repassa os dados à OIE (MAPA 2020). A doença recebe esse nome por ser causada por agentes virais grandes de DNA (entre 120 e 200 nm) do gênero *Ranavirus* (Rv), da família Iridoviridae (Chinchar 2002), sendo atualmente divididos em dois grupos: i) os Rv associados aos anfíbios (AARVs – Amphibian-associated ranaviruses) que também podem infectar répteis, incluem as linhagens *Frog virus* 3 (FV3-like), *Ambystoma tigrinum virus* (ATV-like) e *Common midwife toad virus* (CMTV-like), e ii) os Rv associados aos peixes: Grouper iridovirus (GIV-like), European catfish virus (ECV-like) e *Epizootic haematopoietic necrosis virus* (EHNV-like) (Jancovich et al. 2015; Price et al. 2016; Candido et al. 2019; Fig. 1).

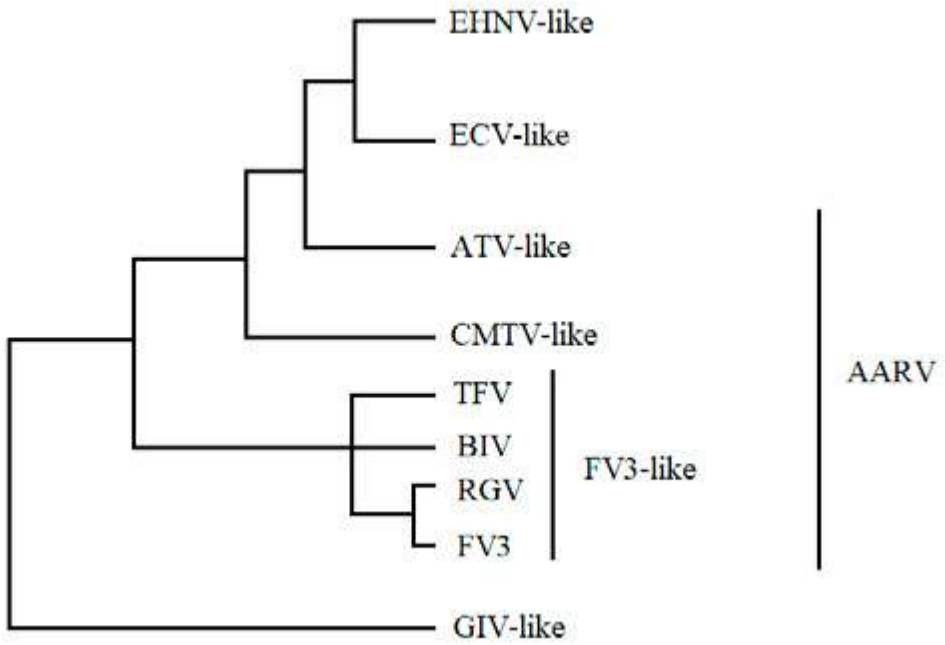


Figura 1. Relações filogenéticas dos grupos de espécies de *Ranavirus* (baseada em Candido et al. 2019). AARV (Amphibian-associated ranaviruses) se refere ao grupo dos *Ranavirus* associados aos anfíbios.

A linhagem FV3 e similares (FV3-like) apresentam distribuição global e já foram responsáveis por declínios de peixes, anfíbios e répteis, tanto em cativeiro quanto em ambientes naturais (Duffus et al. 2015). No Brasil, o Rv foi relacionado com eventos de mortalidade em massa de girinos de rã-touro, *Aquarana catesbeiana* (Shaw, 1802), em ranários (Galli et al. 2006; Mazzoni et al. 2009; Candido et al. 2019) e em populações selvagens no sul da Mata da Atlântica (Ruggeri et al. 2019).

Existem diferentes métodos utilizados para a detecção de Rv, incluindo detecções histológicas, e moleculares tanto por reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional como por PCR quantitativo em tempo real (qPCR). Com o objetivo de incentivar a investigação do Rv em espécies da herpetofauna brasileira, apresentamos aqui um resumo dos protocolos mais utilizados para a detecção de Rv em anfíbios (AARVs), bem como uma comparação entre os métodos (Tab. 1). Ainda, apresentamos reagentes alternativos para o protocolo de Candido & Sousa (2018; Tab. 2).

MÉTODOS DIAGNÓSTICOS

Métodos não invasivos: diagnóstico visual

Os sinais clínicos da infecção por Rv em anfíbios consistem principalmente em lesões na pele, hemorragia interna, eritema (Fig. 2) e comportamento anormal do animal, como natação errática e perda de flutuabilidade (Miller et al. 2015). Alguns espécimes também podem apresentar distensão abdominal, cor pálida e enfraquecimento dos membros. Animais com sistema imune comprometido costumam desenvolver a doença rapidamente, principalmente durante o estágio larval e durante a metamorfose (Mazzoni et al. 2009). Como os sintomas não são exclusivos da doença causada por Rv, recomenda-se que o diagnóstico visual é um método que deve ser confirmado com um exame mais assertivo. Porém, é de extrema importância que qualquer animal que apresente esses sinais clínicos seja isolado do restante da população sempre que possível (Pessier & Mendelson 2010).



Figura 2. Indivíduo de *Pelophylax perezi* coletado na Serra das Estrelas, Portugal, apresentando sinais clínicos no focinho da doença causada pelos *Ranavirus*.
Foto: João Martins.

Métodos invasivos: não letais

Utilizam-se como formas não letais de diagnóstico do Rv, principalmente, a coleta da ponta de dedo ou artelho (articulação de falanges), cauda de girinos, amostras de sangue, e de secreção a partir do suabe da região da cloaca, cavidade oral ou lesões na pele (Pessier & Mendelson III 2010; Gray et al. 2012; Miller et al. 2015). A coleta dessas amostras, abaixo descritas, deve ser realizada com cautela para evitar contaminação cruzada entre as amostras, sendo imprescindível a troca de luvas entre o manuseio dos animais. Além disso, todos os instrumentos envolvidos nesses processos de manuseio devem ser esterilizados com imersão em álcool P.A., seguido de exposição à uma chama aberta (Forzán & Wood 2013), ou por imersão em desinfetante Virkon S a 1% por, no mínimo, 20 minutos (Bryan et al. 2009). Essas amostras podem ser testadas para a presença do Rv por sorologia (amostras de sangue) ou a partir de técnicas moleculares, como PCR ou qPCR. Porém, essas técnicas podem gerar falsos negativos e, portanto, é indicado que elas sejam utilizadas de forma complementar umas com as outras no mesmo indivíduo (Gray et al. 2012).

Amostras de falanges

A coleta é realizada amputando-se um dígito do animal com auxílio de pinça e tesoura esterilizados. Cada amostra deve ser armazenada em um microtubo estéril contendo etanol 70% (Miller et al. 2015).

Amostras de cauda de girinos

Com uma tesoura esterilizada, corta-se cerca de 0.5 a 1 cm da extremidade distal da cauda do girino, que deve ser armazenada em um microtubo estéril, preferencialmente em temperatura de -80 °C até a extração do DNA (Gray et al. 2012), ou em microtubo estéril contendo etanol 70% em temperatura ambiente.

Amostras de sangue

A coleta de amostra de sangue é feita por punção da veia abdominal ou cardíaca do animal utilizando agulha de calibre 25G (0.5 mm; Pessier & Mendelson 2010). A amostra sanguínea deve ser imediatamente inserida em um cartão FTA (qualquer marca), onde será transportado até o laboratório.

Amostras coletadas por suabes

O suabe deve ser passado nas regiões alvo, rodando suavemente o suabe na cavidade oral ou cloacal por 3 a 5 segundos, ou esfregada de forma cuidadosa na lesão. O mesmo suabe pode ser utilizado para a região bucal e cloacal do mesmo indivíduo (Goodman et al. 2013). Cada suabe deve ser mantido em um microtubo estéril com etanol absoluto (99.5%) em temperatura ambiente ou em um microtubo estéril a seco em temperatura de -20 °C, até extração do DNA em laboratório (Miller et al. 2015).

TÉCNICAS MOLECULARES

As técnicas moleculares para detecção do Rv em amostras provenientes do hospedeiro utilizam marcadores moleculares para a amplificação parcial do gene que codifica a proteína principal do capsídeo (Major Capsid Protein: MCP). Essa é uma região conservada entre as espécies do gênero *Ranavirus* e, portanto, permite a detecção do vírus independentemente da linhagem. Porém, a região alvo do gene MCP e os oligonucleotídeos (*primers*) utilizados na amplificação parcial desse gene variam entre os protocolos, que apresentam produtos de diferentes tamanhos e sequências de nucleotídeos (Mao et al. 1997; Allender et al. 2013).

Para a detecção quantitativa do vírus nas amostras, utiliza-se a técnica da reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR), na qual a maioria dos protocolos conhecidos envolve o uso de uma sonda TaqMan (Pallister et al. 2007; Allender et al. 2013; Kolby et al. 2014; Warne et al. 2016; Leung et al. 2017), embora também existam protocolos que utilizam o corante SYBR Green (Jaramillo et al. 2012). Ainda que nenhuma dessas técnicas moleculares permita identificar se o vírus está ativo dentro do hospedeiro, o uso do qPCR é vantajoso em relação ao PCR convencional, pois permite a quantificação de cópias virais (i.e., fornece dados de carga viral), enquanto o PCR convencional somente permite a detecção (i.e., somente dados de ocorrência da infecção) do DNA viral na amostra analisada. Por outro lado, quando o objetivo é o posterior sequenciamento da região alvo do vírus, a técnica comumente utilizada para a obtenção do produto é o PCR convencional.

PCR Convencional (PCR)

Existem diversos protocolos para a detecção de Rv por PCR convencional (e.g. Mao et al. 1997; Mazzoni et al. 2009) e deve-se ter em mente que a temperatura de anelamento (Ta) dos *primers* à sequência de DNA alvo pode variar de acordo com os oligonucleotídeos utilizados (Tab. 3). Destacamos o protocolo de Mazzoni et al. (2009), pois foi desenvolvido a partir da linhagem FV3-like isolada durante um evento de mortalidade em massa de girinos de rã-touro em ranário brasileiro. Esse protocolo utiliza *primers* desenhados para amplificar 1483 pares de base (pb) do gene MCP dessa linhagem FV3-like (Tab. 3), e 233 pb do gene DNA-dependente da RNA polimerase II (Pol-III *primer* senso: TCACCGCCGCAGACATCTTTAG; *primer* anti-senso: GTAACCGTTCTTTTCGCAGTGG).

Cada reação utiliza entre 1 e 5 µL do DNA da amostra, 12.5 µL do reagente GoTaq® DNA Polymerase (Promega, EUA), 1.0 µL de cada *primer* a 10 µM, e água ultrapura até completar o volume de 25 µL. As condições de termociclagem utilizadas neste protocolo são: uma etapa de pré-aquecimento em

Tabela 1. Comparação entre os métodos comumente utilizados para detecção de *Ranavirus* em amostras biológicas.

	Histologia	PCR convencional	qPCR	
Protocolo	HE	Taq polimerase	SYBR green	TaqMan
Tipo de amostra biológica	Tecido	Cultura do vírus / DNA ambiental / Sangue / Tecido	Cauda / Falange / Sangue / Secreção (cloaca, oral, lesão) / Tecido	Cauda / DNA ambiental / Falange / Sangue / Secreção (cloaca, oral, lesão) / Tecido
Extração de DNA	Não	Sim	Sim	Sim
Quantificação do DNA alvo	Não	Não	Sim	Sim
Número de amostras	~ 150 amostras por bloco de parafina/ resina	Até 94 amostras (simplicata) + NTC + controle positivo	Até 188 amostras (duplicata) + NTC + controle positivo	Até 188 amostras (duplicata) + NTC + controle positivo
Custo*	~ USD 12.00 por bloco (múltiplos cortes)	~USD 3.00 por amostra + valor extração DNA	~ USD 10.42 por amostra + valor extração DNA	~ USD 11.35 por amostra + valor extração DNA
Vantagens	Não necessita extrair o DNA	Permite sequenciamento do produto de PCR	Quantificação em tempo real	Alta confiabilidade devido ao uso da sonda; quantificação em tempo real
Desvantagens	Somente post-mortem; não possibilita quantificação do DNA alvo	Não permite quantificação viral na amostra; a visualização dos resultados é feita por eletroforese	Inespecífico (se liga a qualquer molécula de DNA); formação de dímeros de *primers*	Custo alto devido ao uso de sonda fluorescente; necessita extração de DNA

*O custo por reação para cada método foi calculado em dólares americanos (taxa de conversão BRL 5: USD 1) considerando o valor médio dos reagentes e material de consumo utilizados.

105 °C seguida de 2 minutos a 95 °C. Para os *primers* MCP devem-se utilizar 40 ciclos de: 60 segundos a 95 °C (desnaturação), seguido por 60 segundos a 60 °C (anelamento), e 90 segundos a 72 °C (extensão). Já para os *primers* Pol-II, deve-se utilizar 40 ciclos de: 60 segundos a 95 °C, seguido por 60 segundos a 60 °C, e 30 segundos a 72 °C. A extensão final deve ocorrer por 5 minutos a 72 °C.

PCR em Tempo Real (qPCR)

A qPCR além de permitir a análise quantitativa do DNA genômico alvo na amostra, é considerada uma técnica precisa e com alta sensibilidade de detecção (Pallister et al. 2007). Essas características tornam essa técnica preferencial em relação ao PCR convencional quando o objetivo vai além da simples detecção do vírus na amostra.

Existem dois principais ensaios de qPCR utilizados: o ensaio com SYBR Green, no qual este corante se intercala aos pares de base de qualquer molécula de DNA amplificada na reação; e o ensaio TaqMan, no qual se utiliza uma sonda fluorescente específica para o segmento do gene alvo. A principal diferença entre estas técnicas está na presença da sonda utilizada no ensaio TaqMan, que é constituída de oligonucleotídeos marcados com um corante *reporter* fluorescente na extremidade 5' e um corante *quencher* silenciador na extremidade 3'. Quando as sondas se ligam ao segmento alvo, elas emitem luz. Já o corante SYBR Green é detectado quando ocorre a amplificação do DNA reconhecido pelos *primers* utilizados na reação. Em ambos os casos, a luz emitida é acumulada ao longo dos ciclos da qPCR, permitindo assim a quantificação do DNA genômico alvo na amostra.

Para os dois tipos de ensaio, a quantificação do DNA genômico alvo nas amostras é baseado em uma curva padrão constituída por diluições seriadas (1:10) com quantidade de cópias virais conhecidas nas concentrações que podem variar entre 10^0 e 10^9, dependendo do protocolo a ser seguido. Essa curva padrão deve ser preparada com as diluições seriadas em duplicata (ou triplicata) e pode ou não ser incluída em cada placa da reação. Cada amostra biológica na reação deve ser testada no mínimo em duplicata e considerada positiva quando i) ocorre amplificação das duas duplicatas da amostra, ii) a amplificação está dentro do limiar de detecção (Ct) da curva padrão, iii) o ponto de fusão do produto se encontra na mesma faixa de temperatura das amostras padrão (Leung et al. 2017). No caso de uma mesma amostra testar positiva em uma replicata e negativa em outra, essa amostra pode ser testada novamente em outra reação (Brunner et al. 2019) ou ser considerada negativa (Leung et al. 2017). Além disso, quando se utiliza a técnica de qPCR para a quantificação

do DNA genômico nas amostras, a eficiência da reação deve estar entre 90 e 110 %, e pode ser calculada a partir da fórmula:

*Eficiência = (10 (- 1/slope)-1) * 100.*

Abaixo, apresentamos alguns dos protocolos mais comumente utilizados para cada um destes dois ensaios (SYBR Green e TaqMan).

ENSAIO SYBR GREEN

Essa técnica consiste na captação da fluorescência produzida pelo corante SYBR Green durante a reação de qPCR. Esse corante se liga de forma inespecífica às moléculas de DNA e à medida em que as fitas duplas são amplificadas, a fluorescência é emitida. A vantagem dessa técnica é o custo da reação, pois o corante SYBR Green é mais barato do que as sondas utilizadas em reações com TaqMan (descritas abaixo). Por outro lado, a desvantagem é que o corante SYBR Green se liga a qualquer molécula de DNA e, portanto, os *primers* utilizados para amplificar o DNA alvo devem ser desenhados com precisão para evitar falsos positivos.

A seguir, descrevemos um dos protocolos utilizados para a detecção de *Ranavirus* a partir do uso do SYBR Green (Jaramillo et al. 2012). Este protocolo utiliza o reagente QuantiTect SYBR Green Master Mix Kit da Qiagen® e *primers* com região alvo de 94 pb do gene viral MCP (Tab. 3). Porém, vale ressaltar que existem reagentes fabricados por outras empresas (e.g., Thermo Fisher Scientific) que podem ser utilizados na técnica com SYBR Green, assim como outros *primers* podem ser desenhados de acordo com a região alvo de interesse do pesquisador.

Para cada reação descrita neste protocolo utilizam-se 12.5 µL do reagente SYBR Green Master Mix, 12.5 pmol de cada *primer*, 2.5 µL da amostra de DNA e completa-se com água livre de nuclease até o volume final de 22.5 µL. As condições de termociclagem são: 95 °C por 15 minutos para ativar o reagente e iniciar a desnaturação do DNA, seguido por 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 segundos, anelamento a 58 °C por 30 segundos e extensão à 72 °C por 30 segundos. Uma curva padrão constituída por amostras em diluições seriadas de 1:10 com quantidade de cópias virais conhecidas nas concentrações entre 10^0 e 10^6 deve ser incluída em duplicata (ou triplicata) em cada ensaio.

ENSAIO TAQMAN

Aqui apresentamos três protocolos para detecção de *Ranavirus* em amostras a partir do ensaio com TaqMan. Cada protocolo descrito abaixo apresenta vantagens e desvantagens em relação aos outros, que serão consideradas em cada tópico (ver também Tab. 1).

Protocolo de Allender et al. (2013) com modificações (Candido & Sousa 2018)

Esse protocolo foi inicialmente desenvolvido por Allender et al. (2013) para detectar e quantificar o vírus em tartarugas (*Terrapene carolina carolina*) e, recentemente, adaptado por Candido & Sousa (2018) para a detecção do Rv em peixes. Esse protocolo foi também validado para a detecção de *Ranavirus* infectando anfíbios em ambientes naturais no Brasil (Ruggeri et al. 2019). Aqui, nós testamos o protocolo modificado (Candido & Sousa 2018) com dois reagentes, ambos sendo bem sucedidos no ensaio: Platinum® quantitative PCR SuperMix-UDG com adição do ROX Reference Dye (diluição 1:10) e TaqMan® Universal PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific), e apresentamos algumas considerações sobre o protocolo. Uma vez que existem diferentes linhagens de *Ranavirus* distribuídas globalmente, é importante destacar que o protocolo foi eficiente na amplificação de linhagens norte americanas (Allender et al. 2013) e brasileiras (Ruggeri et al. 2019) tanto em peixes quanto em girinos e com diferentes reagentes (esse trabalho; Tab. 2). Esse protocolo utiliza uma sonda fluorescente, que permite a quantificação do DNA alvo em cada amostra (Tab. 3).

Neste protocolo, o DNA extraído das amostras deve ser diluído na concentração de 7.5 ng/µL. Deverão ser incluídos uma amostra positiva na mesma concentração (7.5 ng/µL) e uma amostra controle, com adição de água no lugar do DNA (NTC – non-template control), ambos em duplicata. Pode-se adicionar BSA (albumina de soro bovino) à reação para reduzir a ação de inibidores de PCR e, portanto, diminuir a possibilidade de falsos negativos no ensaio (Garland et al. 2010). No caso de não se utilizar o BSA, substituir a mesma quantidade por água livre de nucleases. A quantidade de cada reagente por reação se encontra na Tab. 2. A ciclagem empregada no protocolo compreende um ciclo à 50 °C por 2 minutos (incubação da UDG/UNG) para evitar contaminação com produto de PCR de ensaios anteriores, seguido por uma incubação a 95 °C por 10 minutos para desnaturação inicial e ativação da DNA polimerase, e 40 ciclos a 95 °C por 15 segundos e 60 °C por um minuto.

Esse é um protocolo simples uma vez que não é necessário utilizar uma curva padrão para cada ensaio, desde que as amostras estejam na concentração de 7.5 ng/µL. Por outro lado, deve-se atentar que cada ensaio apresenta características próprias, como erro de pipetagem, possíveis variações na temperatura do termociclador de diferentes marcas, e o uso de reagentes mais ou menos novos, por exemplo.

Tabela 2. Volume de cada reagente por reação. O corante ROX (6-carboxy-X-rhodamine) deverá ser substituído por água ultrapura ou BSA (albumina de soro bovino) quando esse pigmento de referência passiva estiver presente no reagente escolhido. O mix de reação deve ser calculado com 10% de volume a mais para cada amostra para considerar possíveis erros de pipetagem. Protocolo baseado em Allender et al. (2013).

Reagente	**Volume**	**Reagente**	**Volume**
Platinum® quantitative PCR SuperMix-UDG	12.5 µL	TaqMan® Universal PCR Master Mix	12.5 µL
Água ultrapura	7.75 µL	Água MiliQ	7.75 µL
Primer senso a 10 µM	1.0 µL	*Primer* senso a 10 µM	1.0 µL
Primer anti-senso a 10 µM	1.0 µL	*Primer* anti-senso a 10 µM	1.0 µL
Sonda fluorescente a 10 µM	0.25 µL	Sonda fluorescente a 10µM	0.25 µL
ROX (diluído 1:10)	0.5 µL	BSA (400 ng/µL)	0.5 µL
DNA amostra (7.5 ng/µL)	2.0 µL	DNA amostra (7.5 ng/µL)	2.0 µL
Volume total por reação	**25 µL**	**Volume total por reação**	**25 µL**

Tabela 3. Lista de alguns *primers* e sondas fluorescentes conhecidos para amplificação de fragmentos da região MCP (proteína principal do capsídeo) dos vírus pertencentes ao gênero *Ranavirus*. Para cada *primer* e sonda é indicada a técnica molecular utilizada e o número de pares de bases (pb) amplificados.

***Primer* / sonda**	**Sequência de nucleotídeos (5' – 3')**	**MCP**	**Técnica**	**Referência**
Primer senso	ATGTCTTCTGTAACTGGTTCA	1483 pb	PCR convencional	Mazzoni et al. 2009
Primer anti-senso	AAAGACCCGTTTTGCAGCAAAC			
Primer senso	GACTGACCAACGCCAGCCTTAACG3	94 pb	qPCR: ensaio SYBR Green	Jaramillo et al. 2012
Primer anti--senso	GCGGTGGTGTACCCAGAGTTGTCG3			
Primer senso	AACGCCGACCGAAAACTG	54 pb	qPCR: ensaio TaqMan	Allender et al. 2013
Primer anti-senso	GCTGCCAAGATGTCGGGTAA			
Sonda	6FAM-CCGGCTTTCGGGC-MGB-NFQ			
Primer senso	ACACCACCGCCCAAAA GTAC	70 pb	qPCR: ensaio TaqMan	Warne et al. 2016
Primer anti--senso	CCGTTCATGATGCGGATAATG			
Sonda	FAM-CCTCATCGTTCTGGCCATCAACCAC -TAMRA			
Primer senso	GTCCTTTAACACGGCATACCT	97 pb	qPCR: ensaio TaqMan	Leung et al. 2017
Primer anti--senso	ATCGCTGGTGTTGCCTATC			
Sonda	VIC-TTATAGTAGCCTRTGCGCTTGGCC-MGB-NFQ			

Protocolo de Leung et al. (2017)

Esse protocolo utiliza reagentes TaqMan e envolve uma etapa de quantificação de cópias virais na amostra e uma etapa de quantificação de células do hospedeiro na mesma amostra. Para a elaboração desse protocolo, Leung et al. (2017) utilizaram sequências do MCP depositadas no GenBank das principais linhagens de Rv associado aos anfíbios (AARV) para desenhar os *primers* e a sonda que pudessem amplificar fragmentos de DNA de todas as linhagens de Rv desse grupo (Tab. 3). Os autores utilizaram uma sequência de nucleotídeos da região não codificante de proteína ultra conservada entre vertebrados denominada EBF3N (UCNE id: 8107; Dimitrieva & Bucher 2013), para desenhar os *primers* e a sonda para amplificação do DNA da célula hospedeira.

A primeira etapa do protocolo consiste em identificar e quantificar as amostras infectadas com *Ranavirus* a partir do qPCR. Para isso, utilizam-se *primers* para a amplificação da região MCP dos Rv e sonda fluorescente específica (Tab. 3). A segunda etapa deste protocolo consiste na reação de qPCR utilizando as amostras que testaram positivas para a presença do DNA genômico do vírus no primeiro ensaio de qPCR, utilizando marcadores para a amplificação da região não codificante do vertebrado hospedeiro (*primer* senso ATGCTGCAATTCAAACTGTCAG, *primer* anti-senso CAGTAAGCAAAATKGGGAAGAAGC, e sonda FAM-CACTGGTTTGCTCAGGGATA-MGB-NFQ). O protocolo de termociclagem aplicado nas duas etapas é idêntico e consiste em 2 minutos à 50 °C, seguido de 10 minutos à 95 °C, e 50 ciclos de 15 segundos à 95 °C e 30 segundos à 60 °C. Após os resultados dos dois qPCRs, é feita a normalização a partir da seguinte fórmula (para cada amostra), levando em consideração a quantidade de cromossomos do hospedeiro (ploidia):

$$\textit{Número de cópias virais} = \frac{(\textit{Número de cópias MCP} * \textit{Ploidia do hospedeiro})}{(\textit{Número de cópias EBF3N})}$$

Assim, a vantagem desse protocolo é a possibilidade de se fazer comparações entre a infecção por Rv em diversos hospedeiros devido à normalização dos dados baseado na quantidade de cópias virais encontradas por célula do hospedeiro. Por outro lado, o custo desse protocolo é alto, pois envolve o uso duas sondas fluorescentes diferentes, que é um dos reagentes mais caros das reações de qPCR (Tab. 1).

MÉTODOS *POST-MORTEM*: HISTOPATOLOGIA

Consiste em analisar amostras de tecido do animal com infecção suspeita ou comprovada a partir de técnicas histológicas padronizadas. Essas técnicas são utilizadas de forma complementar ao uso de técnicas moleculares de detecção do patógeno, e auxiliam na comprovação da doença nos animais infectados (Mazzoni et al. 2009; Miller et al. 2015).

Durante a coleta de animais com suspeita de infecção por Rv, sugere-se coletar amostras de tecidos, preferencialmente fígado, baço e rim, e congelar para futura detecção utilizando as técnicas moleculares descritas acima (PCR ou qPCR). Réplicas dos mesmos tecidos devem ser fixadas em formaldeído a 10% e processadas para histologia (i.e., inclusão em parafina ou resina, secção e coloração do material). A secção do material em parafina ou resina deve ser realizada serialmente e idealmente com espessura de 7 µm, para posterior preparação das lâminas, que podem ser coradas usando o método da Hematoxilina e Eosina (HE), e analisadas utilizando microscópio óptico (Greer et al. 2005; Miller et al. 2015). No entanto, identificar alterações celulares causadas pelo Rv é desafiador e requer treinamento, especialmente nos casos de infecções concomitantes com outros patógenos (Miller et al. 2015). Assim, esse método é idealmente utilizado para confirmar a morte por Rv, porém não é adequado para a detecção do patógeno.

DETECÇÃO DO RV NO AMBIENTE (EDNA)

A detecção de DNA livre no ambiente, conhecido como DNA ambiental (eDNA), tornou-se uma ferramenta eficiente para monitorar patógenos nos ambientes onde os hospedeiros vivem sem a necessidade da amostragem do animal (Julian et al. 2019; Miaud et al. 2019). A presença do *Ranavirus* em ambientes aquáticos pode ser investigada ao filtrar a água do ambiente aquático utilizando membranas de celulose de 0.45 µm para reter o vírus e, em seguida, extraindo-se o DNA retido nessa membrana para posterior análise molecular utilizando os protocolos de detecção descritos acima. Essa técnica já se mostrou importante na detecção da presença do Rv na água que transporta animais para exportação (Kolby et al. 2014), assim como em ambientes naturais (Miaud et al. 2019; Vilaça et al. 2020).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Cada uma das técnicas apresentadas têm maior ou menor capacidade de detecção de Rv nas amostras (Forzán & Wood 2013; Miller et al. 2015), sen-

do aquelas provenientes do fígado com resultados superiores a outros tipos de amostras, principalmente no diagnóstico molecular (von Essen et al. 2020). Porém, quando o acesso só é possível em animais vivos, inviabilizando a amostragem de órgãos, indicamos a coleta de múltiplas amostras (como sangue, secreções, falanges e caudas) em conjunto, sempre que possível, para aumentar a confiabilidade dos resultados (Miller et al. 2015). Por outro lado, a detecção desse patógeno ainda não é comum em estudos com a herpetofauna brasileira. Portanto, sugerimos que estudos de detecção de Rv no Brasil sejam iniciados visando uma melhor compreensão da distribuição do vírus e das relações entre o patógeno e os hospedeiros. Além disso, vale ressaltar que o Rv é um patógeno de notificação obrigatória para o OIE e MAPA devido à sua rápida propagação e alta letalidade. Uma vez que a doença causada por esse vírus pode apresentar sinais clínicos evidentes (Miller et al. 2015), é importante separar o indivíduo que apresenta tais sinais da população (i.e., coleta do indivíduo) e investigar a população e os ambientes aquáticos daquela área (Miaud et al. 2019).

Assim, esta revisão de protocolos para a identificação de Rv em hospedeiros e no ambiente pode servir para incentivar estudos no Brasil. Uma vez que esse vírus pode representar mais um problema de conservação relevante e que ainda não foi amplamente abordado, destacamos a importância de incluir a triagem para o Rv nos próximos estudos realizados no Brasil, principalmente aqueles relacionados com a herpetofauna endêmica ou ameaçada.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Roseli Coelho e dois revisores anônimos pelas sugestões. O presente trabalho foi realizado com o apoio dos processos FAPESP #2012/08846-3, #2016/21357-2, #2016/25358-3, #2017/01718-3, #2017/01917-6 e #2019/06938-7, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), do processo CNPq #300896/2016-6, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (Capes) – Código de Financiamento 001.

REFERÊNCIAS

Allender M.C., Bunick D., Mitchell M.A. 2013. Development and validation of TaqMan quantitative PCR for detection of frog virus 3-like virus in eastern box turtles (*Terrapene carolina carolina*). *Journal of virological methods* 188:121–125.

Brunner J.L., Olson A.D., Rice J.G., Meiners S.E., Le Sage M.J., Cundiff

J.A., ... Pessier A.P. 2019. *Ranavirus* infection dynamics and shedding in American bullfrogs: consequences for spread and detection in trade. *Diseases of Aquatic Organisms* 135:135–150.

Bryan L.K., Baldwin C.A., Gray M.J., Miller D.L. 2009. Efficacy of select disinfectants at inactivating *Ranavirus*. *Diseases of Aquatic Organisms* 84:89–94.

Candido M., Sousa R.L.M. 2018. Aspectos celulares e moleculares da ranavirose experimental em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Ph.D. Dissertation, Universidade de São Paulo, Brasil.

Candido M., Tavares L.S., Alencar A.L.F., Ferreira C.M., Queiroz S.R.A., Fernandes A.M., Sousa R.L.M. 2019. Genome analysis of *Ranavirus frog virus 3* isolated from American Bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) in South America. *Scientific Reports* 9:17135.

Chinchar G.V. 2002. *Ranavirus*es (family Iridoviridae): emerging cold-blooded killers. *Archives of Virology* 147:447–470.

Dimitrieva S., Bucher P. 2013. UCNEbase - a database of ultraconserved non-coding elements and genomic regulatory blocks. *Nucleic Acids Research* 41(D1):D101-D109.

Duffus A.L.J., Waltzek T.B., Stöhr A.C., Allender M.C., Gotesman M., Whittington R.J., ... Marschang R.E. 2015. Distribution and host range of ranaviruses. Pp 9–57 in Gray M.J., Chinchar V.G. (Eds), *Ranavirus*es: lethal pathogens of ectothermic vertebrates. Springer. New York.

Forzán M.J., Wood J. 2013. Low detection of ranavirus DNA in wild postmetamorphic green frogs, *Rana (Lithobates) clamitans*, despite previous or concurrent tadpole mortality. *Journal of Wildlife Diseases* 49:879–86.

Galli L., Pereira A., Márquez A., Mazzoni R. 2006. *Ranavirus* detection by PCR in cultured tadpoles (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802) from South America. *Aquaculture* 257:78–82.

Garland S., Backer A., Phillott A.D., Skerratt L.F. 2010. BSA reduces inhibition in a TaqMan® assay for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of Aquatic Organisms* 92:113–116.

Goodman R.M., Miller D.L., Ararso Y.T. 2013. Prevalence of ranavirus in Virginia turtles as detected by tail-clip sampling versus oral-cloacal swabbing. *Northeastern Naturalist* 20:325–332.

Gray M.J., Miller D.L., Hoverman J.T. 2012. Reliability of non-lethal sur-

veillance methods for detecting ranavirus infection. *Diseases of Aquatic Organisms* 99:1–6.

Greer A.L., Berrill M., Wilson P.J. 2005. Five amphibian mortality events associated with ranavirus infection in south central Ontario, Canada. *Diseases of Aquatic Organisms* 67:9–14.

Jancovich J.K., Qin Q., Zhang V.G. 2015. *Ranavirus* replication: molecular, cellular, and immunological events. Pp 105–139, in Gray M.J., Chinchar V.G. (Eds), *Ranavirus*es: lethal pathogens of ectothermic vertebrates. Springer. New York.

Jaramillo D., Tweedie A., Becker J.A., Hyatt A., Crameri S., Whittington R.J. 2012. A validated quantitative polymerase chain reaction assay for the detection of ranaviruses (Family Iridoviridae) in fish tissue and cell cultures, using EHNV as a model. *Aquaculture* 356:186–192.

Julian J.T., Glenney G.W., Rees C. 2019. Evaluating observer bias and seasonal detection rates in amphibian pathogen eDNA collections by citizen scientists. *Diseases of Aquatic Organisms* 134:15–24.

Kolby J.E., Smith K.M., Berger L., Karesh W.B., Preston A., Pessier A.P., Skerrat L.F. 2014. First Evidence of Amphibian Chytrid Fungus (*Batrachochytrium dendrobatidis*) and Ranavirus in Hong Kong Amphibian Trade. *PLoS One* 9:e90750.

Leung W.T., Thomas-Walters L., Garner T.W., Balloux F., Durrant C., Price S.T. 2017. A quantitative-PCR based method to estimate *Ranavirus* viral load following normalization by reference to an ultraconserved vertebrate target. *Journal of Virological Methods* 249:147–155.

Mao J., Hedrick R.P., Chinchar V.G. 1997. Molecular characterization, sequence analysis, and taxonomic position of newly isolated fish iridoviruses. *Virology* 229:212–220.

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2020. Eletronic Database acessível em *http://www.defesaagropecuaria.al.gov.br/sanidade-animal/FORM%20NOTIFICA%20e%20Instrutivo.pdf*.

Mazzoni R., Mesquita A.J., Fleury L. F.F., Brito W.M.E.D., Nunes I.A., Robert J., ... Catroxo M.H.B. 2009. Mass mortality associated with a virus 3-like *Ranavirus* infection in farmed tadpoles *Rana catesbeiana* from Brazil. *Diseases of Aquatic Organisms* 86:181–191.

Miaud C., Arnal V., Poulain M., Valentini A., Dejean T. 2019. eDNA increases

the detectability of ranavirus infection in an alpine amphibian population. *Viruses* 1:526.

Miller D.L., Pessier A.P., Hick P., Whittington R.J. 2015. Comparative pathology of ranaviruses and diagnostic techniques. Pp 171–208 in Gray M.J., Chinchar V.G. (Eds), *Ranavirus*es: lethal pathogens of ectothermic vertebrates. Springer. New York.

Pallister J., Gould A., Harrison D., Hyatt A., Jancovich J., Heine H. 2007. Development of real-time PCR assays for the detection and differentiation of Australian and European ranaviruses. *Journal of Fish Diseases* 30:427–438.

Pessier A.P., Mendelson J.R. 2010. A manual for control of infectious diseases in amphibian survival assurance colonies and reintroduction programs. IUCN/SSC Captive Breeding Specialist Group, Apple Valley, MN.

Price S.J., Garner T.W.J., Cunningham A.A., Langton T.E.S., Nichols R.A. 2016. Reconstructing the emergence of a lethal infectious disease of wildlife supports a key role for spread through translocations by humans. *Proceedings of the Royal Society B* 283:20160952.

Ruggeri J., Ribeiro L.P., Pontes M.R., Toffolo C., Candido M., Carriero M.M., ... Toledo L.F. 2019. Discovery of wild amphibians infected with *Ranavirus* in Brazil. *Journal of Wildlife Diseases* 55:897–902.

Schloegel L.M., Picco A.M., Kilpatrick A.M., Davies A.J., Hyatt A.D., Daszak P. 2009. Magnitude of the US trade in amphibians and presence of *Batrachochytrium dendrobatidis* and *Ranavirus* infection in imported North American Bullfrogs (*Rana catesbeiana*). *Biological Conservation* 142:1420–1426.

Shaw G. 1802. General Zoology or Systematic Natural History (Volume III, Part 1). Amphibia, Thomas Davison, London.

Vilaça S.T., Grant S.A., Beaty L., Brunetti C.R., Congram M., Murray D.L., Wilson C.C., Kyle C.J. 2020. Detection of spatiotemporal variation in ranavirus distribution using eDNA. *Environmental DNA* 2:210–220.

von Essen M., Leung W.T.M., Bosch J., Pooley S., Ayres C., Price S.J. 2020. High pathogen prevalence in amphibian and reptile assemblage at a site with risk factors for dispersal in Galicia, Spain. *PLoS One* 15:e0236803.

Warne R.W., LaBumbard B., LaGrange S., Vredenburg V.T., Catenazzi A. 2016. Co-infection by chytrid fungus and *Ranavirus*es in wild and harvested frogs in the tropical Andes. *PLoS One* 11:e0145864.

Editor: Alexandro Tozetti



Bolitoglossa caldwellae
Tarauacá, AC
@Ubiratã Souza



Ceratophrys cornuta
Resex do Baixo Juruá - Juruá, AM
@Raíssa do N. Rainha