



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO – UFRPE
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO – PRPPG
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL – PGBA

Pesquisa de ranavírus em anuros procedentes de ambiente
natural protegido no estado de Pernambuco, Brasil

Davi dos Santos Rodrigues

Recife, PE

2024



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO – UFRPE
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO – PRPPG
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL – PGBA

Pesquisa de ranavírus em anuros procedentes de ambiente
natural protegido no estado de Pernambuco, Brasil

Davi dos Santos Rodrigues

Dissertação apresentada ao Programa de Biociência
Animal da Universidade Federal Rural de
Pernambuco como parte dos requisitos para obtenção
do grau de Mestre em Biociência Animal.

Orientador: José Wilton Pinheiro Junior
Coorientador: Geraldo Jorge Barbosa de Moura

Recife, PE

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

R696p Rodrigues, Davi dos Santos.
Pesquisa de ranavírus em anuros procedentes de ambiente natural protegido no Estado de Pernambuco, Brasil / Davi dos Santos Rodrigues. – Recife, 2024.

61 f.: il.

Orientador(a): José Wilton Pinheiro Junior.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, Recife, BR-PE, 2024.

Inclui referências e anexo(s).

1. Anura 2. Iridovírus 3. Diagnóstico 4. Epidemiologia
5. Conservação I. Pinheiro Junior, José Wilton, orient. II. Título

CDD 574

FOLHA DE APROVAÇÃO

Pesquisa de ranavírus em anuros procedentes de ambiente natural protegido no estado de Pernambuco, Brasil

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biociência Animal.

Aprovado em: / / 20 .

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Wilton Pinheiro Junior (Orientador)
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof. Dr. Paulo Roberto Eleutério de Souza (Examinador Interno)
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Profa. Dr. Ricardo Luiz Moro de Sousa (Examinador Externo)
Universidade de São Paulo

Profa. Dra. Rita de Cássia Carvalho Maia (Examinadora Substituta)
Universidade Federal Rural de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, fonte da vida e de todo o bem, que me guiou e fortaleceu em todos os momentos. Sem Ele, não estaria aqui.

À minha família: meu pai (Efraim), minha mãe (Eulália), meu irmão (Lucas), minha cunhada (Bruna) e minha sobrinha (Ana Luna). O apoio, encorajamento e amor de vocês me impulsionaram e incentivaram a prosseguir.

Ao meu orientador, Wilton Jr, e meu coorientador, Geraldo Moura, pelo suporte que me foi dado durante cada etapa do meu mestrado. A convivência no ambiente de trabalho e fora dele me fez admirá-los não apenas como profissionais, mas seres humanos.

Aos membros do LAVIAN, atuais e antigos: prof^a Rita Maia (rainha dos vírus), os técnicos Sérgio Alves e Maria Inês, a pós-doutoranda Amanda Mota (oriximiná), e todos os discentes da graduação e pós-graduação: Maria de Nazaré (Naza), Jerlane Telles, Amanda Cordeiro (Amanda nova), Clara Breda, Yasmim, Ciel Lima, Esdras Cabral e Bárbara Almeida (noronhe-se). Amo essa equipe (Virose rainha)!

A todos os amigos do LDIC: Denny, Renato, Raíssa, Lucilene, Emilly, Gabriela (Ganis), Carlos (índio), Pollyanne (Polly), André, Taizi... a convivência com vocês tornou meus dias bem mais leves, obrigado.

Aos alunos do LEPH, que contribuíram para que a pesquisa acontecesse: Thaís, Paulo, Alcina, Alysson e Arthur. Muito obrigado por toda a ajuda que vocês me deram.

Aos professores Ricardo Souza e Paulo Souza, que trouxeram grandes contribuições em momentos decisivos da pesquisa. Agradeço imensamente pela parceria e profissionalismo.

À Marcos Lacerda, da Agência Estadual de Meio Ambiente (CPRH) pela sua contribuição na idealização e confecção do mapa que é apresentado neste trabalho.

Por fim, agradeço a todos, que de alguma maneira, me ajudaram nesta jornada. Tenho a sorte de ter encontrado pessoas maravilhosas no meu caminho, e levo cada uma delas no coração.

“Os animais têm uma vantagem sobre os humanos, pois não podem ser estúpidos.”

Victor Hugo – tradução livre

RESUMO

Objetivou-se realizar a detecção de ranavírus em anfíbios (Anura) de vida livre localizados na Mata do Camucim, situada em São Lourenço da Mata, no estado de Pernambuco, Brasil. As sessões de coleta ocorreram nos meses de julho de 2022 e março de 2023. Foram coletados 36 anuros de 9 espécies diferentes e ambos os sexos por meio da captura manual, sendo realizada a eutanásia destes e posterior dissecação para coleta dos órgãos de interesse: rins, fígado e baço. Para a detecção do DNA genômico de ranavírus utilizou-se a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Na análise dos fragmentos de DNA produzidos na PCR foram detectadas duas amostras positivas (5,5%), tendo ocorrido amplificação de DNA de mesmo tamanho molecular em relação ao controle positivo. As amostras foram submetidas a *nested* PCR para confirmação. Não foi confirmada a presença de DNA de ranavírus nas amostras analisadas, desta forma descartou-se o diagnóstico de infecção por ranavírus. Além desta pesquisa, também foi realizada uma revisão integrativa da literatura, com o objetivo de reunir e sistematizar os conhecimentos existentes sobre a infecção por ranavírus em anuros. Foram avaliados 68 artigos, sendo analisados e descritos dados epidemiológicos sobre a distribuição, prevalência, e espécies/cepas circulantes. Este trabalho destaca a importância deste patógeno emergente para a herpetofauna mundial.

PALAVRAS-CHAVE: anura; Iridovírus; diagnóstico; epidemiologia; conservação.

ABSTRACT

This research aimed to detect ranaviruses in free-living amphibians (anura order) located in the Mata do Tapacurá Integral Protection Unit, situated in São Lourenço da Mata, in the state of Pernambuco. The collection sessions took place in July 2022 and March 2023. A total of 36 anurans of 9 different species and both sexes were collected by manual capture, euthanized and then dissected to collect the organs of interest: kidneys, liver and spleen. Polymerase Chain Reaction (PCR) was used to detect ranavirus genomic DNA. In the analysis of the DNA fragments produced in the PCR, two positive samples (5,5%) were detected and DNA of the same molecular weight in relation to the positive control was amplified. The samples were submitted to nested PCR test. The presence of ranavirus DNA was not confirmed in the samples analyzed, so the diagnosis of ranavirus infection was dismissed. In addition to this research, an integrative literature review was also carried out, with the aim of gathering and systematizing existing knowledge on ranavirus infection in amphibians. A total of 68 articles were evaluated, and epidemiological data on distribution, prevalence, and circulating species/episodes were analyzed and described. This work highlights the importance of this emerging pathogen for the world's herpetofauna.

Keywords: anura; Iridoviruses; diagnostic; epidemiology; conservation.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1 Agente etiológico	12
2.2 Epidemiologia	13
2.3 Patogenia e sinais clínicos	16
2.4 Diagnóstico	17
2.5 Prevenção e controle	18
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20
4. OBJETIVOS	31
CAPÍTULO 1: PESQUISA DE RANAVÍRUS EM ANUROS PROCEDENTES DE AMBIENTE NATURAL PROTEGIDO NO ESTADO DE PERNAMBUCO, BRASIL	32
CAPÍTULO 2: INFECÇÕES POR RANAVÍRUS EM ANFÍBIOS (ORDEM ANURA) NO MUNDO: UMA REVISÃO INTEGRATIVA	41
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	56
ANEXO I	57
ANEXO II	58

1. INTRODUÇÃO

Os anfíbios constituem uma classe diversificada, cosmopolita, contendo atualmente mais de 8 mil espécies conhecidas em todo o mundo (Frost, 2021). Apesar deste grande número, os anfíbios estão ameaçados de extinção: de acordo com a lista vermelha da International Union for the Conservation of Nature - IUCN - 41% das espécies de anfíbios correm o risco de desaparecer (IUCN, 2015). No Brasil está localizado o maior contingente de espécies (1.080 espécies) de anfíbios de todo o mundo; destas, 4,2% estão ameaçadas, sendo classificadas como vulneráveis, em perigo ou criticamente em perigo de extinção (ICMBio, 2018). O anexo I da Portaria no 444/2014 lista as 41 espécies de anfíbios consideradas em risco de extinção no Brasil (Brasil, 2014).

Dentre os motivos que contribuem para a diminuição das populações de anfíbios destacam-se as mudanças climáticas e a ação antrópica com desenvolvimento urbano e avanço das fronteiras agrícolas que ocasiona a destruição, fragmentação e alteração de habitats (Santi; Corrêa, 2018). De fato, o estilo de vida da sociedade proporciona graves danos ao ambiente; a poluição e liberação de gases de efeito estufa que culminam no aquecimento global e aumento de incidência da radiação ultravioleta afetam seriamente estes animais, que são sensíveis às alterações do solo, da água e do ar (Verdade; Dixo; Curcio, 2010).

Além destes fatores, a ocorrência de doenças infecciosas tem sido apontada como causa de impactos significativos na diminuição de muitas dessas espécies. Um dos patógenos emergentes de grande relevância são os ranavírus, iridovírus que infectam peixes, anfíbios e sauropsida. No Brasil e no mundo já foram relatados surtos de ranavirose, o que gera danos tanto à biodiversidade, no caso de espécies em seu ambiente natural, como ao comércio, pois essa virose também ocasiona perdas econômicas importantes em ranários comerciais (Duffus, 2015).

O primeiro relato de infecção por ranavírus ocorreu nos anos 60; desde então, vários episódios de surtos com mortes de rãs foram registrados (Maclachlan; Dubovi, 2016). Considerando a emergência dessa doença, a ocorrência de ranavirose deve ser notificada obrigatoriamente aos órgãos oficiais de saúde animal (WOAH, 2010; Brasil, 2020). As espécies acometidas pelo vírus possuem grande importância, tanto do ponto de vista econômico como ambiental; existem relatos científicos que comprovam o declínio de espécies de anfíbios em meio natural por conta de infecções por diferentes espécies de ranavírus na Europa (Price et al.,

2014), além de eventos de morte em massa de animais em meio natural (Miaud et al., 2016) e em cativeiro (Alencar, 2016).

Esta doença apresenta uma alta taxa de mortalidade, podendo alcançar até 100% (WOAH, 2019), o que ocasiona grandes prejuízos para os ranários comerciais. Além disso, a constante troca e venda de animais entre os diferentes estabelecimentos é um facilitador da disseminação do vírus, que por vezes pode estar presente, mas não ser detectado por existirem animais que são portadores assintomáticos. Desta forma a entrada do patógeno em novas regiões é favorecida (Kolby et al., 2014; Schloegel et al., 2009).

Apesar de amplamente estudada, ainda há falta de dados sobre a ranavirose no Brasil, pois os estudos existentes são restritos às regiões Centro-Oeste e Sudeste (Galli et al., 2006; Oliveira et al., 2016). Em Pernambuco (PE), se concentra um grande número de espécies nativas de anfíbios, dos quais predominam os anuros; algumas destas espécies se encontram ameaçadas de extinção. Os anuros (ordem Anura) compõem o grupo mais diversificado de anfíbios, sendo a ordem mais conhecida e estudada no Brasil (Paula; Toledo, 2014).

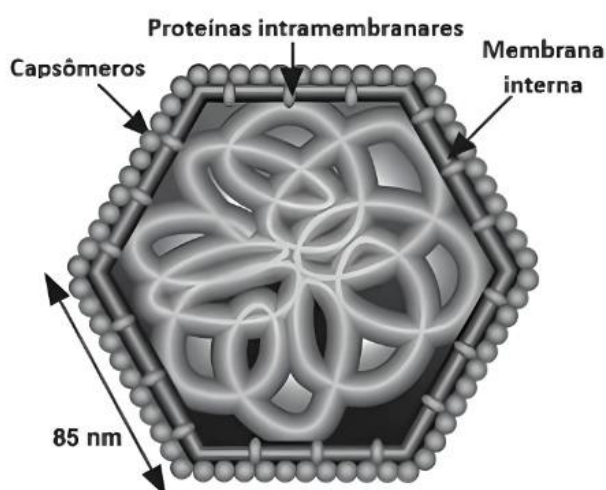
Considerando que espécies de ranavírus podem contribuir para acelerar o processo de extinção de espécies ameaçadas (Earl et al., 2016) e tendo em vista a importância do monitoramento de patógenos que podem afetar negativamente tanto a biodiversidade como a criação comercial, objetivou-se com essa pesquisa determinar a ocorrência de ranavirose em anuros de reservas naturais no estado de Pernambuco, Brasil.

1. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Agente etiológico

Os ranavírus pertencem à família viral *Iridoviridae*, subfamília *Alphairidovirinae*, gênero *Ranavirus*. Estes são vírus grandes (150 a 200nm de diâmetro), com genoma constituído por uma dupla fita linear de DNA (ds DNA), revestido por uma membrana interna, que por sua vez é recoberta por um capsídeo de simetria icosaédrica, podendo ser envolvida por um envelope externo (no caso das espécies que realizam o brotamento da membrana plasmática da célula hospedeira) ou não (FIGURA 1). Estas características morfológicas são comuns a todos os membros deste táxon (Chinchar et al., 2017).

Figura 1: Desenho esquemático do vírion da família Iridovírus, demonstrando seus componentes externos e internos (capsômeros que compõem o capsídeo e bicamada lipídica com suas proteínas envolvendo o material genético).



Fonte: Darcy-Tripier, Nermut, Braunwald, Williams (1984 - traduzido).

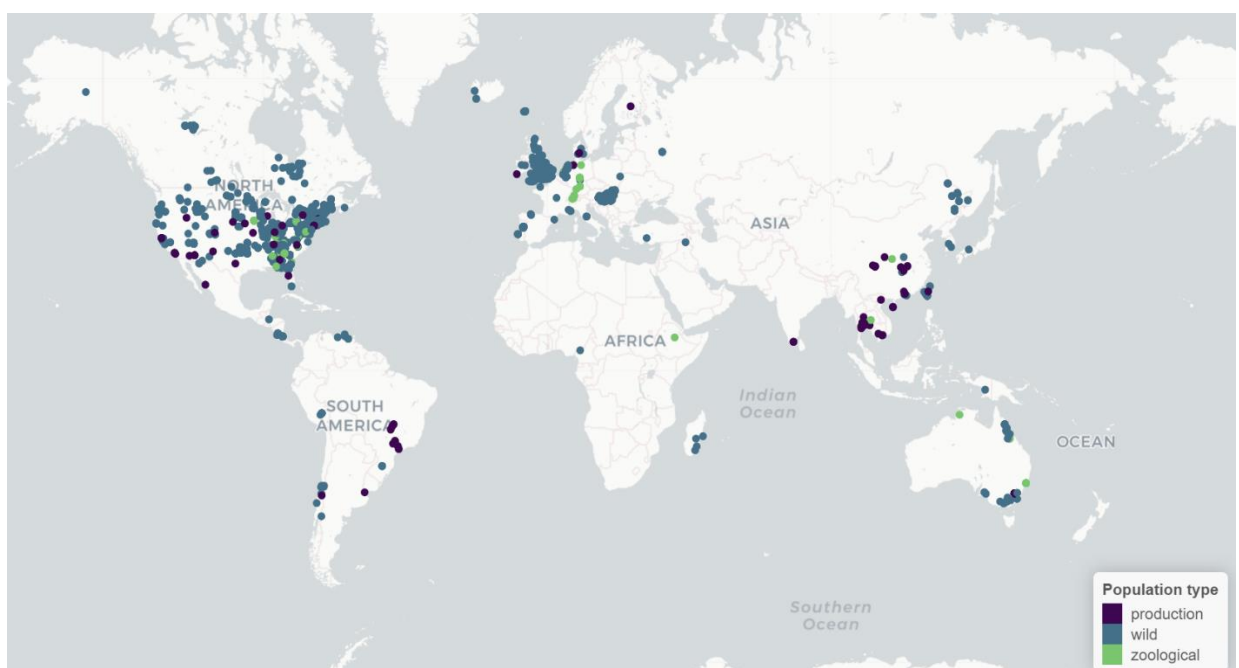
Atualmente, este grupo é composto por seis espécies: Ambystoma Tigrinum Virus (ATV), Common Midwife Toad Virus (CMTV), Epizootic Haematopoietic Necrosis Virus (EHNV), Santee-Cooper Virus (LMBV), Singapore grouper iridovirus (SGIV) e o Frog Virus 3 (FV3), que é a espécie tipo do gênero, sendo amplamente estudada e usada como modelo nas pesquisas envolvendo os iridovírus (Chinchar et al., 2017; Jancovich; Steckler.; Waltzek, 2015). As principais espécies que acometem os anfíbios são o CMTV, ATV e FV3, sendo observado em estudos que os anuros e urodelos apresentam uma suscetibilidade maior ao ATV e FV3, respectivamente (Schock et al., 2008).

Ranavírus são consideravelmente resistentes no ambiente: estudos realizados com o FV3 demonstraram que sua permanência na água a baixas temperaturas (4° C) pode ser de até 102 dias em água de rio filtrada, e de 57 em água não filtrada (Nazir; Spengler; Marschang, 2012). Além disso, estes vírus também podem permanecer em sedimentos, sendo capazes de conservar a sua capacidade infectante, sob a mesma faixa de temperatura (Munro et al., 2016). Os vírions são inativados por pH ácido (<3.0) e alcalino (>11.0), exposição à irradiação UV e também por temperatura elevada (>55° C por 30 minutos) (Jancovich et al., 2012). Além disso, ranavírus são sensíveis à ação de desinfetantes, como a clorexidina, hipoclorito de sódio e compostos de potássio (Bryan et al., 2009).

2.2 Epidemiologia

Os ranavírus são considerados patógenos emergentes e vêm sendo apontados como vírus causadores de grandes impactos em todo o mundo (Gray; Miller, 2013; Maclachlan; Dubovi, 2016), existindo registros casos de sua presença em todos os continentes (FIGURA 2), exceto na Antártica (Hyatt et al., 2002; Doherty-Bone, et al. 2013; Patla et al, 2016; Sluijs et al., 2016; Kwon et al., 2017). Os ranavírus possuem a capacidade de infectar e causar doença em uma vasta gama de hospedeiros vertebrados ectotérmicos, sendo estes animais anfíbios, répteis e peixes (Schock et al., 2008; Brenes et al., 2014; Price et al., 2017).

Figura 2: Países com registro de ocorrência de ranavírus. Mapa do Sistema Global de Registro de Ranavírus.



Fonte: Brunner et al., 2021.

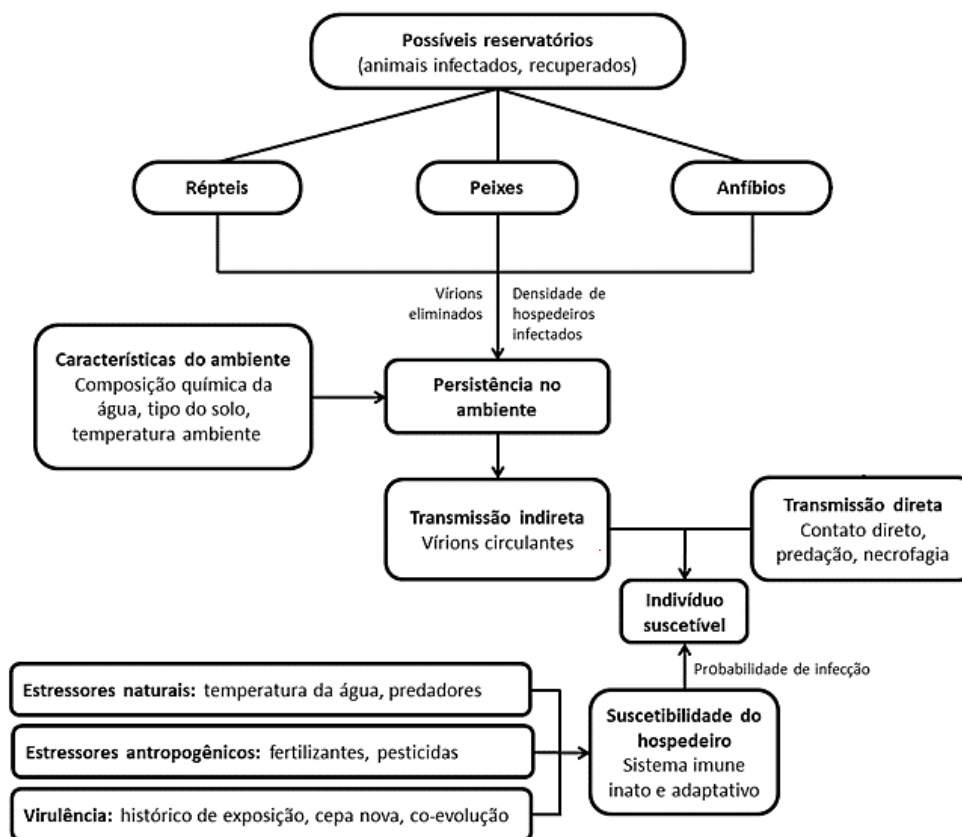
O primeiro registro de ranavirose em organismos aquáticos no Brasil ocorreu no estado de Goiás, em 2003; os animais eram provenientes de ranários produtores da rã-touro americana (*Aquarana catesbeiana*, anteriormente *Lithobates catesbeianus*), onde ocorreram surtos da doença com morte de vários animais (Mazzoni et al., 2009). Desde então, outros episódios de casos da doença foram relatados, tendo como ponto comum a ocorrência da infecção em criações comerciais de rãs ou peixes de interesse zootécnico (Galli et al., 2006; Queiroz, 2014).

Recentemente foi publicado o primeiro relato de infecção por ranavírus em anfíbios silvestres no estado do Rio Grande do Sul, envolvendo tanto espécies nativas como a rã-touro (Ruggeri et al., 2019). Acredita-se que a dispersão do ranavírus foi causada pela própria espécie invasora *A. catesbeiana*, introduzida no Brasil com vistas à produção de carne para o consumo humano em 1935 (Cribbs; Afonso; Mostério, 2013). A sua adaptabilidade a diferentes climas e ambientes levou a escolha desta espécie como a principal utilizada na ranicultura do país. No entanto, rãs que escapavam das instalações passaram a ocupar o ambiente natural, competindo com as espécies nativas, ou mesmo predando-as (Rocha; Bergalo; Mazzoni, 2011).

Apesar de não ser uma doença zoonótica, a ranavirose foi listada como doença de notificação obrigatória à Organização Mundial de Saúde Animal (WAOH – originalmente fundada como OIE) em 2009, principalmente pelos impactos causados na fauna silvestre, que foram facilitados pela interferência humana (Black; Meredith; Price, 2017).

A ecologia dos ranavírus envolve uma cadeia complexa de interação entre espécies hospedeiras, vias de transmissão, persistência ambiental, estressores e a imunidade do indivíduo hospedeiro (Gray; Miller; Hoverman, 2009) (FIGURA 3). A transmissão do vírus ocorre de maneira horizontal. Uma densidade populacional elevada pode facilitar a transmissão entre indivíduos, através do contato direto entre animais sadios e doentes (Duffus et al., 2019). Além disso, comportamentos naturais entre os anfíbios, como a predação (canibalismo e necrofagia), são fatores de risco para a transmissão direta do vírus (Harp; Petranka, 2006; Latney; Klaphake, 2013). O vírus também pode ser disperso por meio da água, solo e sedimentos e infectar outros indivíduos indiretamente (Nazir; Spengler; Marschang, 2012).

Figura 3: Esquema sintético da ecologia e transmissão dos ranavírus.



Fonte: Gray; Miller; Hoverman, 2009 (traduzido e adaptado).

Outro fator que colabora na disseminação do vírus é a ação antrópica. Ambientes modificados para criação de bovinos, por exemplo, exercem influência sobre os anuros em seus entornos. Estudos comprovaram que girinos em lagos com acesso a pastos possuem mais chances de se infectarem com o vírus. Acredita-se que a amônia liberada pelos bovinos diminui a qualidade da água, além de ser um estressor para os girinos, tornando-os suscetíveis à infecção (Gray et al., 2007).

O comércio internacional de animais, seja com o fim de alimentação ou para o mercado *pet*, possibilita a transferência de patógenos entre os animais e a disseminação para outros países (Peeler; Feist, 2011). Animais infectados que são retirados de seu *habitat* original para serem utilizados como iscas de pesca em outros locais (Jancovich et al., 2005), bem como canoas usadas em esportes aquáticos também podem servir como dispersores do vírus (Casais et al., 2019).

Seja em meio natural ou em sistema de confinamento, aspectos ligados ao ambiente exercem grande influência no surgimento de surtos: a temperatura ou qualidade da água, quando em condições inadequadas podem servir como agentes estressores, que por sua vez debilitam o sistema imune dos animais, tornando-os suscetíveis à doença (Brand et al., 2016; North et al., 2015). Também se constatou que o uso de produtos químicos em jardins, como herbicidas, torna os anfíbios vulneráveis ao vírus, por interferir no funcionamento do seu sistema imune (Albert et al., 2007; North et al., 2015).

2.3 Patogenia e sinais clínicos

Após a realização de ensaios com rãs da espécie *Rana sylvatica* inoculadas em laboratório, foi observado que existe uma predileção do vírus pelas células dos tecidos hematopoiético e linfóide, epidérmico, tubular renal, epitélio das mucosas e endotélio vascular (Forzán et al., 2017). Robert et al. (2011) detectaram alta quantidade de DNA viral nas células epiteliais dos túbulos renais de *Xenopus laevis* por períodos prolongados após a infecção (até 10 dias pós infecção), o que indica que esse órgão é um dos alvos prioritários do vírus. Além disso, foi notado que havia proliferação viral precoce nas células intestinais (a partir de 3h p.i); este achado leva a crer que o intestino pode atuar como um sítio primário de replicação viral (Robert et al., 2011).

Os achados anatomopatológicos observados na necropsia são esplenomegalia, hemorragia da mucosa intestinal (Forzán et al., 2015), eritema entérico, rins pálidos, fígado friável (Miller et al., 2007), edema subcutâneo e efusões na cavidade corporal (Une et al., 2009). Já os achados microscópicos são necrose hepática, esplênica e na pele (Miller et al., 2007), necrose glomerular extensa com degeneração hialina dos túbulos renais (Balseiro et al., 2010; Forzán et al., 2015; Une et al., 2009), podendo ser encontradas inclusões virais nestas células (Cunningham; Tams; Russell, 2008).

O início e a intensidade dos sinais clínicos são variáveis e depende de uma série de aspectos relacionados ao animal, patógeno e ambiente: a espécie em questão, fase de desenvolvimento, estado imune do indivíduo, a espécie e cepa viral e condições ambientais (Millerioux, et al., 2012). Animais em estágio larval ou recém metamorfozados são mais suscetíveis que os adultos, ao passo que estes podem albergar o vírus como hospedeiros reservatórios sem apresentar os sinais clínicos da doença (Balseiro et al., 2010).

Sinais comuns às espécies são letargia, hemorragias petequiais ou equimóticas, perda de fluabilidade e nado errático (para as espécies aquáticas), edema, úlceras na pele que podem evoluir em necrose cutânea e necrose de órgãos internos (Forzán et al., 2015; Miller et al., 2015; Stöhr et al., 2013). Sapos e rãs, além dos sinais citados, podem apresentar depressão, regurgitação de alimentos, dispneia, excreção de muco pelas ventosas, às vezes com sangue, eritema na região abdominal e necrose das extremidades (cauda e membros) (Forzán et al., 2015; Fox et al., 2006; Une et al., 2009).

Embora haja uma grande variedade de sinais característicos da ranavirose, é importante destacar que os sinais citados anteriormente não são patognomônicos da doença, inclusive podendo não ocorrer, no caso de infecções subclínicas (Lesbarrères et al., 2011; WOA, 2018). Por conta desta inespecificidade, por muito tempo as doenças de anfíbios eram tratadas como uma única enfermidade: a “doença (ou síndrome) da perna vermelha” (*red leg disease*); no entanto, foi visto que a síndrome não possuía apenas um agente etiológico, podendo ser causada por múltiplos agentes bacterianos, virais e fúngicos que induzem sinais clínicos semelhantes nos animais acometidos (Densmore; Green, 2007).

Apesar de existir uma variedade de quadros clínicos que podem ser observados, alguns animais podem albergar uma infecção subclínica, porém transmissível do vírus, servindo como portadores inaparentes (Brunner et al., 2019). Isso contribui na dispersão do patógeno, principalmente ao considerar o comércio de animais silvestres, apontado por alguns autores como uma “fonte de poluição de patógenos” (Picco; Collins, 2008).

2.4 Diagnóstico

O diagnóstico laboratorial deve ser realizado para a confirmação da infecção por ranavírus, considerando os sinais inespecíficos e a fase subclínica da doença. Dentre todos os métodos utilizados, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é a técnica mais utilizada para detectar ranavírus (Greer; Collins, 2007), embora outros procedimentos também possam ser aplicados, como a Microscopia Eletrônica, Ensaio Imunoenzimático (ELISA), isolamento viral, e imuno-histoquímica (OMSA, 2018).

Também é importante salientar que os resultados da PCR podem variar de acordo com o tempo de exposição ao vírus e com a amostra utilizada. Greer e Collins observaram esse fato ao realizarem sucessivamente os ensaios utilizando amostras dos órgãos (o qual eles denominam “coleta letal”, pelo fato de ser necessário eutanasiar os animais para obtê-las) e

amostras da cauda (“protocolo não letal”). Foi constatado que com um teste precoce (2 dias p.i.) apenas as amostras dos órgãos foram positivas, e com 5 dias p.i. as amostras de cauda apresentaram resultados positivos, mas não para todos os indivíduos (Greer; Collins, 2007). Dessa forma testes com amostras de órgãos podem ter uma vantagem em relação a técnicas não letais de coleta (Gray; Miller; Hoverman, 2012).

O gene alvo preferencial para amplificação na PCR é o gene da proteína principal do capsídeo (*Major Capsid Protein - MCP*), uma proteína altamente conservada que é comum às diferentes espécies de ranavírus (Mao; Hedrick; Chinchar, 1997). No entanto, apenas a detecção de sequências parciais do gene MCP é insuficiente para determinar a espécie/estirpe viral, sendo necessários dados de sequenciamento para que seja possível efetuar a diferenciação (Lesbarrères et al., 2011). Também pode ser realizada a análise com enzimas de restrição aplicadas aos fragmentos obtidos para diferenciação das cepas de acordo com o perfil de digestão das endonucleases (Hyatt et al., 2000; OIE, 2018).

Em contraste com o uso de métodos letais para a detecção de ranavírus, tem-se utilizado as técnicas de diagnóstico baseadas no DNA ambiental, que tem demonstrado uma alta sensibilidade na identificação de patógenos, além da vantagem de ser um método não invasivo, eliminando a necessidade do manejo do animal, o que geraria estresse, ou em casos que envolvam espécies raras (Hall et al., 2015; Barnes et al., 2020; Kaganer et al., 2021).

Outra técnica de diagnóstico é a avaliação das alterações histopatológicas, sendo, porém, considerada como complementar e não suficiente para a confirmação (OMSA, 2018). Também são descritos estudos que aplicaram o bioensaio para confirmação da infecção por ranavírus, no qual o vírus isolado de animais mortos em surtos da doença é inoculado experimentalmente em animais saudáveis, que por sua vez desenvolvem sinais clínicos semelhantes aos observados no curso da infecção natural (Waltzek et al., 2014). Apesar da ampla gama de testes disponíveis, todos eles possuem limitações, sendo necessário avaliar o objetivo da investigação e aplicar diferentes técnicas para obter um diagnóstico acurado (Miller et al., 2015).

2.5 Prevenção e controle

Vacinas são estudadas com o objetivo de serem aplicadas na prevenção da ranavirose (Miller et al., 2015). Pesquisas tem alcançado resultados promissores para a imunização de

peixes com vacinas de DNA recombinante (Zhang et al., 2012) e anfíbios, com vacinas de vetores virais (Zhou et al., 2017; Chen et al., 2018).

O controle da ranavirose em instalações com animais em cativeiro é mais simples do que em populações livres na natureza. Para estabelecimentos na aquicultura, deve-se implementar um conjunto de medidas de biossegurança que visem impedir a introdução do agente ou a sua disseminação e consequente liberação para as populações de animais aquáticos. Quarentena, sanitização do ambiente e equipamentos e eliminação adequada de carcaças de animais devem ser realizadas de forma organizada, segundo os princípios estabelecidos nos manuais da OMSA (Batista; de Vieira; Lopes, 2021). Além disso, em programas de conservação que visam a reintrodução de espécies na natureza, deve ser realizado o diagnóstico para evitar a introdução do agente etiológico na natureza. (Green et al., 2009)

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALSEIRO, A.; DALTON K. P.; CERRO, A. del; MÁRQUEZ, I.; PARRA, F.; PRIETO, J. M.; CASAIS, R. Outbreak of common midwife toad virus in alpine newts (*Mesotriton alpestris cyreni*) and common midwife toads (*Alytes obstetricans*) in Northern Spain: A comparative pathological study of an emerging ranavirus. **The Veterinary Journal**, v. 186, p. 256–258, 2010.

BARNES, M. A.; BROWN, A. D.; DAUM, M. N.; DE LA GARZA, K. A.; DRISKILL, J.; GARRETT, K.; GOLDSTEIN, M. S.; LUK, A.; MAGUIRE, J. I.; MOKE, R.; OSTERMAIER, R. M.; SANDERS, Y. M.; SANDHU, T.; STITH, A. & SURESH, V. V. Detection of the amphibian pathogens chytrid fungus (*Batrachochytrium dendrobatidis*) and Ranavirus in West Texas, USA, using environmental DNA. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 56, n. 3, p. 702-706, 2020.

BATISTA, C. L. M.; DE VIEIRA, A. N. V. B.; LOPES, J. C. O. Frog Virology: Biosafety in an Experimental Farm. In: **Current Perspectives on Viral Disease Outbreaks-Epidemiology, Detection and Control**. p. 1-13. IntechOpen, 2021.

BLACK, Y.; MEREDITH, A.; PRICE, S. J. Detection and Reporting of Ranavirus in Amphibians: Evaluation of the Roles of The World Organisation for Animal Health and the Published Literature. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 53, n. 3, 2017. doi: 10.7589/2016-08-176.

BRAND, M. B.; HILL, R. D.; BRENNES, R.; CHANEY, J. C.; WILKES, R. P.; GRAYFER L.; MILLER, D. R.; GRAY, M. J.; Water Temperature Affects Susceptibility to Ranavirus. **EcoHealth**, v. 13, p. 350–359, 2016. doi: 10.1007/s10393-016-1120-1.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Aquicultura com sanidade - Programa Nacional de Sanidade de Animais Aquáticos de Cultivo: Manual orientado aos órgãos executores de sanidade agropecuária/ Secretaria de Defesa Agropecuária**. – Brasília: MAPA/AECS, 2020.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Portaria nº 444, de 17 de dezembro de 2014. Reconhece como espécies da fauna brasileira ameaçadas de extinção aquelas constantes da "Lista Nacional Oficial de Espécies da Fauna Ameaçadas de Extinção". **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 17 de dezembro de 2014, seção 1, p. 121-126.

BRENES, R.; GRAY, M.J.; WALTZEK, T.B.; WILKES, R.P.; MILLER, D.L. Transmission of Ranavirus between Ectothermic Vertebrate Hosts. **PLoS ONE**, 2014, v. 9, n. 3: e92476. doi:10.1371/journal.pone.0092476.

BRUNNER, J. L.; OLSON, D. H.; GRAY, M. J.; MILLER, D. L.; DUFFUS, A. L. Global patterns of ranavirus detections. **Facets**, v. 6, n. 1, p. 912-924, 2021.

BRUNNER, J. L.; OSLOM, A. D.; RICE, J. G.; MEINERS, S. E.; LE SAGE, M. J.; CUNDIFF, J. A.; GOLDBERG, C. S.; PESSIER, A. P. Ranavirus infection dynamics and shedding in American bullfrogs: consequences for spread and detection in trade. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 135, p. 135–150, 2019.

BRYAN, LAURA K.; BALDWIN, C. A., GRAY, M. J., & MILLER, D. L Efficacy of select disinfectants at inactivating Ranavirus. **Diseases of aquatic organisms**, v. 84, n. 2, p. 89-94, 2009.

CAS AIS, R.; LARRINAGA, A. R.; DALTON, K. P.; LAPIDO, P. D.; MÁRQUEZ, I.; BÉCAREZ, E.; CARTER, E. D.; GRAY, M. J.; MILLER, D. L.; BALSEIRO, A. Water sports could contribute to the translocation of ranaviruses. **Scientific Reports**, v 9 n. 1, p. 2340, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39674-5>.

CHEN, Z. Y., LI, T., GAO, X. C., WANG, C. F., & ZHANG, Q. Y. Protective immunity induced by DNA vaccination against ranavirus infection in Chinese giant salamander *Andrias davidianus*. **Viruses**, v. 10, n. 2, p. 52, 2018.

CHINCHAR, V. G.; HICK, P.; INCE, I. A.; JANCOVICH, J. K.; MARSCHANG, R.; QIN, Q.; SUBRAMANIAM, K.; WALTZEK, T. B.; WHITTINGTON, R.; WILLIAMS, T.; ZHANG, Q.; ICTV Report Consortium. ICTV Virus Taxonomy Profile: *Iridoviridae*, **Journal of General Virology**, v. 98, p. 890–891, 2017.

CRIBBS, A. Y.; AFONSO, A. M.; MOSTÉRIO, C. M. F. Considerações Iniciais e Breve Histórico da Ranicultura no Brasil. In: **Manual técnico de ranicultura**, Brasília - DF: Embrapa, p. 13-19, 2013.

CUNNINGHAM, A. A.; TEMS, C. A.; RUSSEL, P. H. Immunohistochemical Demonstration of Ranavirus Antigen in the Tissues of Infected Frogs (*Rana temporaria*) with Systemic Haemorrhagic or Cutaneous Ulcerative Disease. **Journal of Comparative Pathology**, v. 138, p. 3-11, 2008.

DARCY-TRIPPIER F.; NERMUT M. V.; BRAUNWALD J.; WILLIAMS L.D. The organization of frog virus 3 as revealed by freeze-etching. **Virology**. v. 138, n. 2, p. 287-99, 1984. doi: 10.1016/0042-6822(84)90352-0.

DENSMORE, C. L. GREEN, D. E. Diseases of Amphibians. **Ilar Journal**, v. 48, n. 3, p. 235-254, 2007.

DOHERTY-BONE, T. M.; NDIFON, R. K.; NYINGCHIA, O. F.; LANDRIE, F. E.; YONGHABI, F. T.; DUFFUS, A. L. J.; PRICE, S.; PERKINS, M.; BIELBY, J.; KOME, N. B.; LEBRETON, M.; GONWOUO, L. N.; CUNNINGHAM A. A. Morbidity and mortality of the Critically Endangered Lake Oku clawed frog *Xenopus longipes*. **Endangered Species Research**, v. 21, p. 115–128, 2013. doi: 10.3354/esr00514.

DUFFUS, A. L. J.; WALTZEK, T. B.; STÖHR, A. C.; ALLENDER, A. M.; GOTESMAN, M.; WHITTINGTON, R. J.; HICK, P.; HINES, M. K.; MARSCHANG, R. E. Distribution and Host Range of Ranaviruses. In: GRAY, M. J.; CHINCHAR, V. G. (editors). **Ranaviruses Lethal Pathogens of Ectothermic Vertebrates**, Springer, p. 9-57, 2015.

DUFFUS, A. L. J.; GARNER, T. W. J.; NICHOLS, R. A.; STANDRIDGE, J. P.; EARL, J. E. Modelling Ranavirus Transmission in Populations of Common Frogs (*Rana temporaria*) in the United Kingdom. **Viruses**, v. 11, p. 556, 2019. doi:10.3390/v11060556.

EARL; J. E.; CHANEY, J. C.; SUTTON, W. B.; LILLARD, C. E.; KOUBA, A. J.; LANGHORNE, C.; KREBS, J.; WILKES, R. P.; HILL, R. D.; MILLER, D. L.; GRAY, M. J.

Ranavirus could facilitate local extinction of rare amphibian species. **Oecologia**, v. 182, p. 611–623, 2016. doi: 10.1007/s00442-016-3682-6.

FISHER, M. C.; GARNER, T. W. J.; WALKER, S. F. Global emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis* and amphibian chytridiomycosis in space, time, and host. **Annual review of microbiology**, v. 63, p. 291-310, 2009.

FORZÁN, M. J.; JONES, K. M.; VANDERSITCHEL, R. V.; WOOD, J.; KIBENGE, F. S. B.; KUIKEN, T.; WIRTH, W.; ARIEL, E.; DAOUST, P.-Y. Clinical signs, pathology and dose-dependent survival of adult wood frogs, *Rana sylvatica*, inoculated orally with frog virus 3 (Ranavirus sp., *Iridoviridae*). **Journal of General Virology**, v. 96, p. 1138–1149, 2015.

FORZÁN, M. J.; JONES, K. M.; ARIEL, E.; WHITTINGTON R. J.; WOOD, J.; MARKHAM, R. J. F.; DAOUST, P.-Y. Pathogenesis of Frog Virus 3 (Ranavirus, *Iridoviridae*) Infection in Wood Frogs (*Rana sylvatica*). **Veterinary Pathology**, v. 54, n. 3 p. 531-548, 2017.

FOX, S. F.; GREER, A. L.; TORRES-CERVANTES, R.; COLLINS, J. P.; First case of ranavirus-associated morbidity and mortality in natural populations of the South American frog *Atelognathus patagonicus*. **Diseases of aquatic organisms**, v. 72, p. 87–92, 2006.

FROST, D. **Amphibian Species of the World 6.1**. American Museum of Natural History. Disponível em: <<https://amphibiansoftheworld.amnh.org/>> Acesso em: 01 de fev. de 2021.

GONZÁLEZ-DEL-PLIEGO, P.; FRECKLETON, R. P.; EDWARDS, D. P.; KOO, M. S.; SCHEFFERS, B. R.; PYRON, R. A.; JETZ, W. Phylogenetic and Trait-Based Prediction of Extinction Risk for Data-Deficient Amphibians. **Current Biology**, v. 29, p. 1557–1563, May 6, 2019.

GRAY, M.; MILLER, D. The Rise of Ranavirus. **The Wildlife Professional**, p. 51-55, spring 2013.

GRAY, M. J.; MILLER, D. L.; HOVERMAN, J. T. Reliability of non-lethal surveillance methods for detecting ranavirus infection. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 99, n. 1, p. 1-6, 2012.

GRAY M. J.; MILLER D. L.; SCHMUTZER A. C.; BALDWIN C. A. Frog virus 3 prevalence in tadpole populations inhabiting cattle-access and non-access wetlands in Tennessee, USA. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 77, p. 97-103, 2007. <https://doi.org/10.3354/dao01837>

GREEN, D. E.; GRAY, M. J.; MILLER, D. L. Disease monitoring and biosecurity. In: **Forestry, Wildlife, and Fisheries**, UT Extension publication, p. 481-505, 2009. https://trace.tennessee.edu/utk_forepubs/2

GREER, A. L.; COLLINS, J. P. Sensitivity of a Diagnostic Test for Amphibian Ranavirus Varies with Sampling Protocol. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 43, n. 3, p. 525–532, 2007.

HARP. E. M.; PETRANKA, J. W. Ranavirus in Wood Frogs (*Rana Sylvatica*): Potential Sources of Transmission within and Between Ponds. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 42, n. 2, p. 307–318, 2006.

HYATT, A. D.; GOULD, A. R.; ZUPANOVIC, Z.; CUNNINGHAM, A. A.; HENGSTBERGER, S.; WHITTINGTON, R. J.; KATTENBELT, J.; COUPAR, B. E. H. Comparative studies of piscine and amphibian iridoviruses. **Archives of virology**, 145, p. 301-331, 2000.

HYATT, A. D.; WILLIAMSON, M.; COUPAR, B. E. H.; MIDDLETON, D.; HENGSTBERGER, S. G.; GOULD, A. R.; SELLECK P.; WISE, T. G.; KATTENBELT, J.; CUNNINGHAM, A. A.; LEE, J. First Identification of a Ranavirus from Green Pythons (*Chondropython Viridis*). **Journal of Wildlife Diseases**, v. 38, n. 2, p. 239–252, 2002.

Hall, E. M.; Crespi, E. J., Goldberg; C. S.; Brunner, J. L. Evaluating environmental DNA-based quantification of ranavirus infection in wood frog populations. **Molecular Ecology Resources**, v. 16, n. 2, p. 423-433, 2016.

INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE – IUCN. **The IUCN Red list of threatened species**. Switzerland, 15 p., 2015.

INSTITUTO CHICO MENDES PARA A CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE. Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção: Volume V – Anfíbios. In: Instituto Chico Mendes para a Conservação da Biodiversidade (Org.). **Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção**. Brasília: ICMBio. 128 p., 2018.

JANCOVICH, J.K., CHINCHAR, V.G., HYATT, A., MIYAZAKI, T., WILLIAMS, T. & ZHANG, Q.Y. Family *Iridoviridae*. In: **Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. Editors. A.M.Q. King, M.J. Adams, E.B. Carstens, E.J. Lefkowitz. Elsevier Academic Press, San Diego, CA. p. 193-210, 2012.

JANCOVICH, J. K.; DAVIDSON, E. W.; PARAMESWARAN, N.; MAO, J.; CHINCHAR, V. G.; COLLINS, J. P.; JACOBS, B. L.; STORFER, A. Evidence for emergence of an amphibian iridoviral disease because of human-enhanced spread. **Molecular ecology**, v. 14, n. 1, p. 213-224, 2005.

JANCOVICH, J. K.; STECKLER, N. K.; WALTZEK, T. B. Ranavirus Taxonomy and Phylogeny. In: GRAY, M. J.; CHINCHAR, V. G. (editors). **Ranaviruses Lethal Pathogens of Ectothermic Vertebrates**, Springer, p. 59-70, 2015.

KAGANER, Alyssa W. et al. Environmental DNA-derived pathogen gene sequences can expand surveillance when pathogen titers are decoupled in eDNA and hosts. **Environmental DNA**, v. 3, n. 6, p. 1192-1207, 2021.

KOLBY J. E.; SMITH K. M.; BERGER L.; KARESH, W. B.; PRESTON, A.; PESSIER, A. P.; SKERRATT, L. F. First Evidence of Amphibian Chytrid Fungus (*Batrachochytrium dendrobatidis*) and Ranavirus in Hong Kong Amphibian Trade. **PLoS ONE** v. 9, n. 3, p. e90750, 2014. doi:10.1371/journal.pone.0090750

KWON, S.; PARK, J.; CHOI, W-J.; KOO, K-S.; LEE, J-G.; PARK, D. First case of ranavirus-associated mass mortality in a natural population of the Huanren frog (*Rana huanrenensis*) tadpoles in South Korea. **Animal Cells and Systems**, v. 21, n. 5, p. 358-364, 2017. doi: 10.1080/19768354.2017.1376706.

LESBARRÈRES, D.; BALSEIRO, A.; BRUNNER, J.; CHINCHAR, V. G.; DUFFUS, A.; KERBY, J.; MILLER, D. L.; ROBERT, J.; SCHOCK, D. M.; WALTZEK, T.; GRAY, M. J. Ranavirus: past, present and future. **Biology Letters**, v. 8, p. 481–483, 2011. doi:10.1098/rsbl.2011.0951.

MACLACHLAN, N. J.; DUBOVI, E. J. *Asfarviridae* and *Iridoviridae*. In: MACLACHLAN, N. J.; DUBOVI E. J. (editors) **Fenner's Veterinary Virology**, 5th ed., Elsevier, p. 175-188, 2016.

MAO, J.; HEDRICK, R. P.; CHINCHAR, V. G.; Molecular Characterization, Sequence Analysis, and Taxonomic Position of Newly Isolated Fish Iridoviruses. **Virology**, v. 229, p. 212–220, 1997.

MARTINS, H. Brasil é segundo maior criador de rãs do mundo. **G1**, Rio de Janeiro, 06 de nov. de 2016. Disponível em: <<http://g1.globo.com/economia/agronegocios/globorural/noticia/2016/11/brasil-e-segundo-maior-criador-de-ras-do-mundo.html>>. Acesso em: 27 de janeiro de 2021.

MAZZONI, R.; DE MESQUITA, A. J.; FLEURY, L. F. F.; DE BRITO, W. M. E. D.; NUNES, I. A.; ROBERT, J.; MORALES, H.; COELHO, A. S. G.; BARTHASSON, D. L.; GALLI, L.; CATROXO, M. H. Mass mortality associated with a frog virus 3-like Ranavirus infection in farmed tadpoles *Rana catesbeiana* from Brazil. **Diseases of aquatic organisms**, v. 86, n. 3, p. 181-191, 2009.

MIAUD, C.; POZET, F.; GAUDIN, N. C. G.; MARTEL, A.; PASMANS, F.; LABRUT, S. *Ranavirus* Causes Mass Die-offs of Alpine Amphibians in the Southwestern Alps, France. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 52, n. 2, p. 242–252, 2016. doi: 10.7589/2015-05-113.

MILLER, D. L.; RAJEEV, S.; GRAY, M. J.; BALDWIN, C. A. Frog Virus 3 Infection, Cultured American Bullfrogs. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 2, p. 342-343, 2007.

MILLERIOUX, M.; DEJEAN, T.; MIAUD, C.; ARTOIS, M. Les infections à Ranavirus chez les amphibiens. **Bulletin de la Société Herpétologique de France**, v. 141, p. 23-46, 2012.

MOURA, G. J. B.; SANTOS, E. M.; ANDRADE, E. V. E.; FREIRE, E. M. X. Distribuição geográfica e caracterização ecológica dos anfíbios de Pernambuco. In: MOURA, G. J. B.; SANTOS, E. M.; OLIVEIRA, M. A. B.; CABRAL, M. C. C. (Organizadores) **Herpetofauna no estado de Pernambuco** - Brasília: Ibama, p. 51-84, 2011.

MUNRO, James et al. Survival of frog virus 3 in freshwater and sediment from an English lake. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 52, n. 1, p. 138-142, 2016.

NAZIR, J; SPENGLER, M.; MARSCHANG, R. E. Environmental persistence of amphibian and reptilian ranaviruses. **Diseases of aquatic organisms**, v. 98, p. 177–184, 2012.

NORTH, A. C.; HODGSON, D. J.; PRICE, S. J.; GRIFFITHS, A. G. F. Anthropogenic and Ecological Drivers of Amphibian Disease (Ranavirosis). **PLoS ONE** v. 10, n. 6, e0127037, 2015. doi:10.1371/journal.pone.0127037, 2015.

OLIVEIRA, C. R.; ALFAIA, S. R.; IKARI, F. L.; TAVARES, L. S.; SOUSA, R. L. M.; HARAKAVA, R.; FERREIRA, C. M. Detection and molecular characterization of Frog virus 3 in bullfrogs from frog farms in Brazil. **Aquaculture**, v. 516, p. 1-5, 2019.

PAULA, C. D.; TOLEDO, L. F. Anfíbios (Rã, Sapo e Cobra-cega). In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C.; CATÃO-DIAS, J. L. **Tratado de animais selvagens**, 2ª ed., Roca LTDA, São Paulo, p. 132-151, 2014.

PATLA, D.; ST-HILAIRE, S.; RAY, A.; HOSSACK, B. R.; PETERSON, C. R. Amphibian Mortality Events and Ranavirus Outbreaks in the Greater Yellowstone Ecosystem. **Herpetological Review**, v. 47, n. 1, p. 50–54, 2016.

PEELER, E. J.; FEIST, S. W.; Human intervention in freshwater ecosystems drives disease emergence. **Freshwater Biology**, v. 56, p. 705–716, 2011. doi:10.1111/j.1365-2427.2011.02572.x.

PICCO, A. M.; COLLINS, J. P. Amphibian Commerce as a Likely Source of Pathogen Pollution. **Conservation Biology**, v. 22, n. 6, p. 1582–1589, 2008.

PRICE, S. J.; GARNER, T. W. J.; NICHOLS, R. A.; BALLOUX, F.; AYRES, C.; ALBA, A. M.-C. de; BOSCH, J. Collapse of Amphibian Communities Due to an Introduced Ranavirus. **Current Biology**, v. 24, p. 2586–2591, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2014.09.028>.

PRICE, S. J.; ARIEL, E.; MACLAINE, A.; ROSA, G. M.; GRAY, M. J.; BRUNNER, J. L.; GARNER, T. W. J. From fish to frogs and beyond: Impact and host range of emergent ranaviruses. **Virology**, v. 511, p. 272–279, 2017.

QUEIROZ, S. R. DE A.; PÁDUA, S. B. DE; MENEZES FILHO, R. N. DE; ARAÚJO, A. P.; MAGANHA, S. R. DE L.; NAVARRO, J. DE O.; ROSA, M. P. L.; ALENCAR, A. L. F.; ARRUDA E. DE P.; MUNIN, F. S.; FERNANDES, A.M.; SOUSA, R. L. M. DE. Molecular detection and phylogenetic relationships of an amphibian ranavirus associated to outbreaks of mortality in Brazilian fish farm. **Virus Reviews & Research**. Novo Hamburgo: Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, 2014.

ROBERT, J.; GEORGE, E.; ANDINO, F de J.; CHEN, G. Waterborne infectivity of the ranavirus Frog-Virus 3 in *Xenopus laevis*. **Virology** v. 417, n. 2, p. 410–417, 2011 doi:10.1016/j.virol.2011.06.026.

ROCHA, C. F. D.; BERGALLO, H. G.; MAZZONI, R. Invasive vertebrates in Brazil. Biological invasions: Economic and environmental costs of alien plant, animal, and microbe species, p. 53-106, 2011.

RUGGERI, J.; RIBEIRO, L. P.; PONTES, M. R.; TOFFOLO, C.; CANDIDO, M.; CARRIERO, M. M.; ZANELLA, N.; SOUSA, R. L. M.; TOLEDO, L. F. Discovery of Wild Amphibians Infected with Ranavirus in Brazil. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 55, n. 4, p. 897–902, 2019. doi: 10.7589/2018-09-224.

SANTI, E. L. L. M.; CORRÊA, A. C. Mata Atlântica: A sobrevivência dos anfíbios. **FESPPR Publica** v. 2, n. 3 (2018). Disponível em: <<http://publica.fesppr.br/index.php/publica/article/view/136/59>> Acesso em: 04 de janeiro de 2020.

SCHOCK, D.; BOLLINGER, T. K.; CHINCHAR, V. G.; JANCOVICH, J. K.; COLLINS, J. P. Experimental Evidence that Amphibian Ranaviruses are Multi-Host Pathogens. **Copeia**, nº 1, p. 133–143, 2008.

SCHLOEGEL, L. M., PICCO, A. M., KILPATRICK, A. M., DAVIES, A. J., HYATT, A. D., & DASZAK, P. Magnitude of the US trade in amphibians and presence of *Batrachochytrium dendrobatidis* and ranavirus infection in imported North American bullfrogs (*Rana catesbeiana*). **Biological Conservation**, v. 142, n. 7, p. 1420-1426, 2009.

SLUIJS, A. S. der; PASMANS, F.; STRUIJK, R. P. J. H.; SCHILS, M.; DOORNBOS, P.; STERREN, F. van der; RIJKS, J.; KIK, M.; SAUCEDO, B.; BOSMAN, W.; MARTEL, W. Course of an Isolated Ranavirus Outbreak in a *Pelobates fuscus* Population in The Netherlands. **Journal of Herpetological Medicine and Surgery**, v. 26, n. 3–4, p. 117-121, 2016.

STÖHR, A. C.; BLAHAK, S.; HECKERS, K. O.; WIECHERT, J.; BEHNCKE, H.; MATHES, K.; GÜNTHER, P.; ZWART, P.; BALL, I.; RÜSCHOFF, B.; MARSCHANG, R. E. Ranavirus infections associated with skin lesions in lizards. **Veterinary Research**, v. 44, n. 84, 2013.

UNE, Y.; SAKUMA, A.; MATSUEDA, H.; NAKAI, K.; MURAKAMI, M. Ranavirus Outbreak in North American Bullfrogs (*Rana catesbeiana*), Japan, 2008. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 7, p. 1146-1147, July 2009.

VERDADE, V. K.; DIXO, M.; CURCIO, F. F. Os riscos de extinção de sapos, rãs e pererecas em decorrência das alterações ambientais. **Estudos avançados**, v. 24, p. 161-172, 2010.

WALTZEK, T. B.; MILLER, D. L., GRAY, M. J., DRECKTRAH, B., BRIGGLER, J. T., MACCONNELL, B; HUDSON, C.; HOPPER, L.; FRIARY, J.; YUN, S. C.; MALM, K. V.; WEBER, E. S.; HEDRICK, R. P. New disease records for hatchery-reared sturgeon. I. Expansion of frog virus 3 host range into *Scaphirhynchus albus*. **Diseases of aquatic organisms**, v. 111, n. 3, p. 219-227, 2014.

WARNE, R. W.; LABUMBARD, B.; LAGRANJE, S.; VREDENBURG, V. T.; CATENAZZI, A. Co-Infection by Chytrid Fungus and Ranaviruses in Wild and Harvested Frogs in the Tropical Andes. **PLoS ONE**, v. 11, n.1, e0145864, 2016. doi:10.1371/journal.pone.0145864

WOAH. Infection with Ranavirus. In: WOA. **Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals**, 7th ed., p. 1-24, OIE© 2019. Disponível em: https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahm/current/chapitre_ranavirus.pdf Acesso em: 28 de dezembro de 2020.

WOAH. Infection with Ranavirus. In: WOA. **Aquatic Animal Health Code**, 13th ed. WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH©. p.142-148, 2010.

ZHANG, M., HU, Y. H., XIAO, Z. Z., SUN, Y., & SUN, L. Construction and analysis of experimental DNA vaccines against megalocytivirus. **Fish & shellfish immunology**, v. 33, n. 5, p. 1192-1198, 2012.

ZHOU, X., ZHANG, X., HAN, Y., JIA, Q., & GAO, H. Vaccination with recombinant baculovirus expressing ranavirus major capsid protein induces protective immunity in Chinese giant salamander, *Andrias davidianus*. **Viruses**, v. 9, n. 8, 195, 2017.

3. OBJETIVOS

Geral

Realizar um estudo epidemiológico de ranavirose em anuros procedentes de ambientes naturais do estado de Pernambuco.

Específicos

- Determinar a ocorrência de ranavirose em anuros de vida livre em ambientes naturais;
- Realizar uma revisão integrativa da literatura com informações das infecções por ranavírus em anfíbios no mundo;

**CAPÍTULO 1: PESQUISA DE RANAVÍRUS EM ANUROS
PROCEDENTES DE AMBIENTE NATURAL PROTEGIDO NO ESTADO
DE PERNAMBUCO, BRASIL**

**Surveillance of ranavirus in anurans from a protected natural area
in the state of Pernambuco, Brazil**

Artigo submetido ao periódico Acta Biológica Catarinense

Surveillance of ranavirus in anurans from a protected natural area in the state of Pernambuco, Brazil

Pesquisa de ranavírus em anuros procedentes de ambiente natural protegido no estado de Pernambuco, Brasil

Davi dos S. Rodrigues¹, Rita de Cássia C. Maia², Geraldo Jorge B. de Moura³, Ricardo Luiz M. de Souza⁴, Paulo Roberto Eleutério de Souza⁶, José Wilton Pinheiro Junior⁵

¹ Federal Rural University of Pernambuco (UFRPE), Recife – PE.
E-mail: davidossantosr@gmail.com

² Federal Rural University of Pernambuco (UFRPE), Recife – PE. E-mail: rita.carvalho@ufrpe.br

³ Federal Rural University of Pernambuco (UFRPE), Recife – PE.
E-mail: geraldo.jbmoura@ufrpe.br

⁴ São Paulo University (USP), Pirassununga – SP. E-mail: rlmoros@usp.br

⁵ Federal Rural University of Pernambuco (UFRPE), Recife – PE.
E-mail: wilton.pinheiro@ufrpe.br

⁶ Federal Rural University of Pernambuco (UFRPE), Recife – PE. E-mail: paulo.eleuterio@ufrpe.br

Abstract

Ranaviruses are emerging pathogens associated with several episodes of epizootic outbreaks worldwide, leading to the decline of endangered species. Little is known about their distribution in Brazil. Therefore, this study aimed to investigate the occurrence of ranavirus infection in free-living anurans located in the Mata do Tapacurá Conservation Unit, situated in São Lourenço da Mata, in the state of Pernambuco. A total of 36 specimens were collected, euthanized and then dissected to collect the organs of interest. Polymerase Chain Reaction (PCR) was used to detect ranavirus DNA. Analysis of the DNA fragments produced in the PCR detected positive samples, with DNA amplification of the same molecular size as the positive control. The samples were submitted to a new reaction, using an adapted nested PCR protocol. The samples were submitted to nested PCR test. The diagnosis of ranavirus infection was dismissed, as it was found that these were non-specific reactions, probably related to the genetic material of the animals tested. Although no viral DNA was detected in the samples collected, this study is a pioneering initiative in the Northeast region, and it is hoped that it will stimulate further research and create a surveillance network aimed at conserving the national herpetofauna.

Keywords: Amphibians; Diagnosis; Iridoviridae; Ranaviral disease.

Resumo

Ranavírus são patógenos emergentes associados a diversos surtos epizooticos em todo o mundo, inclusive causando o declínio de espécies ameaçadas. Porém no Brasil, pouco se sabe a respeito de sua distribuição no território. Diante disto, objetivou-se com esta pesquisa investigar a ocorrência da infecção por ranavírus em anuros de vida livre localizados na Unidade de Conservação Mata do Tapacurá, situada em São Lourenço da Mata, no estado de Pernambuco. Foram coletados 36 espécimes, sendo realizada a eutanásia e posterior dissecação para coleta dos órgãos de interesse. Para a detecção do DNA genômico de ranavírus utilizou-se a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR convencional). Na análise dos fragmentos de DNA produzidos na PCR foram detectadas amostras positivas, tendo ocorrido amplificação de DNA de mesmo tamanho molecular em relação ao controle positivo. As amostras foram submetidas a *nested* PCR para confirmação. Não foi confirmada a presença de DNA de ranavírus nas amostras analisadas, desta forma descartou-se o diagnóstico de infecção por ranavírus. Apesar de não ter sido detectado DNA viral nas amostras coletadas, este estudo traz uma iniciativa pioneira na região Nordeste, e espera-se estimular a continuidade de pesquisas, bem como a criação de uma rede de vigilância visando a conservação da herpetofauna nacional.

Palavras-chave: Anfíbios; Diagnóstico; Iridoviridae; Ranavirose.

INTRODUCTION

Amphibians are at risk of extinction: it is estimated that since the 1960s, around 200 species of frogs have become extinct, and in the next century, hundreds more may cease to exist (ALROY, 2015). The causes of this decline are climate change, pollution, changes in land use and commercial exploitation, as well as infectious diseases (COLLINS, 2010). Among the emerging diseases affecting amphibians, ranavirosis stands out, listed as a notifiable disease by the World Organization for Animal Health, due to the impact it causes both on aquaculture and biodiversity (BLACK; MEREDITH; PRICE, 2017). Cases of ranavirus infection have been reported worldwide (GRAY; MILLER, 2013), including in Brazil (OLIVEIRA et al., 2019). Despite its occurrence being known, both in captivity and in the wild (GALLI et al., 2006; RUGGERI et al., 2019), the extent of its distribution in the national territory is still unknown, as existing studies are limited to the Midwest (MAZZONI et al., 2009), Southeast, and South (RUGGERI et al., 2019) regions. Given the country's vast territorial expanse, studies covering its entirety are necessary, especially considering Brazil's priority hotspots for biodiversity conservation (MITTERMEIER et al., 2004). To contribute to filling this gap, a research was conducted to detect the occurrence of ranavirus in anuran amphibians present in the Tapacurá Forest, located in São Lourenço da Mata, Pernambuco, Brazil. This is the first investigative initiative of this pathogen in the region, intending to raise awareness of the importance of monitoring agents that cause harm to amphibian populations.

MATERIAL AND METHODS

ETHICAL ASPECTS

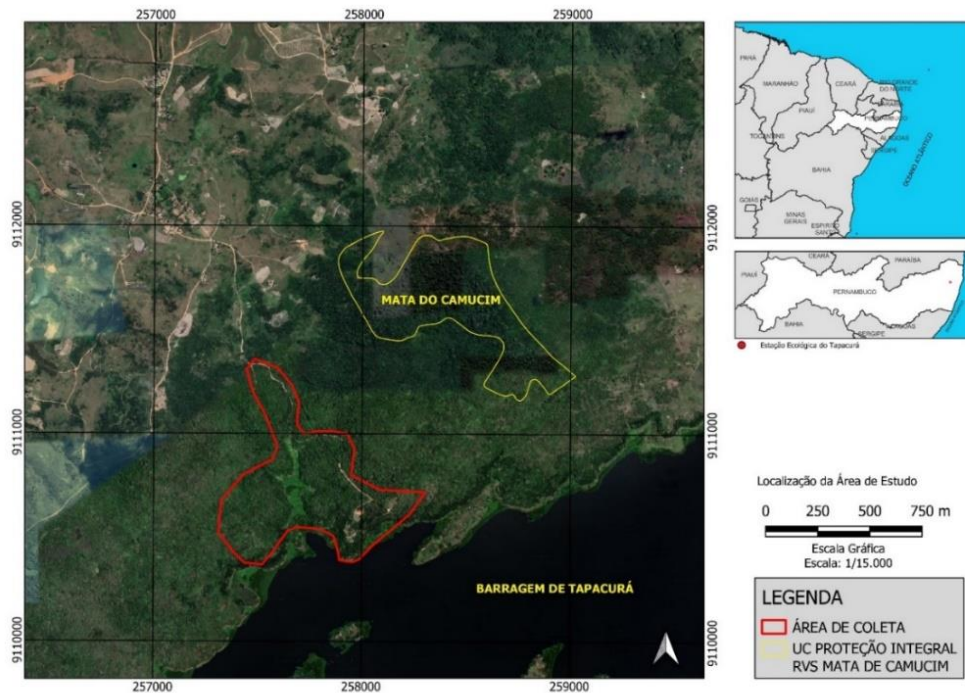
The research was approved by the Ethics Committee for Animal Use (CEUA) (protocol number: 3987250521) of the Federal Rural University of Pernambuco (UFRPE), following Resolution no. 436/2005. Similarly, it also received approval from the Biodiversity Authorization and Information System - SISBIO (number 78540-3) and was registered in SisGen (number A1D26D5).

STUDY AREA

The Tapacurá Forest Integral Protection Unit is located in the municipality of São Lourenço da Mata (08°03'32"S and 35°10'05"W), in the metropolitan region of Recife. It was designated as an ecological reserve in 1987, to preserve the hydrographic system, relief, soil, fauna, and flora (PERNAMBUCO, 1987). According to the Köppen-Geiger model, the area has an As/Aw climate (savanna climate), influenced by a rainy and a dry season (de MEDEIROS; de HOLANDA; ALEXANDRE, 2018). It is composed of three Conservation

Units (UCs): Mata do Camucim, Mata do Alto da Buchada, and Mata do Toró. The unit contains remnants of the Atlantic Forest, hosting a wide variety of flora and fauna, including endemic and endangered species (MELO; MOURA; SILVA, 2018). The research was conducted near Mata do Camucim, along the banks of Lake Tapacurá (Figure 1).

Figure 1 Map outlining the study area.



ANIMAL COLLECTION

Two collections were carried out, one during the rainy season (July/2022) and another during the dry season (March/2023). A total of 36 animals, of both sexes, were collected through manual capture. The animals were euthanized with a lethal dose of topical or injectable lidocaine (for larger species), following the guidelines of the National Council for Animal Experimentation Control - CONCEA. After confirming death, the organs of interest, including kidneys, liver, and spleen, were removed. In specimens smaller than 2cm, the recommendation from the WOAH manual was followed, utilizing the entire body except for the head (WOAH, 2019).

GENETIC MATERIAL EXTRACTION AND MOLECULAR TESTS

Extraction and PCR Organ samples were grouped into pools per individual (1 animal = kidneys, liver, and spleen). Extraction was performed using a specific kit for genomic DNA purification (Wizard® Genomic DNA Purification Kit - Promega), following the manufacturer's instructions. The Polymerase Chain Reaction (PCR) technique used was conventional, followed by electrophoresis to observe the reaction products. In the initial PCR

assay, the structural gene MCP was targeted, using the MCP primers pairs (TABLE 1) (WOAH, 2019).

Table 1 Primer sequences recommended by WOAHA.

Direction	Sequence (5'-3')	Gene	Product size
Forward	AAC-CCG-GCT-TTC-GGG-CAG-CA	<i>MCP-1</i>	321pb
Reverse	CGG-GGC-GGG-GTT-GAT-GAG-AT		
Forward	AAA-GAC-CCG-TTT-TGC-AGC-AAA-C	<i>MCP</i>	580pb
Reverse	CGC-AGT-CAA-GGC-CTT-GAT-GT		

The PCR thermocycling protocol was applied according to the primer pair used, adapted from the Manual of Aquatic Animal Diagnosis by WOAHA (WOAH, 2019) for amplifying the MCP fragment, conducted with the following parameters: an initial denaturation cycle at 94°C for 3 minutes, followed by 35 cycles (denaturation - 94°C for 30 seconds; annealing - 58°C for 30 seconds; extension - 72°C for 1 minute); finally, the final extension phase (72°C for 3 minutes).

Positive samples were subjected to nested PCR (nPCR) for confirmation. Two primer pairs were designed based on the MCP gene available in the NCBI database (Table 1), using the primer editing tool BLAST. Reaction tests were performed to assess primer efficiency, detection limit, and suitable annealing temperature. Finally, the parameters used were the same as those initially applied.

Table 2 Primer sequences used for nested PCR protocol.

Direction	Sequence (5'-3')	Product size
Forward	CTC-CCT-CCC-CTA-CAA-CGA-GA	443pb
Reverse	CGC-TCT-TGA-CGG-GAT-CTA-CC	
Forward	GAT-CCT-CCA-GCA-CAA-CAC-CA	138pb
Reverse	CTC-ATG-GCC-TGT-CTC-TCG-TC	

RESULTS AND DISCUSSION

The anuran species collected were as it is displayed in Table 3. Additionally, one animal of the genus *Dendropsophus* was collected, but its species could not be identified. All individuals were post-metamorphic; none of the captured specimens showed clinical signs or behavioral changes indicating any pathology. Similarly, the internal organs showed no macroscopic alterations.

Table 3 Anuran species collected in the study.

Species	No of specimens
<i>Leptodactylus fuscus</i> (Schneider, 1799)	5
<i>Leptodactylus marmoratus</i> (Parker, 1935)	3
<i>Leptodactylus vastus</i> (Lutz, 1930)	1
<i>Dendropsophus elegans</i> (Wied-Neuwied, 1824)	2
<i>Dendropsophus branneri</i> (Cochran, 1948)	1
<i>Dendropsophus tapacurensis</i> (Oliveira, Magalhães, Teixeira, Moura, Porto, Guimarães, Giaretta & Tinôco, 2021)	1
<i>Scinax x-signatus</i> (Spix, 1824)	15
<i>Scinax pachycrus</i> (Miranda-Ribeiro, 1937)	1
<i>Rhinella diptycha</i> (Cope, 1862)	4

Figure 2 *Scinax x-signatus*.



Following the PCR procedure with the primer pair for the MCP-1 gene, a DNA fragment of the same molecular size as the positive control was amplified. After sequencing, it was found that the amplified DNA was not viral but from the tested animal. The samples were then retested with a new primer pair (MCP). Upon performing PCR and subsequent electrophoresis to evaluate the reaction products, the existence of two positive samples was noted: bands with molecular weights approximate to that of the target fragment were formed. These samples underwent a new PCR, this time using an adapted protocol (nested PCR). Thus, it was confirmed that the tested samples did not contain viral DNA, indicating non-specific amplification.

An alternative to consider is the use of other primers targeting different regions of the viral genome; studies report that genes such as DNA polymerase (DNApol), the alpha subunit of the ribonucleotide reductase gene (RNR- α) and others are targets used for PCR amplification (BOX et al., 2021; KAGANER et al., 2021).

No reports were found in the literature regarding ranavirus infection in any of the anuran species collected, with a particular mention of the species *D. tapacurensis*, recently described and endemic to this biome (OLIVEIRA et al., 2021). In a similar study, Reis (2018) investigated the occurrence of ranavirus infection in wild anurans of the species *L. fuscus* in two cities in the state of São Paulo, where 40 adult specimens were captured. One of these specimens exhibited macroscopic alterations in the organs, consistent with those caused by the virus in tissues, although no positive animals were detected.

Additionally, the developmental stage is a factor influencing infection dynamics. Young animals (larvae and newly metamorphosed) are more susceptible to infection than adults (BAYLEY et al., 2013), as their immune system is not fully developed during this phase, with some crucial areas of adaptive response being refined during or after metamorphosis (CHEN; ROBERT, 2011). Conversely, adults tend to exhibit a more effective immune response against the virus, developing lasting humoral immunity after exposure (MANIERO et al., 2006). In this study, no tadpoles or individuals in a pre-metamorphic developmental state were found. Thus, it was not possible to observe if there is ranavirus infection in young anurans.

Hoverman and colleagues (2011) demonstrated in an experimental study that there are variations in susceptibility to ranavirus infection among anuran species. Through comparative phylogenetic analysis and experimental infection, it was observed that animals belonging to the *Ranidae* family tend to have a higher sensitivity to infection than other tested families (*Hylidae*, *Bufo* *nidae*, *Scaphiopodidae*). In this research, no ranids were captured; the tested anurans belonged to the families: *Leptodactylidae*, *Hylidae*, and *Bufo* *nidae*.

Another important aspect to consider is the role of invasive species in the maintenance and transmission of ranavirus. Species such as the American bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) play a role in the disease's epidemiology as carriers, as many do not show clinical signs but shed the virus to other susceptible animals (FORTI et al., 2017). No invasive anuran species were found during the collections, but there are records of American bullfrog populations in other municipalities of the state (BOTH et al., 2011). Given their adaptability and dispersal, it is necessary to monitor ranavirus infections in these species to investigate whether these animals are reservoirs of ranavirus.

CONCLUSION

Despite the non-detection of ranavirus DNA in the research, these results are important from a conservation standpoint, considering the presence of endemic species and those at risk of extinction in the Ecological Station. This pioneering research in the Northeast region of Brazil emphasizes the need for surveillance programs to assess the status of amphibian

populations regarding ranaviruses. It is hoped, therefore, to encourage further research in other states of Brazil, thereby expanding knowledge of the distribution and impacts of ranavirus on Brazilian herpetofauna.

REFERENCES

ALROY, John. Current extinction rates of reptiles and amphibians. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 42, p. 13003-13008, 2015.

BLACK, Y.; MEREDITH, A.; PRICE, S. J. Detection and Reporting of Ranavirus in Amphibians: Evaluation of the Roles of The World Organization for Animal Health and the Published Literature. **Journal of Wildlife Diseases**, 53(3), 2017. doi: 10.7589/2016-08-176.

BOTH, C.; LINGNAU, R.; SANTOS-JR, A.; MADALOZZO, B.; LIMA, L. P.; & GRANT, T. Widespread occurrence of the american bullfrog, *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802) (Anura: Ranidae), in Brazil. **South American Journal of Herpetology**, v. 6, n. 2, p. 127-134, 2011.

CHEN G., ROBERT J. Antiviral immunity in amphibians. **Viruses**, Nov; 3 (11): 2065-2086, 2011. doi: 10.3390/v3112065.

COLLINS, James P. Amphibian decline and extinction: what we know and what we need to learn. **Diseases of aquatic organisms**, v. 92, n. 2-3, p. 93-99, 2010.

DE MEDEIROS, R. M.; DE HOLANDA, R. M.; ALEXANDRE, M. Climate classification in Köppen model for the state of Pernambuco-Brazil. **Revista de Geografia (Recife)**, v. 35, n. 3, 2018.

FORTI L. R.; BECKER C. G.; TACIOLI L.; PEREIRA V. R.; SANTOS A. C. F. A. et al. (2017) Perspectives on invasive amphibians in Brazil. **PLOS ONE** 12(9): e0184703. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184703>

KAGANER, Alyssa W. et al. Environmental DNA-derived pathogen gene sequences can expand surveillance when pathogen titers are decoupled in eDNA and hosts. **Environmental DNA**, v. 3, n. 6, p. 1192-1207, 2021.

LORENZ, T.C. Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. *J. Vis. Exp.* (63), e3998, doi:10.3791/3998 (2012).

MANIERO G. D., MORALES H., GANTRESS J., ROBERT J. Generation of a long-lasting, protective, and neutralizing antibody response to the ranavirus FV3 by the frog *Xenopus*. **Dev Comp Immunol.** 30 (7): 649-57, 2006. doi: 10.1016/j.dci.2005.09.007

MITTERMEIER, R. A.; ROBLES-GIL, P.; HOFFMANN, M.; PILGRIM, J.; BROOKS, T.; MITTERMEIER, C. G.; LAMOREUX, J.; DA FONSECA, G. A. 2004. Hotspots revisited. CEMEX, Mexico.

OLIVEIRA, C. R.; ALFAIA, S. R.; IKARI, F. L.; TAVARES, L. S.; SOUSA, R. L. M.; HARAKAVA, R.; FERREIRA, C. M. Detection and molecular characterization of Frog virus 3 in bullfrogs from frog farms in Brazil. **Aquaculture**, v. 516, p. 1-5, 2019.

OLIVEIRA R. F. d.; MAGALHÃES F. d. M.; TEIXEIRA B. F. d. V.; MOURA G. J. B. d.; PORTO C. R.; GUIMARÃES F. P. B. B.; GIARETTA, A. A; TINÔCO M. A new species of the *Dendropsophus decipiens* Group (Anura: Hylidae) from Northeastern Brazil. **PLoS ONE** 16(7): e0248112, 2021. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0248112>

PERNAMBUCO. **Lei nº 9.989**, de 13 de janeiro de 1987. Define como reservas ecológicas as matas de preservação permanente da Região Metropolitana do Recife e dispõe sobre procedimentos básicos relativos a sua preservação.

REIS, M. F. dos. **Deteção molecular de ranavírus em espécies de anfíbios anuros selvagens da região centro-leste do estado de São Paulo**. Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-graduação em Zootecnia) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo. São Paulo, p. 39, 2018.

WOAH. Infection with Ranavirus. In: WOA. **Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals**, 7th ed., p. 1-24, OIE© 2019. Disponível em: https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahm/current/chapitre_ranavirus.pdf Acesso em: 28 de dezembro de 2020.

**CAPÍTULO 2: ANÁLISE EPIDEMIOLÓGICA DAS INFECÇÕES POR
RANAVÍRUS EM ANFÍBIOS (ORDEM ANURA): UMA REVISÃO
INTEGRATIVA**

**Epidemiological analysis of ranavirus infections in amphibians (order anura):
An integrative review**

Artigo submetido ao periódico Web Ecology

Epidemiological analysis of ranavirus infections in amphibians (order Anura): An integrative review

Davi dos S. Rodrigues¹, Rita de Cássia C. Maia¹, Geraldo Jorge B. de Moura¹, Ricardo Luiz M. de Souza², José Wilton P. Junior¹

¹Veterinary Medicine Department, Federal Rural University of Pernambuco (UFRPE), Recife – PE, 52171-900, Brazil

² Veterinary Medicine Department, São Paulo University (USP), Pirassununga – SP, 13635-900, Brazil

Correspondence to: Davi dos S. Rodrigues (davidossantosr@gmail.com)

Abstract. Emerging infectious diseases have contributed to the decline of amphibian species around the world. Among them, ranavirus infections have a major importance, as they significantly impact biodiversity and frog rearing. Ranavirus infections occur worldwide, and several outbreaks have been reported in different countries. This study aimed to conduct an integrative review of recent literature, including epidemiological data on the distribution, prevalence, and circulating species/strains, to collect and synthesize this information. We hope to provide a situational update on ranavirus infections in anurans, identifying both gaps that may still exist and potential directions for future research.

Keywords: Anurans; Iridovirus; ranavirus infections; emerging diseases; conservation

1. Introduction

Amphibians are a diverse and cosmopolitan class, comprising approximately 8,000 species (Frost, 2021). Despite this diversity, amphibians are at risk of extinction. According to the Red List of the International Union for the Conservation of Nature (IUCN), 41% of amphibian species are at risk of disappearing (IUCN, 2023). Several factors are behind this decline, including climate change, anthropic action (deforestation, habitat fragmentation) (Santi; Corrêa, 2018), and the introduction of invasive species (Kraus, 2015). Moreover, the occurrence of infectious diseases significantly impacts the numbers of many of these species (Daszak; Cunningham; Hyatt, 2003). Ranaviruses, viruses belonging to the *Iridoviridae* family (Chinchar et al., 2017) that infect fish, amphibians, and reptiles (Brenes et al., 2014), are among the most important emerging pathogens.

Ranaviruses are large viruses (150 to 200nm in diameter), with a genome consisting of a double strand of DNA (ds DNA), covered by an inner membrane, which in turn is covered by a capsid of icosahedral symmetry, and can be enveloped by an outer envelope (in the case of species that bud from the host cell's plasma membrane) or not. These morphological characteristics are common to all members of this taxon (Chinchar et al., 2017). Seven species are currently recognized: Ambystoma Tigrinum Virus (ATV), Common Midwife Toad Virus (CMTV), Epizootic Haematopoietic Necrosis Virus (EHNV), Santee-Cooper Virus (LMBV), Singapore grouper iridovirus (SGIV), European North Atlantic Ranavirus (LFRV) and Frog Virus 3 (FV3) (Jancovich et al., 2011). The main species that affect amphibians are CMTV, ATV and FV3, and studies have shown that anurans and urodeles are more susceptible to ATV and FV3, respectively (Schock et al., 2008).

Ranaviruses are considerably resistant in the environment: studies performed with FV3 have shown that its permanence in water at low temperatures (4° C) can be up to 102 days in filtered river water, and 57 days in unfiltered water (Nazir et al., 2012). In addition, these viruses can also remain in sediments, being able to conserve their infecting capacity, under the same temperature range (Munro et al., 2016). Virions are inactivated by acidic (<3.0) and alkaline (>11.0) pH, exposure to UV irradiation and also by high temperature (>55° C for 30 minutes). In addition, ranaviruses are sensitive to the action of disinfectants such as chlorhexidine, sodium hypochlorite and potassium compounds (Bryan et al., 2009).

The first description of ranavirus infection occurred in the 1960s; since then, several die-off events have been recorded. These viruses have been identified as causing epizootic outbreaks worldwide (Gray; Miller, 2013; Maclachlan; Dubovi, 2016), with cases reported in several countries (Duffus et al., 2015). The disease has a high mortality rate, reaching 100% (World

Organization for Animal Health, 2010), thus bringing significant losses to aquaculture and biodiversity: there are scientific reports that reveal the decline of amphibian species in the wild due to infections by ranavirus in Europe (Price et al., 2014), as well as mass mortalities of animals in the wild and captivity. For these reasons, ranavirosis was listed as a notifiable disease by the World Organization for Animal Health (WOAH) in 2009, although it is not a zoonotic disease (Black; Meredith; Price, 2017).

The ecology of ranaviruses involves a complex chain of interaction between host species, transmission routes, environmental persistence, stressors and the immunity of the host individual (Gray et al., 2012). The virus is transmitted horizontally. A high population density can facilitate transmission between individuals, through direct contact between healthy and sick animals. In addition, natural behaviors among amphibians, such as predation (cannibalism and necrophagy), are risk factors for direct transmission of the virus (Harp & Petranka, 2006; Latney & Klaphake, 2013). The virus can also be dispersed through water, soil and sediment and infect other individuals indirectly (Nazir et al., 2012).

Affected animals can show symptoms such as altered buoyancy, erratic swimming, lethargy, edema, erythema and skin ulcers, that can develop into skin necrosis with loss of extremities (Forzán et al., 2015; Miller et al., 2007; Stöhr et al., 2013). Despite the variety of clinical signs, some animals may harbor a subclinical but transmissible infection of the virus (Brunner et al., 2019); these carriers contribute to the dispersal of the pathogen, especially when considering the wild animal trade, which some authors point to as a "source of pathogen pollution" (Picco; Collins, 2008).

In the last few years, there has been a significant increase in research involving ranaviruses, evidenced by the growth in the number of articles published on the subject (Wirth et al., 2021). Anurans are the main models used to evaluate important aspects of the infection, such as immunity, pathogenesis (Forzán et al., 2017; Morales et al., 2010), diagnostic techniques (Ford et al., 2022), transmission potential (Cunningham et al., 2007), and environmental drivers (Hall et al., 2020). Furthermore, since ranaviruses can accelerate the process of extinction of threatened species, the risk of disappearance of anurans is concerning from a conservation perspective (Earl et al., 2016). Given the wealth of available information on ranavirus infection in anurans, this study aimed to conduct an integrative literature review to collect and systematize data published in the last 10 years. We hope to provide a situational update on the epidemiology of ranavirus infections in anurans worldwide and identify possible gaps in knowledge that could be the subject of future research.

2. Materials and Methods

This research consisted of an integrative review to analyze data on the prevalence, geographical distribution, and diversity of ranavirus species worldwide. The search criteria included studies published over the last ten years (2013–2022). The search for articles was conducted in two bibliographic databases: Scopus and PubMed. The search terms were applied using Boolean operators: ranavirus AND infection AND (anurans OR amphibian) AND (epidemiology OR prevalence OR occurrence). The researchers predefined the inclusion and exclusion criteria for the articles (Table 1) and applied them for screening and subsequent selection.

Table 1: Predefined inclusion and exclusion criteria for the selection of articles.

INCLUSION CRITERIA	EXCLUSION CRITERIA
Observational prevalence/occurrence studies	Review articles and book chapters
Studies on ranavirus infection in anurans	Clinical trials (experimental infection)
Articles published in the last 10 years	Studies/reports with species other than anurans
Research containing data to calculate the prevalence	Studies that do not focus on the prevalence/occurrence of the disease/infection
Research conducted in any country/language	Studies that do not explain the observed prevalence
	Duplicate articles

The search in the two databases yielded 921 articles. After retrieval, the titles and abstracts were pre-read. 746 articles did not meet the established criteria and were excluded; the duplicate articles were also discarded. The articles that passed the screening were read in full; the inclusion and exclusion criteria were also considered. Those that did not provide the full text for reading were rejected. In the end, 68 articles were selected (Figure 1).

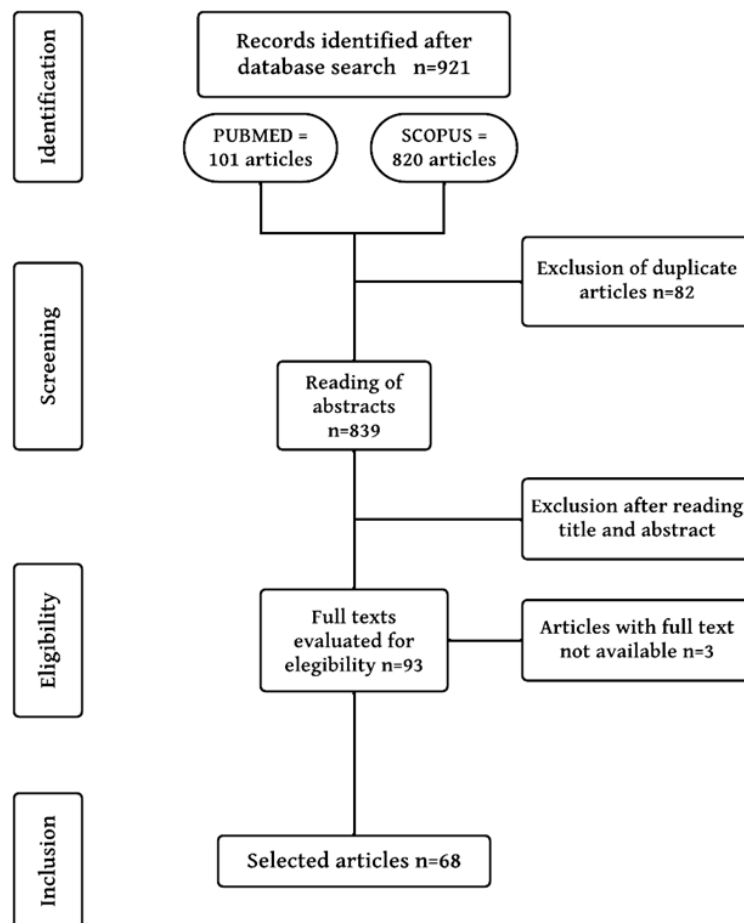
To calculate prevalence, the equation comprising the ratio between the total number of animals detected positive divided by the total number of animals tested was applied. This calculation follows the prevalence principle described by Lima, Pordeu and Rouquayrol (2018), in which it is measured by dividing the number of known cases of a given disease by the number of individuals in the population at a defined point in time (day, month, or year) (Equation 1).

Equation 1: Calculation for measuring prevalence.

$$Prevalence\ ratio = \frac{(number\ of\ known\ cases\ of\ disease)}{population} \times 100$$

Importantly, articles without prevalence information were included if access to the data needed to calculate this indicator for the species of interest was possible. In articles where the prevalence was defined for other orders of anurans (e.g., Caudata), a prevalence calculation was conducted considering only anurans. Studies wherein this information was impossible to retrieve were discarded.

Figure 3: Flowchart showing the sequence of article selection for the integrative review.



3. Results

We selected 68 articles reporting cases of ranavirus infections in anuran amphibians, confirmed by laboratory techniques over the last ten years (2013–2022). The reports came from countries in all continents, except Antarctica; of these, most (39.7%) described occurrences in the United States. Consequently, the number of cases recorded in North America was higher than in other continents (33 records/48.5% of publications). In contrast, only one record has been reported in Oceania from a surveillance study of the infection in critically endangered species (Wynne, 2020).

Several species of anurans have been affected by the infection: 16 families were recorded in the reports, including species threatened with extinction (Table 2). Assessed animals came from various sources: free-living animals, animals bred in captivity (commercial farms and aquariums), and zoological collections. It is worth noting that some articles reported the first case of detection of the pathogen in amphibians, either in a natural environment or in captivity (Park et al., 2021; Vörös et al., 2020; Kwon et al., 2017; Ruggeri et al., 2019), in order to create a collaborative, information-exchanging network, demonstrating the increased efforts to identify the cause behind the outbreaks of this emerging disease.

Table 2: List of anurans grouped by families and species found in the 68 records selected.

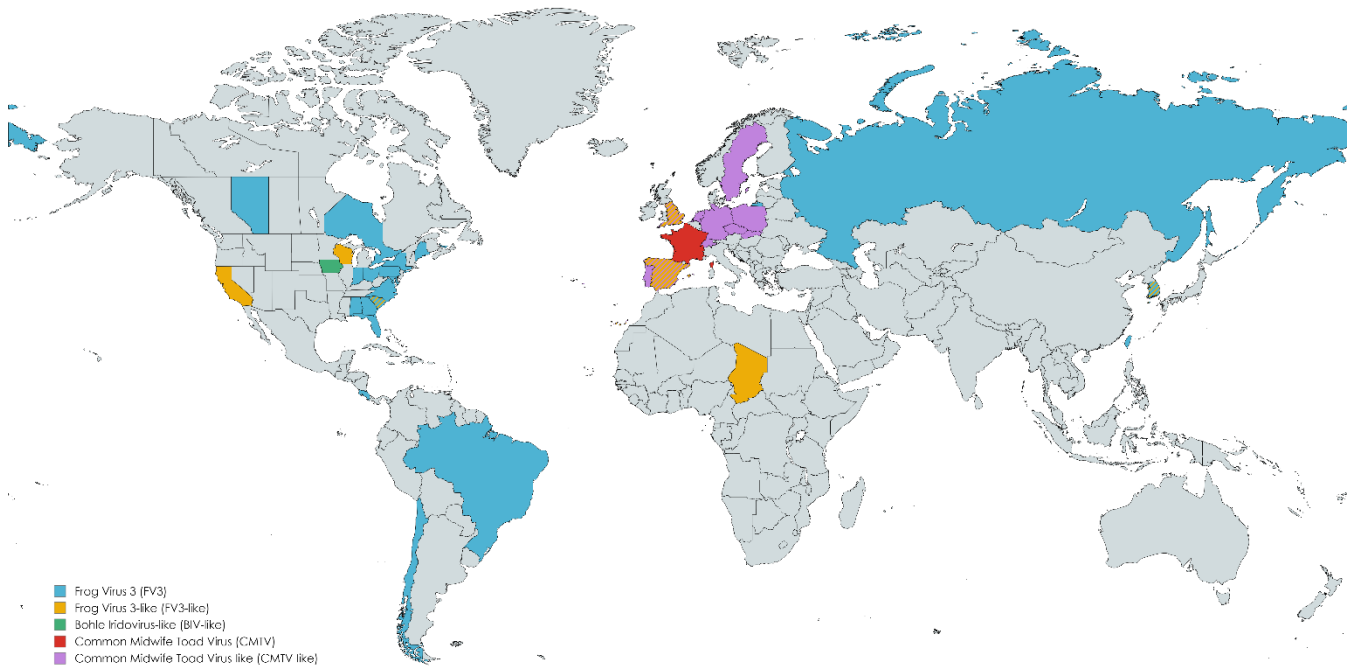
Order	Family	Species
Anura	Alytidae	<i>Alytes obstetricans</i>
	Bombinatoridae	<i>Bombina bombina</i> , <i>Bombina orientalis</i> , <i>Bombina variegata</i>
	Bufo	<i>Bufo bufo</i> , <i>Bufo spinosus</i> , <i>Anaxyrus (Bufo) hemiophrys</i> , <i>Anaxyrus americanus</i> , <i>Anaxyrus boreas boreas</i> , <i>Duttaphrynus dhufarensis</i> , <i>Epidalea calamita</i> , <i>Rhinella manu</i> , <i>Rhaebo haematiticus</i> , <i>Rhinella marina</i> , <i>Rhinella horribilis</i>
	Calyptocephalellidae	<i>Calyptocephalella gayi</i>
	Centronelidae	<i>Teratohyla spinosa</i>
	Craugastoridae	<i>Craugastor ranoides*</i> , <i>Craugastor bransfordii</i> , <i>Craugastor fitzingeri</i> , <i>Craugastor megacephalus</i> , <i>Craugastor mimus</i> , <i>Craugastor crassidigitus</i> , <i>Craugastor podiciferus</i> , <i>Craugastor stejnegerianus</i> , <i>Craugastor taurus*</i>
	Hylidae	<i>Agalychnis callidryas</i> , <i>Agalychnis lemur*</i> , <i>Agalychnis spurrelli</i> , <i>Acris gryllus</i> , <i>Acris blanchardi</i> , <i>Duellmanohyla legleri*</i> , <i>Dendropsophus phlebodes</i> , <i>Hyla cinerea</i> , <i>Hyla molleri</i> , <i>Hyla squirella</i> , <i>Hyla chrysoscelis</i> , <i>Hyla versicolor</i> , <i>Hyllola regilla</i> , <i>Hyloscirtus palmer</i> , <i>Hypsiboas gladiator</i> , <i>Dendropsophus phlebodes</i> , <i>Dendropsophus microcephalus</i> , <i>Limnodynastes nannotis</i> , <i>Limnodynastes lorica</i> , <i>Pseudacris crucifer</i> , <i>Pseudacris fouquettei</i> , <i>Pseudacris maculata</i> , <i>Pseudacris ornata</i> , <i>Osteopilus septentrionalis</i> , <i>Dryophytes japonicus</i> , <i>Scinax elaeochroa</i> , <i>Smilisca boudinii</i> , <i>Teratohyla spinosa</i>
	Microhylidae	<i>Gastrophryne carolinensis</i> , <i>Gastrophryne olivacea</i>
	Mantellidae	<i>Mantidactylus cowanii</i> , <i>Mantidactylus mocquardi</i>
	Pelobatidae	<i>Pelobates cultripes</i>
	Pelodyadidae	<i>Litoria nannotis</i> , <i>Litoria lorica*</i>
	Pipidae	<i>Xenopus laevis</i>
	Pyxicephalidae	<i>Pyxicephalus spp.</i>
	Ranidae	<i>Rana dybowskii</i> , <i>Rana draytonii</i> , <i>Rana sylvatica</i> , <i>Rana iberica</i> , <i>Rana pyrenaica</i> , <i>Rana temporaria</i> , <i>Rana catesbeiana</i> , <i>Rana clamitans</i> , <i>Rana huanrenensis</i> , <i>Rana sphenoccephala</i> , <i>Rana pipiens</i> , <i>Rana palustris</i> , <i>Rana grylio</i> , <i>Rana heckscheri</i> , <i>Rana okaloosae</i> , <i>Rana virgatipes</i> , <i>Rana muscosa*</i> , <i>Rana sierrae*</i> , <i>Lithobates capito</i> , <i>Lithobates forreri</i> , <i>Lithobates vibicarius</i> , <i>Lithobates warszewitschii</i> , <i>Lithobates clamitans melanota</i> , <i>Hoplobatrachus occipitalis</i> , <i>Hylarana spp.</i> , <i>Ptychadena spp.</i> , <i>Pelophylax esculentus</i> , <i>Pelophylax ridibundus</i> , <i>Pelophylax lessonae</i>
	Scaphiropodidae	<i>Scaphiopus holbrookii</i>
	Strabomantidae	<i>Pristimantis lindae</i> , <i>Pristimantis pharangobates</i> , <i>Pristimantis platydactylus</i> , <i>Pristimantis toftae</i>
	Telmatobiidae	<i>Telmatobius marmoratus</i>

* Species classified as vulnerable (VU), endangered (EN), or critically endangered (CR) according to the IUCN Red List.

Moreover, some of the studies reported the occurrence of ranavirus infection in species included in the International Union for the Conservation of Nature (IUCN) Red List categories. *Craugastor ranoides*, *Craugastor taurus*, *Agalychnis lemur*, *Duellmanohyla legleri*, *Litoria lorica* and *Rana muscosa*, and *Rana sierrae* are classified as endangered species at one of the the following levels: vulnerable (VU), endangered (EN), or critically endangered (CR). The assessment considers various factors to define the conservation status of species of different taxa (IUCN, 2023).

Of the 68 articles analyzed, 27 (39.7%) identified the viral species involved; Frog Virus 3 (FV3) was implicated in most cases (13 records). The spatial distribution of ranavirus species in different countries is shown in Figure 2. Ranaviruses are widespread globally, aided by the international animal trade, whether for the pet market or food. Studies showed the presence of exported animals with the infection (Kolby et al., 2014), which facilitates the spread of the virus across borders.

Figure 4: Geographical distribution of the ranavirus species/isolates identified in the records.



4. Discussion

The decline of endangered species is a matter of concern: it is estimated that since the 1960s, around 200 species of frog have become extinct, and that in the next century, hundreds more may no longer exist (Alroy, 2015). Invasive species intensify this process: as well as competing for food resources and preying on native species, they have a key role as pathogen carriers, serving as a source of infection and acting as conduits in the dynamics of agent transmission. Some articles cited invasive species, such as *Eleutherodactylus planirostris* (Rivera et al., 2019) and *Lithobates catesbeianus* (Ruggeri et al., 2019), currently named as *Aquarana catesbeiana* (Jorgewich-Cohen et al., 2022). In one of the articles reviewed, *E. planirostris* had a higher prevalence and intensity of infection than the other species evaluated, highlighting the amplifying role that invaders play in disseminating ranaviruses (Rivera et al., 2019).

Frog farming is an important branch of aquaculture that contributes significantly to the production of meat protein and other non-food purposes: according to a report by the Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 147.8 thousand tons of frogs (live weight) were produced in 2020 (FAO, 2022). The American bullfrog (*Aquarana catesbeiana*) is a species widely used in production for human consumption. This anuran has been introduced into several countries, as various farming sites have been built to breed them on a commercial scale. However, reports of animals escaping or being abandoned in the wild after the closure of facilities are not uncommon, and the species, which is highly adaptable, has managed to thrive

in the outdoors. In South America, several countries have recorded feral populations of the bullfrog, such as Argentina (Akmentins & Cardozo, 2010), Uruguay (Laufer et al., 2008) and Brazil (Both et al., 2011).

In addition to intra-class interaction, ranaviruses can be transmitted through inter-class contact since this pathogen can infect different host classes. Studies have reported the occurrence of ranavirus infection in sympatric amphibians and chelonians (Currylow; Johnson; Williams, 2014), as well as in anurans and urodeles that share the same territory in a prey–predator relationship (Rothermel et al., 2016). This dynamic favors the transmission of the agent, increasing the likelihood of infection. When considering an environment with great biodiversity, other mobile taxa, such as birds and reptiles, can carry the virus as carriers or reservoirs, contributing to spreading the pathogen in the environment (Tornabene et al., 2018).

Some of the records evaluated also highlighted the increased impact of co-infection with other emerging pathogens, including the chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*; this zoospore-forming fungus can infiltrate the host's epidermis, causing a disturbance in its osmoregulatory function (Sewell et al., 2021). One hypothesis to be confirmed is that infection by one of these pathogens may favor subsequent infection by the other (Warne et al., 2016). Seven studies reported animals co-infected with the two pathogens (Whitfield et al., 2013; Reshetnikov et al., 2014; Warne et al., 2016; Olori et al., 2018; Talbott et al., 2018; Watters et al., 2018; Julian et al., 2019). Co-infection, combined with factors such as climate change, exacerbates the impacts caused by these agents, increasing disease severity and triggering new outbreaks (Thumsová et al., 2022).

The environment is also a key factor in the occurrence of ranavirus infections. Studies showed that certain environmental aspects can increase the predisposition of animals to infection. Elements such as the season or environment-linked aspects (e.g., distance from the nearest lake with a ranavirus infection) are used to predict infections (Tornabene et al., 2018). The deleterious consequences of food production on the environment also impact amphibians, predisposing them to the virus; for example, ammonia from livestock farming and fertilizers used in agriculture is extremely toxic to aquatic animals and impairs their development and interferes with their immune function (Talbott et al., 2018).

Regarding diagnosis, all studies used polymerase chain reaction (PCR) as the primary test to confirm infection; however, other techniques, such as viral isolation (Miaud et al., 2016; Julian et al., 2019), histopathology (Landsberg et al., 2013; Rothermel et al., 2016; Sluijs et al., 2016; Eustace et al., 2018; Hsieh; Rairat; Chou, 2021), immunohistochemistry (Forzán et al., 2019), *in situ* hybridization, and electron microscopy, were also used (Hsieh; Rairat; Chou, 2021). Molecular tests are highly sensitive and enable the identification of the species involved in infection. The use of samples from the environment to recover environmental DNA (eDNA) is a growing trend, which has the advantage of eliminating the need to handle and euthanize animals, as well as providing quantitative data on viral elimination in the environment during outbreaks, demonstrating satisfactory results (Hall et al., 2018; Miaud et al., 2019; Tornabene et al., 2021).

Laboratory diagnosis must be carried out to confirm ranavirus infection, considering the non-specific signs and the subclinical phase of the disease. Of all the methods used, Polymerase Chain Reaction (PCR) is the technique recommended by the World Organization for Animal Health (WOAH) due to its availability, utility and diagnostic sensitivity and specificity. Other techniques can also be used, such as electron microscopy, viral isolation in cell culture and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) (World Organization for Animal Health, 2010).

Despite the large number of studies reporting the occurrence of ranavirus infections, little is known about the species and strains of the virus involved in these cases, as mentioned before. One of the records evaluated shows the diagnosis and molecular characterization through phylogenetic analysis of a strain of ranavirus in Brazil (Oliveira et al., 2020). This isolate was found to have a different phylogenetic profile from other strains recorded in other countries. Sequencing studies are especially relevant because they can reveal the evolutionary history of these viruses, as well as provide knowledge of genes that might have an impact on the replication cycle and viral pathogenesis.

Table 3 shows the prevalence values found in the articles evaluated. In some cases, it was necessary to calculate the prevalence, as this parameter was not indicated. A new calculation was performed considering only anuran amphibians in articles that

presented data for other orders of amphibians. There is a wide variation in prevalence, with values reaching 100% in cases wherein outbreaks with high mortality have been reported (Wheelwright et al., 2014; Miaud et al., 2016; Kwon et al., 2017; Hartmann, 2022).

Table 5: Prevalence found in the records, divided by continent, their respective countries, and the species involved.

Continent	Country	Prevalence
North America	United States	73% - <i>A. gryllus</i> 100% - <i>L. capito</i> (Hartmann, 2022) 24,87% - <i>Rana</i> spp. (Karwacki et al., 2021) 72% - <i>O. septentrionalis</i> (Galt et al., 2021) 0-100% - <i>R. silvatica</i> (Hall et al., 2018) 21,4% - <i>A. blanchardi</i> , <i>Hyla</i> spp., <i>Pseudacris</i> spp., <i>Gastrophryne</i> spp., <i>Rana</i> spp. (Davis et al., 2019) 42% - <i>L. sylvaticus</i> (Mosher et al., 2019) 5% - <i>Hyla</i> spp., <i>E. planirostris</i> (Rivera et al., 2019) 5% - <i>L. clamitans melanota</i> , (Julian et al., 2019) 26% - <i>R. sylvatica</i> (Savage et al., 2019) 0% - <i>B. marinus</i> , <i>E. planirostris</i> , <i>D. auratus</i> , <i>Rana</i> spp. (Goodman et al., 2019) 5,94% - <i>A. americanus</i> , <i>A. blanchardi</i> , <i>Hyla</i> spp., <i>Rana</i> spp. (Watters et al., 2018) 23,33-26,6% (2012-14) 38,3% (2015) 7,9% (2016) - <i>A. americanus</i> , <i>H. versicolor</i> , <i>P. crucifer</i> , <i>Lithobates</i> spp. (Olori et al., 2018) 66,33% - <i>H. regilla</i> , <i>A. bóreas</i> , <i>Rana</i> spp. (Tornabene et al., 2018) 4,51% - <i>R. catesbeiana</i> , <i>A. americanus</i> , <i>Lithobates</i> spp., <i>Pseudacris</i> spp., <i>Hyla</i> spp. (Standish et al., 2018) 60% - 2014; 18% - 2015 - <i>R. sylvatica</i> , <i>Pseudacris</i> spp., <i>Hyla</i> spp. (Talbot et al., 2018) 3,4% - <i>Rana</i> spp. (Smith; Picco; Roland Knapp, 2017) 0,11% - <i>H. squirella</i> (Horner et al., 2017) 32,11% - <i>S. holbrookii</i> , <i>A. terrestris</i> , <i>G. carolinensis</i> , <i>A. gryllus</i> , <i>Pseudacris</i> spp., <i>Hyla</i> spp., <i>Lithobates</i> spp. (Love et al., 2016) 38,9% - <i>R. sylvatica</i> (Crespi et al., 2015) 19,43% - <i>A. americanus</i> , <i>Pseudacris</i> spp., <i>Lithobates</i> spp., <i>Rana</i> spp., <i>Hyla</i> spp. (Rothermel et al., 2016) 100% - <i>A. boreas boreas</i> (2014) 100% - <i>R. sylvatica</i> (Wheelwright et al., 2014) 2,8% - não identificada (Currylow; Johnson; Williams, 2014) 6,7% - <i>Lithobates</i> spp. (Landsberg et al., 2013) 0% - <i>P. maculata</i> , <i>L. pipiens</i> (Tornabene et al., 2022) 0% - <i>R. sylvatica</i> (Richter et al., 2013) 0% - <i>L. clamitans</i> (Titus & Green, 2013)
	Canada	10.5% - <i>R. sylvatica</i> , <i>P. maculata</i> , <i>A. hemiophrys</i> (Bienentreu et al., 2022) 40.32% - <i>Pseudacris maculata</i> , <i>Anaxyrus hemiophrys</i> , <i>Rana</i> spp. (Grant et al., 2019) 80.7% - <i>A. hemiophrys</i> , <i>R. sylvatica</i> , <i>P. maculata</i> (Forzán et al., 2019) 38.9% - <i>R. sylvatica</i> (Crespi et al., 2015) 6.8% - <i>R. sylvatica</i> (D'Aoust-Messier et al., 2015) 1.05% - <i>L. clamitans</i> (Forzán ; Wood, 2013)
	Mexico	0% - <i>T. smithii</i> (Jacinto-Maldonado et al., 2020)
Central America	Costa Rica	16.5% - <i>Craugastor</i> spp., <i>Lithobates</i> spp., <i>H. palmer</i> , <i>E. prosoblepon</i> , <i>H. colymbiphylum</i> , <i>D. legleri</i> , <i>A. lemur</i> , <i>D. phlebodes</i> , <i>R. horribilis</i> (Whitfield et al., 2021) 4% - <i>C. ranoides</i> (Puschendorf et al., 2019) 16.6% - <i>R. haematiticus</i> , <i>R. marina</i> , <i>S. elaeochroa</i> , <i>S. boudinii</i> , <i>T. spinosa</i> , <i>C. bransfordii</i> , <i>C. fitzingeri</i> , <i>C. megacephalus</i> , <i>O. pumilio</i> (Whitfield et al., 2013)
	Panama	0% - <i>Atelopus zeteki</i> (Eustace et al., 2018)
South America	Brazil	7.7% - <i>L. catesbeianus</i> (Oliveira et al., 2020) 36.4% - <i>Bufo</i> spp., <i>Hylidae</i> spp. (Ruggeri et al., 2019)
	Chile	4.3% - <i>X. laevis</i> , <i>C. gayi</i> (Soto-Azat et al., 2016)
	Ecuador	1.4% - <i>Pristimantis</i> spp. (Urgiles et al., 2021)
Africa	Peru	53% - <i>T. marmoratus</i> ; 75% - <i>R. manu</i> ; 30% - <i>H. gladiator</i> ; 38.2% - <i>Pristimantis</i> spp. (Warne et al., 2016)
	Chad	16% - <i>H. occipitalis</i> , <i>Ptychadena</i> spp., <i>Pyxicephalus</i> spp. (Box et al., 2021b)
	Madagascar	5.2% - <i>M. cowanii</i> , <i>M. mocquardi</i> (Kolby et al., 2015)
Europe	Spain	94.45% - <i>A. obstetricans</i> , <i>B. spinosus</i> , <i>H. molleri</i> , <i>P. cultripes</i> , <i>R. pyrenaica</i> , <i>R. temporaria</i> (Thumsová et al., 2022) 36.69% - <i>A. obstetricans</i> , <i>B. spinosus</i> , <i>R. iberica</i> , <i>R. temporaria</i> (Bosch et al., 2021) 28.6% - <i>A. obstetricans</i> , <i>B. spinosus</i> (Bielby et al., 2021) 53.7% - <i>A. obstetricans</i> , <i>B. spinosus</i> , <i>H. molleri</i> , <i>P. perezi</i> , <i>R. iberica</i> (von Essen et al., 2020)
	Portugal	18.25% - <i>A. obstetricans</i> , <i>B. spinosus</i> (Rosa et al., 2017)
	France	23% - <i>R. temporaria</i> (Miaud et al., 2019) 100% - <i>R. temporaria</i> (Miaud et al., 2016)
	England	0% - <i>P. lessonae</i> (Sainsbury et al., 2017) 20.91% - <i>R. temporaria</i> , <i>B. bufo</i> (Price et al., 2017)
	United Kingdom (England, Scotland, and Wales)	3.77% - <i>B. bufo</i> , <i>A. obstetricans</i> (Duffus; Nichols; Garner, 2014)
	Greece	0% - <i>B. bufo</i> , <i>B. variegata</i> , <i>R. dalmatina</i> , <i>B. viridis</i> , <i>Pelophylax</i> spp., <i>Pelobates</i> spp. (Strachinis et al., 2022)
	Poland	2.8% - <i>R. temporaria</i> , <i>Bombina</i> spp., <i>Pelophylax</i> spp. (Palomar et al., 2021)
	Slovenia	0% - <i>Bombina</i> spp., <i>Bufo</i> spp., <i>Rana</i> spp., <i>P. adspersus</i> , <i>T. resinifictrix</i> , <i>X. laevis</i> , <i>H. arborea</i> , <i>L. catesbeianus</i> , <i>P. fuscus</i> , <i>P. esculentus</i> (Kostanjšek et al., 2021)
	Hungary	9.6% - <i>B. bufo</i> , <i>P. ridibundus</i> (Vörös et al., 2020)
	The Netherlands	0.96% - <i>Pelophylax</i> spp., <i>B. bufo</i> (Sluijs et al., 2016)
	Russia	48.57% - <i>B. Bufo</i> (Reshetnikov et al., 2014)
	Sweden, Czech Republic, Slovakia, Poland, Germany, and Switzerland	47.2% - <i>P. esculentus</i> (Stöhr et al., 2013)
Asia	China	18.9% - <i>B. orientalis</i> , <i>X. laevis</i> (Kolby et al., 2014)
	South Korea	7.2% - <i>D. japonicus</i> , <i>P. nigromaculatus</i> , <i>L. catesbeianus</i> (Roh et al., 2022) 100% - <i>R. dybowskii</i> (Park et al., 2021)
	Taiwan	100% - <i>R. catesbeiana</i> (Hsieh; Rairat; Chou, 2021)
	Oman	34.8% - <i>D. dhufarensis</i> (Bates et al., 2023)
Oceania	Australia	2.7% - <i>Litoria nannotis</i> , <i>L. lorica</i> (Wynne, 2020)

In epidemiology, we use coefficients to measure events linked to the health-disease process. The prevalence coefficient, point prevalence, or simply prevalence, is one of the most widely used measures of disease frequency; it quantifies the proportion of individuals in a population who are affected by a disease at a given time. Wagner (1998) compares this indicator to a photo, which is static, being related to a point in time (even if the data collection took place over days, months or years). Hence, it is

important to measure the probability of morbid events (Merchán-Hamann et al., 2000) and assess the frequency of disease risk factors (Lima et al., 2018).

Regarding prevalence data, it is noteworthy that lower values do not necessarily imply a lower occurrence of infection compared to other cases. For instance, Miaud et al. (2016) described a ranavirus outbreak where hundreds of dead animals were observed in three lakes in the southeastern Alps. In that study, 21 animals were collected for the diagnostic test, and all tested positive. In contrast, Price et al. (2017) conducted a 25-year retrospective study evaluating the occurrence of infections in individuals from an archive. Although the number of positive animals detected was higher (87), the prevalence was low due to the large number of tested individuals.

Eradicating a disease that circulates among wild animals is quite difficult; therefore, prevention and risk analysis are necessary to avoid the spread of ranaviruses. Sainsbury and colleagues (Sainsbury et al., 2017) described their application within a program for the reintroduction of *Pelophylax lessonae* with a view to its conservation. In this sense, quarantine and testing of animals to be reintroduced into the wild is important to ensure that these animals do not introduce pathogens into the receiving environment, thus avoiding the origin of disease outbreaks.

4. Conclusions

Ranavirus infections are being documented with greater frequency; thus, preventive measures must be taken, especially regarding the impacts caused by humans. Moreover, there is a clear need for surveillance actions aimed at the conservation of endangered species, with the monitoring of emerging infectious diseases and immediate notification to national and international animal health agencies.

Data Availability Statement: All data generated or analyzed during this study are included in this published article.

Author Contributions: Conceptualization, JWPJ. and DdosSR; methodology, JWPJ; validation, RdeCCM, GJBdeM and RLMdeS; formal analysis, DdosSR; investigation, DdosSR; data curation, DdosSR; writing—original draft preparation, DdosSR; writing—review and editing, JWPJ, RdeCCM, GJBdeM and RLMdeS.; visualization, JWPJ, RdeCCM., GJBdeM and RLMdeS; supervision, JWPJ and RdeCCM. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

Funding: This research received no external funding.

References

- Akmentins, M. S., & Cardozo, D. E. (2010). American bullfrog *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802) invasion in Argentina. *Biological Invasions*, *12*(4), 735–737. <https://doi.org/10.1007/s10530-009-9515-3>
- Alroy, J. (2015). Current extinction rates of reptiles and amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*(42), 13003–13008. <https://doi.org/10.1073/pnas.1508681112>
- Bates, K. A., Friesen, J., Loyau, A., Butler, H., Vredenburg, V. T., Laufer, J., Chatzinotas, A., & Schmeller, D. S. (2023). Environmental and Anthropogenic Factors Shape the Skin Bacterial Communities of a Semi-Arid Amphibian Species. *Microbial Ecology*, *86*(2), 1393–1404. <https://doi.org/10.1007/s00248-022-02130-5>
- Bielby, J., Price, S. J., Monsalve-Carcaño, C., & Bosch, J. (2021). Host contribution to parasite persistence is consistent between parasites and over time, but varies spatially. *Ecological Applications*, *31*(3). <https://doi.org/10.1002/eap.2256>
- Bienentreu, J.-F., Schock, D. M., Greer, A. L., & Lesbarrères, D. (2022). Ranavirus Amplification in Low-Diversity Amphibian Communities. *Frontiers in Veterinary Science*, *9*. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.755426>

- Black, Y., Meredith, A., & Price, S. J. (2017). Detection and reporting of ranavirus in amphibians: evaluation of the roles of the world organisation for animal health and the published literature. *Journal of Wildlife Diseases*, 53(3), 509–520. <https://doi.org/10.7589/2016-08-176>
- Bosch, J., Mora-Cabello de Alba, A., Marquínez, S., Price, S. J., Thumsová, B., & Bielby, J. (2021). Long-Term Monitoring of Amphibian Populations of a National Park in Northern Spain Reveals Negative Persisting Effects of Ranavirus, but not *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Frontiers in Veterinary Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.645491>
- Both, C., Lingnau, R., Santos-Jr, A., Madalozzo, B., Lima, L. P., & Grant, T. (2011). Widespread Occurrence of the American Bullfrog, *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802) (Anura: Ranidae), in Brazil. *South American Journal of Herpetology*, 6(2), 127–134. <https://doi.org/10.2994/057.006.0203>
- Box, E. K., Cleveland, C. A., Subramaniam, K., Waltzek, T. B., & Yabsley, M. J. (2021). Molecular Confirmation of Ranavirus Infection in Amphibians from Chad, Africa. *Frontiers in Veterinary Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.733939>
- Brenes, R., Gray, M. J., Waltzek, T. B., Wilkes, R. P., & Miller, D. L. (2014). Transmission of Ranavirus between Ectothermic Vertebrate Hosts. *PLoS ONE*, 9(3), e92476. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092476>
- Brunner, J., Olson, A., Rice, J., Meiners, S., Le Sage, M., Cundiff, J., Goldberg, C., & Pessier, A. (2019). Ranavirus infection dynamics and shedding in American bullfrogs: consequences for spread and detection in trade. *Diseases of Aquatic Organisms*, 135(2), 135–150. <https://doi.org/10.3354/dao03387>
- Bryan, L., Baldwin, C., Gray, M., & Miller, D. (2009). Efficacy of select disinfectants at inactivating Ranavirus. *Diseases of Aquatic Organisms*, 84, 89–94. <https://doi.org/10.3354/dao02036>
- Chinchar, V. G., Hick, P., Ince, I. A., Jancovich, J. K., Marschang, R., Qin, Q., Subramaniam, K., Waltzek, T. B., Whittington, R., Williams, T., & Zhang, Q. Y. (2017). ICTV virus taxonomy profile: Iridoviridae. *Journal of General Virology*, 98(5), 890–891. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000818>
- Crespi, E. J., Rissler, L. J., Mattheus, N. M., Engbrecht, K., Duncan, S. I., Seaborn, T., Hall, E. M., Peterson, J. D., & Brunner, J. L. (2015). Geophysiology of Wood Frogs: Landscape Patterns of Prevalence of Disease and Circulating Hormone Concentrations across the Eastern Range. *Integrative and Comparative Biology*, 55(4), 602–617. <https://doi.org/10.1093/icb/icc096>
- Cunningham, A. A., Hyatt, A. D., Russell, P., & Bennett, P. M. (2007). Experimental transmission of a ranavirus disease of common toads (*Bufo bufo*) to common frogs (*Rana temporaria*). *Epidemiology and Infection*, 135(7), 1213–1216. <https://doi.org/10.1017/S0950268807007935>
- Currylow, A. F., Johnson, A. J., & Williams, R. N. (2014). Evidence of ranavirus infections among sympatric larval amphibians and box turtles. *Journal of Herpetology*, 48(1), 117–121. <https://doi.org/10.1670/12-235>
- D'Aoust-Messier, A., Echaubard, P., Billy, V., & Lesbarrères, D. (2015). Amphibian pathogens at northern latitudes: presence of chytrid fungus and ranavirus in northeastern Canada. *Diseases of Aquatic Organisms*, 113(2), 149–155. <https://doi.org/10.3354/dao02837>
- Daszak, P., Cunningham, A. A., & Hyatt, A. D. (2003). Infectious disease and amphibian population declines. In *Diversity and Distributions* (Vol. 9, Issue 2, pp. 141–150). <https://doi.org/10.1046/j.1472-4642.2003.00016.x>
- Davis, D. R., Farkas, J. K., Kruisselbrink, T. R., Watters, J. L., Ellsworth, E. D., Kerby, J. L., & Siler, C. D. (2019). Prevalence and distribution of ranavirus in amphibians from southeastern Oklahoma, USA. In *Herpetological Conservation and Biology* (Vol. 14, Issue 2). www.wildlifedepartment.com/CWCS.htm
- De, E., Leite, L., Santi, M., & Corrêa, A. C. (2018). Mata Atlântica: a sobrevivência dos anfíbios. Atlantic forest: the survival of the amphibians. *FESPPR Publica*.
- Duffus, A. L. J., Nichols, R. A., & Garner, T. W. J. (2014). Detection of a Frog Virus 3-like Ranavirus in Native and Introduced Amphibians in the United Kingdom in 2007 and 2008. *Herpetological Review*, 45(4), 608–610.
- DUFFUS, A. L. J., WALTZEK, T. B., STÖHR, A. C., ALLENDER, A. M., GOTESMAN, M., WHITTINGTON, R. J., HICK, P., HINES, M. K., & MARSCHANG, R. E. (2015). Distribution and Host Range of Ranaviruses. In M. J.; GRAY & V. G. CHINCHAR (Eds.), *Ranaviruses Lethal Pathogens of Ectothermic Vertebrates* (pp. 9–57). Springer.

- Earl, J. E., Chaney, J. C., Sutton, W. B., Lillard, C. E., Kouba, A. J., Langhorne, C., Krebs, J., Wilkes, R. P., Hill, R. D., Miller, D. L., & Gray, M. J. (2016). Ranavirus could facilitate local extinction of rare amphibian species. *Oecologia*, *182*(2), 611–623. <https://doi.org/10.1007/s00442-016-3682-6>
- Eustace, R., Wack, A., Mangus, L., & Bronson, E. (2018). Causes of mortality in captive panamanian Golden frogs (*Atelopus zeteki*) at the Maryland zoo in Baltimore, 2001–2013. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, *49*(2), 324–334. <https://doi.org/10.1638/2016-0250.1>
- Ford, C. E., Brookes, L. M., Skelly, E., Sergeant, C., Jordine, T., Balloux, F., Nichols, R. A., & Garner, T. W. J. (2022). Non-Lethal Detection of Frog Virus 3-Like (RUK13) and Common Midwife Toad Virus-Like (PDE18) Ranaviruses in Two UK-Native Amphibian Species. *Viruses*, *14*(12). <https://doi.org/10.3390/v14122635>
- Forzán, M., Bienentreu, J., Schock, D., & Lesbarrères, D. (2019). Multi-tool diagnosis of an outbreak of ranaviruses in amphibian tadpoles in the Canadian boreal forest. *Diseases of Aquatic Organisms*, *135*(1), 33–41. <https://doi.org/10.3354/dao03369>
- Forzán, M. J., Jones, K. M., Ariel, E., Whittington, R. J., Wood, J., Markham, R. J. F., & Daoust, P. Y. (2017). Pathogenesis of Frog Virus 3 (Ranavirus, *Iridoviridae*) Infection in Wood Frogs (*Rana sylvatica*). *Veterinary Pathology*, *54*(3), 531–548. <https://doi.org/10.1177/0300985816684929>
- Forzán, M. J., Jones, K. M., Vanderstichel, R. V., Wood, J., Kibenge, F. S. B., Kuiken, T., Wirth, W., Ariel, E., & Daoust, P.-Y. (2015). Clinical signs, pathology and dose-dependent survival of adult wood frogs, *Rana sylvatica*, inoculated orally with frog virus 3 Ranavirus sp., *Iridoviridae*. *Journal of General Virology*, *96*(5), 1138–1149. <https://doi.org/10.1099/vir.0.000043>
- 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*(4), 879–886. <https://doi.org/10.7589/2013-03-051>
- Frost, D. (n.d.). *Amphibian Species of the World 6.1*. American Museum of Natural History. Retrieved January 31, 2021, from <https://amphibiansoftheworld.amnh.org/>
- Galt, N., Atkinson, M., Glorioso, B. M., Hardin Waddle, J., Litton, M., & Savage, A. (2021). Widespread ranavirus and perkinsea infections in Cuban treefrogs (*Osteopilus septentrionalis*) invading New Orleans, USA. In *Herpetological Conservation and Biology* (Vol. 16, Issue 1).
- Goodman, R. M., Tyler, J. A., Reinartz, D. M., & Wright, A. N. (2019). Survey of Ranavirus and *Batrachochytrium dendrobatidis* in Introduced Frogs in Hawaii, USA. *Journal of Wildlife Diseases*, *55*(3), 668. <https://doi.org/10.7589/2018-05-137>
- Grant, S., Bienentreu, J., Vilaça, S., Brunetti, C., Lesbarrères, D., Murray, D., & Kyle, aCJ. (2019). Low intraspecific variation of Frog virus 3 with evidence for novel FV3-like isolates in central and northwestern Canada. *Diseases of Aquatic Organisms*, *134*(1), 1–13. <https://doi.org/10.3354/dao03354>
- Gray, M. J., & Miller, D. L. (2013). The Rise of Ranavirus. *The Wildlife Society*, 51–55. www.wildlife.org
- Gray, M., Miller, D., & Hoverman, J. (2012). Reliability of non-lethal surveillance methods for detecting ranavirus infection. *Diseases of Aquatic Organisms*, *99*(1), 1–6. <https://doi.org/10.3354/dao02436>
- Hall, E. M., Brunner, J. L., Hutzenbiler, B., & Crespi, E. J. (2020). Salinity stress increases the severity of ranavirus epidemics in amphibian populations. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *287*(1926). <https://doi.org/10.1098/rspb.2020.0062>
- Hall, E. M., Goldberg, C. S., Brunner, J. L., & Crespi, E. J. (2018). Seasonal dynamics and potential drivers of ranavirus epidemics in wood frog populations. *Oecologia*, *188*(4), 1253–1262. <https://doi.org/10.1007/s00442-018-4274-4>
- Harp, E. M., & Petranksa, J. W. (2006). Ranavirus in Wood frogs (*Rana sylvatica*): potential sources of transmission within and between ponds. *Journal of Wildlife Diseases*, *42*(2), 307–318. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-42.2.307>
- Hartmann, A. M.; M. M. L.; O. R. J.; L. A. V. (2022). Sustained ranavirus outbreak causes mass mortality and morbidity of imperiled amphibians in Florida. *EcoHealth*, 1–7.

- Horner, A. A., Hoffman, E. A., Tye, M. R., Hether, T. D., & Savage, A. E. (2017). Cryptic chytridiomycosis linked to climate and genetic variation in amphibian populations of the southeastern United States. *PLOS ONE*, *12*(4), e0175843. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175843>
- Hsieh, C.-Y., Rairat, T., & Chou, C.-C. (2021). Detection of Ranavirus by PCR and in situ hybridization in the American bullfrog (*Rana catesbeiana*) in Taiwan. *Aquaculture*, *543*, 736955. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736955>
- International Union for Conservation of Nature. (n.d.). *The IUCN Red list of threatened species*. Version 2023-1. Retrieved November 13, 2023, from <https://www.iucnredlist.org>
- Jacinto-Maldonado, M., García-Peña, G. E., Paredes-León, R., Saucedo, B., Sarmiento-Silva, R. E., García, A., Martínez-Gómez, D., Ojeda, M., Del Callejo, E., & Suzán, G. (2020). Chiggers (Acariformes: Trombiculoidea) do not increase rates of infection by *Batrachochytrium dendrobatidis* fungus in the endemic Dwarf Mexican Treefrog *Tlalocohyla smithii* (Anura: *Hylidae*). *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, *11*, 163–173. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2019.12.005>
- Jancovich, J. K., Chinchar, V. G., Hyatt, A., Miyazaki, T., Williams, T., & Zhang, Q. Y. (2011). *ICTV Report Chapters: Iridoviridae - Subfamily Alphairidovirinae (Genus: Ranavirus)*. Ninth ICTV Report. https://ictv.global/report_9th/dsDNA/Iridoviridae
- Jorgewich-Cohen, G., Toledo, L. F., & Grant, T. (2022). Genetic structure of American bullfrog populations in Brazil. *Scientific Reports*, *12*(1), 9927. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-13870-2>
- Julian, J. T., Brooks, R. P., Glenney, G. W., & Coll, J. A. (2019). State-wide Survey of amphibian pathogens in green frog (*Lithobates clamitans melanota*) reveals high Chytrid infection intensities in Constructed wetlands. In *Herpetological Conservation and Biology* (Vol. 14, Issue 1). <https://riparia>.
- Karwacki, E. E., Martin, K. R., & Savage, A. E. (2021). One hundred years of infection with three global pathogens in frog populations of Florida, USA. *Biological Conservation*, *257*, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2021.109088>
- Kolby, J. E., Smith, K. M., Berger, L., Karesh, W. B., Preston, A., Pessier, A. P., & Skerratt, L. F. (2014). First Evidence of Amphibian Chytrid Fungus (*Batrachochytrium dendrobatidis*) and Ranavirus in Hong Kong Amphibian Trade. *PLoS ONE*, *9*(3), e90750. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090750>
- Kolby, J. E., Smith, K. M., Ramirez, S. D., Rabemananjara, F., Pessier, A. P., Brunner, J. L., Goldberg, C. S., Berger, L., & Skerratt, L. F. (2015). Rapid Response to Evaluate the Presence of Amphibian Chytrid Fungus (*Batrachochytrium dendrobatidis*) and Ranavirus in Wild Amphibian Populations in Madagascar. *PLOS ONE*, *10*(6), e0125330. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125330>
- Kostanjšek, R., Turk, M., Vek, M., Gutiérrez-Aguirre, I., & Cimerman, N. G. (2021). First screening for *Batrachochytrium dendrobatidis*, *B. salamandrivorans* and Ranavirus infections in wild and captive amphibians in Slovenia. *Salamandra*, *57*(1), 162–166. <http://www.salamandra-journal.com>
- Kraus, F. (2015). Impacts from Invasive Reptiles and Amphibians. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, *46*, 75–97. <https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-112414-054450>
- Kwon, S., Park, J., Choi, W.-J., Koo, K.-S., Lee, J.-G., & Park, D. (2017). First case of ranavirus-associated mass mortality in a natural population of the Huanren frog (*Rana huanrenensis*) tadpoles in South Korea. *Animal Cells and Systems*, *21*(5), 358–364. <https://doi.org/10.1080/19768354.2017.1376706>
- Landsberg, J., Kiryu, Y., Tabuchi, M., Waltzek, T., Enge, K., Reintjes-Tolen, S., Preston, A., & Pessier, A. (2013). Co-infection by alveolate parasites and frog virus 3-like ranavirus during an amphibian larval mortality event in Florida, USA. *Diseases of Aquatic Organisms*, *105*(2), 89–99. <https://doi.org/10.3354/dao02625>
- Latney, L. V., & Klaphake, E. (2013). Selected Emerging Diseases of Amphibia. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, *16*(2), 283–301. <https://doi.org/10.1016/j.cvex.2013.01.005>
- Laufer, G., Canavero, A., Núñez, D., & Maneyro, R. (2008). Bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) invasion in Uruguay. *Biological Invasions*, *10*(7), 1183–1189. <https://doi.org/10.1007/s10530-007-9178-x>
- Lima, J. R. C., Pordeu, J. M. C., & Rouquayrol, M. Z. (2018). Medida da Saúde Coletiva. In M. Z. Rouquayrol & M. G. C. Silva (Eds.), *Epidemiologia e Saúde* (8 ed., pp. 108–200). Medbook.

- Love, C., Winzeler, M., Beasley, R., Scott, D., Nunziata, S., & Lance, S. (2016). Patterns of amphibian infection prevalence across wetlands on the Savannah River Site, South Carolina, USA. *Diseases of Aquatic Organisms*, *121*(1), 1–14. <https://doi.org/10.3354/dao03039>
- MACLACHLAN, N. J., & DUBOVI, E. J. (2016). Asfarviridae and Iridoviridae. In N. J. MACLACHLAN & DUBOVI E. J (Eds.), *Fenner's Veterinary Virology* (5th ed., pp. 175–188). Elsevier.
- Merchán-Hamann, E., Tauil, P. L., & Costa, M. P. (2000). Terminologia das medidas e indicadores em epidemiologia: Subsídios para uma possível padronização da nomenclatura. *Informe Epidemiológico Do Sus*, *9*(4). <https://doi.org/10.5123/S0104-16732000000400006>
- Miaud, C., Arnal, V., Poulain, M., Valentini, A., & Dejean, T. (2019). eDNA Increases the detectability of ranavirus infection in an Alpine amphibian population. *Viruses*, *11*(6), 526. <https://doi.org/10.3390/v11060526>
- Miaud, C., Pozet, F., Gaudin, N. C. G., Martel, A., Pasmans, F., & Labrut, S. (2016). *Ranavirus* causes mass die-offs of alpine amphibians in the southwestern Alps, France. *Journal of Wildlife Diseases*, *52*(2), 242–252. <https://doi.org/10.7589/2015-05-113>
- Miller, D. L., Rajeev, S., Gray, M. J., & Baldwin, C. A. (2007). Frog virus 3 infection, cultured American bullfrogs. *Emerging Infectious Diseases*, *13*(2), 342–343. <https://doi.org/10.3201/eid1302.061073>
- Morales, H. D., Abramowitz, L., Gertz, J., Sowa, J., Vogel, A., & Robert, J. (2010). Innate Immune Responses and Permissiveness to Ranavirus Infection of Peritoneal Leukocytes in the Frog *Xenopus laevis*. *Journal of Virology*, *84*(10), 4912–4922. <https://doi.org/10.1128/jvi.02486-09>
- Munro, J., Bayley, A. E., McPherson, N. J., & Feist, S. W. (2016). Survival of Frog Virus 3 in Freshwater and Sediment from an English Lake. *Journal of Wildlife Diseases*, *52*(1), 138–142. <https://doi.org/10.7589/2015-02-033>
- Nazir, J., Spengler, M., & Marschang, R. (2012). Environmental persistence of amphibian and reptilian ranaviruses. *Diseases of Aquatic Organisms*, *98*(3), 177–184. <https://doi.org/10.3354/dao02443>
- Oliveira, C. R., Alfaia, S. R., Ikari, F. L., Tavares, L. S., Sousa, R. L. M. de, Harakava, R., & Ferreira, C. M. (2020). Detection and molecular characterization of Frog virus 3 in bullfrogs from frog farms in Brazil. *Aquaculture*, *516*, 734575. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734575>
- Olori, J., Netzband, R., McKean, N., Lowery, J., Parsons, K., & Windstam, S. (2018). Multi-year dynamics of ranavirus, chytridiomycosis, and co-infections in a temperate host assemblage of amphibians. *Diseases of Aquatic Organisms*, *130*(3), 187–197. <https://doi.org/10.3354/dao03260>
- Palomar, G., Jakóbk, J., Bosch, J., Kolenda, K., Kaczmarek, M., Joško, P., Roces-Díaz, J., Stachyra, P., Thumsová, B., Zieliński, P., & Pabijan, M. (2021). Emerging infectious diseases of amphibians in Poland: distribution and environmental drivers. *Diseases of Aquatic Organisms*, *147*, 1–12. <https://doi.org/10.3354/dao03631>
- Park, J., Grajal-Puche, A., Roh, N.-H., Park, I.-K., Ra, N.-Y., & Park, D. (2021). First detection of ranavirus in a wild population of Dybowski's brown frog (*Rana dybowskii*) in South Korea. *Journal of Ecology and Environment*, *45*(1), 2. <https://doi.org/10.1186/s41610-020-00179-2>
- PICCO, A. M., & COLLINS, J. P. (2008). Amphibian Commerce as a Likely Source of Pathogen Pollution. *Conservation Biology*, *22*(6), 1582–1589. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2008.01025.x>
- Price, S. J., Garner, T. W. J., Nichols, R. A., Balloux, F., Ayres, C., Mora-Cabello de Alba, A., & Bosch, J. (2014). Collapse of Amphibian Communities Due to an Introduced Ranavirus. *Current Biology*, *24*(21), 2586–2591. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.09.028>
- Price, S. J., Wadia, A., Wright, O. N., Leung, W. T. M., Cunningham, A. A., & Lawson, B. (2017). Screening of a long-term sample set reveals two Ranavirus lineages in British herpetofauna. *PLOS ONE*, *12*(9), e0184768. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184768>
- Puschendorf, R., Wallace, M., Chavarría, M. M., Crawford, A. J., Wynne, F., Knight, M., Janzen, D. H., Hallwachs, W., Palmer, C. V., & Price, S. J. (2019). Cryptic diversity and ranavirus infection of a critically endangered Neotropical frog before and after population collapse. *Animal Conservation*, *22*(5), 515–524. <https://doi.org/10.1111/acv.12498>

- Reshetnikov, A., Chestnut, T., Brunner, J., Charles, K., Nebergall, E., & Olson, D. (2014). Detection of the emerging amphibian pathogens *Batrachochytrium dendrobatidis* and ranavirus in Russia. *Diseases of Aquatic Organisms*, *110*(3), 235–240. <https://doi.org/10.3354/dao02757>
- Richter, S. C., Drayer, A. N., Strong, J. R., & Cross, C. S. (2013). High prevalence of ranavirus infection in permanent constructed wetlands in eastern Kentucky, USA. *Herpetological Review*, *44*(3), 464–466.
- Rivera, B., Cook, K., Andrews, K., Atkinson, M. S., & Savage, A. E. (2019). Pathogen Dynamics in an Invasive Frog Compared to Native Species. *EcoHealth*, *16*(2), 222–234. <https://doi.org/10.1007/s10393-019-01432-4>
- Roh, N., Park, J., Kim, J., Kwon, H., & Park, D. (2022). Prevalence of Ranavirus Infection in Three Anuran Species across South Korea. *Viruses*, *14*(5), 1073. <https://doi.org/10.3390/v14051073>
- Rosa, G. M., Sabino-Pinto, J., Laurentino, T. G., Martel, A., Pasmans, F., Rebelo, R., Griffiths, R. A., Stöhr, A. C., Marschang, R. E., Price, S. J., Garner, T. W. J., & Bosch, J. (2017). Impact of asynchronous emergence of two lethal pathogens on amphibian assemblages. *Scientific Reports*, *7*(1), 43260. <https://doi.org/10.1038/srep43260>
- Rothermel, B., Miller, D., Travis, E., Gonyorn McGuire, J., Jensen, J., & Yabsley, M. (2016). Disease dynamics of red-spotted newts and their anuran prey in a montane pond community. *Diseases of Aquatic Organisms*, *118*(2), 113–127. <https://doi.org/10.3354/dao02965>
- Ruggeri, J., Ribeiro, L. P., Pontes, M. R., Toffolo, C., Candido, M., Carriero, M. M., Zanella, N., Sousa, R. L. M., & Toledo, L. F. (2019). Discovery of Wild Amphibians Infected with Ranavirus in Brazil. *Journal of Wildlife Diseases*, *55*(4), 897. <https://doi.org/10.7589/2018-09-224>
- Sainsbury, A. W., Yu-Mei, R., Ågren, E., Vaughan-Higgins, R. J., McGill, I. S., Molenaar, F., Peniche, G., & Foster, J. (2017). Disease Risk Analysis and Post-Release Health Surveillance for a Reintroduction Programme: the Pool Frog *Pelophylax lessonae*. *Transboundary and Emerging Diseases*, *64*(5), 1530–1548. <https://doi.org/10.1111/tbed.12545>
- Savage, A. E., Muletz-Wolz, C. R., Campbell Grant, E. H., Fleischer, R. C., & Mulder, K. P. (2019). Functional variation at an expressed MHC class II β locus associates with Ranavirus infection intensity in larval anuran populations. *Immunogenetics*, *71*(4), 335–346. <https://doi.org/10.1007/s00251-019-01104-1>
- Schock, D. M., Bollinger, T. K., Gregory Chinchar, V., Jancovich, J. K., & Collins, J. P. (2008). Experimental Evidence that Amphibian Ranaviruses Are Multi-Host Pathogens. *Copeia*, *2008*(1), 133–143. <https://doi.org/10.1643/CP-06-134>
- Sewell, T. R., Longcore, J., & Fisher, M. C. (2021). *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Trends in Parasitology*, *37*(10), 933–934. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2021.04.014>
- Sluijs, A. S. der, van den Broek, J., Kik, M., Martel, A., Janse, J., van Asten, F., Pasmans, F., Gröne, A., & Rijks, J. M. (2016). Monitoring ranavirus-associated mortality in a Dutch heathland in the aftermath of a ranavirus disease outbreak. *Journal of Wildlife Diseases*, *52*(4), 817. <https://doi.org/10.7589/2015-04-104>
- Soto-Azat, C., Peñafiel-Ricaurte, A., Price, S. J., Sallaberry-Pincheira, N., García, M. P., Alvarado-Rybak, M., & Cunningham, A. A. (2016). *Xenopus laevis* and Emerging Amphibian Pathogens in Chile. *EcoHealth*, *13*(4), 775–783. <https://doi.org/10.1007/s10393-016-1186-9>
- Standish, I., Leis, E., Schmitz, N., Credico, J., Erickson, S., Bailey, J., Kerby, J., Phillips, K., & Lewis, T. (2018). Optimizing, validating, and field testing a multiplex qPCR for the detection of amphibian pathogens. *Diseases of Aquatic Organisms*, *129*(1), 1–13. <https://doi.org/10.3354/dao03230>
- Stöhr, A. C., Hoffmann, A., Papp, T., Robert, N., Pruvost, N. B. M., Reyer, H.-U., & Marschang, R. E. (2013). Long-term study of an infection with ranaviruses in a group of edible frogs (*Pelophylax kl. esculentus*) and partial characterization of two viruses based on four genomic regions. *The Veterinary Journal*, *197*(2), 238–244. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.02.014>
- Strachinis, I., Marschang, R., Lymberakis, P., Karagianni, K., & Azmanis, P. (2022). Infectious disease threats to amphibians in Greece: new localities positive for *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of Aquatic Organisms*, *152*, 127–138. <https://doi.org/10.3354/dao03712>
- Talbott, K., Wolf, T., Sebastian, P., Abraham, M., Bueno, I., McLaughlin, M., Harris, T., Thompson, R., Pessier, A., & Travis, D. (2018). Factors influencing detection and co-detection of Ranavirus and *Batrachochytrium dendrobatidis* in

Midwestern North American anuran populations. *Diseases of Aquatic Organisms*, 128(2), 93–103. <https://doi.org/10.3354/dao03217>

The State of World Fisheries and Aquaculture 2022. (2022). FAO. <https://doi.org/10.4060/cc0461en>

Thumsová, B., Price, S. J., González-Cascón, V., Vörös, J., Martínez-Silvestre, A., Rosa, G. M., Machordom, A., & Bosch, J. (2022). Climate warming triggers the emergence of native viruses in Iberian amphibians. *iScience*, 25(12), 105541. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.105541>

Titus, V. R., & Green, T. M. (2013). Presence of ranavirus in green frogs and eastern tiger salamanders on Long Island, New York. *Herpetological Review*, 44(2), 266–267.

Tornabene, B., Crespi, E., Traversari, B., Stemp, K., Breuner, C., Goldberg, C., & Hossack, B. (2021). Low occurrence of ranavirus in the Prairie Pothole Region of Montana and North Dakota (USA) contrasts with prior surveys. *Diseases of Aquatic Organisms*, 147, 149–154. <https://doi.org/10.3354/dao03640>

Tornabene, B. J., Blaustein, A. R., Briggs, C. J., Calhoun, D. M., Johnson, P. T. J., McDevitt-Galles, T., Rohr, J. R., & Hoverman, J. T. (2018). The influence of landscape and environmental factors on ranavirus epidemiology in a California amphibian assemblage. *Freshwater Biology*, 63(7), 639–651. <https://doi.org/10.1111/fwb.13100>

Urgiles, V. L., Ramírez, E. R., Villalta, C. I., Siddons, D. C., & Savage, A. E. (2021). Three Pathogens Impact Terrestrial Frogs from a High-Elevation Tropical Hotspot. *EcoHealth*, 18(4), 451–464. <https://doi.org/10.1007/s10393-021-01570-8>

von Essen, M., Leung, W. T. M., Bosch, J., Pooley, S., Ayres, C., & Price, S. J. (2020). High pathogen prevalence in an amphibian and reptile assemblage at a site with risk factors for dispersal in Galicia, Spain. *PLOS ONE*, 15(7), e0236803. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0236803>

Vörös, J., Herczeg, D., Papp, T., Monsalve-Carcaño, C., & Bosch, J. (2020). First detection of Ranavirus infection in amphibians in Hungary. *Herpetology Notes*, 13, 213–217.

Wagner, M. B. (1998). Medindo a ocorrência da doença: prevalência ou incidência? *Jornal de Pediatria*, 74, 157–162.

Warne, R. W., LaBumbard, B., LaGrange, S., Vredenburg, V. T., & Catenazzi, A. (2016). Co-Infection by Chytrid Fungus and Ranaviruses in Wild and Harvested Frogs in the Tropical Andes. *PLOS ONE*, 11(1), e0145864. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145864>

Watters, J. L., Davis, D. R., Yuri, T., & Siler, C. D. (2018). Concurrent Infection of *Batrachochytrium dendrobatidis* and Ranavirus among Native Amphibians from Northeastern Oklahoma, USA. *Journal of Aquatic Animal Health*, 30(4), 291–301. <https://doi.org/10.1002/aah.10041>

Wheelwright, N. T., Gray, M. J., Hill, R. D., & Miller, D. L. (2014). Sudden mass die-off of a large population of wood frog (*Lithobates sylvaticus*) tadpoles in Maine, USA, likely due to ranavirus. *Herpetological Review*, 45(2), 240–242.

Whitfield, S., Alvarado-Barboza, G., Abarca, J., Zumbado-Ulate, H., Jimenez, R., & Kerby, J. (2021). Ranavirus is widespread in Costa Rica and co-occurs with threatened amphibians. *Diseases of Aquatic Organisms*, 144, 89–98. <https://doi.org/10.3354/dao03576>

Whitfield, S., Geerdes, E., Chacon, I., Ballester Rodriguez, E., Jimenez, R., Donnelly, M., & Kerby, J. (2013). Infection and co-infection by the amphibian chytrid fungus and ranavirus in wild Costa Rican frogs. *Diseases of Aquatic Organisms*, 104(2), 173–178. <https://doi.org/10.3354/dao02598>

Wirth, W., Lesbarrères, D., & Ariel, E. (2021). Ten years of ranavirus research (2010–2019): an analysis of global research trends. *FACETS*, 6(1), 44–57. <https://doi.org/10.1139/facets-2020-0030>

World Organisation for Animal Health. (2010). Infection with Ranavirus. In *Aquatic Animal Health Code* (13th ed.). WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH.

Wynne, F. J. (2020). Detection of ranavirus in endemic and threatened amphibian populations of the Australian Wet Tropics Region. *Pacific Conservation Biology*, 26(1), 93. <https://doi.org/10.1071/PC19009>

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ranavírus são patógenos de grande relevância para a saúde animal, e apesar dos grandes esforços em pesquisar, documentar e compreender a dinâmica da relação patógeno-hospedeiro, ainda existem questões a serem esclarecidas. Levando em consideração a dimensão continental do país, são necessários novos estudos em toda a área do território. Espera-se, portanto, incentivar a realização de novas pesquisas em outros estados do Brasil, de forma a ampliar o conhecimento da distribuição e impactos do ranavírus na herpetofauna brasileira.

ANEXO I

Autorização da Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa (CEUA – UFRPE) para a realização da pesquisa.



UNIVERSIDADE
FEDERAL RURAL
DE PERNAMBUCO

Universidade Federal Rural de Pernambuco

Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Estudo epidemiológico de ranaviruses em anuros procedentes de ambientes naturais no estado de Pernambuco, Brasil", protocolada sob o CEUA nº 3987250521 (ID 000814), sob a responsabilidade de **José Wilton Pinheiro Junior** e equipe; *Rita de Cássia Carvalho Maia; Geraldo Jorge Barbosa de Moura; Sérgio Alves do Nascimento; Marcos Antônio Barbosa de Lima; Ricardo Luiz Moro de Sousa; Maria Inês Maria Silva; Davi dos Santos Rodrigues; Bárbara Ferreira de Almeida; ALEXANDRE PEREIRA DANTAS* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural de Pernambuco (CEUA/UFRPE) na reunião de 08/09/2021.

We certify that the proposal "Epidemiological study of ranaviruses in anurans from natural environments in the state of Pernambuco, Brazil", utilizing 50 Amphibians (males and females), protocol number CEUA 3987250521 (ID 000814), under the responsibility of **José Wilton Pinheiro Junior** and team; *Rita de Cássia Carvalho Maia; Geraldo Jorge Barbosa de Moura; Sérgio Alves do Nascimento; Marcos Antônio Barbosa de Lima; Ricardo Luiz Moro de Sousa; Maria Inês Maria Silva; Davi dos Santos Rodrigues; Bárbara Ferreira de Almeida; ALEXANDRE PEREIRA DANTAS* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethic Committee on Animal Use of the Rural Federal University of Pernambuco (CEUA/UFRPE) in the meeting of 09/08/2021.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: de 10/2021 a 07/2023 Área: Medicina Veterinária

Origem: Não aplicável biotério

Espécie: Anfíbios

sexo: Machos e Fêmeas

idade: 1 a 2 anos

Quantidade: 50

Linhagem: Espécies citadas no delineamento

Peso: 10 a 100 g

Recife, 03 de janeiro de 2024

Prof. Dr. Carlos Fernando Rodrigues Guaraná
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof. Dr. Francisco de Assis Leite Souza
Vice-Cordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal Rural de Pernambuco



ANEXO II

Autorização do Instituto Chico Mendes para a Conservação da Biodiversidade (ICMBio), por meio do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade – Sisbio, para a realização da pesquisa.



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 78540-5	Data da Emissão: 02/09/2022 18:17:24	Data da Revalidação*: 01/07/2023
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		
Dados do titular		
Nome: DAVI DOS SANTOS RODRIGUES	CPF: 103.040.774-61	
Título do Projeto: Estudo epidemiológico de ranavírus em anuros procedentes de ambientes naturais no estado de Pernambuco, Brasil		
Nome da Instituição: Universidade Federal Rural de Pernambuco	CNPJ: 24.416.174/0001-06	

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coletas/transporte	10/2021	07/2023

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Nacionalidade
1	José Wilton Pinheiro Junior	Coordenador	032.038.534-50	Brasileira
2	RITA DE CASSIA CARVALHO MAIA	Coordenador	895.069.104-30	Brasileira
3	gerald jorge barbosa de moura	Coordenador	856.532.174-68	Brasileira
4	Marcos Antonio Barbosa de Lima	colaborador	802.032.564-68	Brasileira
5	Ricardo Luiz Moro de Sousa	colaborador	199.579.038-96	Brasileira
6	Alexandre Pereira Dantas	colaborador	016.830.364-76	Brasileira

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0785400520220902

Página 1/5



Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 78540-5	Data da Emissão: 02/09/2022 18:17:24	Data da Revalidação*: 01/07/2023
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: DAVI DOS SANTOS RODRIGUES	CPF: 103.040.774-61
Título do Projeto: Estudo epidemiológico de ranavírus em anuros procedentes de ambientes naturais no estado de Pernambuco, Brasil	
Nome da Instituição: Universidade Federal Rural de Pernambuco	CNPJ: 24.416.174/0001-06

Observações e ressalvas

1	A autorização não eximirá o pesquisador da necessidade de obter outras anuências, como: I) do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador quando as atividades forem realizadas em área de domínio privado ou dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso; II) da comunidade indígena envolvida, ouvido o órgão indigenista oficial, quando as atividades de pesquisa forem executadas em terra indígena; III) do Conselho de Defesa Nacional, quando as atividades de pesquisa forem executadas em área indigenável à segurança nacional; IV) da autoridade marítima, quando as atividades de pesquisa forem executadas em águas jurisdicionais brasileiras; V) do Departamento Nacional de Produção Mineral, quando a pesquisa visar a exploração de depósitos fossilíferos ou a extração de espécimes fósseis; VI) do órgão gestor de unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, dentre outras.
2	Deve-se observar as recomendações de prevenção contra o COVID-19 das autoridades sanitárias locais e das Unidades de Conservação a serem acessadas.
3	Esta autorização NÃO libera o uso de substância com potencial agrotóxico e/ou inseticida e NÃO isenta o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de atender às exigências e obter as autorizações previstas em outros instrumentos legais relativos ao registro de agrotóxicos (Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002, entre outros).
4	Esta autorização NÃO libera o uso de substância com potencial agrotóxico e/ou inseticida e NÃO isenta o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de atender às exigências e obter as autorizações previstas em outros instrumentos legais relativos ao registro de agrotóxicos (Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002, entre outros).
5	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
6	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério da Ciência e Tecnologia.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/icgen .
8	O titular de licença ou autorização e os membros de sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição <i>in situ</i> .
9	Esta autorização NÃO isenta o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
10	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infraestrutura da unidade.
11	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando de violação da legislação vigente, ou quando de inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiarem a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0785400520220902

Página 2/5



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 78540-S	Data da Emissão: 02/09/2022 18:17:24	Data da Revalidação*: 01/07/2023
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: DAVI DOS SANTOS RODRIGUES	CPF: 103.040.774-61
Título do Projeto: Estudo epidemiológico de ranaviruses em anuros procedentes de ambientes naturais no estado de Pernambuco, Brasil	
Nome da Instituição: Universidade Federal Rural de Pernambuco	CNPJ: 24.416.174/0001-06

Outras ressalvas

1	RAN Galinha-GO
---	----------------

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Descrição do local	Município-UF	Bioma	Caverna?	Tipo
1	Unidade de Conservação de Proteção Integral Estadual Mata do Tapacurá	São Lourenço da Mata-PE	Mata Atlântica	Não	Fora de UC Federal

Atividades

#	Atividade	Grupo de Atividade
1	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Fora de UC Federal
2	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Fora de UC Federal
3	Captura de animais silvestres in situ	Fora de UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxon	Qtde.
1	Captura de animais silvestres in situ	Hypsiboas crepitans	-
2	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Hypsiboas crepitans	-
3	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Hypsiboas crepitans	10
4	Captura de animais silvestres in situ	Leptodactylus marmoratus	-
5	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Leptodactylus marmoratus	-
6	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Leptodactylus marmoratus	10
7	Captura de animais silvestres in situ	Leptodactylus fuscus	-
8	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Leptodactylus fuscus	-
9	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Leptodactylus fuscus	10
10	Captura de animais silvestres in situ	Leptodactylus vastus	-
11	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Leptodactylus vastus	-
12	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Leptodactylus vastus	10
13	Captura de animais silvestres in situ	Scinax x-signatus	-
14	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Scinax x-signatus	-
15	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Scinax x-signatus	10
16	Captura de animais silvestres in situ	Dendropsophus minutus	-
17	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Dendropsophus minutus	10

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0785400520220902

Página 3/5



Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 78540-5	Data da Emissão: 02/09/2022 16:17:24	Data da Revalidação*: 01/07/2023
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: DAVI DOS SANTOS RODRIGUES	CPF: 103.040.774-61
Título do Projeto: Estudo epidemiológico de ranaviruses em anuros procedentes de ambientes naturais no estado de Pernambuco, Brasil	
Nome da Instituição: Universidade Federal Rural de Pernambuco	CNPJ: 24.416.174/0001-06

Atividades X Táxons

#	Atividade	Taxon	Qtde.
18	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Dendropsophus minutus	-
19	Captura de animais silvestres in situ	Rhinella jmi	-
20	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Rhinella jmi	-
21	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Rhinella jmi	10
22	Captura de animais silvestres in situ	Boana albomarginata	-
23	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Boana albomarginata	10
24	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Boana albomarginata	-
25	Captura de animais silvestres in situ	Dendropsophus branneri	-
26	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Dendropsophus branneri	-
27	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Dendropsophus branneri	10
28	Captura de animais silvestres in situ	Rhinella granulosa	-
29	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Rhinella granulosa	-
30	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Rhinella granulosa	10

A quantidade prevista só é obrigatória para atividades do tipo "Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ". Essa quantidade abrange uma porção territorial mínima, que pode ser uma Unidade de Conservação Federal ou um Município.

A quantidade significa: por espécie X localidade X ano.

Materiais e Métodos

#	Tipo de Método (Grupo taxonômico)	Materiais
1	Amostras biológicas (Anfibios)	Animal encontrado morto ou partes (carcaça)/osso/pele, Ectoparasita, Fezes, Ovos, Outras amostras biológicas (Fígado, baço e rins), Sangue
2	Método de captura/coleta (Anfibios)	Captura manual

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo destino
1	Universidade Federal Rural de Pernambuco	Laboratório

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0785400520220902

Página 4/5



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 78540-5	Data da Emissão: 02/09/2022 18:17:24	Data da Revalidação*: 01/07/2023
-----------------	--------------------------------------	----------------------------------

De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.

Dados do titular	
Nome: DAVI DOS SANTOS RODRIGUES	CPF: 103.040.774-61
Título do Projeto: Estudo epidemiológico de ranavirose em anuros procedentes de ambientes naturais no estado de Pernambuco, Brasil	
Nome da Instituição: Universidade Federal Rural de Pernambuco	CNPJ: 24.416.174/0001-06

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº 03/2014, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Taxon*	Qtde.	Tipo de Amostra	Qtde.	Data

* Identificar o espécime do nível taxonômico possível.

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0785400520220902

Página 5/5