

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA**  
**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**MIMIVÍRUS EM AMBIENTE HOSPITALAR: AVALIAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO  
E DA DIVERSIDADE BIOLÓGICA, MOLECULAR E ESTRUTURAL DE  
ISOLADOS VIRAIS**

**LUDMILA KAREN DOS SANTOS SILVA**

**Belo Horizonte, Maio de 2015**

**LUDMILA KAREN DOS SANTOS SILVA**

**MIMIVÍRUS EM AMBIENTE HOSPITALAR: AVALIAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO  
E DA DIVERSIDADE BIOLÓGICA, MOLECULAR E ESTRUTURAL DE  
ISOLADOS VIRAIS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do **Grau de Mestre em Microbiologia**.

**Orientador:** Dr. Jônatas Santos Abrahão

**Co-orientadora:** Dra. Wanessa Trindade  
Clemente

**Belo Horizonte, Maio de 2015**

043 Silva, Ludmila Karen dos Santos.

Mimivírus em ambiente hospitalar: avaliação da distribuição e da diversidade biológica, molecular e estrutural de isolados virais [manuscrito] / Ludmila Karen dos Santos Silva. – 2015.

117 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Dr. Jônatas Santos Abrahão. Co-orientadora: Dra. Wanessa Trindade Clemente.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. Microbiologia. 2. Mimiviridae. 3. Infecção hospitalar. 4. Vírus – Isolamento. I. Abrahão, Jônatas Santos. II. Clemente, Wanessa Trindade. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 579

## AGRADECIMENTOS

Sempre à Deus! Por me dar força de vontade e disposição para nunca desistir, mesmo quando o fardo parecia pesado demais. Por colocar em minha vida pessoas maravilhosas que são o verdadeiro significado das palavras família e amizade. Por me indicar o caminho certo e por me proporcionar a vivência de momentos que me levaram, sem dúvida, a grandes aprendizados.

À minha família pelo amor incondicional! À minha mãe pela motivação constante, pelas palavras de carinho, cafunés reconfortantes e marmitinhas feitas com muito amor. Ao meu pai por propor as melhores hipóteses científicas. Até hoje procuro descobrir o princípio ativo do limpa alumínio no combate às onicomicoses. Ainda vamos patentear esse novo medicamento juntos! Aos meus irmãos, meus exemplos de luta e sucesso na vida, obrigada pelos apelidos carinhosos e bullying sofridos na infância, jamais me esquecerei! Ao Morpheu e a Mel pela companhia durante a escrita dessa dissertação!

Às minhas amigas irmãs: Mandinha e Lalá por acreditarem sempre em mim, mais do que eu mesma. À Gabi, Tui e Laila pela amizade duradoura que já ultrapassa 10 anos. Aos meus amigos biológicos, que assim como eu escolheram estudar a beleza da vida, muito obrigada por acompanharem de perto o desenvolvimento de todo esse trabalho. Ao Gordim, por simplesmente ser o que é, sua amizade é incondicional e sua simplicidade, inteligência e companheirismo são inigualáveis. Quando eu crescer quero ser igual a você!

Ao meu orientador, Dr. Jônatas Santos Abrahão, por ter me dado a oportunidade de desenvolver esse trabalho, por sempre propor novos desafios e por acreditar no meu potencial. À professora Erna Kroon por ter me acolhido no Laboratório de Vírus quando ainda era uma graduanda sem nenhuma experiência. Aos professores Paulo Peregrino, Cláudio Bonjardim e Giliane Trindade pelo aprendizado sem fim.

Aos colegas de profissão do Laboratório de Vírus, o que seria de mim sem a ajuda de todos vocês que me auxiliaram de diversas maneiras e aturaram meu jeito “esquentadinho” de ser. Aos Mimi amigos pela parceria, trocas de



informações e comprometimento em ser um grupo sempre unido. Aos jovens distintos pela companhia durante toda a realização desse trabalho que foi regada a muitas risadas, trocadilhos, ironias e ideias geniais.

Ao Centro de Microscopia da UFMG pelo ótimo trabalho prestado e pela excelente qualificação profissional de todos os funcionários.

Aos profissionais do Hospital das Clínicas da UFMG, principalmente, a Dr. Wanessa Trindade Clemente pela co-orientação e por ter possibilitado que as amostras utilizadas nesse trabalho fossem coletadas.

À banca avaliadora pela disponibilidade e por poder colaborar na fase final desse trabalho.

Às agências de fomento, CAPES, CNPq E FAPEMIG pelo auxílio financeiro que permitiu a execução desse projeto.

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	18
1.1. Vírus Gigantes Núcleo-citoplasmáticos de DNA (NCLDV)s .....	18
1.2. Descoberta dos mimivírus.....	20
1.3. Família <i>Mimiviridae</i> e outros vírus gigantes .....	22
1.4. Ordem <i>Megavirales</i> e o quarto domínio da vida .....	26
1.5. <i>Acanthamoeba polyphaga mimivirus</i> (APMV).....	28
1.5.1. Estrutura .....	28
1.5.2. Genoma .....	30
1.5.3. Ciclo de multiplicação.....	33
1.6. <i>Acanthamoeba</i> .....	37
1.7. Importância Clínica dos vírus gigantes.....	40
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	44
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	45
3.1. Objetivo geral .....	45
3.2. Objetivos específicos.....	45
<b>4. FLUXOGRAMA</b> .....	46
<b>5. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	47
5.1. Materiais .....	47
5.1.1. Meio de cultura.....	47
5.1.1.1 Meio PYG. ....	47
5.1.2. Sistema celular.....	48
5.1.2.1 <i>Acanthamoeba castellanii</i> (ATCC 30010). ....	48

5.1.3. Vírus.....	48
5.1.3.1 Acanthamoeba polyphaga mimivirus (APMV).....	48
5.1.3.2 Kroon virus (KV).....	49
5.1.3.3 Vírus M4. ....	49
5.1.4. Coleções de amostras.....	49
5.2. Métodos .....	51
5.2.1. Processamento das amostras .....	51
5.2.2. Extração de DNA pelo método de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico .....	52
5.2.3. Reação em cadeia de polimerase (PCR) em tempo real –qPCR .....	52
5.2.4. Sequenciamento, análises de sequências e construção de árvore filogenética	53
5.2.5. Isolamento viral - Ensaio de placa em ágar PAS (Boughalmi <i>et al</i> , 2013) .....	54
5.2.6. Multiplicação de vírus gigantes (Abrahão <i>et al</i> , 2014).....	54
5.2.7. Purificação de vírus gigantes (La Scola <i>et al</i> , 2003) .....	55
5.2.8. Titulação viral (La Scola <i>et al</i> , 2003).....	55
5.2.9. Curva de multiplicação .....	56
5.2.10 Teste de resistência a biocidas químicos (Campos & Andrade <i>et al</i> , 2012). ....	56
5.2.11. Teste de resistência a temperatura.....	57
5.2.12. Avaliação da expressão gênica.....	57
5.2.12.1. Expressão de mRNAs de tRNAs e tRNAs sintetases .....	58
5.2.12.2. Extração de RNA total, transcrição reversa (RT PCR) e qPCR.....	58
5.2.13. Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE).....	59
5.2.14. Coloração de gel com prata.....	60
5.2.15. Coloração de gel com Comassie blue .....	61
5.2.16. Microscopia eletrônica de Transmissão .....	61
5.2.17. Microscopia eletrônica de Varredura .....	62
5.2.18. Morfometria .....	62
<b>6. RESULTADOS .....</b>	<b>63</b>

6.1. Triagem por qPCR, isolamento viral e seleção de isolados para caracterização ...	63
6.1.1. Amostras do HC/UFMG .....	63
6.1.2. Amostras do ICEX/UFMG .....	67
6.2. Caracterização molecular .....	68
6.2.1. Análises filogenéticas baseadas no sequenciamento do gene da RNA helicase viral	69
6.3. Caracterização biológica .....	71
6.3.1. Curva de multiplicação em <i>Acanthamoeba castellanii</i> .....	71
6.3.2. Teste de resistência a temperatura .....	74
6.3.3. Teste de resistência a biocidas .....	76
6.3.4. Expressão gênica .....	77
6.4. Caracterização estrutural .....	78
6.4.1. Perfil protéico viral .....	78
6.4.2. Microscopia eletrônica de transmissão e varredura .....	80
6.4.3. Morfometria .....	83
<b>7. DISCUSSÃO</b> .....	<b>86</b>
<b>8. CONCLUSÕES</b> .....	<b>91</b>
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>93</b>
<b>10. ANEXOS</b> .....	<b>102</b>
10.1. Anexo I .....	102
10.2. Anexo II .....	102
<b>11. PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>104</b>

## RESUMO

Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-Graduação em Microbiologia-Universidade Federal de Minas Gerais

### **MIMIVÍRUS EM AMBIENTE HOSPITALAR: AVALIAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO E DA DIVERSIDADE BIOLÓGICA, MOLECULAR E ESTRUTURAL DE ISOLADOS VIRAIS**

LUDMILA KAREN DOS SANTOS SILVA

ORIENTADOR: Jônatas Santos Abrahão

COORIENTADORA: Wanessa Trindade Clemente

Belo Horizonte, maio de 2015

No ano de 1992, durante um surto de pneumonia, um vírus gigante foi isolado a partir da água de torres de resfriamento, em Bradford, na Inglaterra. Esse novo vírus, denominado *Acanthamoeba polyphaga mimivirus* (APMV), infecta amebas do gênero *Acanthamoeba*, e é o vírus protótipo do gênero *Mimivirus*, o qual faz parte do grupo dos Vírus Gigantes Núcleo-citoplasmáticos de DNA (NCLDVs). Pneumonia é uma das principais causas de morte relacionada a infecção em todo o mundo, no entanto, cerca de 20 a 50% dos casos apresentam etiologia desconhecida. Estudos têm apontado alguns vírus do gênero *Mimivirus* (mimivírus) como prováveis agentes causadores de pneumonia em seres humanos. Diante desse cenário, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a distribuição dos mimivírus em diferentes setores do Hospital das Clínicas de Belo Horizonte (HC UFMG). Para tanto, 242 amostras de poeira hospitalar foram coletadas, processadas, e submetidas a qPCR e isolamento viral. Alguns dos isolados virais obtidos foram selecionados, purificados e submetidos a testes de caracterização molecular (sequenciamento e análises filogenéticas), biológica (testes de resistência, curva de multiplicação, expressão gênica) e estrutural (morfometria e microscopias eletrônicas de transmissão e varredura e análise de perfil de proteínas estruturais). Como controle, amostras também foram coletadas em diversas instalações do Instituto de Ciências Exatas (ICEX) da UFMG. Os resultados demonstraram uma distribuição diferenciada de mimivírus pelo HC-UFMG, revelando um maior número de amostras positivas no isolamento respiratório do que em outros ambientes analisados. Não foi possível isolar nenhum vírus a partir do ITEX/UFMG. De uma maneira geral, a

caracterização biológica, molecular e estrutural dos novos isolados demonstrou que a maioria dos isolados apresentam características únicas, mas similares aos mimivírus do grupo A, como o protótipo APMV. Dentre estas características, destacamos diferenças na curva de multiplicação, na expressão de genes envolvidos na tradução e a presença de substituições nucleotídicas no gene da RNA helicase viral. É crescente o número de evidências relacionando os mimivírus com casos de pneumonias nosocomiais, e nosso trabalho é o primeiro a demonstrar de forma significativa a associação espacial entre o local ocupado por pacientes com pneumonia e isolados de APMV. Nossos resultados reforçam a necessidade de controle da presença desses vírus no ambiente hospitalar.

## **ABSTRACT**

Master Thesis

Programa de Pós-Graduação em Microbiologia-Universidade Federal de Minas Gerais

### **MIMIVIRUS IN HOSPITAL ENVIRONMENT: ASSESSMENT OF DISTRIBUTION AND BIOLOGICAL, MOLECULAR AND STRUCTURAL DIVERSITY OF VIRAL ISOLATED**

LUDMILA KAREN DOS SANTOS SILVA

ADVISOR: Jônatas Santos Abrahão

CO ADVISOR: Wanessa Trindade Clemente

Belo Horizonte, May 2015

In 1992, during a pneumonia outbreak, a giant virus was isolated from cooling towers in England. This new virus, called *Acanthamoeba polyphaga mimivirus* (APMV), infects *Acanthamoeba* amoebas, and is the prototype virus of *Mimivirus* genus, which belongs to the group of Nucleo-Citoplasmatic Large DNA Virus (NCLDVs). Pneumonia is a leading cause of death related to infection throughout the world, however, about 20 to 50% of the cases present unknown etiology. Studies have pointed out some virus belong to the *Mimivirus* genus (mimivirus) as putative agents of pneumonia in humans. Considering this background, this study aimed to evaluate the distribution of mimivirus in different areas of the Hospital das Clínicas (HC) in Belo Horizonte UFMG. For this, 242 hospital dust samples were collected, processed, and subjected to real-time PCR and isolation. Some of the isolated viruses were purified and subjected to molecular characterization (sequencing and phylogenetic analysis), biological characterization (resistance assays, multiplication curve, gene expression profile) and structural characterization tests (morphometric, transmission and scan electron microscopy and analysis of structural proteins). As experimental control, samples were also collected from various facilities of the Instituto de Ciências Exatas (ICEX) of UFMG. The results demonstrated a differential distribution of mimivirus in the hospital, revealing a higher number of positive samples in respiratory isolation facility than in other analyzed environments. It was not possible to isolate any virus from ITEX/UFMG. In general, biological, molecular and structural characterization of new isolates showed some similarity between these viruses and mimiviruses group A, as the APMV prototype. However, some

differences in the multiplication curve, nucleotide composition of viral RNA helicase gene and in the expression of genes involved in translation were observed, suggesting the existence of some biological differences in new viral isolates. The volume of evidence linking the mimivirus with nosocomial pneumonia is increasing and our work is the first to demonstrate a significant spatial association between the site occupied by patients with pneumonia and isolated APMV. Our results reinforce the need to control the presence of these viruses in the hospital.



## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1:** APMV, inicialmente chamado de Coco de Bradford, no interior de uma ameba de vida livre.

**Figura 2:** Microscopia eletrônica mostrando a morfologia de simetria icosaédrica dos mimivírus.

**Figura 3:** Microscopia eletrônica de transmissão de alguns mimivírus brasileiros.

**Figura 4:** Representação esquemática do surgimento dos quatro domínios da vida a partir de um ancestral comum.

**Figura 5:** Organização das camadas da partícula viral de APMV.

**Figura 6:** Reconstrução gráfica de microscopia crioelétrica de partículas de APMV.

**Figura 7:** Microscopia eletrônica de varredura evidenciando a abertura do star-gate.

**Figura 8:** Distribuição taxonômica dos 128 genes conservados em APMV.

**Figura 9:** Microscopia eletrônica de transmissão do vírus M4.

**Figura 10:** Ciclo de multiplicação do APMV em ameba.

**Figura 11:** Microscopias eletrônicas das etapas de internalização de APMV em macrófagos (RAW 264.7).

**Figura 12:** Microscopias eletrônicas de transmissão evidenciando fusão da membrana interna viral com a membrana do fagossomo.

**Figura 13:** Microscopias eletrônicas das fábricas virais dos mimivírus.

**Figura 14:** Estágios do ciclo de vida de amebas do gênero *Acanthamoeba*.

**Figura 15:** *Acanthamoeba castellanii* corada por Hemacolor evidenciando a presença de uma coinfeção por vírus e bactérias.

**Figura 16:** Representação esquemática das áreas de coleta no HC/UFMG.

**Figura 17:** Padrão do gráfico de amplificação e curva de Melt resultante das reações de qPCR para o gene da RNA Helicase.

**Figura 18:** Ensaio de placa em ágar PAS.

**Figura 19:** Análises filogenéticas baseadas no gene da RNA helicase.

**Figura 20:** Ensaio de curva de multiplicação dos isolados IRL6 e IRP16, comparados ao APMV e ao KV em amebas *A. castellanii*.

**Figura 21:** Morfologia apresentada por amebas *A. castellanii* após infecção por APMV, KV, IRL6 e IRP16 (vertical) em diferentes tempos (horizontal).

**Figura 22:** Teste de resistência a temperatura.

**Figura 23:** Teste de resistência a biocidas químicos.

**Figura 24:** Perfil de expressão de mRNA de Arginil tRNA sintetase, Tirosinil tRNA sintetase, Triptofanil tRNA e Leucil tRNA pelos isolados IRL6 e IRP16 e os vírus APMV e KV.

**Figura 25:** Comparação entre o perfil das proteínas estruturais dos isolados IRL6, IRP16 e dos vírus APMV, KV e M4 através de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE).

**Figura 26:** Microscopia eletrônica de transmissão do isolado IRL6, destacando as estruturas morfológicas e as diferentes etapas do ciclo de multiplicação viral.

**Figura 27:** Microscopia eletrônica de transmissão do isolado IRP16, destacando as estruturas morfológicas e as diferentes etapas do ciclo de multiplicação viral.

**Figura 28:** Microscopia eletrônica de varredura dos isolados IRL6 e IRP16, destacando a densa camada de fibrilas a o star-gate.

**Figura 29:** Morfometria dos isolados virais e dos vírus APMV e KV.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Principais características das famílias dos NCLDV's.

**Tabela 2:** Descrição das amostras do HC/UFMG, identificando o local e os ambientes de coleta, assim como o número de amostras e o ano de coleta.

**Tabela 3:** Descrição das amostras do ICEX/UFMG, identificando o local e os ambientes de coleta, assim como o número de amostras e o ano de coleta.

**Tabela 4:** Sequências dos oligonucleotídeos que foram utilizados nas reações de qPCR para verificar os níveis de mRNAs de tRNAs e tRNAs sintetases.

**Tabela 5:** Ambientes de coleta de poeira no HC/UFMG e resultados dos testes de qPCR e isolamento viral

**Tabela 6:** Ambientes de coleta de poeira no ICEX/UFMG e resultados dos testes de qPCR e isolamento viral

## LISTA DE ABREVIATURAS

**APMV:** *Acanthamoeba polyphaga mimivirus*

**ATCC:** American Type Culture Collection

**AVL:** Amebas de vida livre

**cm:** centímetros

**CroV:** *Cafeteria roenbergensis virus*

**CTI:** Centro de Terapia Intensiva

**DNA:** Ácido Desoxi-ribonucléico

**EUA:** Estados Unidos da América

**HC:** Hospital das Clínicas

**ICEX:** Instituto de Ciências Exatas

**ICTV:** Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (International Committee on Taxonomy of Viruses)

**Kb:** Kilo pares de bases

**KV:** Kroon virus

**Mb:** Mega pares de bases

**MCP:** Proteína principal do capsídeo (Major Capsid Protein)

**M.O.I.:** Multiplicidade de Infecção

**mM:** milimolar

**mL:** mililitros

**mRNA:** RNA mensageiro

**NCLDV:** Vírus Gigantes Núcleo-citoplasmáticos de DNA (Nucleo-Citoplasmatic Large DNA Virus)

**nm:** nanômetros

**ORFs:** Janelas Abertas de Leitura

**PAS:** Salina para amebas

**PBMC:** células mononucleares do sangue periférico (peripheral blood mononuclear cells)

**PBS:** Tampão Fosfato Salina (Phosphate Buffered Saline)

**PCI:** Fenol-clorofórmio-álcoolisoamílico

**PCR:** Reação em Cadeia da Polimerase (Polimerase Chain Reaction)

**PYG:** Protease Peptona Extrato de Levedura e Glicose

**RNA:** Ácido Ribonucléico

**RNV:** Rio Negro vírus

**RPM:** rotações por minuto

**SMBV:** Samba vírus

**TEM:** Microscopia Eletrônica de Transmissão

**TGH:** Transferência gênica Horizontal

**tRNA:** RNA transportador

**UFMG:** Universidade Federal de Minas Gerais

**UTI:** Unidade de Terapia Intensiva

**μL:** microlitros

**μm:** micrômetros

**μM:** micromolar

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Vírus Gigantes Núcleo-citoplasmáticos de DNA (NCLDVs)

Vírus são caracterizados como um grupo de parasitas ubíquos capazes de infectar organismos pertencentes aos três domínios da vida e de se multiplicarem em uma gama de tipos celulares. Além disso, são tradicionalmente conhecidos pelo seu tamanho ultramicroscópico, pela dependência quase completa da maquinaria celular do hospedeiro para sua multiplicação e por apresentarem uma ampla diversidade na arquitetura e complexidade da partícula viral. Muitos vírus compartilham genes homólogos que são responsáveis por codificar proteínas envolvidas na replicação do genoma e na formação da partícula viral, no entanto, nenhum gene é comum a todos os vírus. Logo, não há evidências que comprovam a origem monofilética desses micro-organismos. Entretanto, nos últimos anos, análises genômicas demonstraram que alguns genes, que codificam proteínas responsáveis por boa parte das funções essenciais para a multiplicação viral, são conservados em um grande grupo de vírus denominado de Vírus Gigantes Núcleo-citoplasmáticos de DNA (NCLDVs), indicando que esse grupo poderia ser monofilético (IYER *et al*, 2006; YUTIN *et al*, 2009; YUTIN e KOONIM, 2009).

Os NCLDVs são caracterizados por um genoma de dupla fita de DNA, relativamente extenso, entre 100 Kb e 2,5 Mb, e possuem uma capacidade de codificar de centenas a milhares de proteínas. Dentre as famílias que compõem esse grupo, tem-se *Poxviridae*, que infecta insetos e vertebrados, *Asfarviridae*, que infecta suínos, *Iridoviridae*, que infecta invertebrados e vertebrados pecilotérmicos, *Ascoviridae*, que infecta insetos, *Phycodnaviridae*, que infecta algas, *Mimiviridae* e *Marseilleviridae*, recentemente propostas, que infectam amebas. Além dessas famílias, outros três gêneros denominados *Pandoravirus*, *Phitovirus* e *Faustovirus*, recentemente descobertos e ainda não agrupados em nenhuma família viral, também fazem parte do grupo dos NCLDVs (Tabela 1) (YUTIN *et al*, 2009; PHILIPPE *et al*, 2013; GAIA *et al*, 2014, LEGENDRE *et al*, 2014; RETENO *et al*, 2015).

Diferentemente de outros vírus, os NCLDVs apresentam uma relativa independência dos sistemas de replicação e transcrição dos seus hospedeiros,

uma vez que são capazes de codificar várias proteínas necessárias à replicação, expressão gênica e morfogênese viral. Dentre essas proteínas estão DNA polimerases, helicases, topoisomerases, fatores de transcrição, chaperonas, DNA primase viral, DNA ligase, dUTPase e timidinas quinase (IYER *et al*, 2006; YUTIN *et al*, 2009; YUTIN e KOONIM, 2009).

Embora a hipótese de os NCLDV's serem um grupo monofilético e apresentarem um único ancestral comum seja amplamente aceita, há uma discordância no que concerne ao tamanho e à morfologia desse vírus ancestral e como ele deu origem às diferentes famílias virais. Existem basicamente três hipóteses que tentam explicar a evolução dos NCLDV's. A primeira delas seria que os NCLDV's evoluíram e se diversificaram ao perder alguns dos genes comuns e ao adquirir novos genes de seus hospedeiros, assim como de bactérias endossimbióticas e também por duplicação gênica. A segunda hipótese sugere que a evolução do grupo se deu a partir de um vírus ancestral ainda maior e com o genoma mais extenso que gradativamente foi se adaptando e especiando via redução genômica. Finalmente, a terceira teoria propõe que os NCLDV's derivaram de um ancestral com genoma pequeno, que se diversificou por simples aquisição de genes dos hospedeiros e organismos simpátricos (ETTEN *et al*, 2010, ETTEN *et al*, 2011).

Alguns pesquisadores acreditam que os NCLDV's deveriam ser considerados como o quarto domínio da vida. Outros sugerem que os genes de NCLDV's surgiram a partir do pool genético original que levou à origem dos procaríotos e eucariotos. Estas sugestões têm estimulado uma controvérsia sobre se a árvore da vida deveria incluir esses vírus. Independentemente disso, alguns vírus, incluindo o NCLDV's, têm uma longa história evolutiva e provavelmente contribuíram para o surgimento das posteriores vidas celulares modernas. Além disso, a descoberta e a caracterização dos NCLDV's está em sua fase inicial e poderá representar um grande desafio para os virologistas (ETTEN *et al*, 2010; BOYER *et al*, 2010).

**Tabela 1:** Principais características das famílias dos NCLDV's.

Família	Hospedeiros	Tamanho do genoma (Kb)	Compartimento celular de multiplicação
<i>Phycodnaviridae</i>	Algas	150-400	Núcleo e citoplasma
<i>Poxviridae</i>	Insetos, reptéis, aves, mamíferos	130-380	Citoplasma
<i>Asfarviridae</i>	Mamíferos	170	Citoplasma
<i>Ascoviridae</i>	Insetos	150-190	Núcleo e citoplasma
<i>Iridoviridae</i>	Insetos, vertebrados pecilotérmicos	100-220	Núcleo e citoplasma
<i>Mimiviridae</i>	<i>Acanthamoeba</i>	1.180-1.280	Citoplasma
<i>Marseilleviridae</i>	<i>Acanthamoeba</i>	370	Núcleo e Citoplasma
<i>Pandoravirus*</i>	<i>Acanthamoeba</i>	1900-2500	Núcleo e citoplasma
<i>Phitovirus*</i>	<i>Acanthamoeba</i>	600	Citoplasma
<i>Faustovirus*</i>	<i>Vermamoeba vermiformis</i>	466	Citoplasma

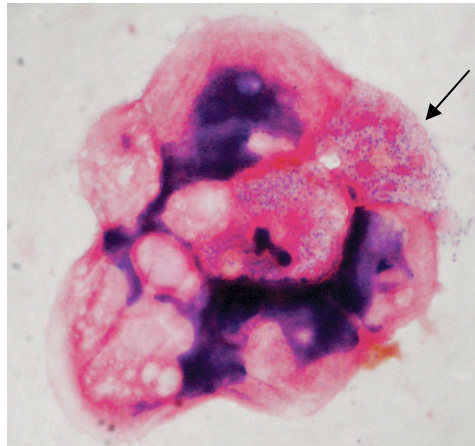
**Fonte:** Yutin *et al*, 2009 – modificado.

\* Vírus ainda não agrupados em nenhuma família viral.

## 1.2. Descoberta dos mimivírus

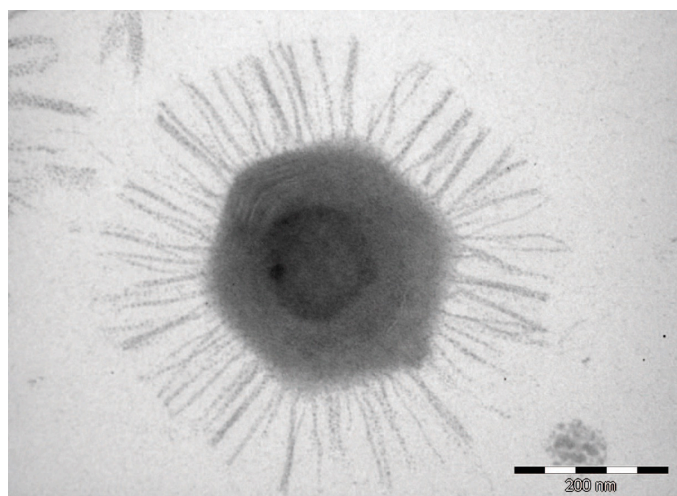
No ano de 1992, durante um surto de pneumonia, um micro-organismo, semelhante a um pequeno coco Gram positivo, foi isolado de amebas presentes na água de torres de resfriamento de um hospital em Bradford, na Inglaterra. Devido à sua morfologia, esse micro-organismo foi inicialmente denominado de coco de Bradford (Fig. 1). Após muitas tentativas frustradas de cultivo, assim como fracassos na identificação molecular usando iniciadores bacterianos universais para a região 16S do DNA ribossomal, a amostra foi estocada por 10 anos (LA SCOLA, 2003; RAOULT *et al*, 2007).





**Figura 1: APMV, inicialmente chamado de Coco de Bradford, no interior de uma ameba de vida livre.** O micro-organismo é corado de violeta (seta) através da coloração de Gram, e assim pode ser visualizado por microscopia óptica. **Fonte:** Raoult *et al*, 2005.

Em 2003, a amostra foi levada para Marselha, França, onde um grupo de pesquisadores coordenados pelo professor Didier Raoult deu continuidade aos estudos. A fim de tentar solucionar o que os pesquisadores acreditavam ser problemas técnicos da identificação molecular, os cocos de Bradford foram examinados por microscopia eletrônica. No entanto, o micro-organismo observado aparentemente apresentava um formato de simetria icosaédrica regular, muito semelhante ao dos iridovírus, com aproximadamente 700nm de diâmetro, sugerindo que os cocos de Bradford na verdade se tratavam de vírus gigantes (Fig. 2) (LA SCOLA, 2003; RAOULT, 2005; RAOULT *et al*, 2007).



**Figura 2: Microscopia eletrônica mostrando a morfologia de simetria icosaédrica dos mimivírus.** A estrutura do vírus gigante pode ser observada: capsídeo de simetria aparentemente icosaédrica circundado por fibrilas. **Fonte:** Raoult, 2005.

Análises posteriores foram necessárias para comprovar a natureza viral do micro-organismo e demonstraram que ele era composto de um genoma extenso, de DNA dupla fita, e apresentava uma fase de eclipse, típica dos vírus, em sua multiplicação. Além disso, foi observado que a morfogênese das partículas virais ocorria no interior de estruturas intracelulares denominadas fábricas virais, semelhante ao observado também em outros vírus, como os poxvírus (LA SCOLA *et al*, 2003; RAOULT *et al*, 2005; RAOULT *et al*, 2007).

Após a comprovação da natureza viral dos cocos de Bradford, o novo vírus foi denominado de *Acanthamoeba polyphaga mimivirus* (APMV), por infectar amebas do gênero *Acanthamoeba* e também por mimetizar micro-organismo, como bactérias após coloração de Gram. Além disso, o termo “mimi” deriva do pseudônimo “ameba mimi” utilizada frequentemente pelo Dr. Didier Raoult ao ensinar evolução para sua filha (comunicação pessoal). Por apresentar características diferenciais que não permitiam sua classificação em nenhuma família viral já existente, a família *Mimiviridae* foi criada para incluir o APMV e após outras análises filogenéticas também foi incluída no grupo dos NCLDVs (LA SCOLA *et al*, 2003; RAOULT *et al*, 2005; RAOULT *et al*, 2007; ICTV, 2014).

A descoberta do APMV levou os pesquisadores a uma busca intensa por vírus semelhantes aos mimivírus o que levou à descoberta de outros vírus gigantes nos mais diversos locais e ambientes do mundo, como água, solo, *permafrost*, ostras e até de seres humanos. Acredita-se que os vírus gigantes só não foram descobertos anteriormente devido a limitações técnicas, como a filtração em malha de 0,2 µm, que causava a retenção da maioria deles, e a utilização de sistemas celulares não permissivos a esses vírus (GHEDIN e CLAVERIE, 2005; ETTEN *et al*, 2010; CAMPOS *et al*, 2014; ANDRADE *et al*, 2014; DORNAS *et al*, 2014).

### **1.3. Família *Mimiviridae* e outros vírus gigantes**

Na última década, diversos vírus gigantes, incluindo alguns bem próximos dos mimivírus, como *Acanthamoeba castellanii mamavirus*, *Acanthamoeba polyphaga mousouvirus*, courdo 11, *Megavirus chilensis*, e outros filogeneticamente mais distantes como *Cafeteria roenbergensis virus*, marseillevírus, tunisvírus e lausannevírus foram isolados a partir de diferentes

protistas fagocíticos e amostras de água. Como dito anteriormente, diante da descoberta de tantos vírus, duas novas famílias virais foram criadas pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV): as famílias *Mimiviridae* e *Marseilleviridae* (LA SCOLA *et al*, 2010; COLSON *et al*, 2012; AHERFI *et al*, 2013; AHERFI *et al*, 2014a; AHERFI *et al*, 2014b).

A família *Mimiviridae* é dividida em dois gêneros: o gênero *Mimivirus* (ou grupo I), que inclui os vírus semelhantes ao APMV, enquanto o gênero *Cafeteriavirus* (grupo II) é composto somente pelo *Cafeteria roenbergensis virus* (CroV). O grupo I é composto por vírus que infectam amebas do gênero *Acanthamoeba* e é subdividido, de acordo com análises filogenéticas baseadas na sequência da DNA polimerase B, em outras três linhagens: A, B e C. O gene da RNA helicase também vem sendo utilizado para detecção e classificação destes grupos. Os mimivírus e os mamavírus estão incluídos na linhagem A, enquanto os moomovírus são classificados na linhagem B e o *Megavirus chilensis* na linhagem C (ARSLAN *et al*, 2011; COLSON *et al*, 2011; COLSON *et al*, 2012; CLAVERIE, 2013; GAIA *et al*, 2014).

Os mamavírus também foram isolados a partir da água de torres de resfriamento em Paris, no ano de 2008, e apresentam alta similaridade com os mimivírus. No entanto, a descoberta dos mamavírus acarretou no isolamento de um outro pequeno vírus chamado *Sputnik*, de simetria icosaédrica com 50 nm de diâmetro e um genoma de dupla fita de DNA de aproximadamente 18 kb. Trabalhos posteriores demonstraram que o *Sputnik* só é capaz de se multiplicar na presença dos mamavírus, ou de alguns outros mimivírus, sendo que sua multiplicação ocorre no interior das fábricas virais e parece depender da RNA polimerase desses vírus gigantes. Além disso, a presença do *Sputnik* também está associada ao aumento do número de partículas virais defectivas, assim como a uma diminuição da lise amebiana e infectividade desses vírus gigantes. Essa nova característica levou os pesquisadores a cunharem o termo virófago para caracterizar vírus que são capazes de parasitar outros vírus, como o *Sputnik* e outros, posteriormente descobertos, como *Sputnik 2*, *Sputnik 3*, Mavirus, Rio Negro e Zamilon (LA SCOLA *et al*, 2008; CLAVERIE e ABERGEL, 2009a; DESNUES E RAOULT, 2010; FISCHER, 2011; DESNUES E RAOULT, 2012; GAIA *et al*, 2014; CAMPOS, *et al*, 2014).

Em 2013, um novo vírus gigante, denominado pandoravírus, foi isolado por Philippe *et al* a partir de amostras de sedimentos marinhos no Chile e de lama de água doce em Melbourne. Esse novo vírus possuía uma morfologia completamente diferente de qualquer outro vírus descrito, apresentando uma partícula viral ovóide, em formato de ânfora, de aproximadamente 1µm de comprimento e 0,5 µm de diâmetro, e um genoma composto por cerca de 2,5 Mb. Além disso, diferentemente dos outros vírus gigantes, a multiplicação dos pandoravírus acontece no núcleo da célula hospedeira. Essa descoberta levou a proposição de um novo gênero denominado *Pandoravirus* para agrupar esses novos vírus (PHILIPPE *et al*, 2013).

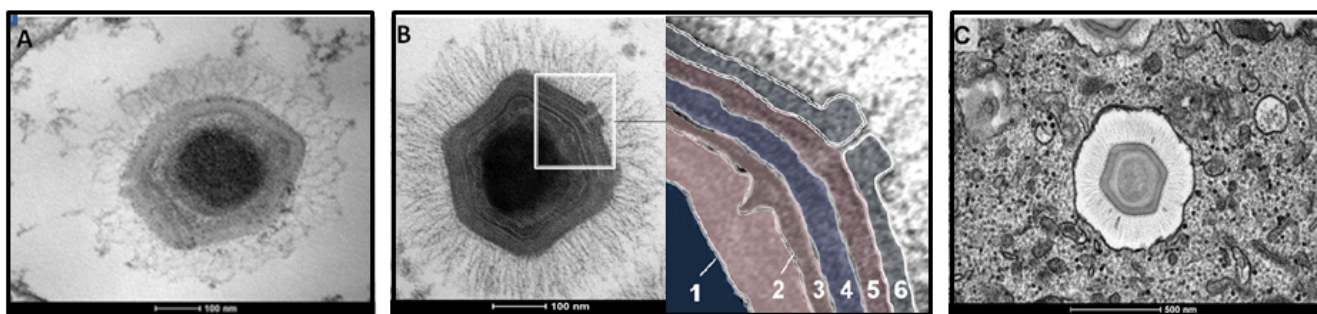
No entanto, no ano de 2014, um vírus, ainda maior do que os pandoravírus, foi descrito por Legendre *et al*. Os pitovírus foram isolados a partir de amostras de *permafrost* siberiano, datado de 30.000 anos, e apresentam cerca de 1,5 µm de comprimento e um genoma surpreendentemente pequeno de aproximadamente 600 Kb. Dessa maneira, esse novo tipo de vírus gigante é capaz de combinar uma morfologia similar aos pandoravírus, mas com um conteúdo gênico mais parecido com os outros NCLDVs (LEGENDRE *et al*, 2014).

Em 2014, o primeiro vírus gigante brasileiro, pertencente à linhagem A da família *Mimiviridae*, foi descrito por Campos *et al* e denominado de Samba vírus (SBV). Isolado a partir das águas do Rio Negro, na Amazônia, o SBV apresenta um diâmetro de aproximadamente 574 nm e cerca de 1,2 Mb de genoma (Fig. 3A). Além disso, associado ao SBV, também foi descrito o primeiro viróforo da América, chamado Rio Negro vírus (RNV), capaz de gerar partículas defectivas e diminuir a infectividade do SBV (CAMPOS *et al*, 2014).

Ainda no Brasil, também já foi isolado e caracterizado, porém ainda não publicado, outro mimivírus da linhagem A denominado de Kroon vírus (KV). Com cerca de 674 nm de diâmetro e 1.221.932 pb de genoma, esse vírus foi isolado das águas da Lagoa Santa do município de Lagoa Santa em Minas Gerais no ano de 2012, e tem como particularidade a presença de uma camada protéica a mais na composição do capsídeo viral, portanto sendo o primeiro mimivírus brasileiro a apresentar uma marcante diferença morfológica (Fig.3B).

Além desses, também já foram isolados outros mimivírus de águas oceânicas e de ostras coletadas na costa brasileira na região dos estados de Santa

Catarina, Rio Grande do Norte e Bahia, nos anos de 2012 e 2013 (Fig. 3C). Análises filogenéticas demonstraram uma estreita relação desses novos isolados com a linhagem A do grupo I dos mimivírus e todos esses dados indicam que as ostras, uma vez que são animais filtradores, podem funcionar ecologicamente como *hot spots* para o isolamento desses vírus (ANDRADE *et al*, 2015).



**Figura 3: Microscopia eletrônica de transmissão de alguns mimivírus brasileiros.** **A.** Samba vírus. **B.** Kroon vírus evidenciando sua camada extra do capsídeo viral. (1) parede do cerne, (2) membrana lipídica, (3), (4), (5) e (6) as quatro camadas protéicas que compõe o capsídeo viral. **C.** **Oyster vírus:** vírus isolado a partir do manto de ostras coletadas na costa brasileira. **Fonte:** Campos *et al*, 2014 e Andrade *et al*, 2015 - modificados.

Até 2015 o único protista utilizado para o cultivo de todos esses vírus gigantes pertencia ao gênero *Acanthamoeba* spp., no entanto, recentemente, Reteno *et al* descreveram o isolamento de uma nova linhagem de vírus gigantes a partir de amebas da espécie *Vermamoeba vermiformis*. Os faustovírus, nome dado aos vírus dessa nova linhagem, apresentam um capsídeo de simetria icosaédrica de aproximadamente 200nm de diâmetro, desprovido de fibrilas, que encapsida um genoma de cerca de 466 Kb. Análises filogenéticas demonstraram que os faustovírus são relacionados ao *African swine fever virus* (ASFV), que pertence à família *Asfarviridae*, no entanto mais estudos se mostram necessários para afirmar se os faustovírus devem ser agrupados dentro dessa família ou se eles devem compor uma nova família de vírus gigantes (RETENO, 2015).

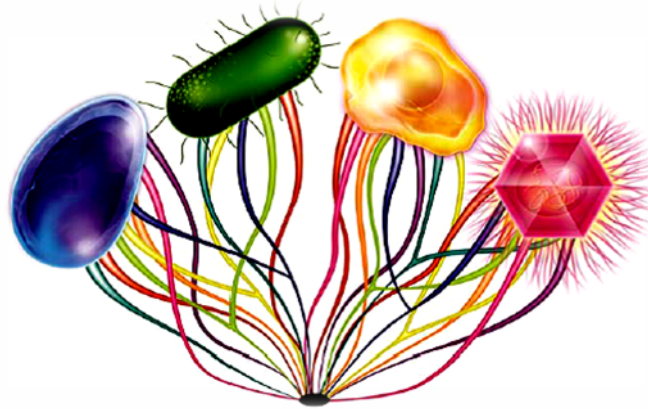
Todos esses dados demonstram que atualmente vários estudos de prospecção já foram concluídos, e muitos outros ainda estão em andamento. Além disso, com o advento de projetos de metagenômica ambiental acredita-se

que o número de novos vírus gigantes tenda a crescer ainda mais nos próximos anos.

#### **1.4. Ordem *Megavirales* e o quarto domínio da vida**

Recentemente um grupo de pesquisadores sugeriu que a família *Mimiviridae*, assim como outras famílias que fazem parte do grupo dos NCLDVs, fossem agrupadas em uma nova ordem denominada *Megavirales*, em referência ao grande tamanho das partículas virais e à características do genoma desses vírus. Essa nova classificação se baseia no fato de os NCLDVs compartilharem algumas características, como uma origem comum, corroborada pela existência de um grande conjunto de genes hipoteticamente ortólogos que codificam proteínas envolvidas na multiplicação viral, uma arquitetura viral semelhante e características biológicas comuns, principalmente a multiplicação no interior de fábricas virais citoplasmáticas (COLSON *et al*, 2012; COLSON *et al*, 2013a).

Em 2010, Boyer e colaboradores, fundamentados em reconstruções filogenéticas, também sugeriram que esses vírus, classificados nessa nova ordem, deveriam ser considerados como o quarto domínio da vida. Essas reconstruções filogenéticas foram baseadas em análises de genes, que são conservados em todos os organismos, inclusive nesses vírus, e que participam da biossíntese de nucleotídeos, replicação de DNA, transcrição e tradução. Os resultados sugeriram a existência de um ancestral único desses genes levando a especulações de que eles surgiram simultaneamente ou imediatamente após as linhagens eucarióticas modernas. Neste contexto, os autores propuseram que a evolução dos grandes Domínios da vida ocorreu não só por evolução gênica regular, mas também foi moldada por eventos de trocas gênicas entre Domínios, em um esquema conhecido como rizoma da vida, em substituição à árvore da vida tradicional (Fig. 4) (BOYER *et al*, 2010).



**Figura 4: Representação esquemática do “rizoma da vida”, sugerindo o surgimento dos quatro domínios da vida a partir de um ancestral comum.** Essa figura representa espécies de cada domínio da vida, sendo que os eucariotos são representados pela célula amarela, as bactérias pela célula verde, as archaas pela célula azul e os vírus pelo mimivírus em rosa. Cada linha colorida representa uma proteína diferente, sendo que as bifurcações representam uma provável transferência gênica lateral. Além disso, pode-se notar que todos os organismos compartilham um conjunto de genes comuns envolvidos no processamento do DNA, que evoluíram a partir de uma única origem ancestral. **Fonte:** Boyer *et al*, 2010.

No entanto, outros pesquisadores refutam essa ideia com base no argumento de que o modelo utilizado por Boyer *et al* (2010) nas reconstruções filogenéticas não foi adequado e que os alinhamentos gênicos contêm heterogeneidade composicional e homoplasias. Além disso, o uso de outros modelos evolucionários por esses autores não foi capaz de descartar a hipótese de que os genes virais analisados possam ter sido adquiridos a partir dos seus hospedeiros eucariotos por transferência gênica horizontal (WILLIAMS *et al*, 2011).

Essa hipótese de aquisição gênica independente também é corroborada por Yutin *et al* (2014), que além de contestar a existência de um quarto domínio afirma que os vírus gigantes surgiram a partir de um vírus de DNA pequeno seguido de um extensivo ganho gênico dos seus hospedeiros (Yutin *et al*, 2014).

Nesse sentido, o cenário atual sobre a evolução e classificação dos vírus gigantes é composto por várias hipóteses e controvérsias. Alguns autores já sugeriram até mesmo a criação de um novo sistema de classificação denominado TRUC, do inglês Things Resisting Uncompleted Classifications, no qual seriam incluídas bactérias, arqueias, eucariotos e os vírus gigantes pertencentes a proposta ordem *Megavirales* (RAOULT, 2013).

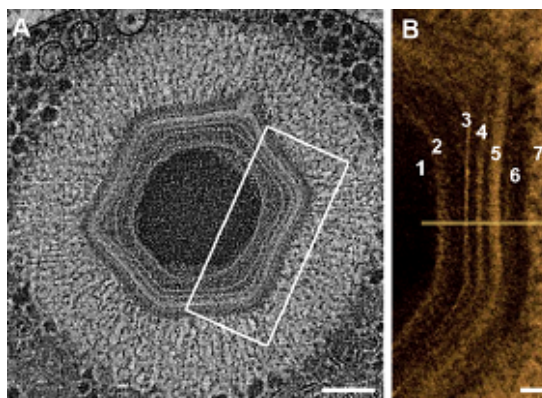


## 1.5. *Acanthamoeba polyphaga mimivirus* (APMV)

### 1.5.1. Estrutura

APMV, vírus protótipo do gênero *Mimivirus*, apresenta características morfológicas bastante peculiares. Estudos baseados em microscopia crioelétrica demonstraram que o capsídeo desse vírus apresenta aproximadamente 500 nm de diâmetro, sendo esse externamente recoberto por uma densa camada de longas fibrilas, de cerca de 125nm, que fazem com que o diâmetro total da partícula viral seja de aproximadamente 750 nm (XIAO *et al*, 2009).

Estudos recentes sugerem que a partícula viral contém uma membrana interna que circunda o genoma viral e que é aparentemente derivada do retículo endoplasmático do hospedeiro. Acredita-se que o capsídeo viral, que envolve essa membrana interna, seja formado por três camadas protéicas e que as fibrilas estejam associadas à camada protéica mais externa. No interior da membrana há a parede do cerne que é responsável por envolver o genoma viral, que por sua vez está associado a uma matriz fibrosa (Fig. 5) (MUTSAFI *et al*, 2013; ABRAHÃO *et al*, 2014).

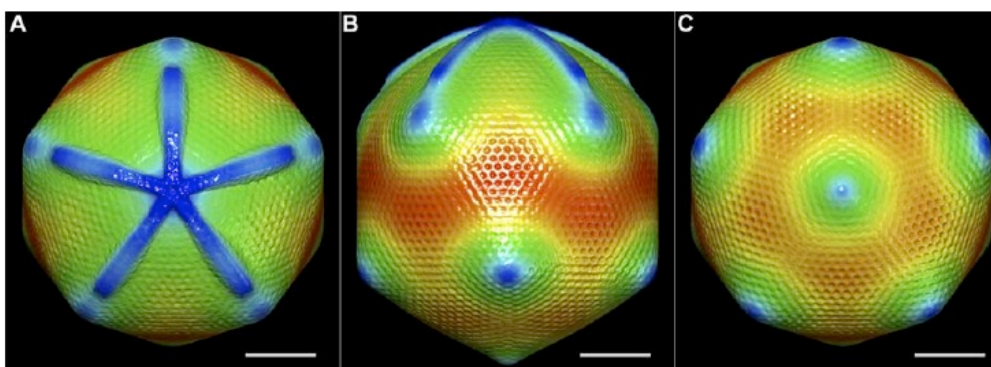


**Figura 5: Organização das camadas da partícula viral de APMV.** **A.** Microscopia Eletrônica de Varredura e Transmissão (STEM) do corte de uma partícula madura de APMV evidenciando suas múltiplas camadas. **B.** Ampliação da região delimitada em (A) evidenciando o cerne (1), parede do cerne (2), membrana interna (3), camadas protéicas do capsídeo (4), (5) e (6) e fibrilas (7). **Fonte:** Mutsafi *et al*, 2013 - modificado.

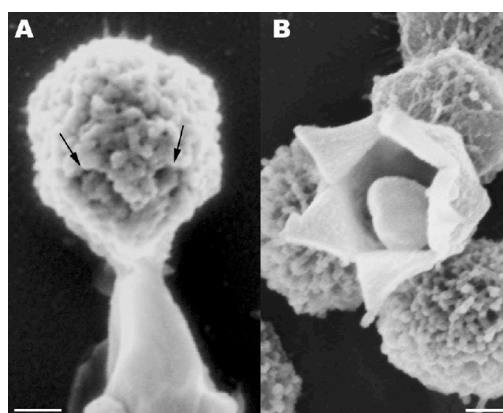
O APMV apresenta um número de triangulação de aproximadamente 1180, indicando que o capsídeo contém cerca de 70.800 moléculas individuais



da proteína estrutural L425. Estudos prévios envolvendo técnicas de criomicroscopia e de força atômica demonstraram que APMV apresenta simetria icosaédrica, com depressões que são rodeadas por seis capsômeros triméricos, evidenciando um arranjo hexagonal. No entanto, Zauberman *et al* (2008), também demonstraram, a partir de microscopia eletrônica de transmissão, que a partícula viral apresenta um único vértice modificado em formato de estrela do mar que é chamado de “star-gate” ou “star-fish” que confere ao vírus uma simetria semi-icosaédrica pentagonal (ou semi-icosaédrica) (Fig.6). Essa estrutura diferenciada possibilita a abertura do capsídeo e, conseqüentemente, a fusão da membrana viral interna com a membrana do fagossomo levando à formação de um canal de membranas por onde o DNA é liberado para o citoplasma da célula hospedeira (Fig. 7) (XIAO *et al*, 2009; XIAO e ROSSMANN, 2011).



**Figura 6: Reconstrução gráfica de microscopia crio eletrônica de partículas de APMV. A. Star-gate. B. vértices da partícula. C. vértice oposto ao star-gate. Fonte: Xiao *et al*, 2009 - adaptado**



**Figura 7: Microscopia eletrônica de varredura evidenciando a abertura do star-gate. A e B. APMV apresentando via de liberação de DNA diferenciada. Fonte: Zauberman *et al*, 2008 - adaptado.**

Como dito anteriormente, a partícula viral dos mimivírus é recoberta por uma densa camada de fibrilas de composição protéica que são envoltas por uma matriz de peptidoglicanos, o que condiz com o fato de APMV ser corado pelo método de Gram e ter sido inicialmente identificado como uma bactéria. Até recentemente, essas fibrilas não tinham suas funções completamente esclarecidas e alguns autores sugeriam que elas poderiam estar envolvidas na interação vírus-hospedeiro, na agregação viral, na proteção contra a radiação solar e também funcionar como um mecanismo de atração para amebas (SUZAN-MONTI *et al*, 2005; XIAO *et al*, 2009). No entanto, trabalhos desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa, e ainda não publicados, demonstraram que as fibrilas não são essenciais na multiplicação dos mimivírus, mas estão diretamente relacionadas a adesão viral à superfície celular e que essa interação é mediada por glicanos, principalmente por N-acetilglicosamina. Além disso, esses estudos também sugerem que as fibrilas de APMV são capazes de interagir com bactérias, fungos e até mesmo artrópodes, sendo que a adesão a esses outros micro-organismos pode facilitar a fagocitose dos mimivírus pelo seu hospedeiro natural.

Essa diversidade de características estruturais encontradas em APMV levam alguns autores a sugerir que os mimivírus são verdadeiras “quimeras biológicas”. O genoma envolto por matrizes fibrosas e membranas lipídicas apresenta similaridade com as células eucarióticas, enquanto que o peptidoglicano externo mimetiza a parede celular bacteriana. Além disso, a presença de um único vértice por onde o genoma viral é liberado se assemelha à cauda dos bacteriófagos. Dessa maneira, vários pesquisadores acreditam que os mimivírus, assim como outros NCLDVs, podem ter adquirido genes de eucariotos, procariotos, assim como arqueias por meio de transferência gênica horizontal e lateral (TGH/TGL) (XIAO *et al*, 2009; ABRAHÃO *et al*, 2014).

### **1.5.2. Genoma**

APMV apresenta um genoma de DNA dupla fita com aproximadamente 1,2 Mb que é composto por uma região central altamente conservada que codifica principalmente proteínas estruturais e enzimas envolvidas no metabolismo do DNA. Além disso, o genoma também é caracterizado por uma

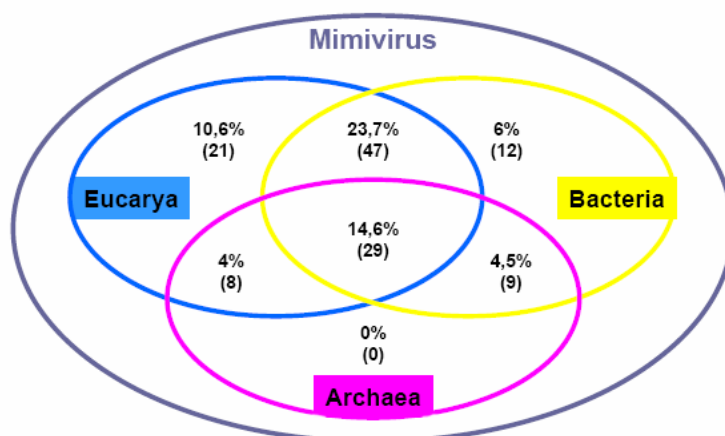
alta capacidade codificadora, de cerca de 90%, e pela presença de mais de 1200 janelas de leitura abertas (ORFs). Algumas sequências do genoma de APMV exibem pouca ou nenhuma homologia com quaisquer outras sequências nucleotídicas conhecidas que são chamadas de ORFans. Outra particularidade do genoma de APMV é o alto conteúdo de adenina e timina (AT) que chegam a compor 75% de todo o conteúdo de nucleotídeos (RAOULT *et al*, 2004; SUZAN-MONTI *et al*, 2005; CLAVERIE e ABERGEL, 2010; COLSON *et al*, 2013b).

O mecanismo de replicação do genoma de APMV ainda é desconhecido, mas sabe-se que o DNA pode assumir uma conformação circular pela presença de repetições invertidas, de aproximadamente 600 nucleotídeos, presentes nas extremidades das fitas lineares. Essas repetições permitem que o DNA assuma um formato semelhante a letra Q com uma extremidade longa e outra curta (COLSON E RAOULT, 2013c).

Além do seu grande genoma, APMV apresenta outras características que o distinguem de outros vírus, incluindo dos NCLDVs, como a presença de genes que codificam tRNAs (embora alguns phycodnavírus também condifiquem), aminoacil-tRNA sintetases, fatores de iniciação e alongamento da tradução, fatores de liberação de peptídeos e capacidade de realizar glicosilação, o que sugere que esses vírus não são completamente dependentes da maquinaria celular de seu hospedeiro. A presença desses genes, assim como outros envolvidos na biossíntese de proteínas (ribonucleotídeo redutases), na replicação e reparo de DNA (DNA polimerase da família B, chaperonas e topoisomerasas do tipo I e II) e na transcrição (RNA polimerase DNA dependente) levaram a estudos abrangendo outras proteínas de bactérias, arqueias, eucariotos e linhagens virais, afim de melhor compreender as relações filogenéticas entre esses grupos (RAOULT *et al*, 2004; SUHRE, 2005; SUZAN-MONTI *et al*, 2005; LEGENDRE *et al*, 2010; LEGENDRE *et al*, 2011; COLSON *et al*, 2013).

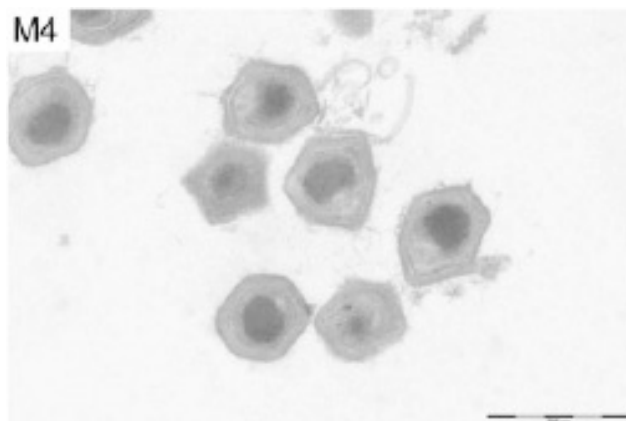
Essa busca por genes homólogos aos genes presentes em APMV levou à elaboração de árvores filogenéticas que sugeriram que os mimivírus hipoteticamente adquiriram a maioria desses genes por TGH a partir dos seus hospedeiros, no caso as amebas, ou por TGL a partir de outros micro-organismos que parasitam o mesmo hospedeiro de forma simpátrica (Fig. 8). Além disso, a detecção de outros eventos de TGH envolvendo genes

provenientes de diferentes eucariotos sugere que o espectro de hospedeiros de mimivírus pode ser bem maior do que o que se conhece atualmente. Outros autores acreditam ainda que os virófagos podem atuar como elementos genéticos móveis, promovendo a transferência e a recombinação gênica. Logo, o processo de TGH e TGL parecem ser importantes no processo evolutivo do genoma dos mimivírus (MOREIRA e BROCHIER-ARMANET, 2008; CLAVERIE *et al*, 2009c; FILÉE e CHANDLER, 2010).



**Figura 8: Diagrama de Venn de 128 genes de APMV em relação à ortologia com outros Domínios.** O número de genes homólogos nos três domínios da vida pode ser observado. **Fonte:** Moreira e Brochier-Armanet, 2008.

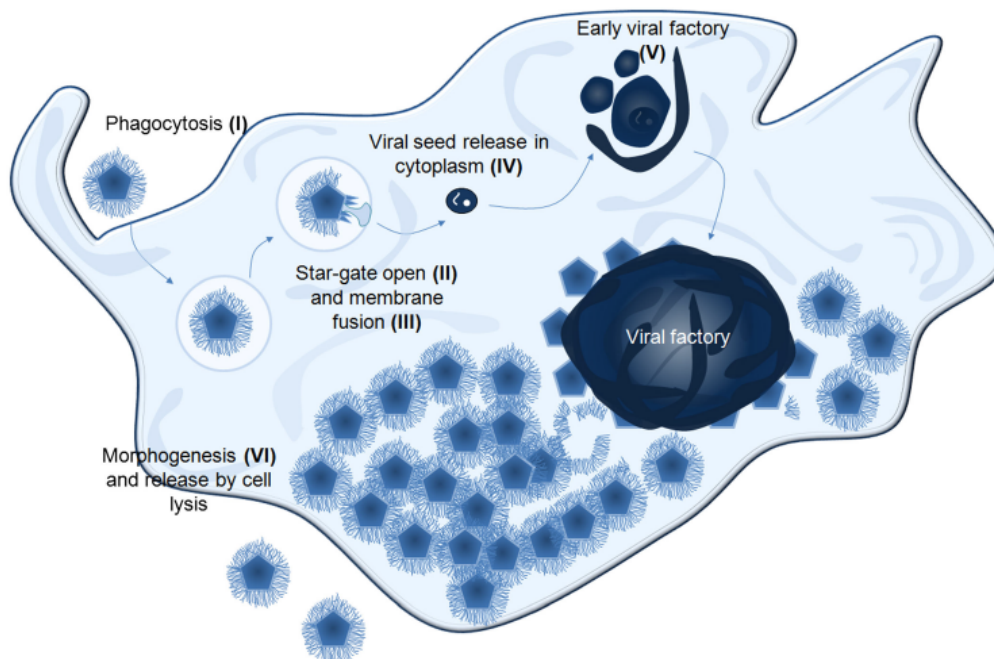
O papel do ambiente no repertório genômico do APMV também já foi estudado por Boyer *et al* em 2011. Nesse estudo foi avaliada a ocorrência de alterações genômicas de APMV em cultura axênica de amebas, na ausência de simpatria com outros micro-organismos. Após 150 passagens virais em cultivo de amebas germ-free, foi observada a presença de partículas virais de APMV, denominadas de M4, morfologicamente e geneticamente diferentes, com perda da camada superficial de fibrilas e redução de 16% do genoma (Fig. 9). De uma maneira geral, esse estudo sugere que a transição dos mimivírus de um ambiente simpátrico para um alopátrico está associada com a ocorrência de deleção de genes que podem estar envolvidos no controle de outros micro-organismos competidores.



**Figura 9: Microscopia eletrônica de transmissão do vírus M4.** Partículas virais de M4 evidenciando a perda da maior parte das fibrilas que envolvem o capsídeo viral. **Fonte:** Boyer *et al*, 2011.

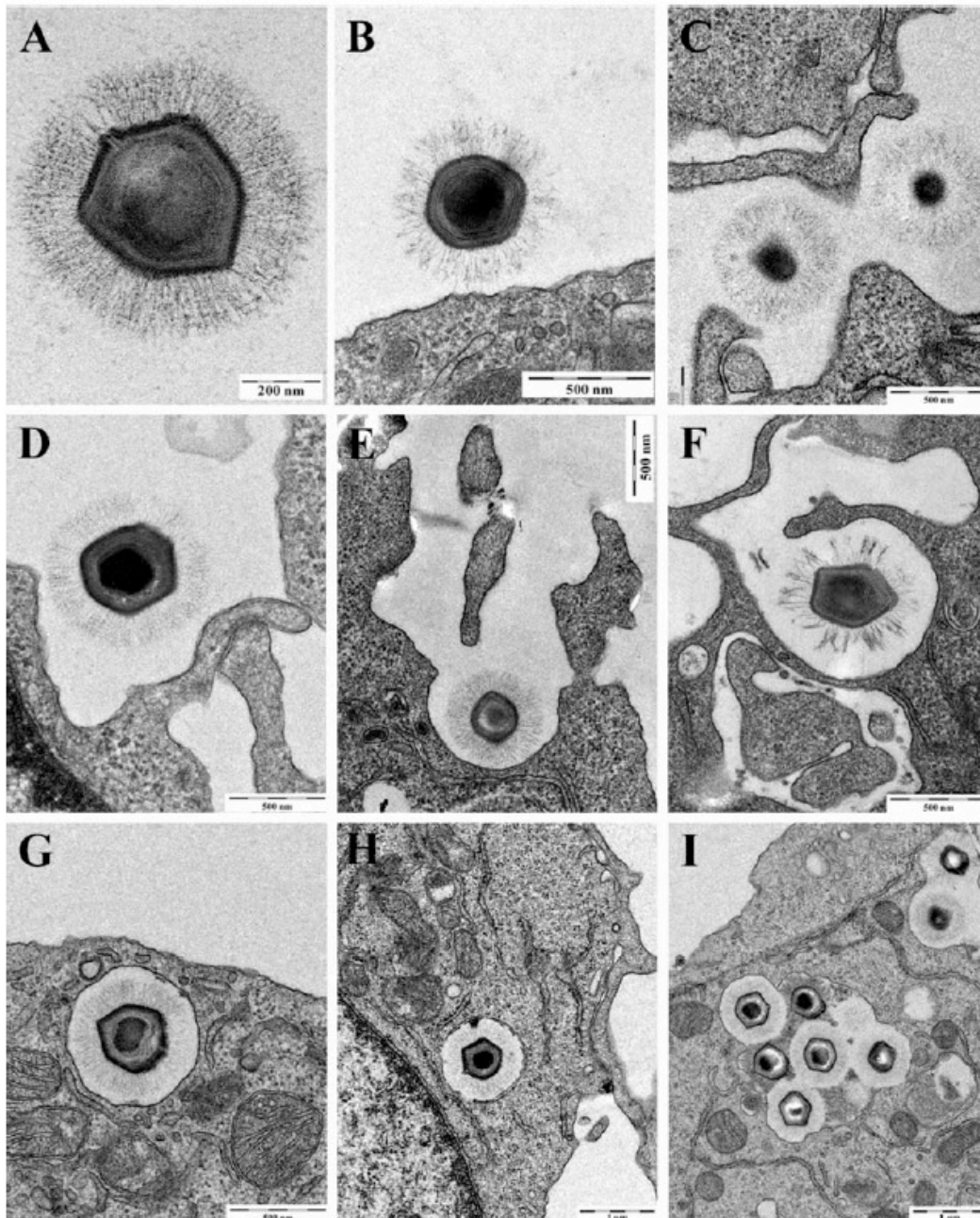
### 1.5.3. Ciclo de multiplicação

Os mimivírus apresentam uma clara relação filogenética com as famílias virais que compõem o grupo dos NCLDVs, no entanto, no que concerne ao ciclo de multiplicação, eles se assemelham muito mais aos poxvírus do que aos outros vírus deste grupo. Isso se deve ao fato da multiplicação dos mimivírus, assim como a dos poxvírus, ocorrer no citoplasma das células hospedeiras, em zonas delimitadas denominadas de fábricas virais (Fig. 10). Dessa maneira, até onde sabemos atualmente, o genoma de APMV não é direcionado até o núcleo da célula e não cruza a membrana nuclear, sendo que o início da transcrição dos genes precoces virais se dá em parte por complexos de transcrição que são carregados pelas partículas do APMV. No entanto, esse processo não deve ser considerado um processo completamente independente do núcleo hospedeiro, uma vez que fatores nucleares necessários à replicação podem participar do processo (SUZAN-MONTI *et al*, 2007; CLAVERIE *et al*, 2009b; MUTSAFI *et al*, 2010; ABRAHÃO *et al*, 2014).



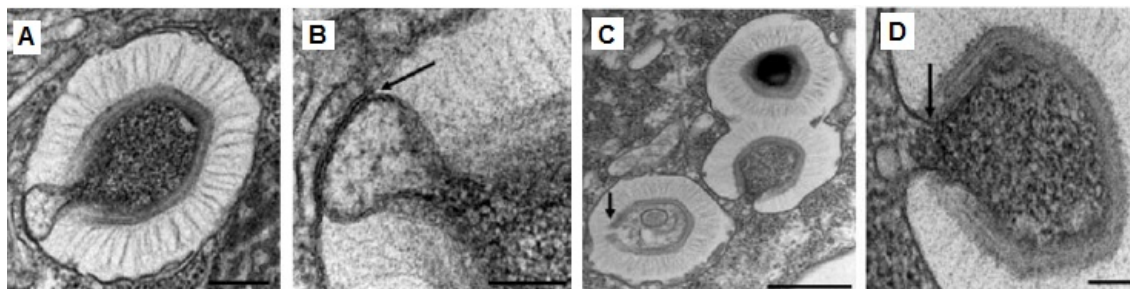
**Figura 10: Ciclo de multiplicação do APMV em ameba.** Representação esquemática do ciclo de multiplicação dos mimivírus. I. Fagocitose. II. Penetração viral por fagossomo, seguida por abertura do star-gate. III. Fusão da membrana viral. IV. Liberação do cerne viral. V. Início da formação das fábricas virais. VI. Crescimento das fábricas virais, seguida da morfogênese viral e liberação das novas partículas virais por lise celular. **Fonte:** Abrahão *et al*, 2014.

O ciclo de multiplicação do APMV é iniciado com a penetração do vírus nas células hospedeiras através da fagocitose. Em seguida, partículas virais podem ser observadas dentro de fagossomos em amebas e também em outras células fagocíticas, como macrófagos (Fig. 11). Logo após, ocorre a abertura do vértice pentagonal do capsídeo, o star-gate, e a extrusão da membrana interna da partícula viral que se funde com a membrana do fagossomo. Essa fusão leva à formação de um canal que permite que o cerne do APMV seja liberado no citoplasma da ameba (Fig. 12) (SUZAN-MONTI *et al*, 2007; CLAVERIE *et al*, 2009b; MUTSAFI *et al*, 2010; ABRAHÃO *et al*, 2014).



**Figura 11: Microscopias eletrônicas das etapas de internalização de APMV em macrófagos (RAW 264.7).** A. APMV isolado. B. APMV se ligando à membrana celular. C. APMV ancorado às extensões da membrana celular. D e E. Extensões celulares começam a internalizar a partícula de APMV. F. APMV englobado. G e H. Fagossomo contendo o APMV dentro do citoplasma. I. Vesículas contendo partículas de APMV que se fundiram. **Fonte:** Ghigo *et al*, 2008.



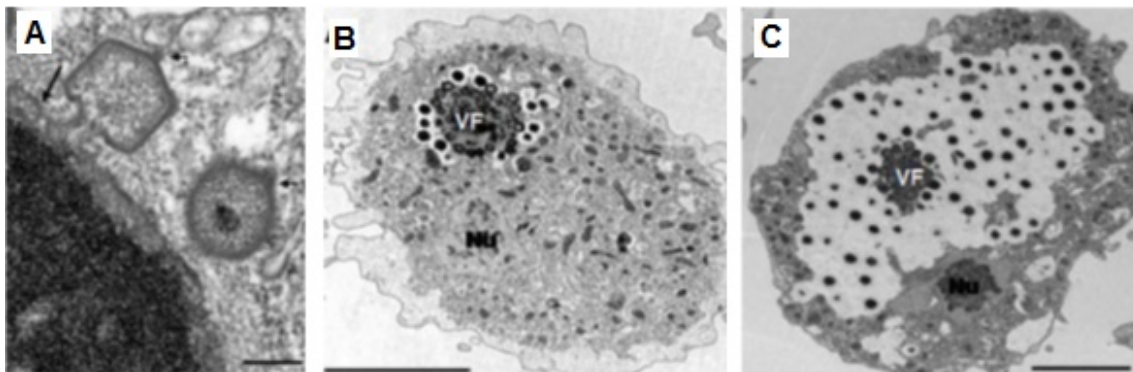


**Figura 12: Microscopias eletrônicas de transmissão evidenciando fusão da membrana interna viral com a membrana do fagossomo.** **A.** Extrusão da membrana interna viral em direção à membrana do fagossomo. **B.** Maior aumento da imagem (A) evidenciando o contato entre as duas membranas (seta preta) **C.** Partículas de APMV com membranas já fusionadas. **D.** Maior aumento da imagem (D) evidenciando a fusão das duas membranas (seta preta). **Fonte:** Suzan-Monti *et al*, 2007 - modificado.

Após a liberação do cerne, o genoma viral é estabilizado sob a forma de núcleos esféricos livres, as chamadas sementes virais, ao redor das quais são formadas as fábricas virais, nas quais ocorre uma massiva replicação do DNA. Oposto aos sítios aonde ocorrem a replicação do genoma, há um acúmulo de novos RNAs mensageiros (mRNA). A transcrição dos genes ocorre de uma forma temporal: transcrição de genes precoces, intermediários e tardios (SUHRE, AUDIC e CLAVERIE, 2005; LEGENDRE *et al*, 2010; MUTSAFI *et al*, 2010).

A fase tardia de multiplicação do APMV é caracterizada por um aumento da fábrica viral, devido a síntese de proteínas estruturais, e pelo início da morfogênese viral e do empacotamento do DNA (Fig. 13). Na periferia das fábricas virais ocorre uma alta acumulação de vírions em fase final de morfogênese e em seguida o ciclo de multiplicação é finalizado com a liberação das novas partículas virais pela lise celular (CLAVERIE *et al*, 2009b; CLAVERIE e ABERGEL, 2009a; MUTSAFI *et al*, 2010).



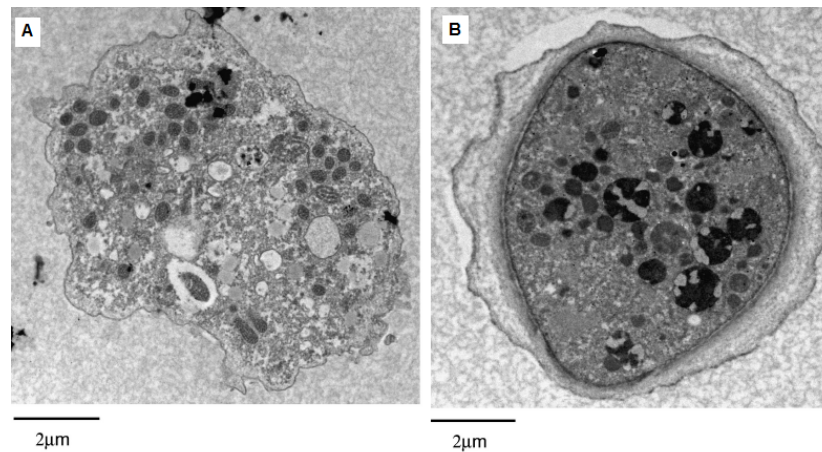


**Figura 13: Microscopias eletrônicas das fábricas virais dos mimivírus.** **A.** Partícula de APMV, sem fibrilas, na zona periférica da fábrica viral. **B e C.** Partículas de APMV completas ao redor de fábricas virais. Em (B) após 8 horas de infecção e em (C) após 12 horas. **Fonte:** Suzan-Monti *et al*, 2007 - modificado.

### 1.6. *Acanthamoeba*

Amebas são protistas unicelulares que podem ingerir partículas maiores do que  $0,5 \mu\text{m}$  por fagocitose. O gênero *Acanthamoeba* foi descrito pela primeira vez por Castellani em 1930, quando ele observou a presença de amebas em um cultivo de leveduras da espécie *Cryptococcus pararoseus*. No entanto, somente em 1931, *Acanthamoeba* foi estabelecido para agrupar amebas que apresentam numerosas projeções espinhosas e superficiais conhecidas como acantopódios. Atualmente *Acanthamoeba* está classificada dentro do super grupo *Amoebozoa* e abrange 19 genótipos (T1 a T19) (SIDDIQUI e KHAN, 2012; TRABELSI *et al*, 2012; CASTRILLÓN e OROZCO, 2013).

O ciclo de vida das espécies do gênero *Acanthamoeba* envolve dois estágios: uma forma ativa conhecida como trofozoíto e uma forma de resistência conhecida como cisto (Fig. 14). As amebas em estágio de trofozoíto podem variar de tamanho, entre  $25$  e  $40 \mu\text{m}$ , e se alimentam de bactérias, leveduras e algas por fagocitose, ou podem captar nutrientes dispersos no ambiente por pinocitose. Sob condições ótimas de crescimento, os trofozoítos se dividem por mitose, no entanto, sob condições adversas, eles sofrem diferenciação celular e encistam. Os cistos apresentam de  $13$  a  $20 \mu\text{m}$  de tamanho, variando de acordo com a espécie, e apresentam uma dupla parede: uma mais interna composta de celulose, e uma mais externa, composta de proteínas e polissacarídeos (SIDDIQUI e KHAN, 2012; CASTRILLÓN e OROZCO, 2013).



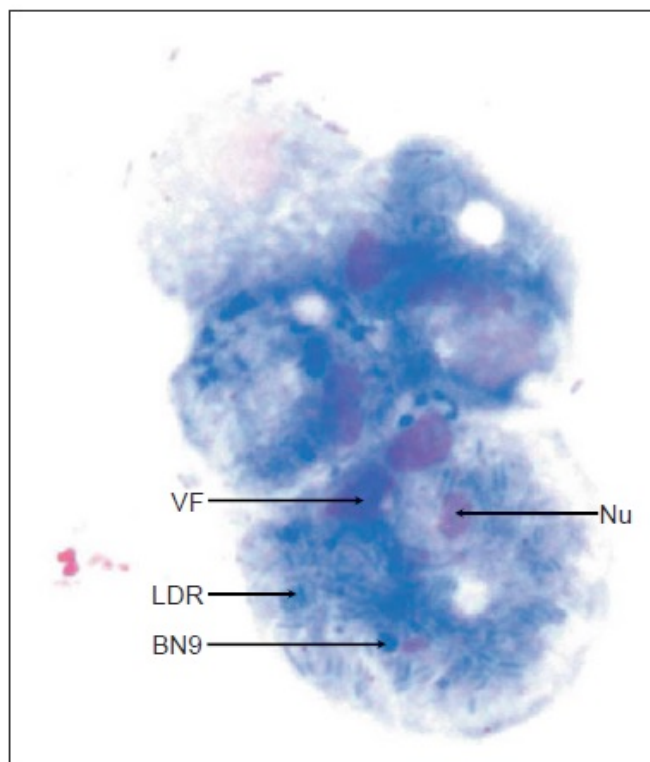
**Figura 14: Estágios do ciclo de vida de amebas do gênero *Acanthamoeba*. A.** Estágio de trofozoíto. **B.** Estágio de cisto. **Fonte:** Siddiqui e Khan, 2012 - modificado.

As espécies do gênero *Acanthamoeba* estão entre os protozoários mais frequentemente encontrados na natureza. Elas estão distribuídas mundialmente e têm sido isoladas de amostras de terra, poeira, ar, água doce natural e tratada, água do mar, piscinas, águas residuais, sedimentos, ar condicionado, hospitais, lentes de contato, cultivos celulares, unidades de diálise, estações de lavagem de olhos e até mesmo da Antártida. Além disso, elas também foram encontradas em cavidades nasais, garganta, faringe, lesões de pele, fezes humanas, córnea, urina e fluidos cerebrais (SIDDIQUI e KHAN, 2012; CASTRILLÓN e OROZCO, 2013).

Apesar de serem caracterizadas como amebas de vida livre, algumas espécies desse gênero, principalmente *Acanthamoeba polyphaga* e *A. castellanii*, podem ser consideradas como patógenos oportunistas e causar algumas doenças em humanos, principalmente em imunocomprometidos. Dentre as doenças associadas a esses protozoários estão lesões cutâneas, sinusite, ceratite, e uma rara, mas fatal, encefalite, conhecida como encefalite amebiana granulomatosa (SIDDIQUI e KHAN, 2012; CASTRILLÓN e OROZCO, 2013).

Além das próprias amebas serem agentes causadores de doenças, elas também servem como plataformas de replicação de outros micro-organismos patogênicos, incluindo bactérias causadoras de infecções respiratórias, como *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Coxiella burnetii*, e leveduras, como *Cryptococcus neoformans*. Além disso, espécies de *Acanthamoeba* são hospedeiros naturais para os mimivírus e para outros vírus

gigantes, como os marseillevírus, pandoravírus e pithovírus (Fig. 15). Dessa maneira, o ambiente no interior da ameba se torna propício para a ocorrência de transferência gênica lateral (TGL) entre vírus e bactérias, e por esse motivo as amebas são conhecidas como “melting pots” propiciando o advento de organismos quiméricos (RAOULT e BOYER, 2010; BORATTO *et al*, 2013, PAGNIER *et al*, 2015)



**Figura 15: *Acanthamoeba castellanii* corada por Hemacolor evidenciando a presença de uma coinfeção por vírus e bactérias.** Pode-se observar o núcleo (Nu), bactérias da espécie *Legionella drancourtii* (LDR) e gênero *Parachlamydia*, linhagem BN9 (BN9), e a fábrica viral de marseillevírus (VF). **Fonte:** Raoult e Boyer, 2010.

Devido ao potencial patogênico de algumas amebas, assim como a presença de outros micro-organismos também patogênicos coinfectando esses protozoários, alguns estudos foram conduzidos no sentido de analisar a presença de amebas em diversos ambientes hospitalares e discutir possíveis fatores de risco associado a sua presença. Carlesso *et al* (2007), conseguiram isolar amebas do gênero *Acanthamoeba* de poeira e biofilme de ambientes como bebedouro, centro cirúrgico, emergência e Unidades de Tratamento Intensivo (UTI) do Hospital das Clínicas de Porto Alegre. Silva e Rosa (2003) isolaram amebas de vida livre (AVL) de poeira hospitalar de dois hospitais do município

de Presidente Prudente em São Paulo. Costa *et al* (2010) também isolaram *Acanthamoeba* de poeira coletadas na Unidade Cirúrgica, corredores, enfermarias, UTI e seção oftalmológica, em 2006, no Hospital das Clínicas da Universidade Federal do Paraná (CARLESSO *et al*, 2007; SILVA e ROSA, 2003; COSTA *et al*, 2010).

Além desses, outros trabalhos demonstraram o isolamento de AVLs em redes hídricas em Laussane, Suíça; em enfermarias de um hospital em Teerã, Irã; em águas de hemodiálise de um hospital em Alexandria, Egito, e em redes hídricas em um hospital nos EUA. Mais recentemente, Pagnier *et al* (2015), também publicaram o isolamento de *Acanthamoeba* e *Vermamoeba vermiformis* da água de três hospitais em Marseille (THOMAS *et al*, 2006; LASJERDI *et al*, 2011; HASSAN *et al*, 2012; OVRUTSKY *et al*, 2013).

Apesar de *Acanthamoeba* servir como plataforma de replicação para bactérias causadoras de infecções respiratórias, como pneumonia, poucos estudos já foram realizados para analisar o papel desses protozoários como causa primária desse tipo de infecção. Em 2014, Bradbury *et al* descreveram o isolamento de *Acanthamoeba* a partir do escarro de um paciente internado na UTI, demonstrando que a colonização do trato respiratório por *Acanthamoeba* pode ocorrer. No entanto, os próprios autores afirmam que o paciente pode ter entrado em contato com essas amebas após ser intubado por um tubo endotraqueal colonizado, e que não necessariamente esses protozoários são verdadeiros agentes etiológicos de infecções respiratórias.

Além desse estudo, um único caso documentado de pneumonia causada por *Acanthamoeba* foi publicado, em 1998, por Im e Kim. Nesse caso fatal, amebas do gênero *Acanthamoeba* foram isoladas do lavado bronquial de uma menina coreana de 7 meses de idade que apresentava pneumonia multi-lobar no pulmão esquerdo. Entretanto, após o óbito análises histológicas não foram realizadas para comprovar a invasão tecidual pelas amebas.

### **1.7. Importância Clínica dos vírus gigantes**

A pneumonia é uma das principais causas de morte relacionada à infecção em todo o mundo. No entanto, cerca de 20 a 50% dos casos apresentam etiologia desconhecida. Isso se deve a inespecificidade dos métodos de

diagnóstico e também a falta de conhecimento sobre agentes etiológicos emergentes. Diante disso, identificar novos agentes causadores de pneumonia nosocomial e comunitária é uma preocupação de saúde pública (LA SCOLA, 2005).

Nos últimos anos, os vírus têm sido apontados como possíveis causadores de infecções respiratórias em pacientes imunocompetentes, assim como de outras doenças nosocomiais, principalmente em pacientes internados em UTIs. Desde a descoberta do APMV, durante um surto de pneumonia sem causa conhecida em Bradford, na Inglaterra, os mimivírus têm sido apontados como potenciais patógenos do trato respiratório e prováveis agentes causadores de pneumonia em seres humanos. Além disso, outros estudos demonstraram que os mimivírus também podem estar associados a ocorrência de artrite (LA SCOLA *et al*, 2005; BERGER *et al*, 2006; VINCENT *et al*, 2010; SAADI *et al*, 2013a; SHAH *et al*, 2013; LUYT *et al*, 2014; KUTIKHIN *et al*, 2014).

As evidências de que APMV poderia ser um possível causador de pneumonia, se fortaleceu após um técnico do laboratório do pesquisador francês Dr. Didier Raoult desenvolver pneumonia subaguda, com tosse seca, febre e dor no peito. Amostras sorológicas foram analisadas contra vários agentes causadores de pneumonia, e os resultados foram negativos para todos eles, exceto para APMV, para o qual se observou soro conversão (RAOULT *et al*, 2007).

No sentido de melhor entender a relação dos mimivírus com a ocorrência de pneumonia, vários estudos sorológicos, moleculares, *in vitro* e *in vivo* foram desenvolvidos. Os estudos sorológicos, envolvendo amostras de pacientes diagnosticados com pneumonia nosocomial ou pneumonia adquirida na comunidade, demonstraram a presença de uma significativa taxa de anticorpos contra mimivírus nesses pacientes. Além disso, estudos moleculares foram capazes de amplificar o DNA de mimivírus a partir de um lavado bronquial de um paciente que apresentava pneumonia de etiologia desconhecida. (LA SCOLA, 2005; BERGER *et al*, 2006; RAOULT *et al*, 2007; DARE *et al*, 2008; COSTA *et al*, 2012; VANSPAUWEN *et al*, 2012; COLSON *et al*, 2013).

No ano de 2006, Khan *et al* desenvolveram um estudo *in vivo*, inoculando camundongos com APMV por via intra-cardíaca, para elucidar se esse vírus era

patogênico, ou seja, se ele era capaz de induzir alterações histológicas, inflamação e, ou, destruição tissular. Após o experimento, os pesquisadores averiguaram que 75% dos animais apresentavam pneumonia aguda com espessamento de paredes alveolares, infiltração celular de leucócitos, macrófagos, linfócitos, dano alveolar difuso e presença de eritrócitos no lúmen alveolar. A partir do tecido do pulmão desses camundongos também foi possível isolar o vírus e detectar antígenos por ensaio de imunofluorescência indireta. Esses dados sugerem que APMV é patogênico para camundongos, em condições experimentais, promovendo a ocorrência de pneumonia murina (KHAN *et al*, 2006).

Outro estudo, conduzido por Ghigo *et al* (2008), demonstrou que o APMV é capaz de penetrar em macrófagos, mas não é capaz de penetrar células não fagocíticas, como fibroblastos, células epiteliais ou neuronais. Além disso, a fagocitose de APMV pelos macrófagos levou a modificações no citoesqueleto celular, dependente de PI3K, possibilitando um ciclo de multiplicação viral produtivo com um aumento significativo de cópias do DNA viral. Com base nesses dados, os pesquisadores concluíram que o APMV é um patógeno de macrófagos, sugerindo que esse vírus poderia se multiplicar em macrófagos alveolares, levando à pneumonia humana (GHIGO *et al*, 2008).

Recentemente, Saadi *et al* (2013b) publicaram o primeiro isolamento de um mimivírus, denominado LBA111, a partir de um aspirado bronquial de uma paciente com pneumonia. O genoma viral foi completamente sequenciado e revelou que LBA111 pertence à linhagem C do grupo I da família *Mimiviridae*, sendo, portanto, um vírus novo, descartando assim a possibilidade de contaminação da amostra por outro mimivírus multiplicado em laboratório. Amostras sorológicas também foram testadas e apresentaram anticorpos contra proteínas específicas do LBA111, confirmando assim a infecção da paciente. No mesmo ano, Saadi *et al* (2013a) publicaram um segundo estudo descrevendo o isolamento de outro mimivírus a partir das fezes de um paciente com pneumonia, esse novo mimivírus foi denominada Shan e classificado também como um mimivírus da linhagem C (SAADI *et al*, 2013a; SAADI *et al*, 2013b).

Frente aos resultados obtidos, alguns autores consideram que os mimivírus são, de fato, potenciais patógenos humanos causadores de pneumonia. No entanto outros pesquisadores não obtiveram sucesso na detecção destes vírus,

em uma gama variada de pacientes (DARE *et al*, 2008; COSTA *et al*, 2010; VANSPAUWEN *et al*, 2013).

A presença de material genético e de anticorpos contra outros vírus gigantes em amostras clínicas também já foi reportada por outros pesquisadores que analisaram o viroma humano. Além disso, vírus da família *Marseilleviridae*, como o senegalvírus e o Giant Blood Marseillevirus, também foram isolados de amostras de sangue e fezes de indivíduos assintomáticos. Esses dados, juntamente com outros estudos que detectaram a presença do genoma de APMV em macacos e bovinos, assim como demonstraram que o APMV é reconhecido pelo sistema imune dos vertebrados e evade elementos do sistema interferon, sugerem que os vertebrados poderiam ser possíveis hospedeiros para os vírus gigantes (GOODMAN, 2013; POPGEORGIEV *et al*, 2013a; POPGEORGIEV *et al*, 2013b; POPGEORGIEV *et al*, 2013c; SILVA *et al*, 2013; DORNAS *et al*, 2014; ABRAHÃO *et al*, 2014).

Diante dessa controvérsia e de algumas questões ainda não respondidas em relação à atuação dos vírus gigantes como patógenos humanos, estudos adicionais e mais abrangentes são necessários (RAOULT *et al*, 2007).

## 2. JUSTIFICATIVA

Desde a descoberta do APMV, durante um surto de pneumonia com etiologia desconhecida, em Bradford, na Inglaterra, os mimivírus têm sido apontados como possíveis patógenos do trato respiratório humano e agentes causadores de pneumonia. Essa suspeita se intensificou após um técnico de um laboratório francês, que lidava com altos títulos de mimivírus, desenvolver pneumonia subaguda. Em seguida vários outros estudos foram publicados descrevendo a presença de anticorpos contra mimivírus, assim como a presença de DNA viral em soros de pacientes com pneumonia. Além disso, outros pesquisadores relataram a capacidade desses vírus em provocar pneumonia em modelo murino e de serem fagocitados por células fagocíticas profissionais, como os macrófagos. Recentemente, no ano de 2013, foi notificado o primeiro isolamento de um mimivírus a partir do aspirado bronquial de uma paciente com pneumonia, aumentando ainda mais as evidências de que os mimivírus estão associados à pneumonia humana. Amebas do gênero *Acanthamoeba* são hospedeiros naturais dos mimivírus e apresentam uma ampla distribuição na natureza, sendo encontradas nos mais diversos ambientes, inclusive em hospitais: centros cirúrgicos, UTI, enfermarias, águas de hemodiálise, redes hídricas de abastecimento ao hospital, e até mesmo de poeira. Diante da presença comprovada de amebas em ambientes hospitalares e do possível papel dos mimivírus como agentes etiológicos de pneumonia, novos estudos abordando a distribuição desses vírus nesses ambientes são necessários. Além disso, analisar a distribuição desses vírus em outros ambientes, a título de comparação, se faz necessário para analisar se há uma correlação ou se a distribuição é diferenciada.



### **3. OBJETIVOS**

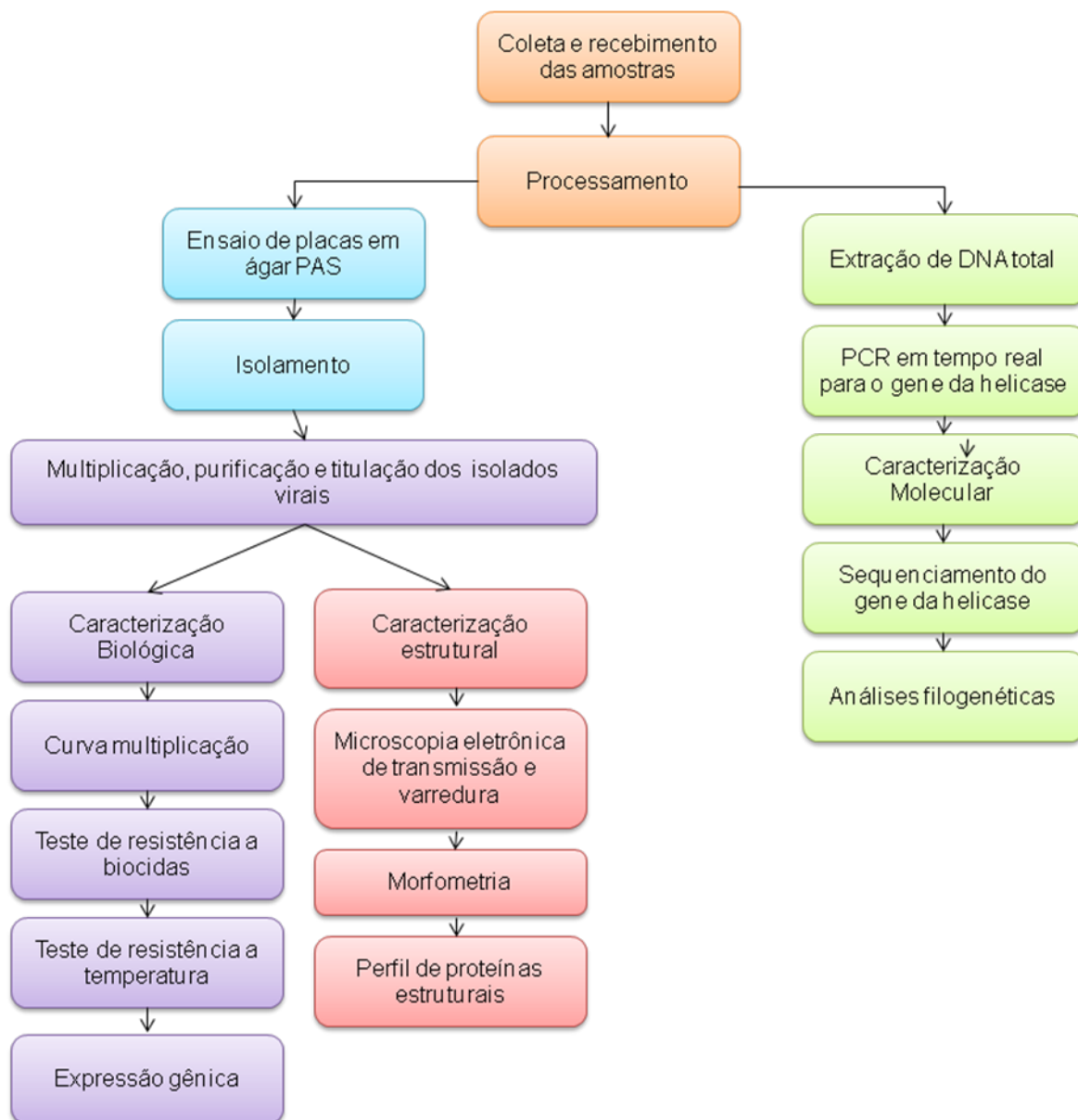
#### **3.1. Objetivo geral**

Avaliar a distribuição de mimivírus em diferentes ambientes do Hospital das Clínicas de Belo Horizonte (HC) - Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e caracterizar os vírus isolados.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Avaliar a positividade de amostras coletadas em diferentes ambientes do HC/UFMG através de qPCR para detecção de mimivírus;
- Isolar vírus gigantes a partir dessas amostras;
- Caracterizar biologicamente os vírus isolados através da curva de multiplicação viral, de testes de resistência a biocidas e temperatura e do perfil de expressão gênica de tRNAs e tRNAs sintetases,
- Realizar a caracterização estrutural dos novos vírus utilizando microscopia eletrônica de transmissão e varredura, morfometria e perfil de proteínas estruturais;
- Caracterizar molecularmente os isolados a partir do sequenciamento do gene da helicase e posterior análise filogenética;
- Avaliar a presença de mimivírus pelos métodos biológicos e moleculares supracitados em diferentes ambientes do Instituto de Ciências Exatas (ICEx) da UFMG, como ambiente experimental controle.

#### 4. FLUXOGRAMA



## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1. Materiais

#### 5.1.1. Meio de cultura

##### 5.1.1.1. Meio PYG

O meio de cultura PYG (meio protease peptona extrato de levedura e glicose) foi o meio utilizado para o cultivo de amebas de vida livre. Três soluções diferentes foram preparadas separadamente, em seguida foram misturadas e o volume foi completado para 1 litro. Em um recipiente foi preparada a primeira solução contendo 300 mL de água destilada, 8  $\mu$ M de sulfato de magnésio heptahidratado ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) (Merck, Alemanha), 0,5  $\mu$ M de cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) (Merck, Alemanha), 5 nM de sulfato de ferro amoniacal hexahidratado ( $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4) \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) (Merck, Alemanha), 1,4 mM de fosfato dibásico de sódio heptahidratado ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) (Merck, Alemanha), 2,5 mM de fosfato monobásico de potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) (Merck, Alemanha), 3,4 mM de citrato de sódio dihidratado ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) (Merck, Alemanha), que em seguida foi homogeneizada até a completa dissolução. A segunda solução foi preparada em outro recipiente, adicionando, à 200 mL de água destilada, 20g de protease peptona (extrato bacto-peptona) (Merck, Alemanha). A terceira solução foi preparada adicionando 0,05 M de glicose (Merck, Alemanha) à 200 mL de água destilada. As três soluções foram adicionadas a um mesmo recipiente e homogeneizadas. Em seguida o volume foi completado para 1L e o pH ajustado a 6,5 (Anexo I). O meio foi autoclavado a 121°C por 15 minutos, e após o resfriamento foi filtrado em filtros de 0,22  $\mu$ m para retirada de eventuais cristais. O meio foi armazenado em câmara fria (temperatura de 4 a 8°C) até o momento do uso. Foi feito também o teste de esterilidade em que 1 mL do meio foi adicionado a 9 mL de meio tioglicolato, por 7 dias a 37°C. Para uso, o meio foi suplementado com Soro Fetal Bovino (SFB) 7%, (Cultilab, Brasil), 200 U/mL de Penicilina (Cristália, Brasil), 50  $\mu$ g /mL de Gentamicina (Sigma, EUA) e 2,5  $\mu$ g/mL de Anfotericina B (Sigma, EUA). Ver anexo I de quantidades em gramas e volumes de cada reagente em anexos, no tópico 10.1.

## 5.1.2. Sistema celular

### 5.1.2.1. *Acanthamoeba castellanii* (ATCC 30010)

Amebas de vida livre pertencentes ao gênero *Acanthamoeba* são hospedeiras de uma variedade de micro-organismos, entre eles o APMV, e outros vírus gigantes. Para o isolamento dos vírus gigantes encontrados nas amostras testadas foram utilizadas amebas da espécie *Acanthamoeba castellanii* originadas da *American Type Culture Collection* (ATCC 30010) (Maryland, E.U.A.) e gentilmente cedidas pelo Laboratório de Amebíases do Instituto de Ciências Biológicas (ICB), da UFMG. Estas células foram utilizadas para testes de isolamento viral, titulação, multiplicação, curva de multiplicação, microscopia eletrônica, expressão gênica, testes de resistência e controle negativo para ausência de vírus em reações em cadeia da polimerase (PCR). Amebas *A. castellanii* foram cultivadas em garrafas de cultura (TPP, Suíça) contendo meio protease peptona extrato de levedura e glicose (PYG) suplementado com 7% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Brasil), gentamicina (50 µg/ml), penicilina potássica (200 U/mL) e anfotericina B (fungizona) (2,5 µg/ml) e incubadas à 32 °C, sendo as garrafas completamente vedadas. Os subcultivos foram realizados três vezes por semana ou de acordo com a necessidade, sendo a monocamada celular desprendida da superfície da garrafa de cultura através de um banho de gelo de cinco minutos. Após este processo, o conteúdo foi coletado, as células contadas em câmara de Neubauer e divididas em novas garrafas de cultura com a adição de meio PYG novo.

## 5.1.3. Vírus

### 5.1.3.1. *Acanthamoeba polyphaga mimivirus* (APMV)

O estoque inicial de APMV foi gentilmente cedido pelos Dr. Didier Raoult e Dr. Bernard La Scola (Universidade de Marseille, França). Estoques virais posteriores foram produzidos (item 5.2.6) e titulados (item 5.2.8), de acordo com a necessidade de uso nos testes biológicos e moleculares, em células *A. castellanii*.

### **5.1.3.2. Kroon virus (KV)**

O estoque inicial de KV foi produzido pelo nosso próprio grupo de pesquisa, segundo o item 5.2.6, no Laboratório de Vírus, após o isolamento do vírus em 2012. Estoques virais posteriores também foram produzidos e titulados, de acordo com a necessidade de uso nos testes biológicos em células *A. castellanii*. O KV foi escolhido para ser utilizado nesse trabalho por ser um mimivírus brasileiro com uma marcante diferença morfológica que é a presença de uma camada protéica a mais na composição do capsídeo viral.

### **5.1.3.3. Vírus M4**

O estoque inicial de M4 foi gentilmente cedido pelos Dr. Didier Raoult e Dr. Bernard La Scola (Universidade de Marseille, França). Estoques virais posteriores foram produzidos (item 5.2.6) e titulados (item 5.2.8), de acordo com a necessidade de uso nos testes biológicos e moleculares, em células *A. castellanii*. Como mencionado anteriormente, o M4 é um vírus morfológicamente e geneticamente diferente, com perda da camada superficial de fibrilas e redução de 16% do genoma, e por essas diferenças também foi escolhido para ser utilizado nesse trabalho.

### **5.1.4. Coleções de amostras**

No presente estudo foram utilizadas duas coleções de amostras:

1) 242 amostras de poeira hospitalar coletadas, com o auxílio de swabs, nos anos de 2012 e 2014, em nove diferentes áreas do Hospital das Clínicas de Belo Horizonte (recepção, escadas, elevadores, corredores, ala infantil, bloco cirúrgico, área de transplantados, UTI e isolamento respiratório) com a colaboração da Dra. Wanessa Trindade Clemente (HC/UFMG) e da enfermeira Letícia Braga. As coletas, assim como o presente estudo, foram desenvolvidas com consentimento e aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (COEP/UFMG) e do Centro de Controle de Infecções Hospitalares do HC/UFMG (Tabela 2).

2) 100 amostras de poeira coletadas, com o auxílio de swabs, em 2014 em diferentes ambientes do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICEX/UFMG) (portaria, elevador, escadas, banheiros, bebedores, corredores, salas de aula, lanchonete, biblioteca e jardins). Essas amostras foram coletadas no ICEX devido ao fato desse instituto apresentar um fluxo de pessoas diário semelhante ao do HC/UFMG e foram utilizadas como ambiente controle (Tabela 3).

**Tabela 2:** Descrição das amostras do HC/UFMG, identificando o local e os ambientes de coleta, assim como o número de amostras e o ano de coleta.

<b>HC/UFMG Ambientes de coleta</b>	<b>Nº de amostras coletadas</b>	<b>Ano de coleta</b>
<b>Recepção</b>	13	2012
<b>Escadas</b>	30	2012
<b>Elevadores</b>	24	2012
<b>Corredores</b>	12	2012
<b>Ala Infantil</b>	19	2012
<b>Bloco cirúrgico</b>	28	2014
<b>Área de transplantados</b>	30	2014
<b>UTI</b>	31	2014
<b>Isolamento respiratório</b>	55	2012
<b>Total</b>	242	

**Tabela 3:** Descrição das amostras do ICEX/UFMG, identificando o local e os ambientes de coleta, assim como o número de amostras e o ano de coleta.

<b>ICEX/UFMG Ambientes de coleta</b>	<b>Nº de amostras coletadas</b>	<b>Ano de coleta</b>
Portaria	7	2014
Elevador	5	2014
Escadas	24	2014
Banheiro	6	2014
Bebedouro	8	2014
Corredor	12	2014
Sala de aula	16	2014
Lanchonete	8	2014
Biblioteca	6	2014
Jardins	8	2014
<b>Total</b>	<b>100</b>	

## **5.2. Métodos**

### **5.2.1. Processamento das amostras**

Para a realização dos ensaios, todas as amostras coletadas foram previamente processadas. Para tanto, os swabs foram acondicionados em microtubos e acrescidos de 1 mL de tampão fosfato salina (PBS). Em seguida foram vortexados, por aproximadamente 20 segundos, e armazenadas em freezer a -20°C.

### **5.2.2. Extração de DNA pelo método de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico**

O DNA total das amostras foi extraído utilizando uma solução de Fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (PCI), na proporção de 25:24:1, respectivamente. Para tanto, 100 µl de cada amostra processada foi previamente incubado a 75°C, por 60 minutos, para favorecer o rompimento do capsídeo viral e liberação do material genético. Em seguida foram acrescentados 300 µl de PBS e mais 400 µl da solução de PCI, a fim de estabelecer a proporção de 1:1 v/v entre amostra e PCI. Essa mistura foi então vortexada, por aproximadamente 10 segundos, e centrifugada, á temperatura ambiente, a 18000 g (Eppendorf 5430/5430R) por 1 minuto. Após a centrifugação e aguardados mais 10 minutos, a fase superior foi cuidadosamente coletada, medida com o auxílio de uma micropipeta e transferida para um novo microtubo. Para a precipitação do material genético foram adicionados 2,5 vezes o volume coletado do sobrenadante de etanol absoluto (96%) gelado e 0,1 vezes o volume coletado do sobrenadante de acetato de sódio pH 5,5 a 3M. Em seguida, essa mistura foi homogeneizada, por inversão, e centrifugada 18000 g (Eppendorf 5430/5430R) por 5 minutos a 4°C. Logo após o sobrenadante foi descartado por inversão e o microtubo foi mantido aberto a 37°C para evaporação do etanol residual. O sedimento gerado foi então ressuspendido em 50µL de água de injeção, a 37°C, e a concentração de DNA foi dosada em nanodrop (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA).

### **5.2.3. Reação em cadeia de polimerase (PCR) em tempo real –qPCR**

O DNA obtido a partir da extração pelo método de PCI descrita no item anterior foi utilizado como molde nas reações de PCR em tempo real para triagem das amostras coletadas. Estas reações foram realizadas em placas de 48 poços, em duplicatas, utilizando-se o kit comercial SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, EUA), iniciadores específicos para o gene da RNA helicase de mimivírus previamente utilizados por nosso grupo (0,4 µM cada) (5'-ACCTGATCCACATCCCATAACTAA-3' e 5'-GCCTCATCAACAAATGGTTTCT-3'), água de injeção em concentrações adequadas e 1µl de amostra, com até 300 ng de DNA, totalizando 10µl de reação (DORNAS *et al*, 2014; ANDRADE *et al*,



2014) . As condições térmicas utilizadas para a amplificação foram as utilizadas no programa padrão da máquina StepOne (Applied Biosystems, EUA): 95°C por 10 min, 40 ciclos de 95°C por 15 s e 60°C por 15 s, seguido por um passo de dissociação, tendo o fragmento amplificado uma temperatura de melting específica de 73°C. Os resultados obtidos foram analisados de maneira qualitativa, com o intuito de verificar somente a presença ou ausência da sequência alvo dos oligonucleotídeos específicos. Os resultados obtidos foram submetidos ao teste de Fisher para análise de significância estatística.

#### **5.2.4. Sequenciamento, análises de sequências e construção de árvore filogenética**

O sequenciamento dos fragmentos obtidos no item 5.2.3 foi realizado pelo método de SANGER, 1977 em sequenciador automático capilar “MegaBACE sequencer” (GE Healthcare), utilizando-se polímero POP7 e o kit “*BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems), obedecendo as condições de reação e leitura indicadas pelo fabricante. Para cada fragmento foram feitas quatro reações de sequenciamento, duas com cada um dos iniciadores. As sequências obtidas foram sobrepostas e a obtenção do consenso foi feita utilizando-se a plataforma Asparagin-Cenargen ([genoma.embrapa.br/phph](http://genoma.embrapa.br/phph)). Em paralelo, para assegurar a qualidade das sequências, as mesmas foram analisadas segundo o programa Sequence Scanner Software 2 (Applied Biosystems, 2012). As sequências obtidas foram comparadas com as depositadas no banco de dados do “National Center for Biotechnology Information” através do programa BLAST 2.0 [<http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST>.- Basic Local Alignment Tool (ALTSUCHL *et al*, 1990)] e analisadas pelo programa BLAST N. Em seguida, as sequências foram analisadas e utilizadas para a construção de árvores filogenéticas, pelo método de neighbor-joining, utilizando o programa MEGA 6.0 (KUMAR *et al*, 1994). A análise de bootstrap foi feita com base em 1000 replicatas.

### **5.2.5. Isolamento viral - Ensaio de placa em ágar em solução salina para amebas (PAS) (Boughalmi *et al*, 2013)**

Nesse estudo foi utilizado um novo método de isolamento denominado ensaio de placa em ágar PAS, que é um método rápido que permite a identificação de amostras positivas para vírus gigantes através da formação de halos de lise, visíveis a olho nu, em monocamadas de amebas. Esse método é menos laborioso no sentido de não requerer que as amostras analisadas sejam previamente enriquecidas. Para a realização desse experimento uma solução de 1,5% de ágar bacteriológico (Kasvi, Brasil) em PAS foi preparada e distribuída em placas de Petri descartáveis e estéreis de 8 cm de diâmetro. Após a solidificação do ágar,  $15 \times 10^6$  amebas da espécie *A. castellanii* foram distribuídas uniformemente pela placa. Após 30 minutos, verificou-se se as amebas sedimentaram e se essas apresentavam uma confluência de 100%. Em seguida, a placa foi subdividida em 9 campos, distantes 1,5 cm um do outro, e 10 uL de cada amostra a ser testada foi adicionado em cada campo. Em seguida a placa foi vedada e incubada em estufa a 32°C por 4 dias. Os campos em que a lise celular foi visualizada foram recortados com o auxílio de um bisturi e acondicionados em microtubos acrescidos de 1 mL de PAS. Após congelamento e descongelamento por três vezes, o conteúdo foi filtrado em membranas de 1,2 µm (Millipore, EUA), ou centrifugado por 10 minutos a 18000 g (Eppendorf 5430/5430R). Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e o sedimento gerado foi ressuspensionado em 200 µL de PAS. O filtrado e o sedimento foram utilizados para posterior passagens e produção do estoque viral em placas de 24 poços, contendo 100.000 amebas ou em garrafas de cultura T25 (TPP, Suíça), contendo  $2 \times 10^6$  amebas. As placas e garrafas foram monitoradas diariamente até o aparecimento de efeito citopático, em seguida o sobrenadante e os fragmentos celulares foram coletados, descongelados e congelados por três vezes, e titulados segundo o método de end-point descrito no item 5.2.8.

### **5.2.6. Multiplicação de vírus gigantes (Abrahão *et al*, 2014)**

Para a multiplicação viral, monocamadas de amebas da espécie *A. castellanii*, cultivadas em garrafas de cultura T175 (TPP, Suíça) com confluência

de cerca de 80%, foram infectadas, com uma multiplicidade de infecção (M.O.I.) de 0,01, com os estoques virais do protótipo APMV, do KV e dos isolados virais obtidos. Para a caracterização estrutural e biológica foram escolhidos dois isolados virais obtidos a partir das amostras coletadas no isolamento respiratório. Essa seleção foi baseada principalmente pelo ambiente de origem dos isolados, que no caso também é local de maior interesse nesse trabalho. Após a infecção com cada vírus ou isolado, as garrafas contendo os inóculos virais foram mantidas a 32°C, completamente vedadas. A monocamada celular foi avaliada diariamente em relação ao aparecimento dos efeitos citopáticos, caracterizados por arredondamento, vacuolização, perda de motilidade e lise celular. Após a lise celular completa (cerca de 3 dias pós infecção) o sobrenadante e os fragmentos celulares foram coletados para purificação viral.

#### **5.2.7. Purificação de vírus gigantes (La Scola *et al*, 2003)**

Para a purificação dos vírus gigantes, o sobrenadante e o lisado celular resultante da multiplicação viral foram coletados em frascos e submetidos a 3 ciclos de congelamento e descongelamento, visando a liberação de partículas virais eventualmente retidas em trofozoítos não lisados. O lisado foi então submetido a outro ciclo de lise utilizando homogeneizador do tipo “Douncer” (Wheaton, USA) por 80 vezes. Em seguida, a solução foi filtrada em membranas de 1,2 µm (Millipore, EUA) para a retenção de resíduos celulares. Em seguida, em tubos para ultra-centrífuga *Combi Sorvall*, foram adicionados 10 mL de uma solução de sacarose 22% (Merck, Alemanha) e gotejado, vagarosamente, 25 mL do lisado filtrado. Esses tubos foram então, submetidos a centrifugação a 35.248 g, por 30 minutos, entre 4°C e 8°C, para que as partículas virais fossem sedimentadas. Por fim, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspendido em 500 µL de PBS. Alíquotas da solução viral foram feitas, identificadas e estocadas à -80°C.

#### **5.2.8. Titulação viral (La Scola *et al*, 2003)**

O título viral foi obtido pelo método de end-point, descrito por Reed-Muench (1938). Placas de 96 poços contendo 100 µL de meio PYG e

aproximadamente 40.000 amebas/poço foram utilizadas para realizar este ensaio após atingirem uma confluência de 80%. As amostras virais a serem tituladas foram diluídas em PBS seriadamente, na razão de 10 ( $10^{-1}$  a  $10^{-11}$ ), e, em seguida, um total de 100  $\mu$ L de cada diluição foi adicionado a cada poço, em quadruplicata. Uma quadruplicata de poços foi reservada como controle de viabilidade de amebas. As placas foram vedadas completamente e incubadas à 32 °C. Cada poço foi monitorado diariamente, para observação de efeitos citopáticos, e após 4 dias de incubação, o cálculo do título viral foi realizado e o valor foi expresso em TCID<sub>50</sub> por mililitro (mL).

### **5.2.9. Curva de multiplicação**

Para avaliar eventuais diferenças nas taxas de multiplicação entre o APMV, o KV e os novos isolados virais, foi realizado o ensaio de curva de multiplicação. Duplicatas de microtubos contendo 100  $\mu$ L de meio PYG com aproximadamente 40.000 amebas e 100  $\mu$ L de solução viral na MOI de 0,01 foram deixados sob homogeneização em agitador orbital por 60 minutos à 28 °C para adsorção. Após a adsorção, os microtubos foram centrifugados a 1000 g (Eppendorf 5430/5430R) por 5 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado, o sedimento foi ressuspendido em 200  $\mu$ L de meio PYG e adicionado a placas de 96 poços. As placas foram vedadas completamente e incubadas à 32 °C. As coletas da monocamada celular e do sobrenadante foram realizadas em cinco diferentes tempos (0, 4, 8, 24 e 48 horas após infecção) e em seguida foram submetidas a três ciclos de congelamento e descongelamento para lise celular. Essa suspensão foi posteriormente submetida a titulação viral de acordo com o protocolo descrito no item 5.2.8.

### **5.2.10. Teste de resistência a biocidas químicos (Campos & Andrade *et al*, 2012)**

Os vírus isolados também foram submetidos a testes de resistência a biocidas químicos utilizados na higienização de ambientes hospitalares (Hipoclorito de sódio 3% e Glutaraldeído 3%). De acordo com o Comitê Europeu de Normalização (European Committee for Standardization), substâncias

interferentes – adaptado -são necessárias para a realização desse experimento, por isso 1µL de albumina sérica bovina (BSA) 0,05% foi adicionado a cada 10 µL de suspensão viral testada. As suspensões virais foram feitas de maneira a conter um total de  $1 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>, por 10 µL. Em seguida, 10 µL de cada suspensão viral e 1µL da solução de BSA foram depositados, em duplicata, em lamínulas de vidro estéreis de 1 cm x 1 cm e deixados para secar por 40 minutos em fluxo de segurança biológica. Posteriormente, as lamínulas foram transferidas para microtubos e 50 µL de cada desinfetante foi independentemente depositado sobre cada lamínula e deixado agir por 1 minuto, a 20°C. Logo após 950µL de meio PYG suplementado com 7% de soro fetal bovino foi adicionado ao microtubo para inativação do desinfetante, e vortexadas por 1 minuto. Controles virais também foram realizados de maneira análoga ao descrito, sendo que o biocida foi substituído por 50 µL de água destilada. Essas soluções foram então tituladas conforme indicado no item 5.2.8.

#### **5.2.11. Teste de resistência a temperatura**

Além do teste de resistência a biocidas, os isolados virais também foram submetidos a testes de resistência à temperatura a título de caracterização biológica e também para verificar se métodos convencionais de esterilização, como autoclavação, por exemplo, poderiam ser eficientes na inativação desses vírus. Para tanto, suspensões virais foram preparadas de maneira a conter um total de  $5 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/mL, por 200µL. Em seguida, 200µL de cada suspensão foram adicionados a microtubos e submetidos a aquecimento em *thermoblock*, por 5 minutos, em diferentes temperaturas (30, 50, 70, 90 e 100°C), em duplicata. Controles virais também foram feitos de maneira análoga ao descrito, porém, sem serem submetidos a nenhum processo de aquecimento. Após o aquecimento, as suspensões também foram tituladas conforme descrito no item 5.2.8.

#### **5.2.12. Avaliação da expressão gênica**

Também com o intuito de caracterizar biologicamente os isolados virais, a avaliação do perfil de expressão de alguns genes virais foi realizada. Estudo

não publicado do nosso grupo vem demonstrando que isolados virais diferentes apresentam variações no perfil de expressão de alguns genes. Para tanto, foram escolhidos quatro genes, dois tRNAs e duas aminoacil-tRNAs sintetases: Leucil tRNA, Triptofanil tRNA, Arginil tRNA sintetase e Tirosil tRNA sintetase.

#### **5.2.12.1. Expressão de mRNAs de tRNAs e tRNAs sintetases**

Para os ensaios de expressão gênica, duplicatas de microtubos contendo 100 µL de meio PYG com aproximadamente 100.000 amebas e 100 µL de solução viral, de APMV, KV ou dos isolados virais, na MOI de 10 foram deixados sob homogeneização em agitador orbital por 60 minutos à 28 °C para adsorção. Após a adsorção, os microtubos foram centrifugados a 1000 g (Eppendorf 5430/5430R) por 5 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado, e o sedimento foi ressuspensionado em 1 mL de meio PYG e adicionado a placas de 24 poços. As placas foram vedadas completamente e incubadas à 32 °C. Após 8 horas de infecção, a monocamada celular e o sobrenadante foram coletados, adicionadas a novos microtubos e centrifugados a 1000 g (Eppendorf 5430/5430R) por 5 minutos. Em seguida o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi submetido à extração de RNA total e RT-PCR (item 5.2.12.2). Controles de células não infectadas também foram utilizados nesse experimento.

#### **5.2.12.2. Extração de RNA total, transcrição reversa (RT) e qPCR**

A extração de RNA total foi realizada a partir dos sedimentos resultantes descritos no item anterior, com o kit *Rneasy* (Qiagen, Alemanha), de acordo com as recomendações do fabricante. O processo consiste, resumidamente, nas seguintes etapas: lise celular e inativação de RNAses com tampão de guanidina; desnaturação e precipitação dos complexos protéicos com etanol 70% e passagem das amostras por uma coluna de afinidade, seguida de lavagens com tampões de lavagem e eluição do RNA extraído com água livre de nucleases. A obtenção de cDNA foi realizada tendo como molde 1 µg de RNA total extraído. As reações foram realizadas utilizando a enzima MMLV (Promega, Madison, WI, USA), tampão 5x, dNTPs, oligo Dt e DTT nas concentrações indicadas pelo fabricante e água q.s.p para 20 µl de reação. O RNA e oligo dT foram incubados

a 70 °C por 5 minutos e depois incubados em gelo por 5 minutos. Os outros componentes da reação foram adicionados e os tubos incubados a 42 °C por uma hora e a 72 °C por 15 minutos. O cDNA resultante foi diluído em 40 µl de água e utilizado para verificar os níveis de mRNAs de tRNAs e aminoacil-tRNAs sintetases dos diferentes vírus por qPCR, de acordo com o item 5.2.3, utilizando-se oligonucleotídeos específicos (0,1 µM de cada) (Tabela 4). Os resultados foram obtidos a partir de valores arbitrários dados a curva padrão e corrigidos utilizando normalização, por valores de Delta/Delta Ct, com os níveis do gene constitutivo 18S. Os resultados obtidos foram submetidos a análises estatísticas (Teste t), utilizando-se o programa GraphPad Prism.

**Tabela 4.** Sequências dos oligonucleotídeos que foram utilizados nas reações de qPCR para verificar os níveis de mRNAs de tRNAs e tRNAs sintetases (dados não publicados).

<b>Oligonucleotídeos</b>	<b>Sequência <i>Foward</i></b>	<b>Sequência <i>Reverse</i></b>
<b>18S rDNA</b>	TCCAATTTTCTGCCACCGAA	ATCATTACCCTAGTCCTCGCGC
<b>Leucil tRNA</b>	GGGATTCGAACCCACGACAT	ATAAGCAAAGGTGGCGGAGT
<b>Triptofanil tRNA</b>	GTGCAACAATAGACCTGTTAGTTTA	ACCGGAATCGAACCAGTATCA
<b>Arginil tRNA sintetase</b>	GTGGGTGATTGGGGAECTCA	TGATACGGTCTCCAATCGGG
<b>Tirosil tRNA sintetase</b>	TTTGGCAAACCAATCGGCAA	TGGTTTTGAACCTAGTGGTCGT

### 5.2.13. Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE)

Para análise do perfil protéico dos isolados virais, e também do APMV, KV e M4, os vírus purificados foram misturados a um tampão de amostra [glicerol 40% p/v, SDS 10% p/v, 250mM Tris HCL pH 6,8, β-mercaptoetanol 10% p/v e azul de bromofenol 0,05% p/v (Sigma, EUA)], na proporção de 1:5, respectivamente, e submetidos a aquecimento a 96°C por 10 minutos, para

desnaturação protéica. Em seguida, as amostras foram separadas por fracionamento eletroforético em gel de poli(acrilamida) bifásico a 12%. O gel de poli(acrilamida) bifásico 12 % [TRIS 1,5M, pH 8, Bis/Acrilamida 29:1, SDS 20%, Tetrametiletilendiamina (TEMED) 0,1%, persulfato de amônio (APS) 10% e água deionizada qsp. foi polimerizado em aparato Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio Rad) com espessura de 0.75mm, e transferido para cuba de eletroforese contendo tampão de corrida 1X (Glicina 1,5% p/v, Tris base 0,3% p/v e SDS 0,1% p/v). Foram aplicados 20 µL, em média, de cada amostra e em seguida foi feito o fracionamento eletroforético a 60V, nos primeiros 15 minutos, e a 100V por mais 75 minutos. Como marcador de massa molecular foram utilizados padrões de proteínas de tamanho conhecido (Precision Plus Protein™ Prestained Standards, Bio-Rad), possuindo massas moleculares de 6, 14, 21, 31, 45, 66, 97, 116 e 200 kDa. Após o fracionamento, o gel foi corado em solução de *comassie blue* ou de nitrato de prata.

#### **5.2.14. Coloração de gel com prata**

Após fracionamento por eletroforese, os géis foram corados com solução de nitrato de prata para visualização das proteínas. Para isso os géis foram retirados dos aparatos de eletroforese e transferidos para um recipiente contendo a primeira solução fixadora (metanol 40%; Ac. acético 10%; água deionizada 50%), onde foram mantidos por 30 minutos. Em seguida, a solução fixadora foi descartada e adicionada uma segunda solução fixadora (etanol 10%; ácido acético 5%; água deionizada 85%) duas vezes por 15 minutos. Em seguida foi então adicionada uma solução oxidante (dicromato de potássio 0,0034 M; ácido nítrico 0,0032 M; água deionizada q.s.p) por 5 minutos. Os géis foram submetidos a dois banhos de água deionizada por 5 minutos e em seguida corados com solução de nitrato de prata (0,011 M) por 20 minutos e lavados duas vezes com água deionizada. Ao final foi adicionada solução reveladora (carbonato de sódio 0,28 M, paraformaldeído 0,016 M, água dd) até o aparecimento das bandas. E finalmente, para interrupção da atividade da solução reveladora, foi adicionada uma solução de parada preparada a partir da mistura v/v da primeira e segunda fixadora acima descrita. Para análise e registro



os géis foram fixados em lâmina de vidro cobertos com papel celofane e mantidos a temperatura ambiente para secar completamente.

#### **5.2.15. Coloração de gel com Coomassie blue**

Após o fracionamento eletroforético, os géis também foram corados em solução coomassie blue (coomassie blue 0,2% p/v do corante, metanol 50%, ácido acético 10%, água deionizada qsp.) durante 30 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida, foi descorado por 12 horas em solução fixadora I (metanol 40%, ácido acético 10%, água 50%) mais fixadora II (etanol 10%, ácido acético 5%, água 85%). Posteriormente, o gel foi desidratado entre duas folhas de papel celofane e preso sobre uma placa de vidro, a temperatura ambiente durante 48 h para completa secagem.

#### **5.2.16. Microscopia eletrônica de Transmissão**

Amebas da espécie *A. castellanii*, cultivadas em garrafas de cultura T175 e com 80% de confluência, foram infectadas na M.O.I. de 0,01 com os diferentes vírus isolados. Após 24 horas de infecção a monocamada celular foi lavada duas vezes com tampão fosfato 0,1M. A solução foi totalmente retirada com a ajuda de uma pipeta e, em seguida, foi adicionada uma solução fixadora a base de glutaraldeído 2,5% em quantidade suficiente para cobrir toda a monocamada. Após uma hora de incubação, à temperatura ambiente, a monocamada de amebas foi retirada, utilizando-se um raspador, e centrifugada a 1000 g (Eppendorf 5430/5430R) por 10 minutos a 4°C. O sedimento formado foi transferido para um microtubo no qual foi adicionado 1 mL de tampão fosfato 0,1M pH 7,4. As secções ultrafinas foram realizadas pelo Centro de Microscopia da UFMG e foram observadas em microscópio eletrônico de transmissão Tecnai G2-12 Spirit Bio twin FEI. O protocolo do preparo das soluções utilizadas nesse experimento pode ser encontrado nos Anexos, no item 10.2.

### **5.2.17. Microscopia eletrônica de Varredura**

Para a realização da microscopia eletrônica de varredura, lamínulas circulares foram imersas em solução de Poly-L-Lisina. Em seguida, o excesso da solução foi retirado e a lamínula foi posta para secagem. Após esse processo, 10 µL dos isolados virais purificados foram espalhados sobre a lamínula tratada com a Poly-L-Lisina, e após a secagem do material, as lamínulas foram adicionadas a placas de 12 poços. O material foi fixado com Glutaraldeído 2,5%, em tampão cacodilato 0,1M por 1 hora. Decorrido esse tempo, o fixador foi removido e as amostras foram lavadas três vezes com tampão cacodilato 0,1M. As etapas seguintes da preparação: fixação secundária com tetróxido de ósmio 1,0%, imersão em Ácido Tânico 1%, desidratação em solução crescente de álcool etílico, secagem das amostras em ponto crítico de CO<sup>2</sup> e metalização com ouro/5nm de espessura, foram realizadas pelo próprio Centro de Microscopia da UFMG. Após todo o processamento, as amostras foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura FEG Quanta 200 FEI.

### **5.2.18. Morfometria**

Para a análise morfométrica das partículas virais dos novos isolados, foram utilizadas imagens, de aproximadamente 20 partículas virais diferentes, provenientes de microscopia eletrônica de transmissão. Essas imagens foram analisadas pelo programa Image J (<http://imagej.nih.gov/ij/>), e os tamanhos relativos ao capsídeo, fibrilas e tamanho total da partícula foram calculados.

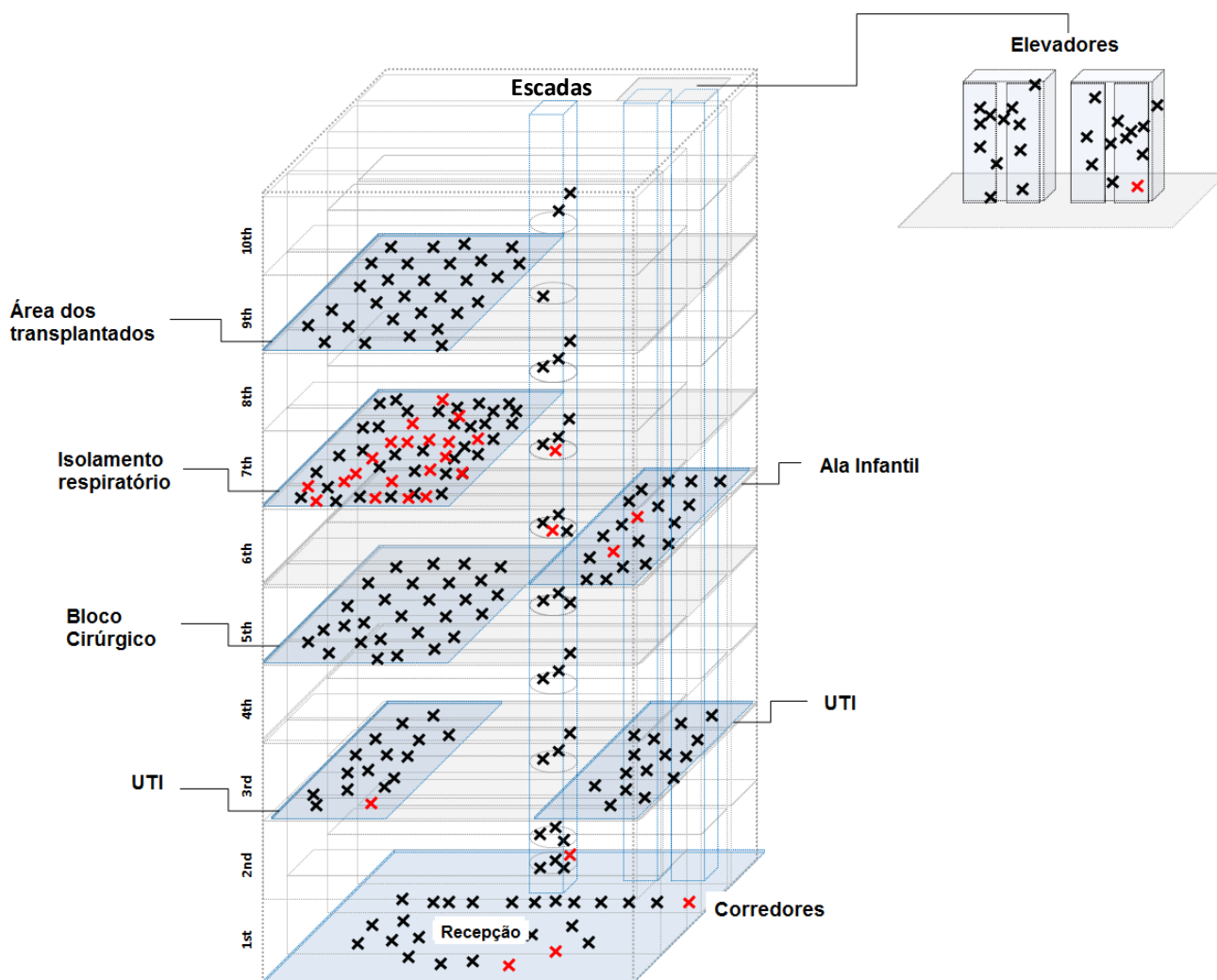
## 6. RESULTADOS

### 6.1. Triagem por qPCR, isolamento viral e seleção de isolados para caracterização

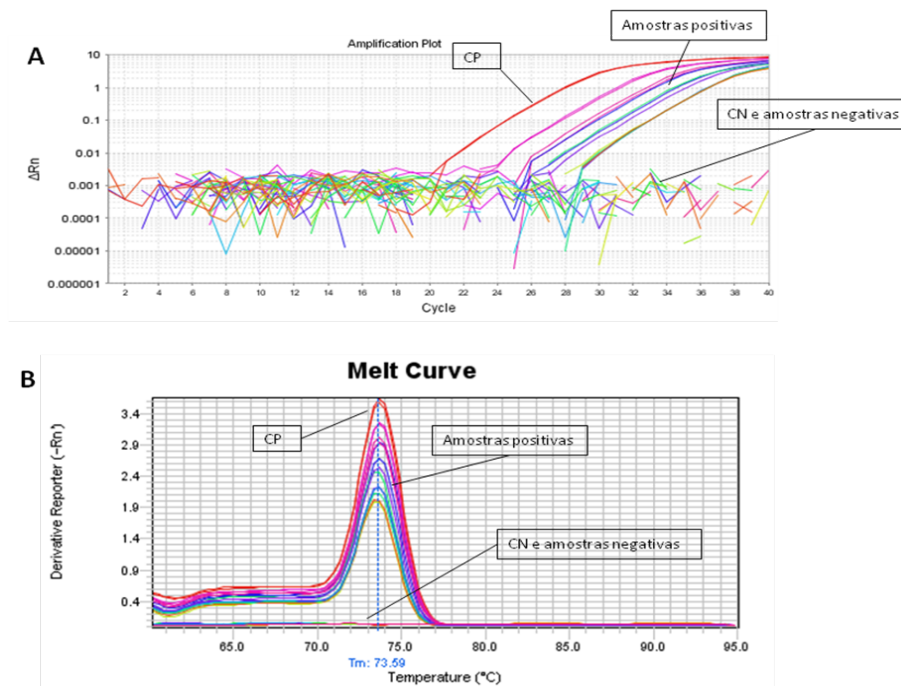
As duas coleções de amostras listadas nas tabelas 2 e 3 do item 5.1.4 foram processadas de acordo com o item 5.2.1 e submetidas à extração de DNA total segundo o item 5.2.2. Após a extração, o DNA foi utilizado como molde para as reações de qPCR, descrita no item 5.2.3, utilizando-se oligonucleotídeos específicos para o gene da RNA Helicase, que é um gene conservado entre as linhagens de mimivírus, mas que ao mesmo tempo permite, pós-sequenciamento, a identificação da linhagem a qual a amostra viral pertence (grupos A, B ou C). Todavia, os iniciadores utilizados apresentam uma especificidade maior para as linhagens A e B de mimivírus. É importante ressaltar que o tamanho do amplicon gerado nessas reações é de aproximadamente 86 pares de bases. Todas as reações foram feitas em duplicatas, e na ocorrência de amplificação de apenas uma das duplicatas, a amostra foi considerada duvidosa e submetida a uma nova qPCR. Caso a amostra fosse considerada novamente duvidosa na segunda qPCR, o critério utilizado foi direcionar essa amostra para o isolamento em ágar PAS.

#### 6.1.1. Amostras do HC/UFMG

Das 242 amostras de poeira coletadas no HC/UFMG, 30 foram positivas para o gene da RNA helicase na qPCR (Fig. 16 e 17), apresentando um valor de T<sub>m</sub> de aproximadamente 73°C em uma reação com eficiência de aproximadamente 98%. O isolamento respiratório foi o ambiente que apresentou a maior positividade 20/55 (36.4%) se comparado aos demais ambientes: recepção 2/13 (15.4%), escadas 3/30 (10.0%), elevadores 1/24 (4.2%), corredores 1/12 (8.3%), ala infantil 2/19 (10.5%) e UTI 1/31 (3.2%) (Tabela 5). Não foi possível detectar por qPCR nenhuma amostra positiva no bloco cirúrgico e na área de transplantados.



**Figura 16: Representação esquemática das áreas de coleta no HC/UFMG.** Na figura pode-se visualizar a distribuição dos ambientes no HC/UFMG aonde foram feitas as coletas de poeira hospitalar. Cada cruz assinalada representa um ponto de coleta nos ambientes específicos, sendo que as cruzes vermelhas representam as amostras que foram positivas para o gene da RNA Helicase na qPCR e as pretas representam as amostras negativas. Pela imagem pode-se notar claramente a maior positividade registrada no isolamento respiratório. UTI: Unidade de tratamento intensivo.



**Figura 17: Padrão do gráfico de amplificação e curva de Melt resultante das reações de qPCR para o gene da RNA Helicase. A.** Gráfico de amplificação demonstrando o padrão de curva visualizada para amostras positivas, controle positivo (CP), amostras negativas e controle negativo (CN). **B.** Curva de Melt evidenciando a temperatura de melting específica (~73°C).

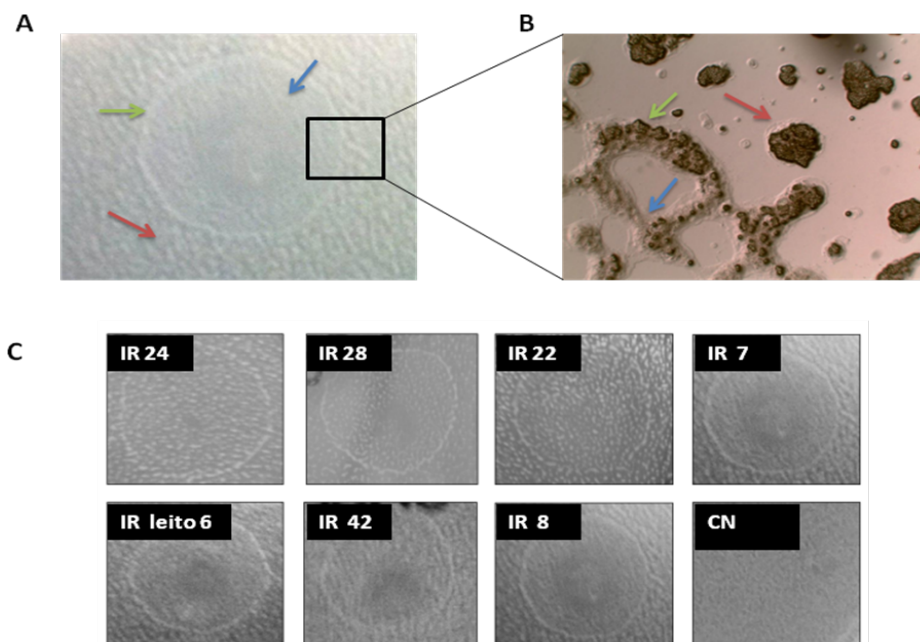
**Tabela 5:** Ambientes de coleta de poeira no HC/UFGM e resultados dos testes de qPCR e isolamento viral

Áreas de coleta HC/UFGM	Nº total de amostras	q PCR (RNA Helicase)		Isolamento
		Nº (%) amostras positivas	Nº (%) amostras negativas	Nº (%) amostras positivas
Recepção	13	2 (15.4)	11 (84.6)	1 (7.7)
Escadas	30	3 (10.0)	27 (90.0)	3 (10)
Elevadores	24	1 (4.2)	23 (95.8)	1 (4.2)
Corredores	12	1 (8.3)	11 (91.7)	1 (8.3)
Ala infantil	19	2 (10.5)	17 (89.5)	2 (10.5)
Bloco cirúrgico	28	0 (0)	28 (100)	*
Área de transplantados	30	0 (0)	30 (100)	*
UTI	31	1 (3.2)	30 (96.8)	0 (0)
Isolamento respiratório	55	20 (36.4)	35 (63.6)	16 (29.0)
<b>Total</b>	<b>242</b>	<b>30 (12.4)</b>	<b>212 (87.6)</b>	<b>24 (9.9)</b>

\*Nenhuma amostra positiva para o gene da RNA Helicase foi detectada nesses ambientes.

Para avaliar a presença de diferenças significativas que validassem a maior prevalência de mimivírus no isolamento respiratório, se comparado aos demais ambientes de coleta, foi utilizado o teste exato de Fisher, que é um teste não paramétrico, capaz de cruzar as duas variáveis em questão: ambiente e positividade nas reações de qPCR. As análises estatísticas apresentaram um valor de  $p < 0.005$ , indicando diferenças significativas em relação a prevalência de mimivírus no isolamento respiratório.

Após essa triagem por qPCR as amostras positivas foram então submetidas ao teste de isolamento em ágar PAS, conforme descrito no item 5.2.5. Das 30 amostras testadas, 24, o equivalente a 9,9% de todas as amostras coletadas, induziram a formação de placas de lise amebiana indicativas do isolamento viral (Tabela 5). Essas placas são caracterizadas por uma intensa lise amebiana, que pode ser visualizada em microscópio óptico no aumento de 4X, e pela presença de um halo, que é a região limítrofe entre a área de lise amebiana e a área de acúmulo de células não lisadas (Fig. 18). A título de controle, 17 amostras negativas para o gene da RNA Helicase também foram submetidas ao teste de isolamento, e como esperado nenhuma dessas amostras foi capaz de induzir a formação de placas de lise.



**Figura 18: Ensaio de placa em ágar PAS.** **A.** Placa de lise amebiana visível a olho nu, evidenciando a presença da região de lise celular (setas azuis), do halo limitrofe (setas verdes) e da região de acúmulo de amebas não lisadas (setas vermelhas). **B.** Placa de lise visualizada ao microscópio óptico (Motic, British Columbia, Canadá) no aumento de 4X evidenciando as mesmas regiões da placa em A. **C.** Placas de lise resultantes da inoculação de 10 $\mu$ l de algumas das amostras coletadas no HC/UFMG, previamente triadas por qPCR. IR: Isolamento respiratório; CN: controle negativo.

Dos 24 isolados, 20 foram escolhidos para caracterização molecular e 2, provenientes do isolamento respiratório (IR), foram escolhidos para posterior caracterização biológica e estrutural. Esses dois isolados foram coletados a partir do leite (L) de pacientes e do piso (P) do ambiente e por isso receberam os nomes de IRL6 e IRP16, respectivamente. Após o isolamento, encontramos dificuldades em liberar as partículas virais do ágar, e para isso lançamos mão de diferentes protocolos. Assim, o isolado IRL6 foi submetido a filtração e o isolado IRP16 a centrifugação, seguido de passagens em cultivo de amebas para produção dos estoques virais, conforme descrito também no item 5.2.5.

### 6.1.2. Amostras do ICEX/UFMG

Das 100 amostras coletadas nos diferentes ambientes do ICEX/UFMG, 15 foram duvidosas (somente uma das duplicatas amplificaram) na qPCR para o gene da RNA Helicase e nenhuma foi positiva (amplificação de ambas as

duplicatas). O padrão de curva de amplificação, assim como o de curva de Melt foi o mesmo observado para as amostras do HC/UFMG (Fig. 17).

Como mencionado anteriormente, as amostras duvidosas foram submetidas à uma nova qPCR e, novamente, só houve amplificação de uma das duplicatas (Tabela 6). Sendo assim, essas amostras foram direcionadas para o isolamento em ágar PAS. No entanto, nenhuma amostra testada levou à formação de halos de lise, impossibilitando assim o isolamento viral. Por esse motivo, os únicos isolados virais escolhidos para caracterização molecular e biológica foram provenientes do HC/UFMG.

**Tabela 6:** Ambientes de coleta de poeira no ICEX/UFMG e resultados dos testes de qPCR e isolamento viral

Áreas de coleta HC/UFMG	Nº total de amostras	q PCR (RNA Helicase)		Isolamento
		Nº (%) amostras duvidosas	Nº (%) amostras negativas	Nº (%) amostras positivas
Portaria	7	1 (14.2)	6 (85.8)	0 (0.0)
Elevador	5	2 (40.0)	3 (60.0)	0 (0.0)
Escadas	24	2 (8.3)	22 (91.7)	0 (0.0)
Banheiro	6	0 (0.0)	6 (100)	0 (0.0)
Bebedouro	8	4 (50.0)	4 (50.0)	0 (0.0)
Corredor	12	3 (25.0)	11 (75.0)	0 (0.0)
Sala de aula	16	2 (12.5)	14 (87.5)	0 (0.0)
Lanchonete	8	0 (0.0)	8 (100)	0 (0.0)
Biblioteca	6	1 (16.6)	5 (83.4)	0 (0.0)
Jardins	8	0 (0.0)	8 (100)	0 (0.0)
<b>Total</b>	100	15 (15.0)	85 (85.0)	0 (0.0)

## 6.2. Caracterização molecular

Para caracterização molecular de alguns dos isolados virais obtidos a partir do HC/UFMG, foi feito o sequenciamento dos *amplicons* gerados na qPCR para o gene da RNA Helicase. É importante ressaltar que o gene da RNA Helicase é conservado nos grupos A, B e C dos mimivírus, mas há diferenças na sequência dos nucleotídeos que compõem esse fragmento do gene que

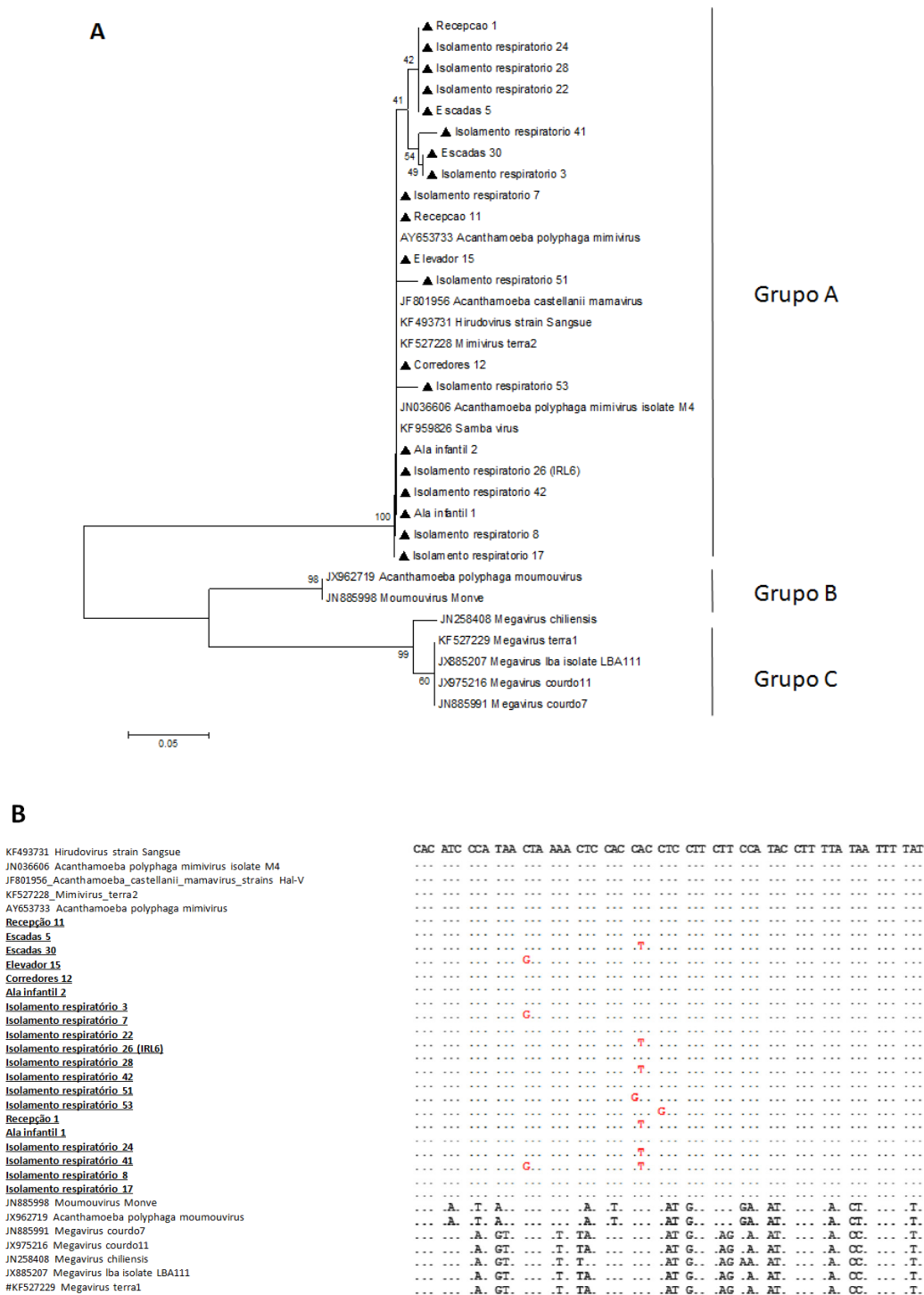


possibilitam também a diferenciação entre esses três grupos. Sendo assim, as sequências geradas a partir do sequenciamento desse gene se mostraram suficientes para agrupar os novos isolados em um dos três grupos descritos, conforme abaixo descrito.

### **6.2.1. Análises filogenéticas baseadas no sequenciamento do gene da RNA helicase viral**

O sequenciamento, a análise das sequências e a construção da árvore filogenética foram feitos conforme descrito no item 5.2.4. Como mencionado anteriormente, para essas análises, os *amplicons* gerados por qPCR de 20 dos 24 isolados virais foram sequenciados.

A árvore filogenética construída revelou uma estreita relação entre os novos isolados virais e a família *Mimiviridae*, mais especificamente com o grupo A do gênero *Mimivirus* (Fig. 19A). Todavia, apesar da similaridade entre os isolados, o alinhamento da sequência demonstrou a presença de uma ou duas substituições de nucleotídeos quando comparadas com as sequências de outras amostras virais do grupo A disponíveis no banco de dados do “National Center for Biotechnology Information” (Fig. 19B).



**Figura 19: Análises filogenéticas baseadas no gene da RNA helicase. A.** Árvore filogenética construída pelo método de neighbor-joining, utilizando-se o MEGA versão 6.0 ([www.megasoftware.net](http://www.megasoftware.net)) com base nas sequências de nucleotídeos, obtidas a partir do GenBank, com bootstrap de 1000. Valores de Bootstrap >40% são mostrados. Os isolados virais estão indicados por um triângulo. A barra de escala indica taxa de evolução. **B.** Alinhamento das sequências de nucleotídeos do fragmento do gene da RNA helicase. As amostras obtidas neste estudo estão sublinhadas. Nucleotídeos em vermelho indicam sítios de polimorfismo entre os isolados obtidos neste estudo e outras amostras virais.

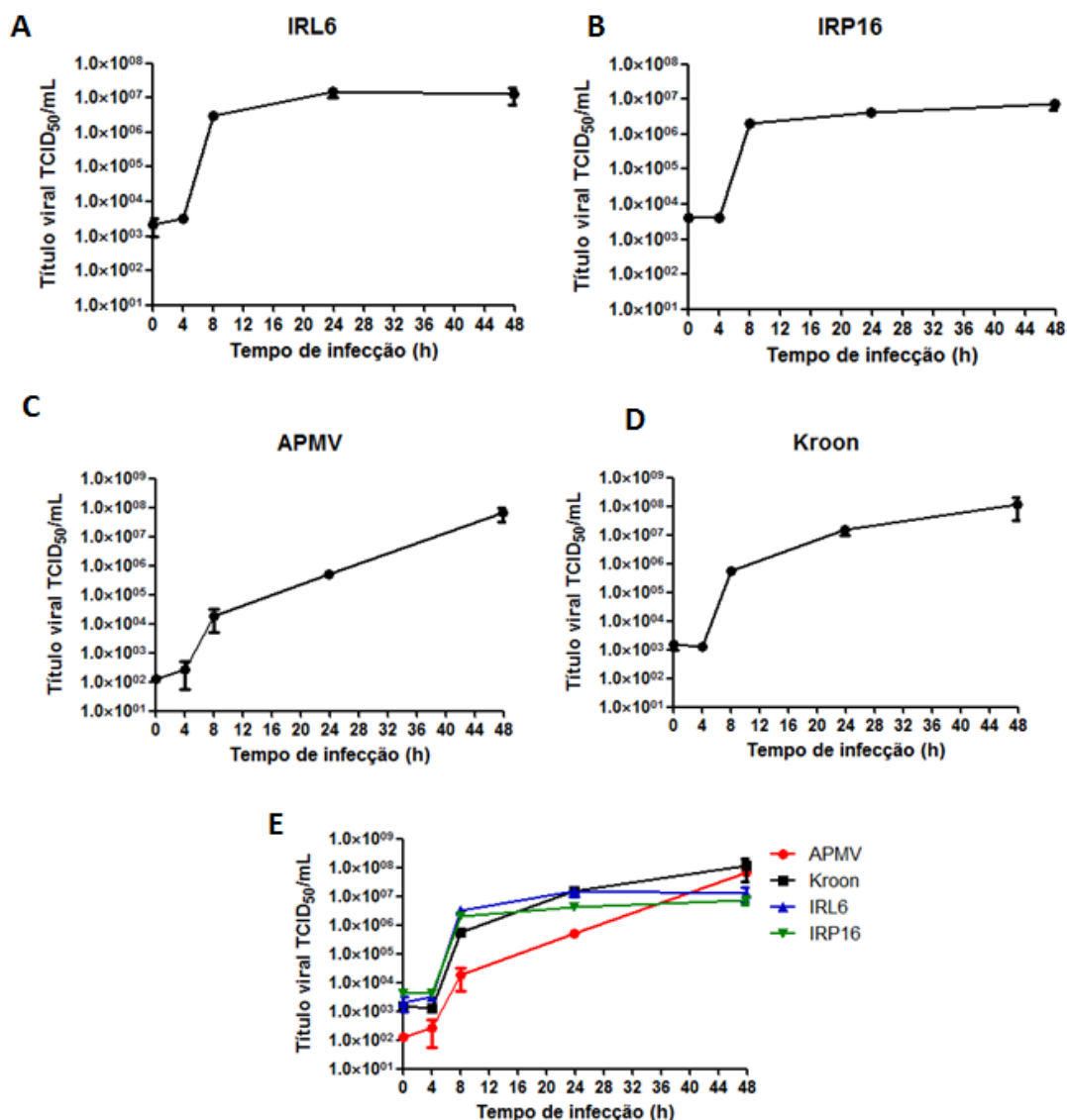
### 6.3. Caracterização biológica

Como mencionado no item 6.1.1, dois isolados virais do HC/UFMG, denominados IRL6 e IRP16 foram selecionados para serem submetidos a diferentes testes a fim de avaliar a presença de possíveis diferenças biológicas entre eles e outros vírus já caracterizados, como APMV, KV e M4. O APMV foi um dos vírus escolhidos por ser o protótipo do gênero *Mimivirus*, já os vírus KV e M4 foram testados devido às suas diferenças morfológica e genética, respectivamente.

#### 6.3.1. Curva de multiplicação em *Acanthamoeba castellanii*

O ensaio de curva de multiplicação foi realizado com o intuito de avaliar o perfil de multiplicação dos isolados IRL6 e IRP16. Nesse ensaio, foram também utilizados os vírus APMV e KV a título de comparação.

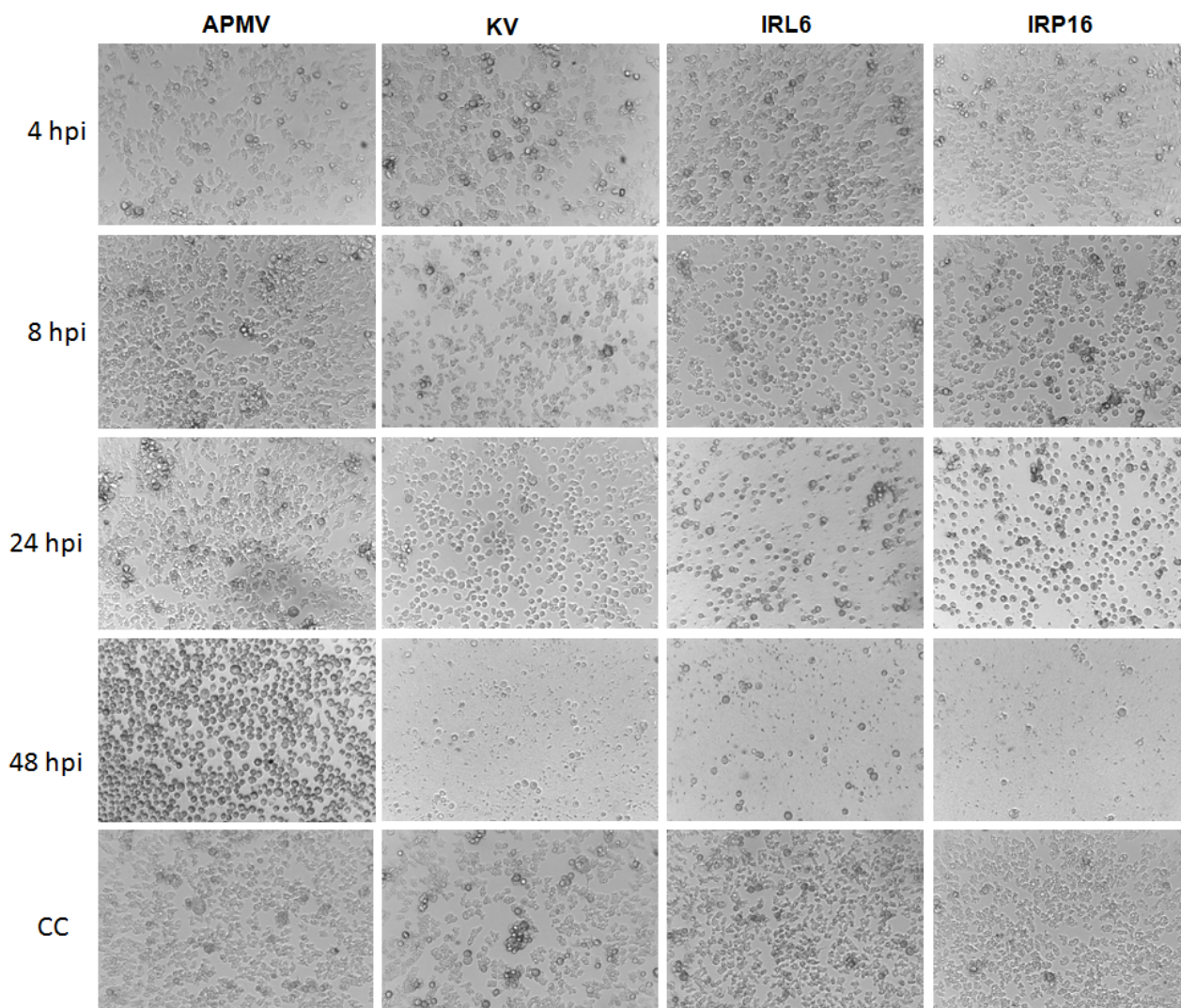
Após a titulação e análise de todos os tempos coletados, foi possível observar um perfil de multiplicação muito semelhante entre os isolados IRL6 e IRP16, mesmo considerando individualmente cada tempo analisado (0, 4, 8, 24 e 48 horas). No entanto, quando o perfil de multiplicação dos isolados é comparado ao perfil apresentado por KV e, principalmente, por APMV, algumas diferenças podem ser observadas. No início do ciclo de multiplicação, mais especificamente nas 8 horas pós-infecção, é possível observar que os isolados IRL6 e IRP16 atingem um título viral maior, de aproximadamente  $1 \times 10^{6.5}$  TCID<sub>50</sub>/mL, quando comparado ao KV ( $1 \times 10^{5.5}$  TCID<sub>50</sub>/mL) e ao APMV ( $1 \times 10^{4.5}$  TCID<sub>50</sub>/mL). Nas 24 horas pós-infecção essa diferença diminui entre IRL6, IRP16 e KV, que passam a apresentar um título viral de aproximadamente  $1 \times 10^{7.0}$  TCID<sub>50</sub>/mL, entretanto a diferença de mais de um log de título ainda permanece entre esses vírus e o APMV, que apresenta um título viral de  $1 \times 10^{5.5}$  TCID<sub>50</sub>/mL. Ao final de 48 horas pós-infecção, nenhuma diferença pode ser mais observada, e os quatro vírus atingem um título viral semelhante, de aproximadamente  $1 \times 10^{7.5}$  TCID<sub>50</sub>/mL (Fig.20).



**Figura 20:** Ensaio de curva de multiplicação dos isolados IRL6 e IRP16, comparados ao APMV e ao KV em amebas *A. castellanii*. Amebas *A. castellanii* foram infectadas com M.O.I. de 0,01 e coletadas nos tempos de 0, 4, 8, 24 e 48 hpi. O título viral foi determinado pelo método de end-point e o valor dado em TCID<sub>50</sub>/mL. **A.** Perfil de multiplicação do isolados IRL6. **B.** Perfil de multiplicação do isolado IRP16. **C.** Perfil de multiplicação do APMV. **D.** Perfil de multiplicação do KV. **E.** Perfil de multiplicação comparativo dos quatro vírus analisados (IRL6, IRP16, APMV e KV). IRL6: Isolamento Respiratório Leito 6; IRP16: Isolamento Respiratório Piso 16, KV: Kroon vírus, APMV: *Acanthamoeba polyphaga mimivirus*.

A fim de verificar se essa diferença de título viral era acompanhada também de uma indução de efeito citopático diferenciado nas amebas, foi feita uma análise da morfologia dessas células durante os mesmos tempos (4, 8, 24 e 48 hpi) através de microscópio óptico. Imagens das monocamadas celulares

foram obtidas em cada tempo, no aumento de 4X e, posteriormente, foram analisadas e comparadas (Fig. 21).



**Figura 21: Morfologia apresentada por amebas *A. castellanii* após infecção por APMV, KV, IRL6 e IRP16 (vertical) em diferentes tempos (horizontal).** Amebas *A. castellanii* foram infectadas com M.O.I. de 0,01 e imagens, no aumento de 4X, evidenciando diferenças na morfologia celular foram obtidas nos tempos de 4, 8, 24 e 48 hpi. hpi: horas pós-infecção; CC: controle celular, IRL6: Isolamento Respiratório Leito 6; IRP16: Isolamento Respiratório Piso 16, KV: Kroon vírus, APMV: *Acanthamoeba polyphaga mimivirus*.

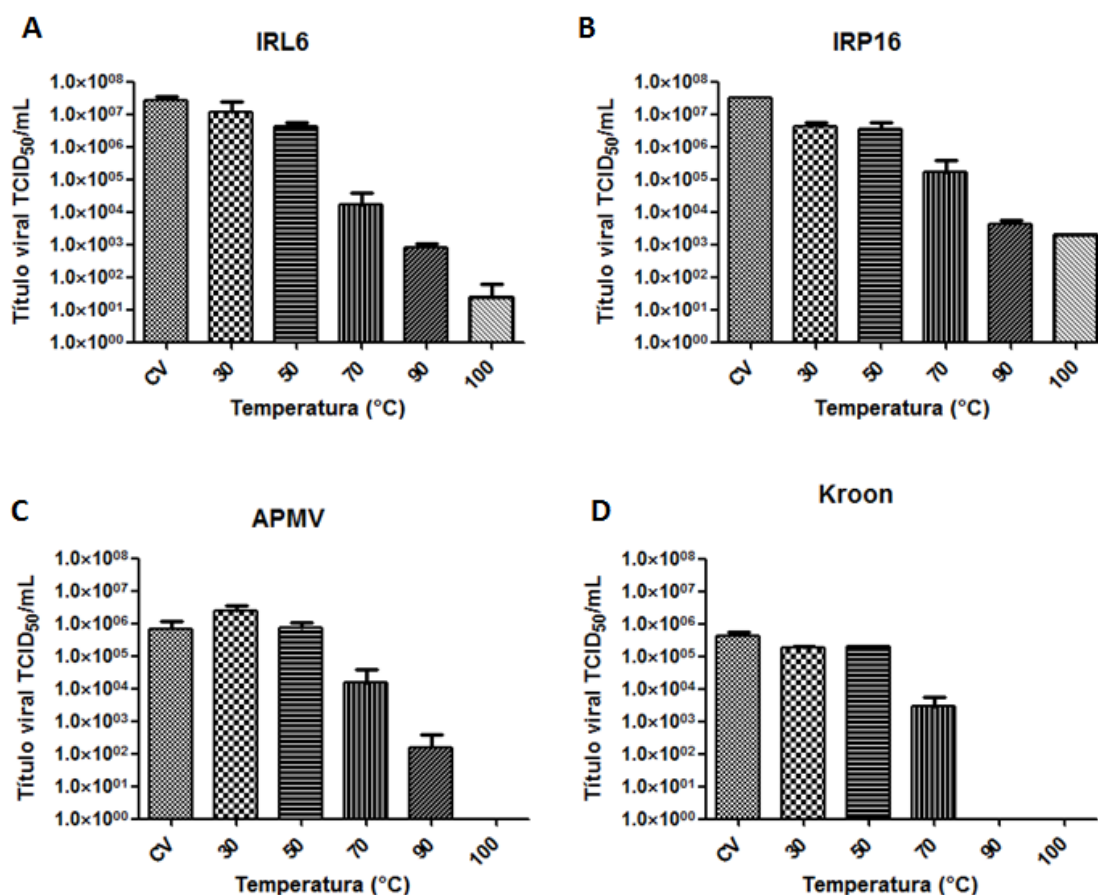
Conforme esperado, a indução de efeito citopático foi semelhante entre IRL6 e IRP16, mas claramente diferente entre esses isolados e os vírus KV e APMV. No tempo de 4 hpi, nenhum dos vírus analisados foi capaz de induzir alteração morfológica, e as amebas continuam a apresentar o formato característico de trofozoíto. No tempo de 8 hpi um arredondamento celular já

pode ser observado nas monocamadas infectadas por IRL6 e IRP16, mas não nas infectadas por KV e APMV, o que condiz com o maior título viral apresentado pelos dois isolados na curva de multiplicação nesse tempo. Nas 24 hpi, KV já é capaz de induzir efeito citopático, mas APMV não, enquanto resíduos de células lisadas já começam a ser observadas nas monocamadas infectadas por IRL6 e IRP16. Somente 48 hpi é que amebas arredondadas passam a ser observadas nas monocamadas infectadas por APMV, enquanto uma intensa lise já é observada nas monocamadas infectadas pelos demais vírus.

### **6.3.2. Teste de resistência a temperatura**

O teste de resistência a temperatura foi feito para avaliar o perfil de sensibilidade dos novos isolados virais frente à exposição a diferentes temperaturas (30, 50, 70, 90 e 100°C) por 5 minutos, conforme descrito mais detalhadamente no item 5.2.10. Após a exposição, cada inóculo foi submetido a titulação viral, como descrito no item 5.2.8.

Após a exposição, os isolados virais apresentaram perfis de sensibilidade à temperatura semelhantes entre si, sendo que o aumento da temperatura foi acompanhado de um decaimento do título viral. O aquecimento a 30 e 50°C não provocou uma diminuição considerável do título viral de nenhum dos dois isolados, no entanto a exposição das partículas a uma temperatura de 70°C foi capaz de levar a uma diminuição de até 3 logs do título viral, no caso do IRL6, e até 2 logs, no caso do IRP16. Aos 90°C o título viral de ambos os vírus apresentou um decaimento de, aproximadamente, 4 logs, se comparada ao controle de vírus (CV). Já na temperatura de 100°C, o título viral dos isolados foi ainda menor, sendo que o IRL6 apresentou uma diminuição de 6 logs do título viral e o IRP16 de, aproximadamente, 5 logs, quando comparados aos controles de vírus (Fig. 22).



**Figura 22: Teste de resistência a temperatura.** 200 $\mu$ l de PAS contendo 10<sup>5</sup> TCID<sub>50</sub>/mL de cada vírus (IRL6, IRP16, APMV e KV) foram submetidos a 5 minutos de aquecimento, à diferentes temperaturas (30, 50, 70, 90 e 100°C), e posterior titulação. **A.** Perfil de resistência do isolado IRL6. **B.** Perfil de resistência do isolado IRP16. **C.** Perfil de resistência do APMV. **D.** Perfil de resistência do KV. IRL6: Isolamento Respiratório Leito 6; IRP16: Isolamento Respiratório Piso 16, KV: Kroon vírus, APMV: *Acanthamoeba polyphaga mimivirus*.

Os isolados virais também apresentaram um perfil de sensibilidade semelhante ao apresentado por APMV e KV. Esses dois últimos vírus também não apresentaram diminuição considerável do título viral nas temperaturas de 30° e 50°C. A exposição a 70°C levou a uma diminuição de aproximadamente 2 logs do título viral de ambos, de maneira análoga ao isolado IRP16. Aos 90°C o título viral de APMV também apresentou um decaimento de, aproximadamente, 3 logs, se comparada ao controle de vírus (CV). No entanto, KV, nessa mesma temperatura e também a 100°C, teve todas as suas partículas virais inativadas. Aos 100°C, APMV também não apresentou nenhuma partícula viral viável (Fig. 22).

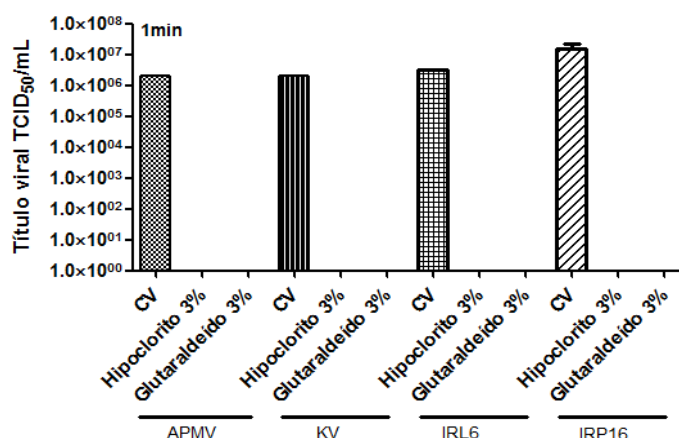


Apesar da semelhança entre os perfis de resistência, esses resultados sugerem uma ligeira diferença de resistência do isolado IRP16, que mesmo na temperatura de 100°C, apresentou um título de, aproximadamente,  $1 \times 10^{3,0}$  TCID<sub>50</sub>/mL. Já o KV apresentou uma resistência um pouco menor às temperaturas de 90° e 100° nas quais nenhuma partícula viável foi recuperada.

### 6.3.3. Teste de resistência a biocidas

Além do teste de resistência a temperatura, os isolados foram submetidos ao teste de resistência aos biocidas químicos, descrito no item 5.2.11. Para a realização desse ensaio foram escolhidos dois biocidas que são geralmente empregados na higienização de ambientes hospitalares e também de utensílios médicos reutilizáveis: o hipoclorito de sódio e o glutaraldeído. A concentração de 3% também foi escolhida por essa ser a porcentagem de produto comumente utilizada na limpeza dessas áreas e utensílios. Do mesmo modo, o tempo de 1 minuto também foi escolhido com base no menor tempo em que o biocida é geralmente deixado em ação sobre as superfícies.

Após a realização do teste, houve uma redução de 100% do número de partículas infectivas viáveis de todos os isolados e vírus testados. Dessa maneira, nenhum vírus apresentou resistência à ação do hipoclorito de sódio e do glutaraldeído a 3% (Fig. 23).



**Figura 23: Teste de resistência a biocidas químicos.**  $10^5$  TCID<sub>50</sub>/mL de cada vírus (IRL6, IRP16, APMV e KV) foram submetidos à ação de biocidas químicos por 1 minuto e posterior titulação. IRL6: Isolamento Respiratório Leito 6; IRP16: Isolamento Respiratório Piso 16, KV: Koon vírus, APMV: *Acanthamoeba polyphaga mimivirus*.



#### 6.3.4. Expressão gênica

No item 6.3.1 foi demonstrado que os isolados virais apresentaram um perfil de multiplicação diferenciado, atingindo um título viral mais alto nas primeiras horas de infecção, acompanhado também da indução de efeito citopático mais precocemente quando comparado ao APMV. A fim de analisar se essa diferença no perfil de multiplicação poderia ser correlacionada com uma expressão gênica diferenciada, alguns genes envolvidos na tradução, os tRNAs e as aminoacil-tRNAs sintetases, foram analisados.

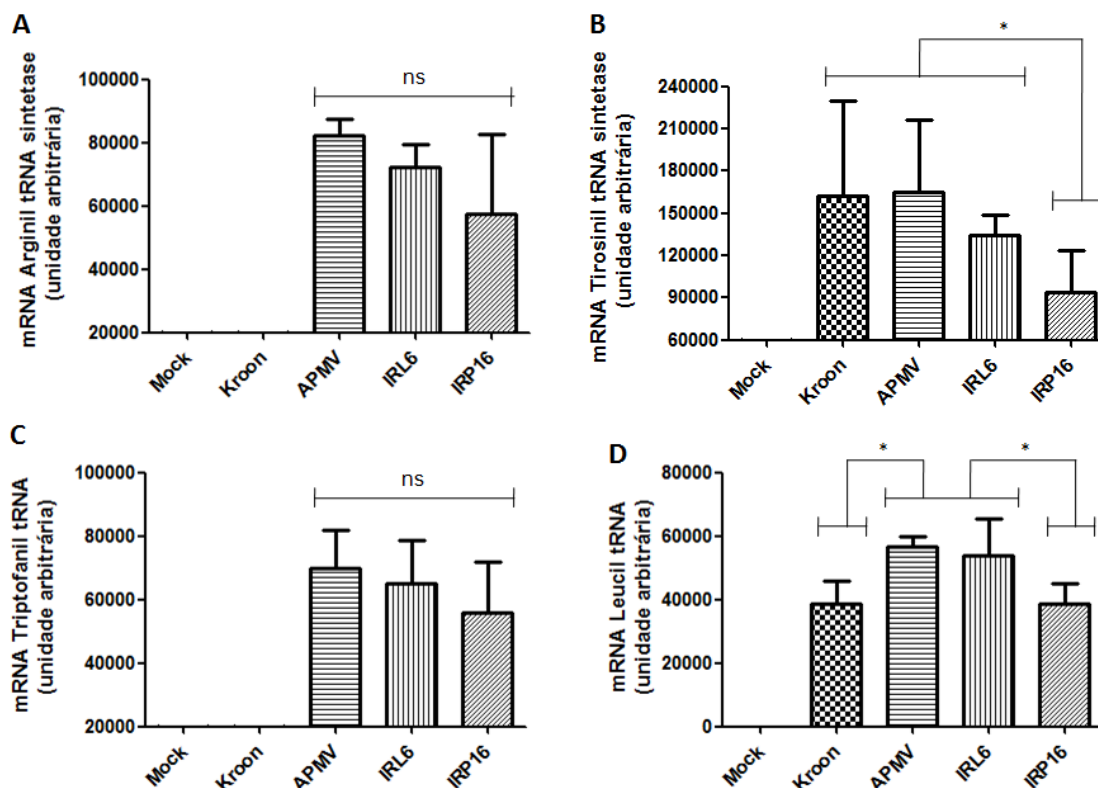
A expressão da Arginil tRNA sintetase, de aproximadamente 80.000 vezes, se mostrou semelhante entre os isolados virais e o APMV, sendo que nenhuma diferença de expressão entre esses três vírus foi significativa quando analisadas pelo teste t ( $p > 0,05$ ). Em contrapartida, não houve expressão desse gene pelo KV ( $p < 0,0001$ ), o que é corroborado por dados preliminares do nosso grupo de pesquisa, aonde resultados semelhantes foram observados, mas ainda não publicados (Fig. 24 A).

A expressão de Tirosinil tRNA sintetase, em contrapartida, foi bem diferente entre os vírus testados. KV, APMV e IRL6 apresentaram expressões semelhantes entre si, de aproximadamente 160 mil vezes. Já IRP16 apresentou uma expressão menor, de 110 mil vezes, sendo essa diferença significativa entre esse isolado e o APMV ( $p < 0,0151$ ), KV ( $p < 0,0447$ ) e IRL6 ( $p < 0,0130$ ) (Fig. 24 B).

Já a expressão de Triptofanil tRNA foi semelhante á observada para a Arginil tRNA sintetase. Os vírus IRL6, IRP16 e APMV apresentaram expressões semelhantes, em torno de 70.000 vezes ( $p > 0,05$ ). Análises do genoma de KV também já foram desenvolvidas pelo nosso grupo de pesquisa, porém ainda não publicados, e demonstraram a ausência do gene da Triptofanil tRNA, e por esse motivo nenhuma expressão desse gene foi observada para esse vírus ( $p < 0,0001$ ) (Fig. 24 C).

O último gene analisado foi o Leucil tRNA. Diferenças de expressão, significativas pelo teste t foram verificadas entre KV e APMV ( $p < 0,0003$ ); KV e IRL6 ( $p < 0,0219$ ), e também entre IRP16 e IRL6 ( $p < 0,0198$ ); e IRP16 e APMV ( $p < 0,0001$ ). Enquanto KV e IRP16 apresentaram expressões de

aproximadamente 40.000 vezes, IRL6 e APMV exibiram expressões de 60.000 vezes, ou seja, 20.000 a mais que os dois primeiros vírus (Fig. 24 D).



**Figura 24: Perfil de expressão de mRNA de Arginil tRNA sintetase, Tirosinil tRNA sintetase, Triptofanil tRNA e Leucil tRNA pelos isolados IRL6 e IRP16 e os vírus APMV e KV.** A. Quantificação de Arginil tRNA sintetase. B. Tirosinil tRNA sintetase. C. Triptofanil tRNA. D. Leucil tRNA. As análises estatísticas foram feitas utilizando o programa GraphPad Prism. Os asteriscos indicam a presença de diferenças de expressão estatisticamente significativas ( $p < 0.05$ ). ns: não significativa, IRL6: Isolamento Respiratório Leito 6; IRP16: Isolamento Respiratório Piso 16, KV: Kroon vírus, APMV: *Acanthamoeba polyphaga mimivirus*.

## 6.4. Caracterização estrutural

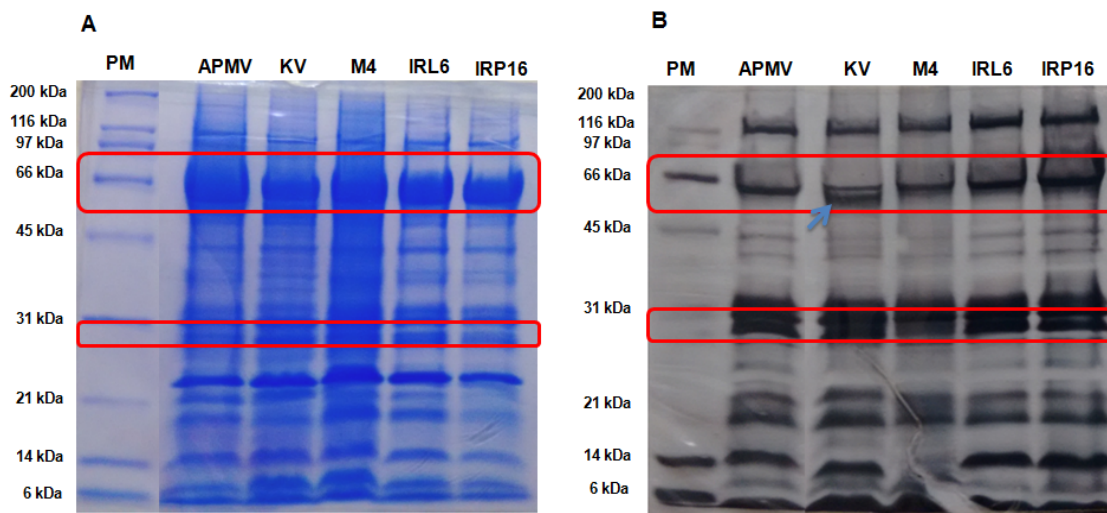
### 6.4.1. Perfil protéico viral

Para avaliar o perfil das proteínas estruturais constituintes das partículas virais dos novos isolados, foi realizada a desnaturação protéica por temperatura, seguida de eletroforese em gel de poliácridamida (PAGE). Os géis foram corados por comassie blue, que possibilitou a visualização de um maior número de bandas, ou por nitrato de prata, que evidenciou a presença de bandas mais bem definidas. Nesse ensaio também foram utilizados o APMV, por ser o vírus

protótipo, o KV, por ser um vírus morfologicamente distinto, apresentando uma camada protéica a mais no capsídeo viral, e o M4, por apresentar deleções de proteínas envolvidas na síntese das fibrilas.

Pela análise de ambos os géis foi possível observar uma grande similaridade entre o perfil de bandas apresentado pelos isolados IRL6, IRP16 e o APMV, indicando a presença de proteínas estruturais semelhantes entre esses vírus (Fig. 25). Há poucas referências bibliográficas sobre as proteínas estruturais presentes nos mimivírus, no entanto, Xiao *et al* (2009), Boyer *et al*, (2011) e Sobhy *et al* (2015) já identificaram algumas proteínas envolvidas na formação do capsídeo viral, como a L425, e na síntese de fibrilas, como a L725, R856, L829 e R135. A L425, principal proteína formadora do capsídeo, apresenta um peso molecular de, aproximadamente, 70 kDa, enquanto as proteínas envolvidas na síntese das fibrilas L725, R856, L829 e R135 apresentam pesos moleculares de 27, 40, 50 e 77 kDa, respectivamente.

A observação dos géis evidencia a presença de duas bandas fortes e bem definidas (Fig. 25). A primeira banda, com peso molecular de aproximadamente 70 kDa provavelmente corresponde à proteína do capsídeo (L425), o que pode ser corroborado pela presença de uma outra banda, que somente é visualizada no KV e pode representar a camada protéica extra do capsídeo desse vírus (Fig. 24 B). A segunda banda, de cerca de 27 kDa pode representar a proteína L725 que é uma das principais proteínas envolvidas na síntese de fibrilas. Apesar do vírus M4 apresentar deleções de proteínas envolvidas na morfogênese das fibrilas, a proteína L725 ainda se encontra presente no genoma desse vírus podendo também ser visualizada nos géis. As demais proteínas não puderam ser identificadas nessa análise.



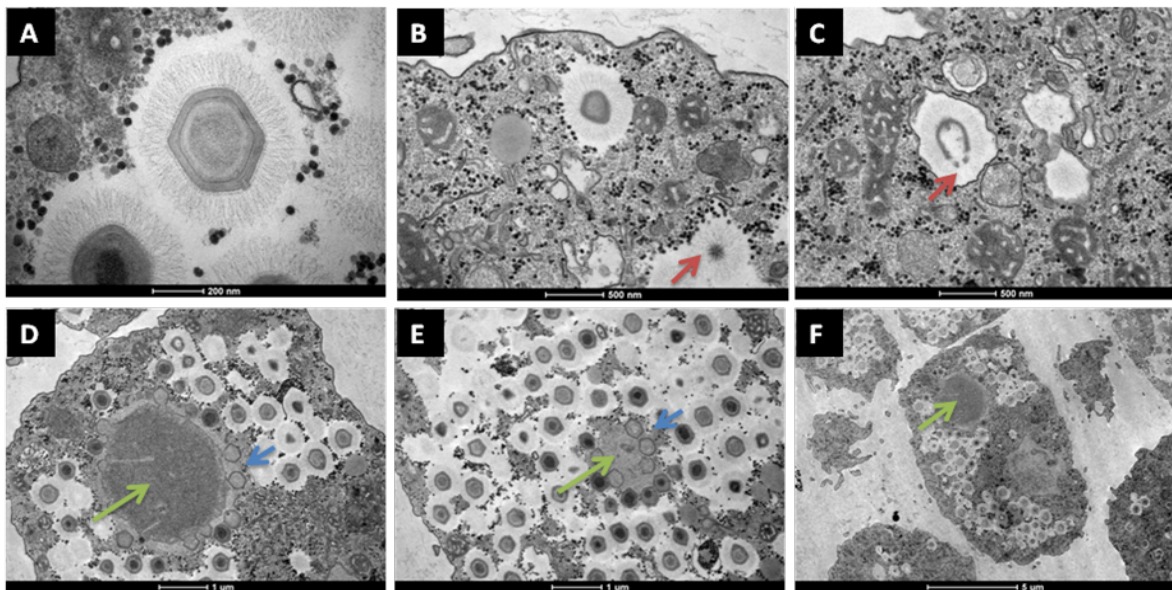
**Figura 25: Comparação entre o perfil das proteínas estruturais dos isolados IRL6, IRP16 e dos vírus APMV, KV e M4 através de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE). A.** Gel corado por comassie blue, evidenciando um maior número de bandas. **B.** Gel corando por nitrato de prata, apresentando bandas mais bem definidas. É possível observar um perfil protéico semelhante entre os novos isolados e o APMV. Os retângulos vermelhos evidenciam a presença de proteínas provavelmente envolvidas na formação do capsídeo viral, (~70 kDa) e na síntese de fibrilas (~27 kDa). A seta azul indica a presença de uma banda que pode representar a camada protéica extra do capsídeo do KV. IRL6: Isolamento Respiratório Leito 6; IRP16: Isolamento Respiratório Piso 16, KV: Kroon vírus, APMV: *Acanthamoeba polyphaga mimivirus*.

#### 6.4.2. Microscopia eletrônica de transmissão e varredura

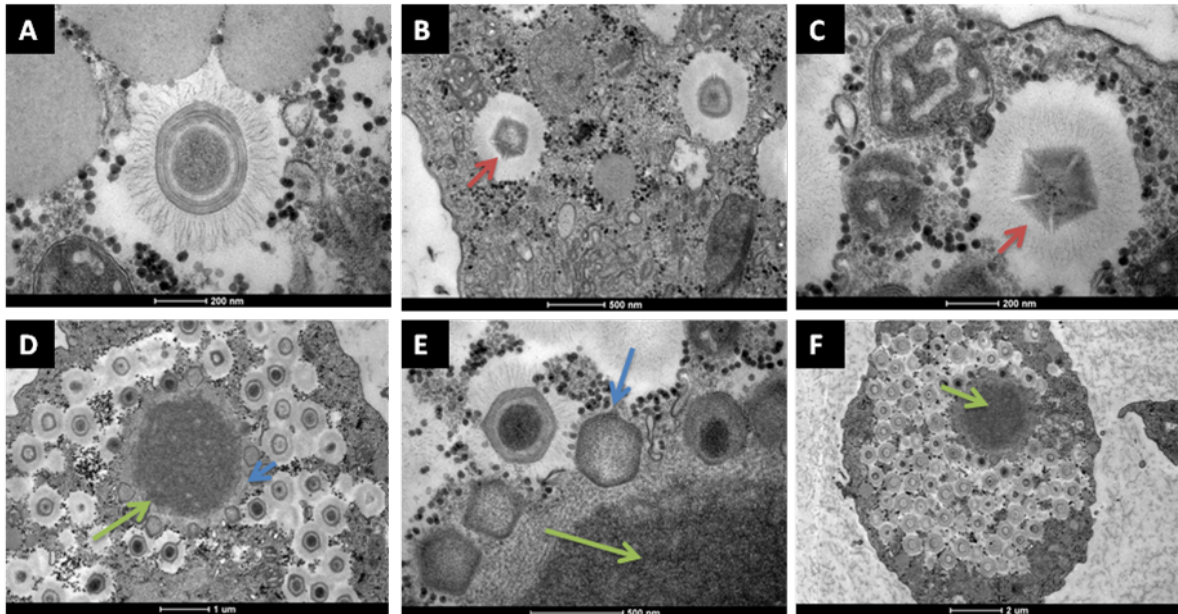
As características morfológicas dos novos vírus isolados foram observadas através de microscopia eletrônica de transmissão e varredura. Para tanto, amostras dos isolados foram preparadas conforme descrito nos itens 5.2.16 e 5.2.17 e enviadas para o Centro de Microscopia da UFMG aonde foram observadas em microscópios eletrônicos.

A análise das imagens provenientes da microscopia eletrônica de transmissão demonstrou a presença de características morfológicas muito semelhantes entre os dois isolados virais e o vírus protótipo APMV. As partículas virais de IRL6 e IRP16 foram caracterizadas pela presença de um capsídeo viral recoberto por uma densa camada de fibrilas, e por uma simetria semi-icosaédrica, sendo um dos vértices modificados pela presença do star-gate, que é uma estrutura típica dos mimivírus. Além disso, também foi possível observar diferentes etapas do ciclo de multiplicação desses isolados, que também parece

se multiplicar dentro de fábricas virais citoplasmáticas, de maneira análoga ao observado para o vírus protótipo (Fig. 26 e 27).



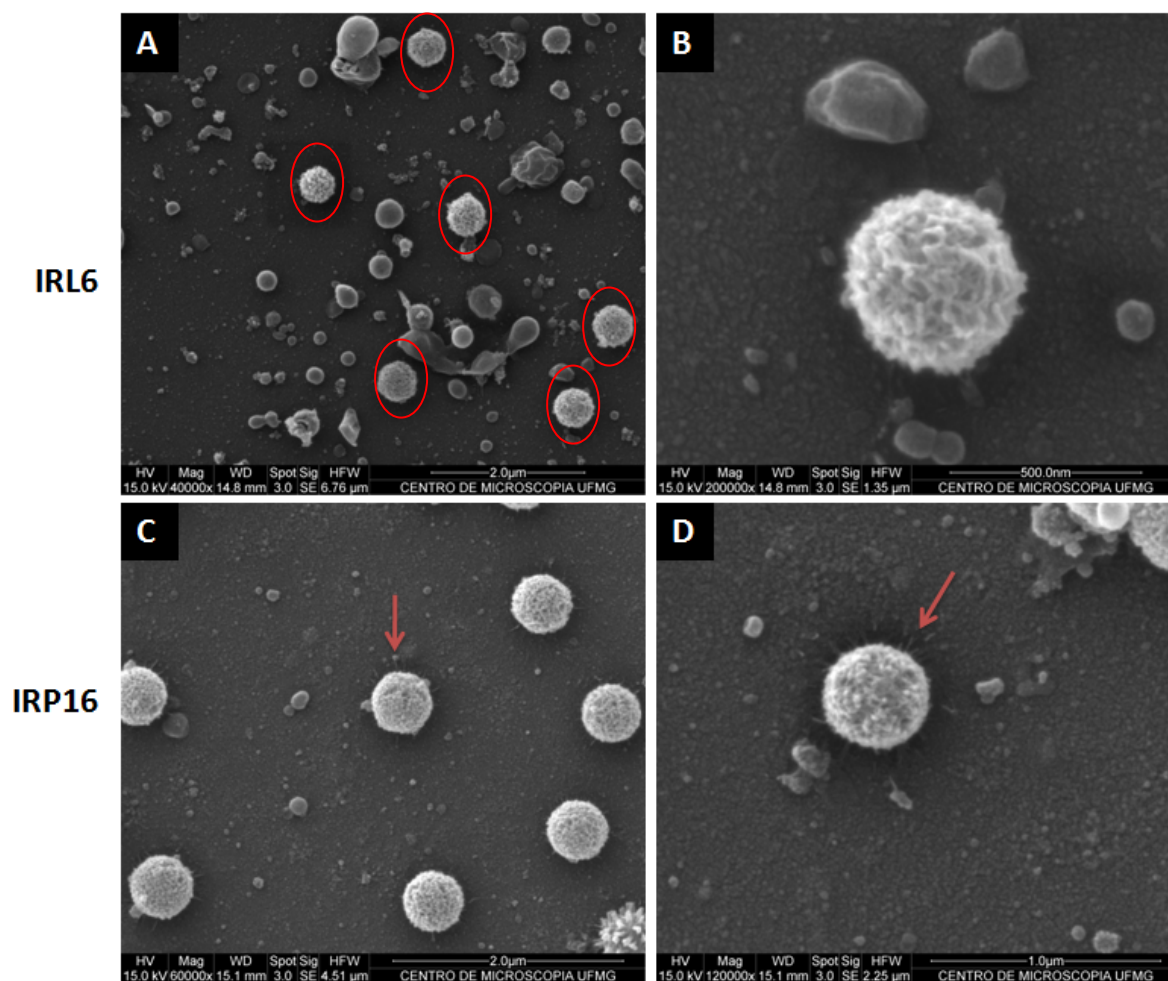
**Figura 26: Microscopia eletrônica de transmissão do isolado IRL6, destacando as estruturas morfológicas e as diferentes etapas do ciclo de multiplicação viral. A.** Partículas de IRL6 apresentando capsídeo de simetria semi-icosaédrica, rodeado pela densa camada de fibrilas. **B.** Partícula viral após morfogênese. **C.** Star-gate se abrindo. **D.** Fábrica viral. É possível observar a morfogênese de novas partículas virais ocorrendo em sua periferia. **E.** Fase tardia do ciclo de multiplicação caracterizada pela presença de muitas partículas virais novas. **F.** Visão geral de uma ameba infectada por IRL6. Setas vermelhas: star-gate; setas verdes: fábrica viral; setas azuis: morfogênese viral. IRL6: Isolamento Respiratório Leito 6.



**Figura 27: Microscopia eletrônica de transmissão do isolado IRP16, destacando as estruturas morfológicas e as diferentes etapas do ciclo de multiplicação viral.** **A.** Partícula de IRP16 apresentando capsídeo de simetria semi-icosaédrica, rodeado pela densa camada de fibrilas. **B.** Partículas virais após morfogênese **C.** Star-gate. **D e E.** Fábricas virais. É possível observar a morfogênese de novas partículas virais ocorrendo em suas periferias. **F.** Visão geral de uma ameba infectada por IRP16. Setas vermelhas: star-gate; setas verdes: fábrica viral; setas azuis: morfogênese viral. IRP16: Isolamento Respiratório Piso 16.

As imagens de microscopia de varredura complementaram a caracterização morfológica desses isolados virais, evidenciando ainda mais a presença da camada de fibrilas recobrendo as partículas virais. A visualização do star-gate também foi facilitada por esse tipo de microscopia, uma vez que essa é a única região da partícula viral que não é recoberta pelas fibrilas, sendo visualizada como uma depressão na partícula em formato de estrela (Fig. 28).





**Figura 28: Microscopia eletrônica de varredura dos isolados IRL6 e IRP16, destacando a densa camada de fibrilas a o star-gate. A e B.** Partículas de IRL6 (círculos vermelhos) recobertas pela densa camada de fibrilas. **C e D.** Partículas de IRP16 destacando a presença do star-gate (setas vermelhas) que são visualizados como depressões em formato de estrela. IRL6: Isolamento Respiratório Leito 6; IRP16: Isolamento Respiratório Piso 16.

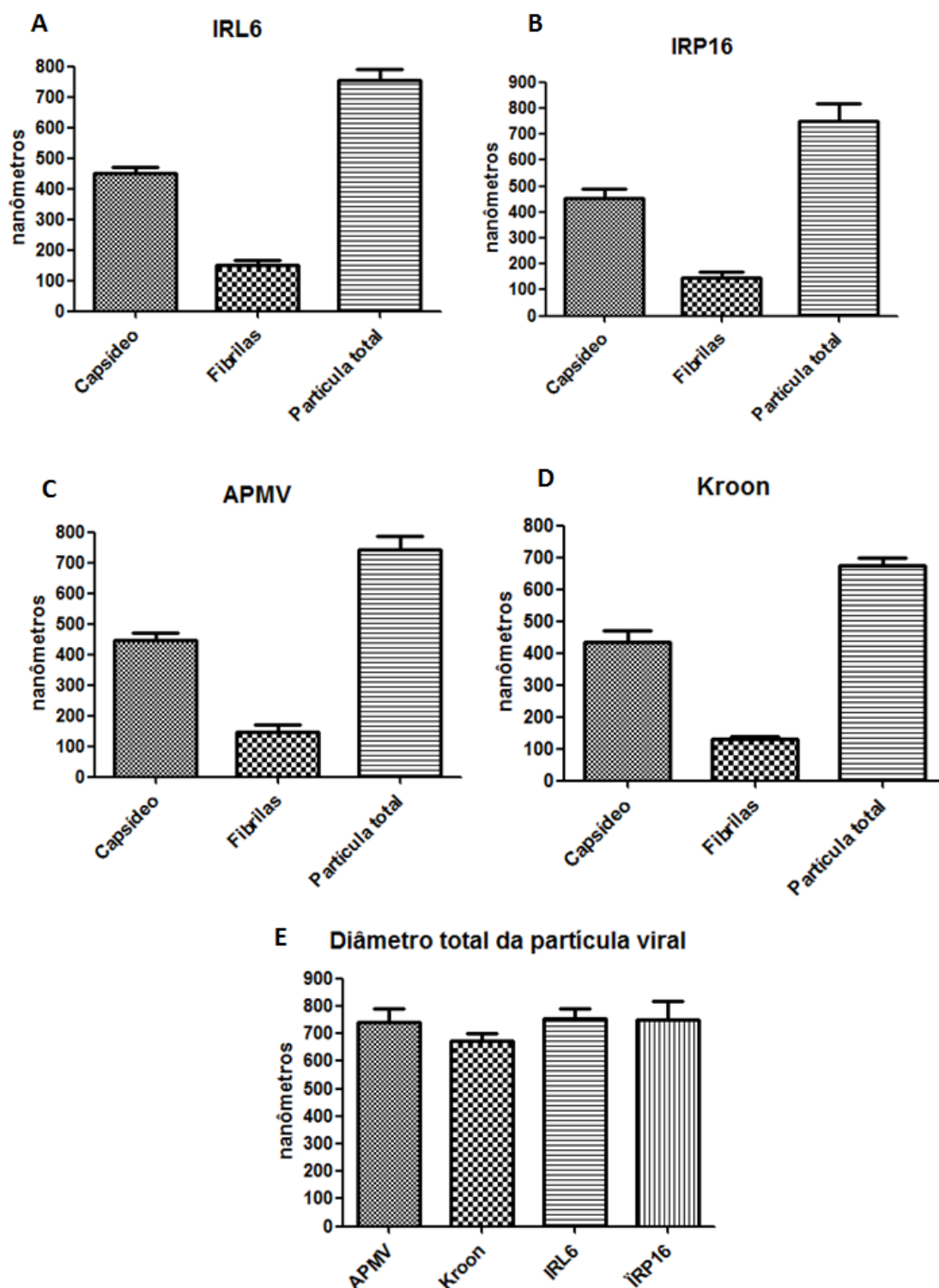
### 6.4.3. Morfometria

A análise morfométrica dos isolados foi feita de acordo com o item 5.2.18 e, posteriormente, foi comparada às morfometrias dos vírus APMV e KV, que já haviam sido feitas previamente pelo nosso grupo de pesquisa.

Os resultados demonstraram novamente uma alta similaridade morfológica entre os isolados IRL6 e IRP16. As partículas de ambos os vírus apresentaram um capsídeo de aproximadamente 450nm, recoberto por uma densa camada de fibrilas de cerca de 150nm, fazendo com que o tamanho total das partículas virais seja de 750nm. Valores extremamente semelhantes

também foram relatados para o APMV, evidenciando uma morfometria quase idêntica entre os isolados e o vírus protótipo. No entanto, a morfometria do KV se mostrou um pouco diferente dos demais vírus. Essa diferença se deu pelo tamanho da camada de fibrilas desse vírus que tem aproximadamente 50nm a menos do que as camadas dos demais vírus. Sendo assim a partícula do KV apresentou cerca de 650nm de diâmetro, ou seja, 100 nm a menos do que as partículas do IRL6, IRP16 e APMV (Fig. 29)





**Figura 29: Morfometria dos isolados virais e dos vírus APMV e KV.** Aproximadamente 20 partículas de cada vírus foram analisadas para levantamento dos tamanhos dos capsídeos, camada de fibrilas e diâmetro total da partícula. Os valores podem ser vistos separadamente para cada vírus. **A.** Morfometria do isolado IRL6. **B.** Morfometria do isolado IRP16. **C.** Morfometria do APMV. **D.** Morfometria do KV. **E.** Perfil de multiplicação comparativo dos quatro vírus analisados (IRL6, IRP16, APMV e KV). O diâmetro total das partículas virais de cada vírus também foi comparado. IRL6: Isolamento Respiratório Leito 6; IRP16: Isolamento Respiratório Piso 16, KV: Kroon vírus, APMV: *Acanthamoeba polyphaga mimivirus*.

## 7. DISCUSSÃO

Infecções do trato respiratório representam a segunda maior causa de morbidade e mortalidade em adultos e crianças no mundo inteiro. Essas infecções podem ser causadas por um amplo espectro de micro-organismos, sendo que a identificação do agente etiológico é de extrema importância para o tratamento clínico e também para o controle epidemiológico pelos órgãos responsáveis (ZUMLA *et al*, 2014).

A pneumonia é uma das principais infecções do trato respiratório inferior, sendo a causa dominante de morte em crianças abaixo de cinco anos em todo o mundo. Aproximadamente 450 milhões de casos dessa doença são registrados anualmente, sendo que cerca de 4 milhões evoluem para óbito. Dados revelam que cerca de 0,5% a 1% dos pacientes hospitalizados adquirem pneumonia nosocomial durante a internação, o que representa de 10% a 15% de todas as infecções hospitalares registradas. Além disso, pneumonia é considerada a principal causa de infecção nosocomial em UTIs. Entretanto, um dos principais problemas envolvendo essa manifestação clínica é a falta de dados e análises indicando seu agente etiológico. (LA SCOLA *et al*, 2005; BERGER *et al*, 2006)

Nos últimos anos tem crescido o número de estudos apontando os vírus como prováveis causadores de pneumonia comunitária e nosocomial. Desde a descoberta do APMV durante um surto de pneumonia, sem etiologia conhecida, em Bradford, na Inglaterra, esses vírus também têm sido apontados como potenciais causadores de pneumonia em seres humanos. No entanto, a real participação desses vírus na ocorrência dessa infecção respiratória ainda é controversa para muitos pesquisadores (LA SCOLA *et al*, 2005; BERGER *et al*, 2006; VINCENT *et al*, 2010; SAADI *et al*, 2013a; LUYT *et al*, 2014; KUTIKHIN *et al*, 2014).

No presente trabalho, foram analisadas 242 amostras de poeira hospitalar coletadas em diversos ambientes do Hospital das Clínicas/UFMG nos anos de 2012 e 2014 (Fig. 16). As análises de qPCR evidenciaram uma distribuição diferenciada de mimivírus pelo hospital, revelando um maior número de amostras positivas no isolamento respiratório (36,4%) do que em outros ambientes analisados. Essa maior positividade evidenciada pela qPCR, também

foi confirmada pelo isolamento viral de um maior número de vírus a partir das amostras provenientes do isolamento respiratório (29%) (Tabela 5). Não foi possível isolar nenhum vírus a partir do ICEx/UFMG, utilizado como ambiente controle nesse trabalho (Tabela 6), indicando que o fluxo de pessoas circulantes provavelmente não é o fator determinante para a maior ou menor presença desses vírus.

Levando em consideração que as instalações do isolamento respiratório são ambientes utilizados por pacientes com doenças respiratórias graves, e também que os mimivírus são considerados possíveis patógenos do trato respiratório e agentes causadores de pneumonia comunitária e nosocomial, o maior número de amostras positivas na qPCR e de vírus isolados neste ambiente pode indicar um fator de risco para a ocorrência desta doença e um perigo para a saúde dos pacientes hospitalizados. É importante destacar que há relatos de casos de pneumonia no HC-UFMG de etiologia desconhecida, e que poderiam estar relacionados com infecções causadas pelo mimivírus.

Um dos fatores que também poderia influenciar na distribuição desses vírus no HC/UFMG seria a periodicidade de limpeza dos diferentes ambientes. Segundo dados fornecidos pelo hospital (comunicação pessoal), as superfícies inanimadas de todos os ambientes são limpas com desinfetantes com frequência similar, uma vez por turno, inviabilizando essa hipótese. No ano de 2014, entretanto, houve uma mudança na higienização realizada em leitos, macas e equipamentos de unidades críticas: o etanol 70% foi substituído pelo produto glucoprotamina (INCIDIN®), que é um biocida mais eficaz e menos tóxico. Esse dado poderia justificar porque as amostras coletadas no ano de 2014, apresentaram menor positividade, UTI 1/31 (3,2%), ou nenhuma positividade, no caso do bloco cirúrgico e área de transplantados, quando comparado às amostras coletadas no ano de 2012.

Além da limpeza do ambiente, é importante ressaltar que a limpeza de utensílios hospitalares, como tubos endotraqueais e dispositivos de ventilação mecânica, também é de extrema importância, uma vez que alguns trabalhos publicados já demonstraram a longa estabilidade dos mimivírus em alguns materiais, incluindo tubos plásticos de ventilação hospitalar, e outros já relataram a colonização desses objetos por amebas do gênero *Acanthamoeba*, que são hospedeiras desses vírus (BRADBURY *et al*, 2014; DORNAS *et al*, 2014).

A fim de investigar de maneira mais detalhada os vírus isolados a partir do isolamento respiratório do HC/UFMG, nós utilizamos ensaios de caracterização molecular, biológica e estrutural desses vírus. A caracterização molecular revelou uma estreita relação entre os novos isolados virais e o grupo A do gênero *Mimivirus* (Fig. 19A). Esta relação estreita com o grupo A dos mimivírus também já foi observada em outros estudos sobre a diversidade de mimivírus brasileiros, apoiando a relação filogenética observada nesta análise. Além disso, a análise das sequências demonstrou a presença de poucos sítios polimórficos entre os isolados (Fig. 19B), evidenciando a alta similaridade desses com o APMV que foi o vírus inicialmente relacionado com a ocorrência de pneumonia em humanos (CAMPOS *et al*, 2014; DORNAS *et al*, 2014 e ANDRADE *et al*, 2015).

Para a caracterização biológica, foram escolhidos os isolados virais IRL6 e IRP16. É importante ressaltar que a escolha desses dois isolados foi baseada, principalmente, no ambiente em que eles foram coletados, no caso o isolamento respiratório, que foi o principal alvo de estudo desse trabalho.

A análise da curva de multiplicação (Fig. 20) e da indução do efeito citopático (Fig. 21) demonstrou uma grande semelhança no perfil de multiplicação dos novos isolados virais entre si. Entretanto, a comparação desses novos isolados com outros vírus já caracterizados, como APMV e KV, demonstrou que IRL6 e IRP16 parecem se multiplicar mais rapidamente e induzir o aparecimento de efeito citopático mais precocemente. Esses dados são indicativos de prováveis diferenças biológicas existente nos novos isolados virais que interferem na taxa de multiplicação desses vírus.

A resistência a diferentes temperaturas também foi avaliada, evidenciando uma semelhança entre os vírus testados e demonstrando que a temperatura de 70°C é capaz de inativar mais de 50% das partículas virais dos isolados e dos vírus APMV e KV (Fig. 22). Dentre os vírus analisados, o isolado IRP16 foi o aparentemente mais resistente, uma vez que aproximadamente 10<sup>3</sup> TCID<sub>50</sub>/ml partículas ainda permaneceram viáveis após aquecimento a 100°C.

O teste de resistência a biocidas demonstrou que o uso de hipoclorito de sódio e glutaraldeído, ambos na concentração de 3%, por 1 minuto, é capaz de inativar 100% das partículas virais de todos os vírus (Fig. 23). O hipoclorito de sódio é um biocida geralmente utilizado na desinfecção de pisos hospitalares,

sendo que seu mecanismo biocida está envolvido com seu alto potencial oxidativo. Já o glutaraldeído é um biocida, que provoca alterações no DNA, RNA e na síntese protéica de micro-organismos, amplamente utilizado na esterilização de utensílios como endoscópios, equipamentos de terapia respiratória e também diafragmas (ABREU *et al*, 2013). O fato dos novos isolados virais, assim como os demais mimivírus, serem susceptíveis a ação desses desinfetantes está de acordo com o exposto por Campos *et al*, 2012, e demonstram que esses dois biocidas químicos podem ser indicados na higienização de ambientes e utensílios hospitalares para eliminação desses micro-organismos. No entanto, é importante ressaltar que amebas do gênero *Acanthamoeba* podem servir como “abrigo” para os mimivírus, como demonstrado por Boratto *et al* (2014), aumentando a resistência desses vírus a biocidas químicos quando estes estão no interior dos seus hospedeiros.

A análise do gel de eletroforese em poliacrilamida revelou o mesmo padrão de bandas protéicas entre os isolados e o APMV, indicando a presença das mesmas proteínas estruturais entre esses vírus (Fig 24). A fim de complementar esses dados, também foram feitas microscopias eletrônicas de transmissão e varredura dos novos isolados que evidenciaram a presença de características típicas de mimivírus, como capsídeo semi-icosaédrico, camada de fibrilas, star-gate e multiplicação no interior de fábricas virais citoplasmáticas (Fig. 27 a 28) (XIAO *et al*, 2009, XIAO e ROSSMANN, 2011; ABRAHÃO *et al*, 2014). A análise morfométrica também revelou que as partículas desses novos isolados apresentam um diâmetro de aproximadamente 750nm, sendo que 450nm correspondem ao capsídeo e 150 nm á densa camada de fibrilas.

De uma maneira geral, a caracterização biológica, molecular e estrutural dos novos isolados demonstrou uma grande similaridade entre esses vírus e o protótipo APMV. No entanto diferenças na curva de multiplicação foram observadas sugerindo a existência de alguma diferença biológica. Diante disso, nós também avaliamos a expressão gênica de alguns genes envolvidos na tradução, os tRNAs e as tRNAs sintetases, para averiguar uma possível correlação entre diferenças de expressão desses genes e perfil de multiplicação. A análise dos quatro genes revelou uma diferença de expressão entre os vírus, no entanto não foi possível estabelecer uma correlação direta entre essas diferenças e o perfil da curva de multiplicação. Mesmo não estabelecendo essa

correlação, as informações obtidas são importantes para a própria caracterização dos isolados, revelando diversidade biológica entre os isolados. Foi possível observar que o isolado IRP16 apresentou uma menor expressão dos genes Tirosinil tRNA sintetase e Leucil tRNA, quando comparado ao IRL6 e também ao APMV. Apesar dessa menor expressão, esse isolado apresentou uma taxa de multiplicação semelhante ao IRL6 e superior ao APMV, demonstrando que a multiplicação não foi prejudicada pela menor expressão.

Apesar do papel dos mimivírus como agentes etiológicos de pneumonia ainda ser controverso, nossos resultados demonstram correlações interessantes que reforçam a necessidade de controle da presença desses vírus no ambiente hospitalar. Além disso, é importante ressaltar que o controle de amebas também se faz necessário, uma vez que esses protozoários, além de já terem sido isolados de ambientes hospitalares, podem servir de abrigo para os mimivírus e também formar biofilme sobre uma gama de materiais hospitalares, servindo como “cavalos de Tróia” para a disseminação desses vírus (SILVA E ROSA, 2003; THOMAS *et al*, 2006; CARLESSO *et al*, 2007; COSTA *et al*, 2010; RAOULT e BOYER, 2010; LASJERDI *et al*, 2011; HASSAN *et al*, 2012; BORATTO *et al*, 2013, OVRUTSKY *et al*, 2013; LA SCOLA, 2014; PAGNIER *et al*, 2015).

## 8. CONCLUSÕES

- ✓ Neste trabalho foi possível detectar e isolar novos vírus gigantes em diferentes ambientes do HC/UFMG.
- ✓ Foi observado a presença de um número significativamente maior de amostras positivas no isolamento respiratório (36,4%) do que em outros ambientes hospitalares analisados.
- ✓ 24 isolados virais foram obtidos, pelo ensaio de ágar PAS, a partir das amostras coletadas no HC/UFMG. Sendo que a maioria desses isolados (29%) também foram obtidos a partir do isolamento respiratório.
- ✓ Não foi possível isolar nenhum mimivírus a partir das amostras coletadas no ICEX/UFMG.
- ✓ Análises moleculares demonstraram uma estreita relação entre os novos isolados virais e o grupo A do gênero *Mimivirus*. A análise das sequências demonstrou a presença de poucos sítios polimórficos entre os isolados virais.
- ✓ As análises estruturais dos isolados evidenciaram a presença de partículas virais de aproximadamente 750nm de diâmetro, composta por proteínas estruturais semelhantes às observadas em APMV. As microscopias eletrônicas de transmissão e varredura demonstraram a presença de estruturas e características típicas de mimivírus.
- ✓ A caracterização biológica dos novos isolados demonstrou uma grande similaridade entre esses vírus e o protótipo APMV. No entanto algumas diferenças na curva de multiplicação e na expressão de genes envolvidos na tradução foram observadas sugerindo a existência de diferenças biológicas nos novos isolados virais.

- ✓ Nossos resultados demonstram correlações interessantes que reforçam a necessidade de controle da presença desses vírus no ambiente hospitalar.



## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHÃO, J. S.; DORNAS, F. P.; SILVA, L.C.F.; ALMEIDA, G.M.; BORATTO, P. V.; COLSON, P.; LA SCOLA, B.; KROON, E.G. *Acanthamoeba polyphaga mimivirus* and other giant viruses: an open field to outstanding discoveries. **Virology Journal**. v. 11:120, 2014.

ABREU, A.C.; TAVARES, R.R; BORGES, A.; MERGULHAO, F.; SIMÕES, M. Current and emergent strategies for disinfection of hospital environments. **J Antimicrob Chemother**. v. 68: p. 2718–2732, 2013.

AHERFI, S.; PAGNIER, I.; FOURNOUS, G.; RAOULT, D.; LA SCOLA, B.; COLSON, P. Complete genome sequence of Cannes 8 virus, a new member of the proposed family “*Marseilleviridae*”. **Virus Genes**. V. 47, p. 550-555, 2013.

AHERFI, S.; BOUGHALMI, M.; PAGNIER, I.; FOURNOUS, G.; LA SCOLA, B.; RAOULT, D.; COLSON, P. Complete genome sequence of Tunisvirus, a new member of the proposed family *Marseilleviridae*. **Archives of Virology**. n 705, 2014a.

AHERFI, S.; LA SCOLA, B.; PAGNIER, I.; RAOULT, D.; COLSON, P. The expanding family *Marseilleviridae*. **Virology**. V 466-467, p. 27-37, 2014b.

ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**. v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.

ANDRADE, K.R.; BORATTO, P.P.V.M.; RODRIGUES, F.P.; SILVA, L.C.F.; DORNAS, F.P.; PILOTTO, M.R.; LA SCOLA, B.; ALMEIDA, G. M. F.; KROON, E.G.; ABRAHÃO, J. S. Oysters as hot spots for mimivirus isolation. **Archives of virology**. v. 160, p. 477-482, 2014.

ARSLAN, D.; LEGENDRE, M.; SELTZER, V.; ABERGEL, C.; CLAVERIE, J.M. Distant mimivirus relative with a larger genome highlights the fundamental features of *Megaviridae*. **PNAS**, E.U.A., v. 108, n. 42, p. 17486-91, 2011.

BERGER, P.; PAPAZIAN, L.; DRANCOURT, M.; LA SCOLA, B.; AUFRAY, J.P.; RAOULT, D. Ameba-associated Microorganisms and Diagnosis of Nosocomial Pneumonia. **Emerging Infectious Disease**. v. 12, n. 2, p. 248-255, 2006.

BORATTO, P. V. M.; DORNAS, F. P.; ANDRADE, K. R.; RODRIGUES, R.; PEIXOTO, F.; SILVA, L.C.F.; LA SCOLA, B.; COSTA, A. O.; ALMEIDA, G. M. F.; KROON, E.G.; ABRAHÃO, J. S. Amoebas as mimivirus bunkers: increased resistance to UV light, heat and chemical biocides when viruses are carried by amoeba hosts. **Archives of Virology**. v. 159, n. 5, p. 1039-1043, 2014.

BOUGHALMI, M.; PAGNIER, I.; AHERFI, S.; COLSON, P.; RAOULT, D.; LA SCOLA, B. First Isolation of a Giant Virus from Wild *Hirudomedicinalis* Leech: *Mimiviridae* isolation in *Hirudomedicinalis*. **Viruses**. v. 5, p. 2920-2930, 2013.

BOYER, M.; MADOU, M.A.; GIMENEZ, G.; LA SCOLA, B.; RAOULT, D. Phylogenetic and Phyletic Studies of Informational Genes in Genomes Highlight Existence of a 4th Domain of Life Including Giant Viruses. **PlosOne**. v. 5, n. 12, p. 1-8, e15530, 2010.

BOYER, M.; AZZA, S.; BARRASSI, L.; KLOSE, T.; CAMPOCASSO, A.; PAGNIER, I.; FOURNOUS, G.; BORG, A.; ROBERT, C.; ZHANG, X.; DESNUES, C.; HENRISSAT, B.; ROSSMANN, M.G.; LA SCOLA, B.; RAOULT, D. Mimivirus shows dramatic genome reduction after intraamoebal culture. **PNAS**. v. 108, n. 25, p. 10296-301, 2011.

BRADBURY, R.S.; FRENCH, L.P.; BLIZZARD, L. Prevalence of *Acanthamoeba* spp. in Tasmanian intensive care clinical specimens. **Journal of Hospital Infections**. v. 86, p. 178-181, 2014.

CAMPOS, R.K.; ANDRADE, K. R.; FERREIRA, P.C.P.; BONJARDIM, C.A.; LA SCOLA, B.; KROON, E.G.; ABRAHÃO, J.S. Virucidal activity of chemical biocides against mimivirus, a putative pneumonia agente. **Journal of Clinical Virology**. v. 55, p. 323-328, 2012.

CAMPOS, R.K.; BORATTO, P. V.; ASSIS, F. L.; AGUIAR, E.R.G.R.; SILVA, L.C.F.; ALBARNAZ, J.D.; DORNAS, F. P.; TRINDADE, G. S.; FERREIRA, P. P., MARQUES, J. T.; ROBERT, C.; RAOULT, D.; KROON, E.G.; LA SCOLA, B.; ABRAHÃO, J. S. *Samba virus*: a novel mimivirus from a giant rain forest, the Brazilian Amazon. **Virology Journal**. v 11:95, 2014.

CARLESSO, A.M.; SIMONETTI, A. B.; ARTUSO, G.L.; ROTT, M. B. Isolamento e identificação de amebas de vida livre potencialmente patogênicas em amostras de ambientes de hospital público da cidade de Porto Alegre, RS. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 40, n. 3, p. 316-320, 2007.

CASTRILLÓN, J.C.; OROZCO, L.P. *Acanthamoeba* spp. como parásitos patógenos y oportunistas. **Rev Chilena Infectol**. v. 30, n. 2, p. 147-155, 2013.

CLAVERIE, J.M.; ABERGEL, C. *Mimivirus* and its Virophage. **Annual Reviews**. v.43, p. 49-66, 2009a.

CLAVERIE, J.M.; ABERGEL, C.; OGATA, H. *Mimivirus*. **Current topics in microbiology and immunology**, Alemanha, v. 328, p. 89-121, 2009b.

CLAVERIE, J.M.; GRZELA, R.; LARTIGUE, A.; BERNADAC, A.; NITSCHKE, S.; VACELET, J.; OGATA, H.; ABERGEL, C. Mimivirus and Mimiviridae: Giant viruses with an increasing number of potential hosts, including corals and sponges. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 101, p. 172-180, 2009c.

CLAVERIE, J. M. Extending the realm of *Megaviridae* to *Viridiplantae*. **Communicative & Integrative Biology**. V 6 (6), 2013.

COLSON, P.; YUTIN, N.; SHABALINA, S.A.; ROBERT, C.; FOURNOUS, G.; LA SCOLA, B.; RAOULT, D.; KOONIN, E.V. Viruses with more than 1,000 Genes: *Mamavirus*, a new *Acanthamoeba polyphagamimivirus* strain, and reannotation of mimivirus genes. **Genome biology and evolution**, Inglaterra, v. 3, p. 737–42, 2011.

COLSON, P.; DE LAMBALLERIE, X.; FOURNOUS, G.; RAOULT, D. Reclassification of giant viruses composing a fourth domain of life in the new order *Megavirales*. **Intervirology**, Suíça, v.55, n. 5, p. 321-32, 2012.

COLSON, P.; LAMBALLERIE, X.; YUTIN, N.; ASGARI, S.; BIGOT, Y.; BIDESHI, D.K.; CHENG, X.W.; FEDERICI, B. A.; ETTEN, J.L.V.; KOONIN, E.V.; LA SCOLA, B.; RAOULT, D. “*Megavirales*”, a proposed new order for eukaryotic nucleocytoplasmic large DNA viroses. **Archives of Virology**. v. 158, p. 2517-2521, 2013a.

COLSON, P.; FOURNOUS, G.; DIENE, S.M.; RAOULT, D. Codon usage, amino acid usage, transfer RNA and amino-acyl-tRNASynthetases in mimiviruses. **Intervirology**, Suíça, v. 56, n. 6, p.364-75, 2013b.

COLSON, P. RAOULT, D. Mimivirus, Other Viruses Infecting Phagocytic Protists, and Their Virophages. **Fields virology**. 6th ed. Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia. p. 2259, 2013c.

COSTA, A.O.; CASTRO, E.A.; FERREIRA, G.A.; FURST, C.; CROZETA, M.A. THOMAZ-SOCCOL, V. Characterization of *Acanthamoeba* Isolates from Dust of a Public Hospital in Curitiba, Paraná, Brazil. **J. Eukaryot. Microbiol.** v. 57, n.1, p.75-77, 2010.

COSTA, C; BERGALLO, M.; ASTEGIANO, S.; TERLIZZI, M.E.; SIDOTI, F.; SOLIDORO, P.; CAVALLO, R. Detection of mimivirus in bronchoalveolar lavage of ventilated and nonventilated patients. **Intervirology**, v. 55, p.303-305, 2012.

DARE, R.K.; CHITTAGANPITCH, M.; ERDMAN, D.D. Screening pneumonia patients for mimivirus. **Emerging Infectious Disease**, v. 14, p. 465-7, 2008.

DESNUES, C.; RAOULT, D. Inside the lifestyle of the virophage. **Intervirology**, Suíça, v. 53, n.5, p. 293-303, 2010.

DESNUES, C.; RAOULT, D. Virophages question the existence of satellites. **NatureReviewsMicrobiology**. v. 9, p. 762-763, 2012.

DORNAS, F.P.; RODRIGUES, F.P.; BORATTO, P.V.M.; SILVA, L.C.F.; FERREIRA, P.C.P.; BONJARDIM, C.A.; TRINDADE, G.S.; KROON, E.G.; LA SCOLA, B.; ABRAHÃO, J.S. *Mimivirus* circulation among wild and domestic mammals, Amazon region, Brasil. **Emerging**. v. 20, n.3, p. 469-472, 2014.

**EMBRAPA**, Recursos Genéticos e Biotecnologia. Electropherogram quality analysis. Brasil, 2010. Disponível em <<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>>. Acesso em 22 de julho 2014.

ETTEN, J.L.V.; LANE, L. C.; DUNIGAN, D.D. DNA viruses: the really big ones (giruses). **Annual review of microbiology**, E.U.A., v. 13, n. 64, p. 83–99, 2010.

ETTEN, J.L.V. Another Really, Really Big Virus. **Viruses**. v.3, p. 32-46, 2011.

FILÉE, J.; CHANDLER, M. Gene Exchange and the Origin of Giant Viruses. **Intervirol**. v. 53, p. 354-361, 2010.

FISCHER, M. G.; SUTTLE, C. A. A. Virophage at the Origin of Large DNA Transposons. **SCIENCE**. v. 332, p. 231-234, abr. 2011.

GAIA, M.; BENAMAR, S.; BOUGHALMI, M.; PAGNIER, I.; CROCE, O.; COLSON, P.; RAOULT, D.; LA SCOLA, B. Zamilon, a Novel Virophage with *Mimiviridae* Host Specificity. **Plos One**. V. 9(4): e94923, 2014.

GHEDIN, E.; CLAVERIE, J. M. *Mimivirus* relatives in the Sargasso sea. **Virology Journal**, Inglaterra, v. 2, p. 62-69, 2005.

GHIGO, E.; KARTENBECK, J.; LIEN, P.; PELKMANS, L.; CAPO, C.; MEGE, J.L.; RAOULT, D. Ameobal pathogen mimivirus infects macrophages through phagocytosis. **PLoS Pathogens**, E.U.A., v. 4, n. 6, p. 01-17, 2008.

GOODMAN, J.L. *Marseillevirus*, Blood Safety and the Human Virome. **Journal of Infectious Diseases**. v. 208, n. 7, p. 1039-1041, 2013.

HASSAN, A.; FAROUK, H.; HASSANEIM, F.; ABDUL-GHANI, R.; ABDELHADY, A.H. *Acanthamoeba* contamination of hemodialysis and dental units in Alexandria, Egypt: a neglected potential source of infection. **Journal of Infection and Public Health**. v. 5, n. 4, p. 304-310, 2012.

Im K, Kim DS. Acanthamoebiasis in Korea: two new cases with clinical cases review. **Yonsei Med J**. v. 3, n. 9, p.478-484, 1998.

IYER, L.M.; BALAJI, S.; KOONIM, E.V.; ARAVIND, L. Evolutionary genomics of Nucleo-Cytoplasmic Large DNA viruses. **Virus Research**.v. 117, p. 156–184, 2006.

KHAN, M.; LA SCOLA, B.; LEPIDI, H; RAOULT, D. Pneumonia in mice inoculated experimentally with *Acanthamoeba polyphaga* mimivirus. **Microbial Pathogenesis**. v. 42, p. 56–61, 2006.

KUMAR S, TAMURA K, N. M. MEGA: molecular evolutionary genetics analysis software for microcomputers. **Computer Applications in the Biosciences**. v. 10, p. 189–191, 1994.

KUTIKHIN, A.G.; YUZHALLIN, A.E.; BRUSINA, E.B. Mimiviridae, Marseilleviridae, and virophages as emerging human pathogens causing healthcare-Associated infections. **Hygiene and Infection Control**. v. 9, n. 2, 2014.

LASJERDI, Z.; NIYYATI, M.; HAGHIGHI, A.; SHAHABI, S.; BIDEROUNI, F.T.; TAGHIPOUR, N.; EFTEKHAR, M.; MOJARAD, E.N. Potentially pathogenic free-living amoebae isolated from hospital wards with immunodeficient patients in Tehran, Iran. **Parasitology Research**. v. 109, n. 3, p. 575-580, 2011.

LA SCOLA, B.; AUDIC, S.; ROBERT, C.; JUNGANG, L.; DE LAMBALLERIE, X.; DRANCOURT, M.; BIRTLES, R.; CLAVERIE, J.M.; RAOULT, D. A giant virus in amoebae. **Science**, E.U.A., v. 299, n. 5615, p. 2033, 2003.

LA SCOLA, B.; MARRIE, T.J.; AUFRAY, J.P.; RAOULT, D. Mimivirus in pneumonia patients. **Emerging infectious diseases**, E.U.A., v. 11, n. 3, p. 449–52, 2005.

LA SCOLA, B.; DESNUES, C.; PAGNIER, I.; ROBERT, C.; BARRASSI, L.; FOURNOUS, G.; MERCHAT, M.; SUZAN-MONTI, M.; FORTERRE, P.; KOONIN, E.; RAOULT, D. The virophage as a unique parasite of the giant mimivirus. **Nature**. Inglaterra, v. 455, n. 7209, p. 100-4, 2008.

LA SCOLA, B.; CAMPOCASSO, A.; N'DONG, R.; FOURNOUS, G.; BARRASSI, L.; FLAUDROPS, C.; RAOULT, D. Tentative characterization of new environmental giant viruses by MALDI-TOF mass spectrometry. **Intervirology**. Suíça, v. 53, n. 5, p. 344-53, 2010.

LA SCOLA, B. Looking at protists as a source of pathogenic viruses. **Microbial Pathogenesis**. v. 77, p. 131-135, 2014.

LEGENDRE, M.; AUDIC, S.; POIROT, O.; HINGAMP, P.; SELTZER, V.; BYRNE, D.; LARTIGUE, A.; LESCOT, M.; BERNADAC, A.; POULAIN, J.; ABERGEL, C.; CLAVERIE, J.M. mRNA deep sequencing reveals 75 new genes and a complex transcriptional landscape in Mimivirus. **Genome Research**, E.U.A., v. 20, n.5, p. 664-74, 2010.

LEGENDRE, M.; SANTINI, S.; RICO, A.; ABERGEL, C.; CLAVERIE, J.M. Breaking the 1000-gene barrier for *Mimivirus* using ultra-deep genome and transcriptome sequencing. **Virology Journal**. v. 8 :99, 2011.

LEGENDRE, M.; BARTOLI, J.; SHMAKOVA, L.; JEUDY, S.; LABADIE, K.; ADRAIT, A.; LESCOT, M.; POIROT, O.; BERTAUX, L.; BRULEY, C.; COUTE, Y.; RIVKINA, E.; ABERGEL, C.; CLAVERIE, J. M. Thirty-thousand-year-old distant relative of giant icosahedral DNA viruses with a pandoravirus morphology. **PNAS**. v. 111 (11), p. 4274–4279, 2014.

LUYT, C. E.; BRÉCHOT, N.; CHASTRE, J. What role do viruses play in nosocomial pneumonia?. **Current Opinion in Infectious Diseases**. v. 27, n.2, 194-199, 2014.

MOREIRA, D.; BROCHIER-ARMANET, C. Giant viruses, giant chimeras: the multiple evolutionary histories of mimivirus genes. **BMC Evolutionary Biology**, Inglaterra, v. 8, n. 12, p. 01-10, 2008.

MUTSAFI, Y.; ZAUBERMAN, N.; SABANAY, I.; MINSKY, A. Vaccinia-like cytoplasmic replication of the giant Mimivirus. **PNAS**, E.U.A., v. 107, n. 13, p.5978–82, 2010.

MUTSAFI, Y.; SHIMONI, E.; SHIMON, A.; MINSKY, A. Membrane Assembly during the Infection Cycle of the Giant Mimivirus. **PLOS Pathogens**. v. 9, n.5, 2013.

OVRUTSKY, A. R.; CHAN, E.D.; KARTALIJA, M.; BAI, X.; JACKSON, M.; GIBBS, S.; FALKINHAM III, J.O.; ISEMAN, M. D.; REYNOLDS, P.R.; MCDONELL, G.; THOMAS, V. Cooccurrence of free-living amoebae and nontuberculous Mycobacteria in hospital water networks, and preferential growth of Mycobacterium avium in Acanthamoeba lenticulata. **Appl Environ Microbiol**. v. 79, n. 10, p. 3185-3192, 2013.

PAGNIER, I., VALLES, C.; RAOULT D.; LA SCOLA, B. Isolation of Vermamoeba vermiformis and associated bacteria in hospital water. **Microbial Pathogenesis**. v. 80, p. 14-20, 2015.

PHILIPPE, N.; LEGENDRE, M.; DOUTRE, G.; COUTE, Y.; POIROT, O.; LESCOT, M.; ARSLAN, D.; SELTZER, V., BERTAUX, L.; BRULEY, C.; GARIN, J.; CLAVERIE, J.M.; ABERGEL, C. Pandoraviruses: Amoeba Viruses with Genomes Up to 2.5 Mb Reaching That of Parasitic Eukaryotes. **Science**. v. 341, p. 281-286, 2013.

POPGEORGIEV, N.; BOYER, M.; FANCELLO, L.; MONTEIL, S.; ROBERT, C.; RIVET, R.; NAPPEZ, C.; AZZA, S.; CHIARONI, J.; RAOULT, D.; DESNUES, C. Giant Blood Marseillevirus recovered from asymptomatic blood donors. **Journal of Infectious Diseases**. v. 208, n. 7, p. 1042-1050, 2013a.

POPGEORGIEV, N.; MICHEL, G.; LEPIDI, H.; RAOULT, D.; DESNUES, C. Marseillevirus Adenitis in an Eleven-Month-Old Child. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 51, n. 12, p. 4102-4105, 2013b.

POPGEORGIEV, N.; COLSON, P.; THURET, I.; CHIARIONI, J.; GALLIAN, P.; RAOULT, D.; DESNUES, C. Marseillevirus prevalence in multitransfused patients suggests blood transmission. **Journal of Clinical Virology**. v. 58, n. 4, p. 722-725, 2013c.

RAOULT, D.; AUDIC, S.; ROBERT, C.; ABERGEL, C.; RENESTO, P.; OGATA, H; LA SCOLA, B.; SUXAN, M.; CLAVERIE, J.M. The 1.2-megabase genome sequence of Mimivirus. **Science**.v. 306, p. 1344–1350, 2004.

RAOULT, D. The journey from Rickettsia to Mimivirus. **ASM News**, E.U.A., v. 71, n. 6, p. 278-84, 2005.

RAOULT, D.; LA SCOLA, B.; BIRTLES, R. The discovery and characterization of Mimivirus the largest known virus and putative pneumonia agent. **Clinical infectious diseases**, E.U.A., v. 45, n. 1, p. 5-102, 2007.

RAOULT, D.; BOYER, M. Amoebae as Genitors and Reservoirs of Giant Viruses. **Intervirolgy**. v. 53, p. 321–329, 2010.

REED, L.J.; MUENCH, H. A Simple method of estimating fifty per cent endpoints. **The American Journal of Hygiene**. v. 27. n. 3, p. 493-497, 1938.

RETENO, D.G.; BENAMAR, S.; KHALIL, J.B.; ANDREANI, J.; ARMSTRONG, N.; KLOSE, T.; ROSSMAN, M.; COLSON, P.; RAOULT, D.; LA SCOLA, B. Faustovirus, an asfarvirus-related new lineage of giant viruses Infecting amoebae. **Journal of virology**. v. 89, n9, 2015.

SAADI, H.; RETENO, D.G.; COLSON, P.; AHERFI, S.; MINODIER, P.; PAGNIER, I.; RAOULT, D.; LA SCOLA, B. *Shan virus*: a new mimivirus isolated from the stool of a Tunisian patient with pneumonia. **Intervirolgy**, Suíça, v. 56, n. 6, p. 424-9, 2013a.

SAADI, H.; PAGNIER, I.; COLSON, P.; CHERIF, J.K.; BEJI, M.; BOUGHALMI, M.; AZZA, S.; ARMSTRONG, N.; ROBERT, C.; FOURNOUS, G.; LA SCOLA, B.; RAOULT, D. First isolation of Mimivirus in a patient with pneumonia. **Clinical infectious diseases**, E.U.A., v. 57, n.4, p. 127-34, 2013b.

SAMBROOK, J., RUSSELL, D.W. Molecular Cloning. **A Laboratory Manual**, NewYork, NY, 1989.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **PNAS**. v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

SHAH, N.; HULSMIEIER, A.J.; HOCHHOLD, N.; NEIDHART, M.; GAY, S.; HENNET, T. Exposure to Mimivirus Collagen Promotes Arthritis. **Journal of Virology**. v. 88, p. 838-845, 2013.

SIDDIQUI, R.; KHAN, N.A. Biology and pathogenesis of Acanthamoeba. **Parasite and Vectors**. v. 5, n. 6, p. 3-24, 2012.

SILVA, M.A.; ROSA, J.A. Isolamento de amebas de vida livre potencialmente patogênicas em poeira de hospitais. **Rev Saúde Pública**. v. 37, n. 2, p. 242-246, 2003.

SILVA, L.C.F.; ALMEIDA, G.M.F.; OLIVEIRA, D.B.; DORNAS, F.P.; CAMPOS, R.K.; LA SCOLA, B.; FERREIRA, P.C.P.; KROON, E.G.; ABRAHÃO, J.S. A

resourceful giant: APMV is able to interfere with the human type I interferon system. **Microbes and Infections**. v. 16, n. 3, p. 187-195, 2013.

SOBHY, H.; LA SCOLA, B.; PAGNIER, I.; RAOULT, D.; COLSON, P. Identification of giant Mimivirus protein functions using RNA interference. **Frontiers in Microbiology**. v. 6, 2015.

SUHRE, K. Gene and genome duplication in *Acanthamoeba polyphaga* Mimivirus. **Journal of Virology**, E.U.A., v. 79, n. 22, p.14095–101, 2005.

SUHRE, K.; AUDIC, S.; CLAVERIE, J.M. Mimivirus gene promoters exhibit an unprecedented conservation among all eukaryotes. **PNAS**, E.U.A., v. 102, n. 41, p. 14689-93, 2005.

SUZAN-MONTI, M.; LA SCOLA, B.; RAOULT, D. Genomic and evolutionary aspects of Mimivirus. **Virus Research**. v. 117, p. 145–155, 2005.

SUZAN-MONTI, M.; LA SCOLA, B.; BARRASSI, L.; ESPINOSA, L.; RAOULT, D. Ultrastructural characterization of the giant volcano-like virus factory of *Acanthamoeba polyphaga* Mimivirus. **PLoS One**, E.U.A., v. 2, n. 3, p. 01-11, 2007.

THOMAS, V.; HERRERA-RIMANN, K.; BLANC, D.S.; GREUB, G. Biodiversity of amoebae and amoeba-resisting bacteria in a hospital water network. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 72, n. 4, p. 2428-2438, apr. 2006.

TRABELSI, H.; DENDANA, A.; SELLAMI, A.; SELLAMI, H.; CHEIKHROUHOU, F.; NEJI, S.; MAKNI, F.; AYADI, A. Pathogenic free-living amoebae: Epidemiology and clinical review. **Pathologie Biologie**. v. 60, n. 6, p. 399-405, 2012.

VANSPAUWEN, M.J.; FRANSEN, F.M.; RAOULT, D.; WOUTERS, E.F.; BRUGGEMAN, C.A.; LINSSEN, C.F. Infections with mimivirus in patients with chronic obstructive pulmonary disease. **Respiratory medicine**, Inglaterra, v. 106, n. 12, p. 1690-4, 2012.

VANSPAUWEN, M.J.; SCHNABEL, R.M.; BRUGGEMAN, C.A.; DRENT, M.; MOOK, W.N.K.A.; BERGMANS, D.C.J.J.; LINSSEN, C.F.M. Mimivirus Is Not a Frequent Cause of Ventilator-Associated Pneumonia in Critically Ill Patients. **Journal of Medical Virology**. v. 85 (10), p. 1836-1841, 2013.

VINCENT, A.; LA SCOLA, B.; PAPAZIAN, L. Advances in Mimivirus pathogenicity. **Intervirolgy**, Suíça, v. 53, n. 5, p. 304–09, 2010.

WILLIAMS, T.A.; EMBLEY, T.M.; HEINZ, E. Informational Gene Phylogenies Do Not Support a Fourth Domain of Life for Nucleocytoplasmic Large DNA Viruses. **Plos one**. v. 6, n. 6, 2011.



XIAO, C.; CHIPMAN, P.R.; BATTISTI, A.J.; BOWMAN, V.D.; RENESTO, P.; RAOULT, D.; ROSSMANN, M.G. Cryo-electron Microscopy of the Giant Mimivirus. **Journal of Molecular Biology**.v 353, p. 493-496, 2005.

XIAO, C.; KUZNETSOV, Y.G.; SUN, S.; HAFENSTEIN, S.L.; KOSTYUCHENKO, V.A.; CHIPMAN, P.R.; SUZAN-MONTI, M.; RAOULT, D.; MCPHERSON, A.; ROSSMANN, M.G. Structural studies of the giant Mimivirus. **PLoS Biology**, E.U.A., v. 7, n. 4, p. 958-66, 2009.

XIAO, C.; ROSSMANN, M. Structures of giant icosahedral eukaryotic dsDNA viruses. **Current opinion in virology**. v.1, n.2, p. 101-109, 2011.

YUTIN, N.; WOLF, Y.I.; RAOULT, D.; KOONIN, E.V. Eukaryotic large nucleocytoplasmic DNA viruses: clusters of orthologous genes and reconstruction of viral genome evolution. **Virology Journal**, Inglaterra, v. 6, n. 223, p. 01-13, 2009.

YUTIN, N.; WOLF, KOONIN, E.V. Evolution of DNA ligases of Nucleocytoplasmic Large DNA viruses of eukaryotes: a case of hidden complexity. **Biology Direct**. 4(1):51, 2009.

YUTIN, N.; WOLF, KOONIN, E.V. Origin of giant viruses from smaller DNA viruses not from a fourth domain of cellular life. **Virology**. v. 466, p. 38-52, 2014.

ZAUBERMAN, N.; MUTSAFI, Y.; HALEVY, D.B.; SHIMONI, E.; KLEIN, E.; XIAO, C.; SUN, S.; MINSKY, A. Distinct DNA exit and packaging portals in the virus *Acanthamoeba polyphaga* mimivirus. **PLoS Biol.**, v. 6, e114, 2008.

ZUMLA, A.; AL-TAWFIQ, J.A.; ENNE, V. I.; KIDD, M.; DROSTEN, J.B.; BREUER, J.; et. al. Rapid point of care diagnostic tests for viral and bacterial respiratory tract infections—needs, advances, and future prospects. **The Lancet Infectious Disease**. v.14, p. 1123-1135, 2014.

## 10. ANEXOS

### 10.1. Anexo I

Quantidades em gramas e volumes de cada reagente necessário para o preparo de 1000mL de meio PYG.

	Componentes	Quantidade
1	Sulfato de magnésio heptahidratado ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )	0,98 g
2	Cloreto de cálcio ( $CaCl_2$ )*	0,06 g
3	Glicose ( $C_6H_{12}O_6$ )	9,0 g
4	Sulfato de ferro amoniacal hexahidratado ( $Fe(NH_4)_2(SO_4) \cdot 6H_2O$ )	0,02 g
5	Fosfato dibásico de sódio heptahidratado ( $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ )**	0,40 g
6	Fosfato monobásico de potássio ( $KH_2PO_4$ )	0,34 g
7	Citrato de sódio dihidratado ( $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$ )	1,00 g
8	Protease peptona (Extrato bactopectona)	20,0 g
9	Extrato de levedura	2,0 g
10	Soro bovino fetal 7%	70 mL
11	Penicilina 200 U/mL	1 tubo
12	Gentamicina 50 mcg/mL	1 tubo
13	Anfotericina B 2,5 mcg/mL	1 tubo
14	Água destilada q.s.p	1000 mL

### 10.2. Anexo II

Protocolo de preparo das soluções utilizadas para a microscopia eletrônica de transmissão:

#### Solução Fixadora

- Glutaraldeído 25% ----- 6mL
- Tampão fosfato 0,2M ----- 30mL
- Água deionizada (q.s.p. 60 mL) ----- 24mL

Volume final da solução: 60mL

Solução A: Fosfato de sódio monobásico 0,2M

- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ----- 5,37g
- Água deionizada ----- 100mL

Solução B: Fosfato de sódio dibásico 0,2M

- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ----- 5,37g
- Água deionizada ----- 100mL

Solução A+B: tampão fosfato 0,2M, pH 7,4

- Solução A ----- 19mL
- Solução B ----- 81mL

Volume final da solução: 100mL

## 11. DISCIPLINAS E PRODUÇÃO CIENTÍFICA

### Disciplinas cursadas durante o mestrado

<b>Período</b>	<b>Turma</b>	<b>Disciplina</b>
2014/1	DIP MIC824 B	BACTERIOLOGIA DE ANAEROBIOS
2014/1	DIP MIC835 A	TOP. ESP. EM MICROBIOLOGIA
2014/1	DIP MIC836 B	TOP. ESP. EM MICROBIOLOGIA
2014/1	DIP MIC842 A	BIOLOGIA MOLECULAR DE MICROORGANISMOS
2014/1	DIP MIC848 B	BACTERIOLOGIA DE AEROBIOS
2014/1	DIP MIC855 A	BIOSSEGURANCA E BIOETICA
2014/2	DIP MIC835 D	TOP. ESP. EM MICROBIOLOGIA
2014/2	DIP MIC853 A	MICROORGANISMOS PATOGENICOS
2014/2	DIP MIC856 A	TREINAMENTO DIDATICO EM MICROBIOLOGIA I
2014/2	DIP MIC858 A	A IMUNIDADE INATA A INFEC. MICROBIANAS
2014/2	DIP MIC860 A	ANTIMICROBIANOS
2014/2	PJP MIC003 A	PROJETO DE PÓS-GRADUAÇÃO
2015/1	DIP MIC808 A	SEMINARIOS EM MICROBIOLOGIA
2015/1	ETF GER000	ELABORACAO DE TRABALHO FINAL

## Trabalhos apresentados em eventos científicos

Evaluation of the distribution of mimivirus in a hospital environment and correlation with the presence of Acanthamoeba. **SILVA, L. K. S.**, ANDRADE, K. R., RODRIGUES, R.A.L., BORATTO, P. V. M., ARANTES, T. S., SILVA, L. C. F., DORNAS, F. P., KROON, E. G., CLEMENTE, W. T., ABRAHAO, J. S. **XXV Brazilian Congress of Virology and IX Mercosur Meeting of Virology, Ribeirão Preto-SP, 2014.**

Mimivírus em ambiente hospitalar: avaliação da distribuição e correlação com a presença de amebas do gênero Acanthamoeba. **SILVA, L. K. S.**, ANDRADE, K. R., RODRIGUES, R.A.L., BORATTO, P. V. M., ARANTES, T. S., SILVA, L. C. F., KROON, E. G., CLEMENTE, W. T., ABRAHAO, J. S. **I Simpósio de Microbiologia da UFMG: a microbiologia e a sociedade, Belo Horizonte-MG, 2014.**

Comparison of different methods for isolation of giant virus. ARANTES, T. S., ANDRADE, K. R., SILVA, L. C. F., DORNAS, F. P., **SILVA, L. K. S.**, RODRIGUES, R.A.L., KROON, E. G., ABRAHAO, J. S. **XXV Brazilian Congress of Virology and IX Mercosur Meeting of Virology, Ribeirão Preto-SP, 2014.**

Comparação entre diferentes métodos de isolamento de vírus gigantes. ARANTES, T. S., ANDRADE, K. R., SILVA, L. C. F., DORNAS, F. P., RODRIGUES, R.A.L., **SILVA, L. K. S.**, KROON, E. G., ABRAHAO, J. S. **I Simpósio de Microbiologia da UFMG: a microbiologia e a sociedade, Belo Horizonte-MG, 2014.**

Fibrils of the giant Acanthamoeba Polyphaga Mimivirus - Initial studies of probable functions of this peculiar structure. RODRIGUES, R.A.L., **SILVA, L. K. S.**, DORNAS, F. P., BORATTO, P. V. M., ARANTES, T. S., LA SCOLA, B., KROON, E. G., ABRAHAO, J. S. **XXV Brazilian Congress of Virology and IX Mercosur Meeting of Virology, Ribeirão Preto-SP, 2014.**

Fibrilas do gigante Acanthamoeba Polyphaga Mimivirus - estudos iniciais de suas prováveis funções. RODRIGUES, R.A.L., **SILVA, L. K. S.**, DORNAS, F. P., ARANTES, T. S., BORATTO, P. V. M., LA SCOLA, B., KROON, E. G., ABRAHAO, J. S. **I Simpósio de Microbiologia da UFMG: a microbiologia e a sociedade, Belo Horizonte-MG, 2014.**

## Artigo publicado relacionado ao trabalho de mestrado

Journal of Clinical Virology 66 (2015) 62–65



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Clinical Virology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jcv](http://www.elsevier.com/locate/jcv)



Short communication

### High positivity of mimivirus in inanimate surfaces of a hospital respiratory-isolation facility, Brazil



Ludmila Karen dos Santos Silva<sup>a</sup>, Thalita Souza Arantes<sup>a</sup>, Kétyllen Reis Andrade<sup>a</sup>, Rodrigo Araújo Lima Rodrigues<sup>a</sup>, Paulo Victor Miranda Boratto<sup>a</sup>, Gabriel Magno de Freitas Almeida<sup>a</sup>, Erna Geessien Kroon<sup>a</sup>, Bernard La Scola<sup>b</sup>, Wanessa Trindade Clemente<sup>c</sup>, Jônatas Santos Abrahão<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Laboratório de Vírus, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

<sup>b</sup> Aix-Marseille Université, Marseille, France

<sup>c</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Hospital das Clínicas, Comissão de Controle de Infecção Hospitalar, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

#### ARTICLE INFO

##### Article history:

Received 28 November 2014  
Received in revised form 5 March 2015  
Accepted 9 March 2015

##### Keywords:

Mimivirus  
Hospital environment  
Pneumonia

#### ABSTRACT

**Background:** Mimiviruses have been considered putative emerging pneumonia agents. Pneumonia is a leading cause of death related to infection throughout the world, with approximately 40% of cases presenting unknown etiology. Therefore, identifying new causative agents of community and nosocomial pneumonia is of major public health concern.

**Objective:** We evaluated the distribution of these viruses in samples collected from different environments of one of the largest hospitals in Brazilian Southeast.

**Study design:** We analyzed, by molecular and virological approaches, the distribution of mimivirus in 242 samples collected from inanimate surfaces in different hospital facilities.

**Results:** A significant positivity of mimivirus in respiratory-isolation-facilities was observed ( $p < 0.001$ ).

**Conclusion:** Although the role of mimivirus as etiological agents of pneumonia is still under investigation, our results demonstrates interesting correlations that strengthens the need for control over the occurrence of these viruses in hospital facilities.

© 2015 Published by Elsevier B.V.

#### 1. Background

In 1992, during a pneumonia outbreak in a hospital in Bradford (England), a microorganism resembling a Gram positive bacterium was isolated from water cooling towers. After several failed attempts to characterize this new microorganism, in depth analysis revealed that it was in fact a virus that infects amoebae of the genus *Acanthamoeba*, and was called *Acanthamoeba polyphaga mimivirus* (APMV) [1]. APMV belongs to the *Mimiviridae* family, included into the nucleocytoplasmic large DNA viruses (NCLDVs) group, and is characterized by a double-stranded DNA genome, with approximately 1.2 Kb, and mature particles of 750 nm in diameter [2].

Pneumonia is a leading cause of death related to infection throughout the world, with approximately 40% of cases presenting

unknown etiology. Therefore, identifying new causative agents of community and nosocomial pneumonia is of major public health concern [3]. Some studies have pointed out mimivirus as potential respiratory tract pathogens and putative agents of pneumonia in humans. Besides the description of a murine model for pneumonia studies, it has already been shown that mimiviruses are able to infect human phagocytes, and antibodies against mimivirus in patients with nosocomial and community-acquired pneumonia have also been described in the literature [3–6]. In addition, mimiviruses have been isolated from bronchial aspirates and stool of patients with pneumonia, with no association with *Acanthamoeba* [7,8]. Despite all these evidences, there are authors that suggest that APMV is not a frequent pneumonia causative agent [9–11].

#### 2. Objectives

Since, most of the current available data regarding mimiviruses and pneumonia were obtained from patients' clinical samples we decided to explore a different subject: hospital inanimate surfaces

\* Corresponding author at: Laboratório de Vírus, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos 6627, Caixa Postal 486, 31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. Tel.: +55 31 3409 2539; fax: +55 31 3409 2536.  
E-mail address: [jonatas.abrahao@gmail.com](mailto:jonatas.abrahao@gmail.com) (J. Santos Abrahão).

**Table 1**  
Collection areas of dust samples in HC/UFMG and test results for detection of DNA from mimivirus.

Collection areas in HC/UFMG	Total no. samples	Real-time PCR, helicase gene		Viral Isolation
		No. (%) positive samples	No. (%) negative samples	No. (%) positive samples
Reception	13	2 (15.4)	11 (84.6)	1 (7.7)
Stairs	30	3 (10.0)	27 (90.0)	3 (10)
Elevators	24	1 (4.2)	23 (95.8)	1 (4.2)
Hallways	12	1 (8.3)	11 (91.7)	1 (8.3)
Children's ward	19	2 (10.5)	17 (89.5)	2 (10.5)
Surgical block	28	0 (0)	28 (100)	a
Transplant area	30	0 (0)	30 (100)	a
Intensive care unit	31	1 (3.2)	30 (96.8)	0 (0)
Respiratory isolation facilities	55	20 (36.4)	35 (63.6)	16 (29.0)
Total	242	30 (12.4)	212 (87.6)	24 (9.9)

<sup>a</sup> No positive sample for helicase gene was found in these areas.

as possible sources for mimivirus infection [3–6]. The rationale of this strategy is based in studies that have shown the presence of *Acanthamoeba sp.* and *Naegleria* in hospital facilities, however, no association was done among these amoebas and viruses [12,13]. Here, we evaluated the distribution of these viruses in samples collected from different environments of Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Minas Gerais (HC/UFMG), in Belo Horizonte, Minas Gerais.

### 3. Study design

Sample collection was performed in HC/UFMG, one of the largest hospitals in Brazilian Southeast and reference in the treatment of diseases of high complexity. All procedures were done according to the Ethics Committee of UFMG and HC rules. By using sterile swabs, 242 dust samples were collected from inanimate surfaces (floor, beds, drains, etc) in 2012, at different HC/UFMG environments such as reception, stairs, elevators, hallways, children's ward, surgical block, transplant area, intensive care unit and respiratory isolation facilities (Table 1 and Supplementary Fig. A). Following collection, swabs were transferred to microtubes containing 1 ml of sterile and DNA-free phosphate buffered saline (PBS), vortexed and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ . All samples were subjected to molecular analysis for detection of mimiviruses DNA, while all PCR-positive samples and several negative samples were used for viral isolation.

Total DNA extraction from each sample was performed by using phenol–chloroform–isoamyl alcohol, and DNA quality and concentration were checked by using a nanodrop spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). After this procedure, the DNA was used as template for real-time PCR assays, using SYBr Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), targeting the mimiviruses conserved helicase gene (primers 5'-ACCTGATCCACATCCATAACTAA-3' and 5'-GCCTCATCAACAAATGGTTTCT-3'). DNA for positive controls was obtained from APMV (kindly provided by Didier Raoult, Marseille, France). Samples were manipulated in a laminar flow cabinet, separated from any viral samples, to avoid cross-contamination.

Twenty helicase positive samples were sequenced, in both orientations and in duplicates, using an automated capillary sequencer (MegaBACE sequencer, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). The resulting sequences were aligned with previously published sequences from GenBank by using the ClustalW ([www.clustal.org](http://www.clustal.org)) and MEGA software version 6.0 ([www.megasoftware.net](http://www.megasoftware.net)). A phylogenetic tree was constructed using the neighbor-joining method.

Concomitant to the phylogenetic analysis, all samples that were positive for the helicase gene and 25 negative samples were submitted to isolation tests using a high-throughput adapted method [10]. For this assay, Petri dishes with 8 cm in diameter containing a solution of 1.5% bacteriological agar (Kasvi, Italy) diluted in Page's

amoeba saline solution (PAS) supplemented with antibiotics were used. To each plate,  $15 \times 10^6$  *Acanthamoeba castellanii* amoebae were added. After amoebal sedimentation, the plates were divided into 14 fields, 1.5 cm distant from one another, and 10  $\mu\text{l}$  of samples were added to each field. As negative control, 10  $\mu\text{l}$  of PBS was used. After 4 days at  $32^{\circ}\text{C}$ , each field was observed for identification of cytopathic effect and the cells were photographed under an inverted optical microscope (Motic, British Columbia, Canada).

### 4. Results

Of the 242 analyzed samples, 30 (12.4%) were positive for helicase gene in qPCR (Supplementary Fig. C). Respiratory isolation facilities showed a higher positivity 20/55 (36.4%) when compared to other environments: reception 2/13 (15.4%), stairs 3/30 (10.0%), elevators 1/24 (4.2%), hallways 1/12 (8.3%), children's ward 2/19 (10.5%) and intensive care unit 1/31 (3.2%). We could not detect any positive samples in both surgical block and transplant area (Table 1). Fisher's exact test indicates statistical significance regarding prevalence of mimivirus in respiratory isolation ( $p < 0.005$ ) if compared to the others facilities.

The phylogenetic tree constructed revealed a close relationship among the new-found isolates to the *Mimiviridae* family, more specifically to the group A mimiviral strains of the genus *Mimivirus* (Fig. 1A). This close relationship with the group A mimiviral strains was also observed in other studies regarding the diversity of Brazilian mimivirus, supporting the phylogenetic relationship observed in this analysis [14–16]. Furthermore, optimal alignment of the highly conserved helicase showed that the amplified DNA presented about one or two nucleotide substitutions when compared with other mimivirus available sequences (Fig. 1B).

Regarding the isolation tests, a total of 24 (9.9%) among the 29 positive helicase gene samples presented a cytopathic effect characterized by a halo of lysis, and amoebic lysis was also observed in optical microscopy, suggesting the presence of mimiviruses (Supplementary Fig. B). As expected, none cytopathic effect was observed in any of the analyzed negative helicase gene samples.

### 5. Discussion

Our data demonstrates a differential distribution of mimiviruses in HC/UFMG, revealing a greater number of positive samples in respiratory isolation facilities compared to other hospital environments. This finding was observed by qPCR/direct sequencing and confirmed by viral isolation. Moreover, it is noteworthy that the inanimate surfaces of all facilities showed the same contact with water and the same periodicity of cleaning with disinfectants and antiseptics. Taking into consideration that the respiratory isolation facilities are environments used by patients with severe respiratory diseases, and also that mimiviruses have been considered potential



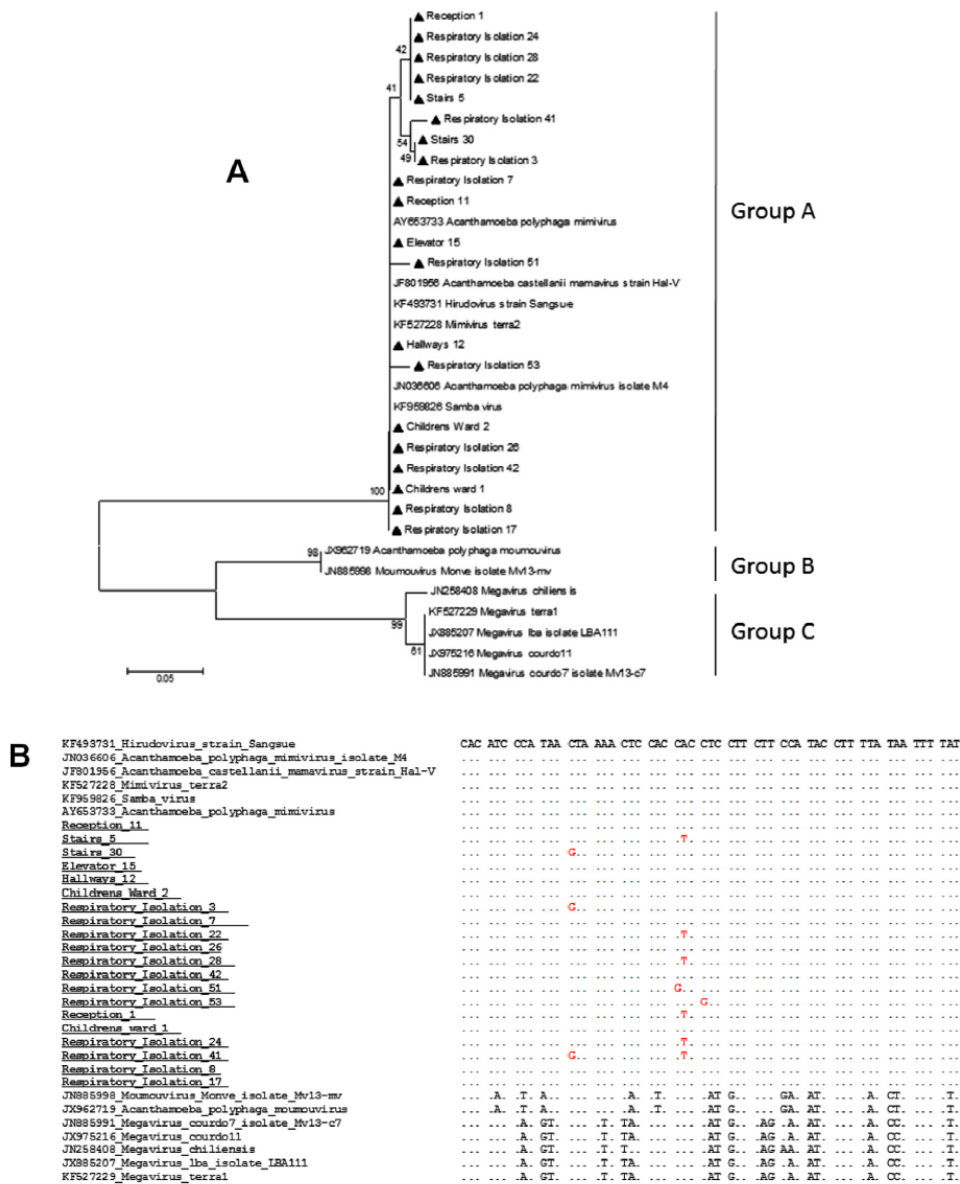


Fig. 1. (A) A neighbor-joining phylogenetic tree constructed using the sequenced DNA fragments obtained in qPCR assay targeting helicase gene. Tree was constructed by using MEGA version 6.0 ([www.megasoftware.net](http://www.megasoftware.net)) on the basis of the nucleotide sequences with 1000 bootstrap replicates. Bootstrap values >40% are shown. Nucleotide sequences were obtained from GenBank. Scale bar indicates rate of evolution. (B) Nucleotide sequence of a fragment of the mimiviruses helicase gene. Samples obtained in this study are underlined. In red, some polymorphic sites.

respiratory tract pathogens and possible community and nosocomial pneumonia etiological agents, the greater number of positive samples, and viable viruses, in this environment may indicate a risk factor for the occurrence of this disease and a health hazard for hospitalized patients [3–6]. Furthermore, our group has demonstrated a long-lasting stability of mimiviruses in a number of materials, including hospital ventilator devices [17]. Indeed, an important percentage of pneumonia cases in HC-UFGM is of unknown etiology, which could be related to mimiviruses infections.

Although the role of mimivirus as etiological agents of pneumonia is still controversial, our results demonstrate interesting

correlations that strengthens the need for control over the occurrence of these viruses in the hospital.

**Competing interests**

All authors have declared no conflicts of interest with other people or organizations.

**Funding**

This study was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação



de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), the Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), and the Pro-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais.

### Ethical approval

Ethical Approval was declared in the manuscript: number – CAAE-00749912.3.0000.5149.

### Acknowledgement

We thank colleagues from the Laboratório de Vírus for their excellent technical support.

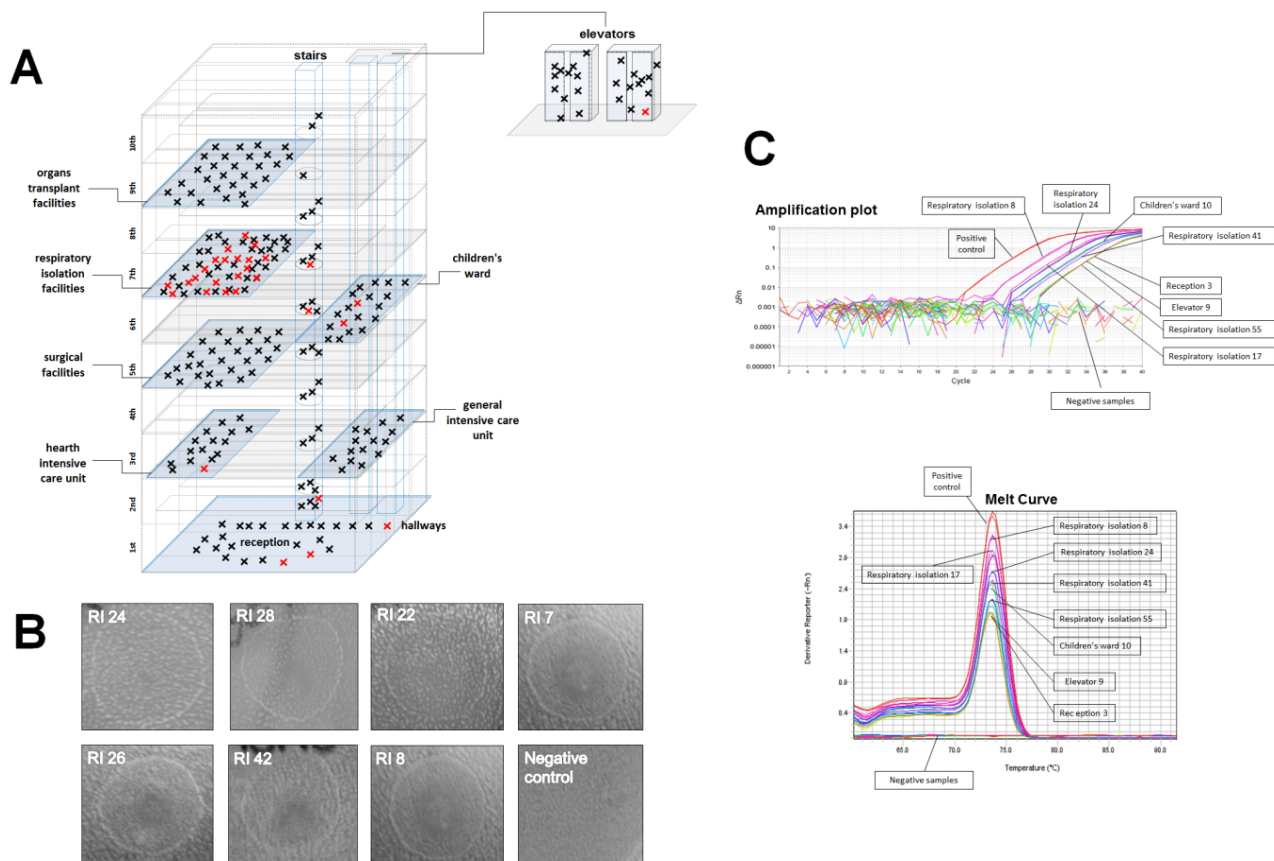
### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2015.03.008>.

### References

- [1] B. LaScola, S. Audic, C. Robert, L. Jungang, X. DeLamballerie, M. Drancourt, et al., A giant virus in amoebae, *Science* 299 (2003) 2033.
- [2] J.M. Claverie, H. Ogata, S. Audic, C. Abergel, K. Suhre, P.E. Fournier, Mimivirus and the emerging concept of giant virus, *Virus Res.* 1 (2006) 133–144.
- [3] B. La Scola, T.J. Marrie, J.P. Auffray, D. Raoult, Mimivirus in pneumonia patients, *Emerg. Infect. Dis.* 11 (2005) 449–452.
- [4] D. Raoult, B. La Scola, R. Birtles, The discovery and characterization of Mimivirus, the largest known virus and putative pneumonia agent, *Clin. Infect. Dis.* 45 (2007) 95–102.
- [5] E. Ghigo, J. Kartenbeck, P. Lien, L. Pelkmans, C. Capo, J.L. Mege, et al., Ameobal pathogen mimivirus infects macrophages through phagocytosis, *PLoS Pathog.* 4 (2008) e1000087.
- [6] M.J. Vanspauwen, F.M. Franssen, D. Raoult, E.F. Wouters, N.C.A. Bruggeman, C.F. Linssen, Infections with mimivirus in patients with chronic obstructive pulmonary disease, *Respir. Med.* 106 (2012) 1690.
- [7] H. Saadi, D.G. Reteno, P. Colson, S. Aherfi, P. Minodier, I. Pagnier, et al., Shan virus: a new mimivirus isolated from the stool of a Tunisian patient with pneumonia, *Intervirology* 56 (2013) 424–429.
- [8] H. Saadi, I. Pagnier, P. Colson, J.K. Cherif, M. Beji, M. Boughalmi, et al., First isolation of Mimivirus in a patient with pneumonia, *Clin. Infect. Dis.* 57 (2013) 127–134.
- [9] R.K. Dare, M. Chittaganpitch, D.D. Erdman, Screening pneumonia patients for mimivirus, *Emerg. Infect. Dis.* 14 (2008) 465–467.
- [10] C. Costa, M. Bergallo, S. Astegiano, M.E. Terlizzi, F. Sidoti, P. Solidoro, et al., Detection of mimivirus in bronchoalveolar lavage of ventilated and nonventilated patients, *Intervirology* 55 (2012) 303–305.
- [11] M.J. Vanspauwen, R.M. Schnabel, C.A. Bruggeman, M. Drent, W.N.K.A. Mook, D.C.J.J. Bergmans, et al., Mimivirus is not a frequent cause of ventilator-associated pneumonia in critically ill patients, *J. Med. Virol.* 85 (2013) 1836–1841.
- [12] A.M. Carlesso, A.B. Simonetti, G.L. Artuso, M.B. Rott, Isolamento e identificação de amebas de vida livre potencialmente patogênicas em amostras de ambientes de hospital público da cidade de Porto Alegre, RS, *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 40 (2007) 316–320.
- [13] M.A. Silva, J.A. Rosa, Isolamento de amebas de vida livre potencialmente patogênicas em poeira de hospitais, *Rev. Saúde Pública.* 37 (2003) 242–246.
- [14] R.K. Campos, P.V. Boratto, F.L. Assis, E.R.G.R. Aguiar, L.C.F. Silva, J.D. Albarnaz, et al., Samba virus: a novel mimivirus from a giant rain forest, the Brazilian Amazon, *Virol. J.* 11 (2014) 95.
- [15] F.P. Dornas, F.P. Rodrigues, P.V.M. Boratto, L.C.F. Silva, P.C.P. Ferreira, C.A. Bonjardim, et al., Mimivirus circulation among wild and domestic mammals, Amazon Region, Brazil, *Emerg. Infect. Dis.* 20 (2014) 469–472.
- [16] K.R. Andrade, P.V.M. Boratto, F.P. Rodrigues, L.C. Silva, F.P. Dornas, M.R. Pilotto, et al., Oysters as hot spots for mimivirus isolation, *Arch. Virol.* 160 (February (2)) (2015) 477–482.
- [17] F.P. Dornas, L.C. Silva, G.M. de Almeida, R.K. Campos, P.V. Boratto, A.P. Franco-Luiz, B. La Scola, P.C. Ferreira, E.G. Kroon, J.S. Abrahão, Acanthamoeba polyphaga mimivirus stability in environmental and clinical substrates: implications for virus detection and isolation, *PLoS One* 9 (February (2)) (2014) e87811.

### Appendix A. Supplementary data



**Sup. figure:** (A) Schematic representation of the HC showing the locations and the number of samples analyzed in this work. Samples that were positive for helicase gene by real time PCR are highlighted in red. (B) Viral isolation tests using a high-throughput adapted method.<sup>10</sup> To each plate,  $15 \times 10^6$  *Acanthamoeba castellanii* amoebae were added. After amoebal sedimentation, the plates were divided into 14 fields, 1,5 cm distant from one another, and 10  $\mu$ l of samples were added to each field. As negative control, 10  $\mu$ l of PBS was used. After 4 days at 32 °C, each field was observed for identification of cytopathic effect and the cells were photographed under an inverted optical microscope. Halo formation induced by some representative samples collected from respiratory-isolation facilities. (C) Amplification plot and melt curve showing some positive and negative samples for helicase gene by real-time assay.

## Artigo aceito não relacionado ao trabalho de mestrado



## Mimivirus Fibrils Are Important for Viral Attachment to the Microbial World by a Diverse Glycoside Interaction Repertoire

Rodrigo Araújo Lima Rodrigues,<sup>a</sup> Ludmila Karen dos Santos Silva,<sup>a</sup> Fábio Pio Dornas,<sup>a</sup> Danilo Bretas de Oliveira,<sup>a</sup> Thais Furtado Ferrelra Magalhães,<sup>b</sup> Daniel Assis Santos,<sup>b</sup> Adriana Oliveira Costa,<sup>d</sup> Lutz de Macêdo Farias,<sup>c</sup> Paula Prazeres Magalhães,<sup>c</sup> Cláudio Antônio Bonjardim,<sup>a</sup> Erna Geessien Kroon,<sup>a</sup> Bernard La Scola,<sup>f</sup> Juliana Reis Cortines,<sup>a</sup> Jônatas Santos Abrahão<sup>a</sup>

Laboratório de Vírus, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil (UFMG), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil<sup>a</sup>; Laboratório de Micologia, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil (UFMG), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil<sup>b</sup>; Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil (UFMG), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil<sup>c</sup>; Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil (UFMG), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil<sup>d</sup>; Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Departamento de Virologia-Centro de Ciências da Saúde, Cidade Universitária, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, RJ, Brazil<sup>e</sup>; URMITE CNRS UMR 6236-IRD 3R198, Aix Marseille Université, Marseille, France<sup>f</sup>

### ABSTRACT

*Acanthamoeba polyphaga mimivirus* (APMV) is a giant virus from the *Mimiviridae* family. It has many unusual features, such as a pseudoicosahedral capsid that presents a starfish shape in one of its vertices, through which the ~1.2-Mb double-stranded DNA is released. It also has a dense glycoprotein fibril layer covering the capsid that has not yet been functionally characterized. Here, we verified that although these structures are not essential for viral replication, they are truly necessary for viral adhesion to amoebae, its natural host. In the absence of fibrils, APMV had a significantly lower level of attachment to the *Acanthamoeba castellanii* surface. This adhesion is mediated by glycans, specifically, mannose and *N*-acetylglucosamine (a monomer of chitin and peptidoglycan), both of which are largely distributed in nature as structural components of several organisms. Indeed, APMV was able to attach to different organisms, such as Gram-positive bacteria, fungi, and arthropods, but not to Gram-negative bacteria. This prompted us to predict that (i) arthropods, mainly insects, might act as mimivirus dispersers and (ii) by attaching to other microorganisms, APMV could be ingested by amoebae, leading to the successful production of viral progeny. To date, this mechanism has never been described in the virosphere.

### IMPORTANCE

APMV is a giant virus that is both genetically and structurally complex. Its size is similar to that of small bacteria, and it replicates inside amoebae. The viral capsid is covered by a dense glycoprotein fibril layer, but its function has remained unknown, until now. We found that the fibrils are not essential for mimivirus replication but that they are truly necessary for viral adhesion to the cell surface. This interaction is mediated by glycans, mainly *N*-acetylglucosamine. We also verified that APMV is able to attach to bacteria, fungi, and arthropods. This indicates that insects might act as mimivirus dispersers and that adhesion to other microorganisms could facilitate viral ingestion by amoebae, a mechanism never before described in the virosphere.

Just over a decade ago, some dogmas of virology were put to the test with the discovery of the giant *Acanthamoeba polyphaga mimivirus* (APMV) (1). This was the first member of the family *Mimiviridae*, which comprises one of the most complex viral groups (2). Further studies confirmed its genetic and structural complexity, revealing genes related to the translational apparatus of cell machinery, glycosylation pathways, and a pseudoicosahedral capsid of approximately 750 nm surrounded by a dense layer of fibrils, characteristics never observed before in virology (3–5). Those fibrils have a proteic composition and are covered by a peptidoglycan matrix. Until now, they had no established functions. They surround almost the entire viral particle area, except for the stargate region, the structure responsible for releasing the viral genome inside the host cell (6).

These viruses are hosted by free-living amoebae of the genus *Acanthamoeba* (1). These unicellular organisms go through two distinct life stages: a resistant form (the cyst) and a metabolically active form (the trophozoite), which feeds through phagocytosis (7). By this process, amoebae can incorporate many microorganisms, such as bacteria, fungi, protozoa, and viruses, including giant viruses such as pandoravirus, pithovirus, marseillevirus, and mimivirus (8). It is known that for phagocytosis to occur, the

microbial structure and cellular adhesion factors, which are often surface glycans, must interact (9). On the surface of *Acanthamoeba*, glucose, mannose, *N*-acetylgalactosamine (GalNAc), and *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) have already been identified to be cellular adhesion factors (10). These carbohydrates serve as the building blocks for several natural polymers, such as peptidoglycan and chitin, both of which are largely distributed in the microbial world as the structural components of bacteria, fungi, and arthropods, among other organisms. Although there are some

Received 5 August 2015 Accepted 3 September 2015

Accepted manuscript posted online 16 September 2015

Citation Rodrigues RAL, dos Santos Silva LK, Dornas FP, de Oliveira DB, Magalhães TFF, Santos DA, Costa AO, de Macêdo Farias L, Magalhães PP, Bonjardim CA, Kroon EG, La Scola B, Cortines JR, Abrahão JS. 2015. Mimivirus fibrils are important for viral attachment to the microbial world by a diverse glycoside interaction repertoire. *J Virol* 89:11812–11819. doi:10.1128/JVI.01976-15.

Editor: G. McFadden

Address correspondence to Jônatas Santos Abrahão, jonatas.abrahao@gmail.com. Copyright © 2015, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.



studies about the mode of infection of mimiviruses in both amoebae and other phagocytes (11), there is no information about the initial steps of adhesion of these viruses to their hosts. Thus, this constitutes an important gap in the current knowledge about giant viruses.

Taking this into account and considering the lack of information about the functions of the fibrils that cover the mimiviruses, this work aimed to evaluate their role in viral adhesion to the surface of distinct organisms and to identify possible adhesion factors for APMV. Our results demonstrate that fibrils have an important role in viral adhesion to the surface of natural hosts using cell surface carbohydrates, mainly GlcNAc. We also noted that APMV intensively adheres to other organisms whose structures contain this glycan. This work therefore represents the first description of a function for the mimivirus fibrils, contributing to our biological understanding of these unique viruses.

## MATERIALS AND METHODS

**Cell culture.** *Acanthamoeba castellanii* cells (ATCC 30010) were grown in 75-cm<sup>2</sup> cell culture flasks (Nunc, USA) in peptone-yeast extract-glucose (PYG) medium supplemented with 7% fetal calf serum (Cultilab, Brazil), 2.5 µg/ml amphotericin B (Fungzone; Cristalia, Brazil), and 500 U/ml penicillin and 50 µg/ml gentamicin (Schering-Plough, Brazil). In the assays with *Aspergillus fumigatus*, amphotericin B was replaced by 20 µg/ml voriconazole (Pfizer, Brazil).

**Viruses.** APMV and mimivirus M4 were grown and purified as previously described (12). The APMV peptidoglycan matrix and fibrils were removed by enzymatic treatment as previously described (13). APMV particles were submitted to enzymatic treatment for the removal of the peptidoglycan matrix or protein fibrils to investigate their role in viral viability and adherence to *Acanthamoeba castellanii* (ATCC 30010) cells. To remove only the peptidoglycan matrix, viral particles were incubated with 4 volumes of 10 mg/ml lysozyme (Sigma, USA) for 24 h at room temperature (these particles are referred to as lysozyme-treated APMV [LAPMV]). Samples were washed twice and stored in phosphate-buffered saline (PBS; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.5%; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.2%; NaCl, 9%; pH 7.2) at -70°C. To remove the fibril, APMV was submitted to sequential enzymatic treatment. First, the particles were incubated with 4 volumes of 10 mg/ml lysozyme for 24 h at room temperature. The samples were then washed twice with saline buffer and incubated with 5 volumes of 14 mg/ml bromelain from pineapple stems (Sigma, USA) for 24 h at room temperature. Then, the samples were washed twice and incubated with 4 volumes of 10 mg/ml proteinase K (Gibco, USA) for 2 h at room temperature (these samples are referred as defibrated APMV [DAPMV]). The samples were then washed twice and stored in PBS at -70°C. All of the viruses were titrated by the endpoint method (14). Briefly, the viruses were serially diluted, and multiple replicate samples of each dilution were inoculated into *A. castellanii* monolayers. After 96 h of incubation, the amoebae were analyzed to determine whether infection had taken place, and the virus titers were ascertained by determining the precise dilution required for infection of 50% of the wells containing amoeba cells.

**Viral particle saturation with carbohydrates.** APMV, LAPMV, DAPMV, and mimivirus M4 particles were incubated for 1 h in solutions of glucose, mannose, GalNAc, GlcNAc, chitin, and peptidoglycan at concentrations of 10, 25, 50, 75, 100, and 125 µg/ml and room temperature. Then, the samples were centrifuged, and the pellet was resuspended in PBS.

**Electronic microscopy.** For transmission electron microscopy (TEM) analyses, the samples were prepared as described previously (15). Briefly, *Acanthamoeba castellanii* cells infected with viruses treated with enzymes at a multiplicity of infection (MOI) of 10 for 1 h were fixed with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer. The amoebae were postfixed with 2% osmium tetroxide and embedded in Epon resin, and ultrathin sections were examined by transmission electron microscopy. Scanning

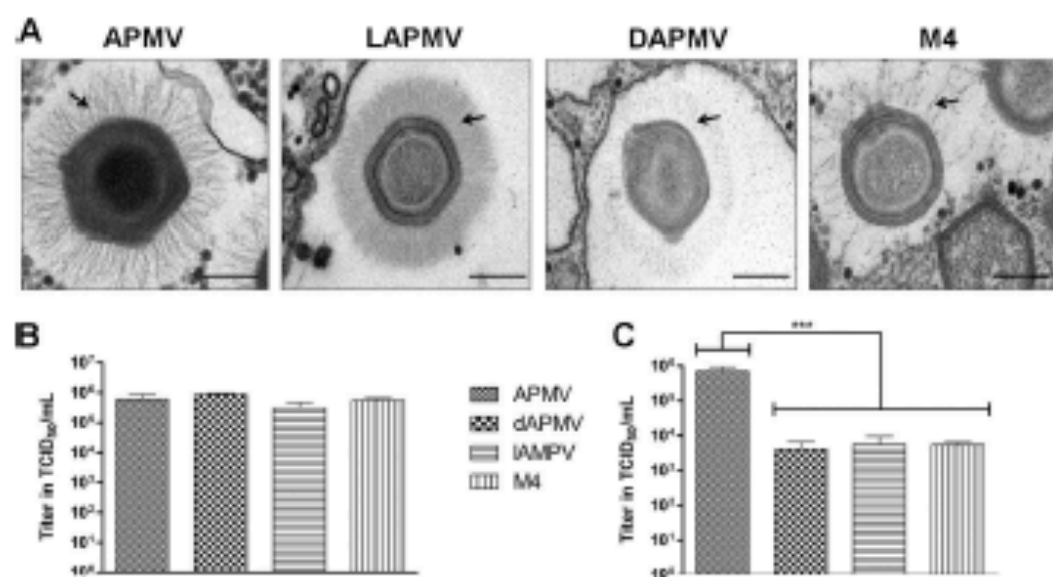
electron microscopy (SEM) was used for the analyses of viral attachment to different organisms. Samples were prepared by adding the material (viruses alone or viruses associated with other organisms) to round glass coverslips covered by poly-L-lysine and fixed with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer for at least 1 h at room temperature. The samples were then washed three times with 0.1 M cacodylate buffer and postfixed with 1.0% osmium tetroxide for 1 h at room temperature. After a second fixation, the samples were washed three times with 0.1 M cacodylate buffer and immersed in 0.1% tannic acid for 20 min. The samples were then washed in cacodylate buffer and dehydrated by serial passages in ethanol solutions with concentrations ranging from 35% up to 100%. They were dried at the critical CO<sub>2</sub> point, put into stubs, and metalized with a 5-nm gold layer. The analyses were completed by scanning electronic microscopy (FEG Quanta 200 FEI) at the Center of Microscopy of the Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil (UFMG).

**Viral attachment to amoebae.** To evaluate the role of fibrils in the viral adhesion to amoeba cells, APMV, LAPMV, DAPMV, and mimivirus M4 were incubated with an *A. castellanii* cell monolayer for 1 h at room temperature. Then, the samples were collected and centrifuged at 1,000 × g for 5 min to separate the attached particles from the free ones. The pellet was resuspended in PBS, frozen and thawed three times to lyse the amoeba cells, and further titrated using the endpoint method. The experiment was performed twice in duplicate. The viruses were also incubated with 80,000 trophozoites of *A. castellanii* in 100 µl of PYG medium at an MOI of 50 for 10 min at room temperature. Next, 10 µl of the suspension was used to prepare samples for SEM analyses as described above. Thirty images of isolated cells were randomly obtained, and the viral particles attached to the cell surface were manually counted. The results were plotted in a dispersion graph, and the statistical significance was determined by a one-way analysis of variance (ANOVA), using GraphPad Prism software. The difference was considered to be significant when the *P* value was less than 0.05.

To evaluate the role of glycans in APMV adhesion to *A. castellanii*, 10<sup>6</sup> 50% tissue culture infective doses (TCID<sub>50</sub>) of APMV, LAPMV, DAPMV, and mimivirus M4 were treated with various concentrations of different carbohydrates (glucose, mannose, *N*-acetylglucosamine, *N*-acetylgalactosamine, chitin, and peptidoglycan) and incubated with 50,000 trophozoites for 15 min at 25°C. The samples were then centrifuged at 1,000 × g for 5 min to separate the attached particles from the free ones. The pellet was resuspended in PBS, frozen and thawed three times to lyse the amoeba cells, and further titrated using the endpoint method. The experiment was performed twice in duplicate.

**Viral attachment to distinct organisms.** The attachment of APMV to *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Aspergillus fumigatus*, and an *Aedes* sp. was evaluated. *S. aureus* (ATCC 25923) and *E. coli* (ATCC PTA-4752) were grown in Luria-Bertani broth for 6 h at 37°C. Both bacteria were quantified using the McFarland scale, and the wavelength was set at 600 nm. *A. fumigatus* (ATCC 16913) was grown in a flask with dextrose agar solid medium for 96 h at 28°C. Hyphae and conidia were collected by the addition of Tween 80 (Sigma, USA) solution to the flask. Conidia were quantified under an optical microscopy using a Neubauer chamber. *Aedes* mosquitoes were grown in captivity and kindly donated by Alvaro Elias of UFMG. Mosquitoes were sacrificed by making them hypothermic, and their legs were mechanically removed. Bacterial and fungal cells (2.5 × 10<sup>6</sup> cells/ml) were incubated with 10<sup>6</sup> TCID<sub>50</sub> of APMV, LAPMV, DAPMV, and mimivirus M4 in 400 µl of PBS for 1 h under constant shaking at room temperature. The same amount of virus was incubated with 10 insect legs under the same conditions. The experiment was also completed with APMV alone as an experimental control. The samples were then centrifuged at 950 × g for 10 min. The microorganismal cells and insect legs were resuspended in 100 µl of PBS for further titration. The values were then converted to arbitrary absolute numbers, where the mean value of the viral titer for the control group (APMV only) was set equal to 1, and the other values were determined in relationship to this value via simple direct proportions. The experiment was completed twice in duplicate.





**FIG 1** Electron microscopy images of *Acanthamoeba polyphaga* mimivirus and viral titers in the host *Acanthamoeba castellanii*. (A) Transmission electron microscopy images showing structural differences among the APMVs: APMVs treated with lysozyme (LAPMV); APMVs treated with lysozyme, bromelain, and proteinase K (DAPMV), and mimivirus M4. Arrows, fibrils in APMV and LAPMV and also the reduction of them in DAPMV and mimivirus M4. Bars, 200 nm. (B) The titer of each virus after the viruses were incubated with cells of *A. castellanii* for 96 h. There was no difference in viral replication between the groups, resulting in similar titers. (C) The titer of each virus after each sample was incubated with cells of *A. castellanii* for 1 h and then centrifuged to recover only cells and their attached viruses. The pellet was titrated using *A. castellanii* cells. There was a 100-fold decrease in the titers of the treated viruses and mimivirus M4 compared with the titers of the APMVs. Error bars indicate SDs. \*\*\*,  $P < 0.001$  (one-way ANOVA).

Samples of viruses with distinct organisms were prepared for SEM analyses as described above. To evaluate the role of glycans in viral adhesion to distinct organisms,  $10^6$  TCID<sub>50</sub> of viruses (APMV, LAPMV, DAPMV, and mimivirus M4) treated with various concentrations of different carbohydrates (glucose, mannose, *N*-acetylglucosamine, *N*-acetylgalactosamine, chitin, and peptidoglycan) were incubated with the same amount of microorganism cells and mosquito legs using the same conditions described above. The results were plotted in a column graph, and the statistical significance was given by a two-tailed Student's *t* test, performed using GraphPad Prism software. The difference was considered significant when the *P* value was less than 0.05.

**Statistical analyses.** Statistical analyses were performed using GraphPad Prism software. The significance analyses were performed using one-way ANOVA and a two-tailed Student's *t* test (with the 95% confidence interval). Differences were considered significant when the *P* values were less than 0.05.

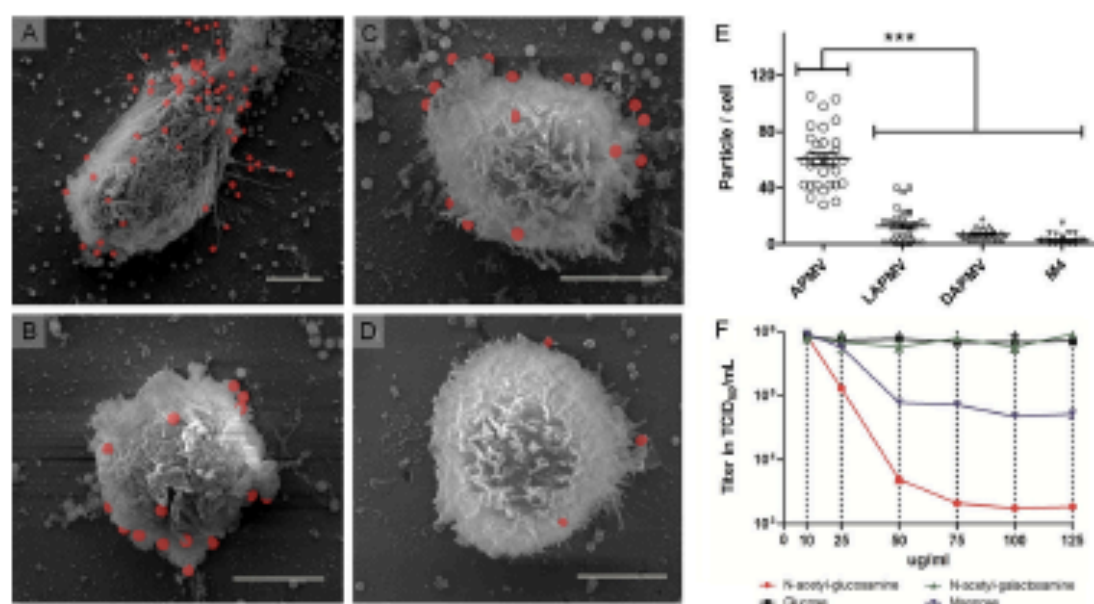
## RESULTS

**A lack of fibrils does not alter APMV replication but decreases attachment to *A. castellanii*.** The dense fibril layer that surrounds the mimivirus particle has not yet been functionally characterized, although much is known about its structure and genomic contents (16). The fibrils are embedded in a peptidoglycan matrix (5) that surrounds the capsid. Despite its proteic nature, the fibrils are resistant to proteases, except when viral particles are pretreated with lysozyme (5). By treating APMV with lysozyme, one can still visualize the fibrils by transmission electron microscopy (TEM), as the lysozyme acts only in the removal of the peptidoglycan matrix (Fig. 1). However, after lysozyme action, the fibrils become sensitive to proteases. By treating viruses with bromelain and proteinase K, it is difficult to visualize the dense protein layer surrounding the capsid by TEM (Fig. 1). The images obtained were compared with the TEM images of mimivirus M4 (Fig. 1). This virus was obtained after 150 passages in an axenic culture of *A.*

*castellanii*, resulting in the deletion of 16% of the genome and a drastic reduction in the number of surface fibrils (17). Electron microscopy images confirmed this observation, which was also observed for APMV that was sequentially treated with lysozyme and proteases. After enzymatic treatment, we verified the viability of the virus in an *A. castellanii* culture. When incubated with amoeba cells for 96 h, all viruses grew normally and had viral titers similar to that of untreated virus (Fig. 1), and we also noticed viral uptake by phagocytosis even when the fibrils were reduced (data not shown). However, when viruses of each group were kept in contact with an *Acanthamoeba* cell monolayer for 1 h and centrifuged and only the pellet (particles attached to the cell surface) was titrated, the titers of the treated viruses and mimivirus M4 were found to be 100-fold lower than the titer of untreated virus ( $P < 0.0001$ ) (Fig. 1). These results demonstrate that fibrils do not alter viral replication and are not essential for the viability of the giant virus in an axenic culture of amoebae. However, they seem to be important for the adhesion of viral particles to the host cell surface.

**The presence of fibrils leads to increased viral attachment to the cell surface mediated by mannose and *N*-acetylglucosamine.** It is known that mimiviruses enter their host cells by phagocytosis, although there are no reports about the initial adhesion of these viruses to their natural hosts. Therefore, the influence of fibrils in viral adhesion to the cell surface of *A. castellanii* was investigated. Four viral groups were evaluated: APMV, APMV treated with lysozyme (LAPMV), APMV treated with lysozyme followed by bromelain and proteinase K (DAPMV), and mimivirus M4. Each group was incubated with cells for 10 min at an MOI of 50, followed by scanning electron microscopy (SEM) analysis. Comparison of viral adherence among the groups showed that APMV had a mean adhesion that was at least 5-fold higher than that of the





**FIG 2** APMV attaches to *A. castellanii* cells, with the viral particles being attached to them via glycoside interactions. Scanning electron microscopy images of APMV (A), LAPMV (B), DAPMV (C), and mimivirus M4 (D) attached to the amoeba cell. The viral particles on each image are highlighted in red. Unattached viral particles can be observed in distinct proportions in each image. During the preparation of the samples for SEM, these particles may have become unattached from the cells, because the interaction is not intense. Bars, 5.0  $\mu$ m. (E) Distribution of the viral particles per cell of *A. castellanii*. For each group, 30 amoeba cells were analyzed. The mean values were 60.5 APMV particles per *Acanthamoeba* cell, 12.8 LAPMV particles per *Acanthamoeba* cell, 6.8 DAPMV particles per *Acanthamoeba* cell, and 2.9 mimivirus M4 particles per *Acanthamoeba* cell.  $***$ ,  $P < 0.0001$  (one-way ANOVA). (F) APMV particles were saturated with mannose, glucose, *N*-acetylgalactosamine, and *N*-acetylglucosamine and were then immersed in solutions of the four distinct sugars at concentrations ranging from 10 to 125  $\mu$ g/ml for 1 h. Then, the viral particles were recovered and titrated in *A. castellanii* cells.

others ( $P < 0.0001$ ), with an average of 60.5 attached particles per cell (Fig. 2A and E). LAPMV had an average of 12.8 attached particles per cell (Fig. 2B and E), DAPMV had an average of 6.8 attached particles per cell (Fig. 2C and E), and mimivirus M4 had an average of 2.9 attached particles per cell (Fig. 2D and E). These data indicate a direct influence of the fibril layer in mimivirus adhesion to the surface of amoeba hosts, revealing a possible function of this structure during the mimivirus life cycle. The next step was the identification of possible adhesion factors of *A. castellanii* which may allow its interaction with the fibrils of the giant APMV.

For this purpose, we turned our attention to the surface glycans that had already been described in *Acanthamoeba*: glucose, mannose, GalNAc, and GlcNAc (10). APMV particles were incubated in solutions with each of these glycans at a concentration of 10, 25, 50, 75, 100, or 125  $\mu$ g/ml, followed by incubation with *A. castellanii* cells. After the recovery of attached particles on the cell surface, a reduction in viral attachment was observed in the presence of some carbohydrates. There were no changes in viral titers in the presence of glucose and GalNAc at any of the concentrations tested. The presence of mannose at concentrations of 10 and 25  $\mu$ g/ml caused no difference in viral titers. However, an  $\sim$ 10-fold reduction in the viral titer was observed when the sugar concentration reached 50  $\mu$ g/ml, and this pattern was maintained at concentrations of 100 and 125  $\mu$ g/ml, leading us to conclude that APMV attachment can be competitively inhibited by mannose. Therefore, we suggest that APMV interacts with this sugar. For GlcNAc, the difference in the titers was even more pronounced: an approximate 10-fold reduction in the viral titer was observed in the presence of 25  $\mu$ g/ml of this sugar. Doubling of the GlcNAc concentration produced a  $>$ 100-fold decrease in the viral titer,

and this difference increased to almost 1,000-fold at 75  $\mu$ g/ml, where the effect reached a plateau (Fig. 2F). The same was done with LAPMV, DAPMV, and mimivirus. There were no differences in the titers for any of these viruses when incubated with carbohydrates, where the viral titer was about  $10^6$  TCID<sub>50</sub>/ml for all of the concentrations used for each glycan (data not shown). It is worth noting that although the amount of viruses (treated with glycans) incubated with the cells was  $10^6$  TCID<sub>50</sub>/ml, the viral titer achieved was about  $10^4$  TCID<sub>50</sub>/ml for all of the viruses. This is consistent with our previous results obtained when the viruses (not treated with glycans) were incubated with the cells (Fig. 1C).

These results indicate that APMV interacts with molecules of GlcNAc, as the saturation of viral particles with this glycan prevented them from adhering to the cell surface and from completing further entry and replication inside the host, decreasing the viral titer. It also indicates that the fibrils are involved in this interaction. Thus, the surface glycans of *A. castellanii*, especially mannose and GlcNAc, might act as adhesion factors for the giant virus APMV.

**APMV attaches differentially to distinct organisms via glycoside interactions.** Because APMV's fibrils are important for its adhesion to *A. castellanii* cells, which seems to occur through viral interactions with GlcNAc and mannose, we investigated if the giant virus could adhere to other organisms that display one or more of these glycans (as well as their polymers, chitin and peptidoglycan) on their structures. Considering that the entry of APMV into amoebae occurs via phagocytosis, the association of the virus with organisms present in aquatic macro- or micro-organisms (bacteria, fungi, and aquatic arthropods) may increase the chances of an encounter between the virus and its natural host,

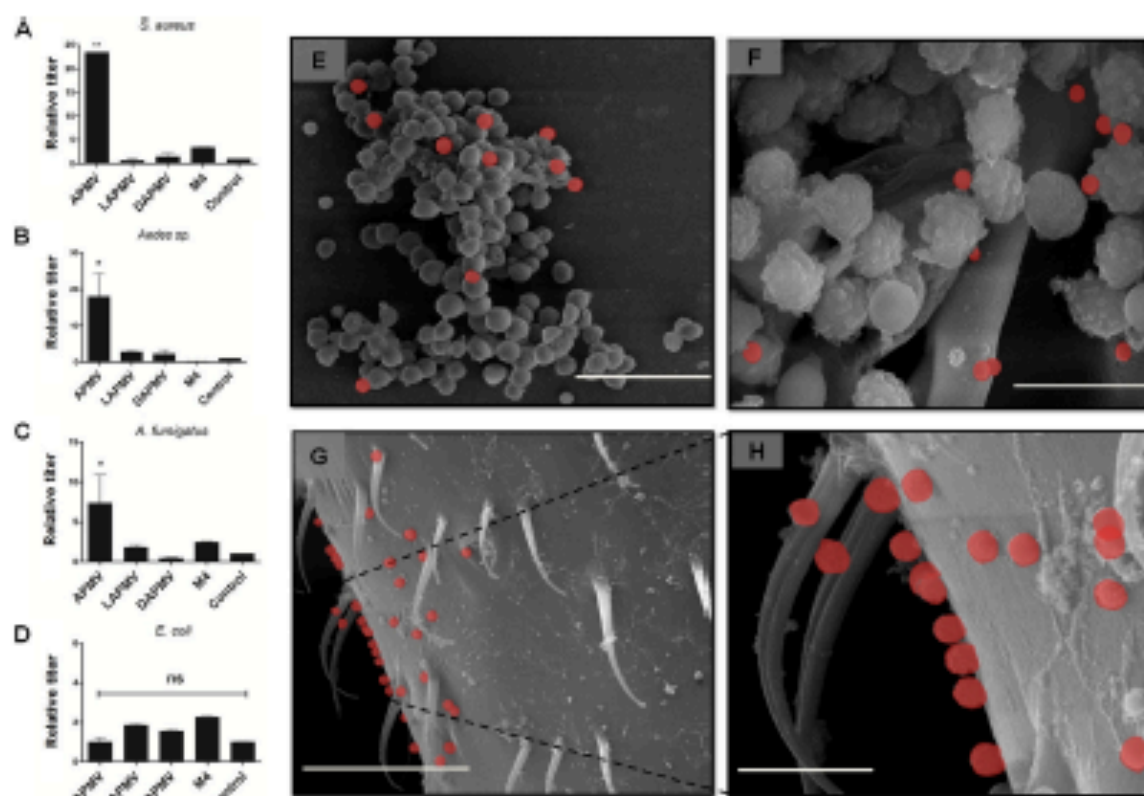


FIG 3 Differential attachment of APMV to distinct organisms. (A to D) Differences in the recovery of viral particles either isolated from or attached to *S. aureus* (A), an *Aedes* sp. (B), *A. fumigatus* (C), and *E. coli* (D). The differences in recovery were statistically significant, except for recovery from the Gram-negative bacterium. \*\*,  $P < 0.01$ ; \*,  $P < 0.05$ ; ns, not significant (two-tailed Student's *t* test). (E to H) Scanning electron microscopy images of APMV attached to *S. aureus* (E), *A. fumigatus* (F), and an *Aedes* sp. (G, H), confirming viral adhesion to those organisms. Viral particles on each image are highlighted in red. Bars, 5.0  $\mu\text{m}$  (E, F), 10  $\mu\text{m}$  (G), and 2  $\mu\text{m}$  (H).

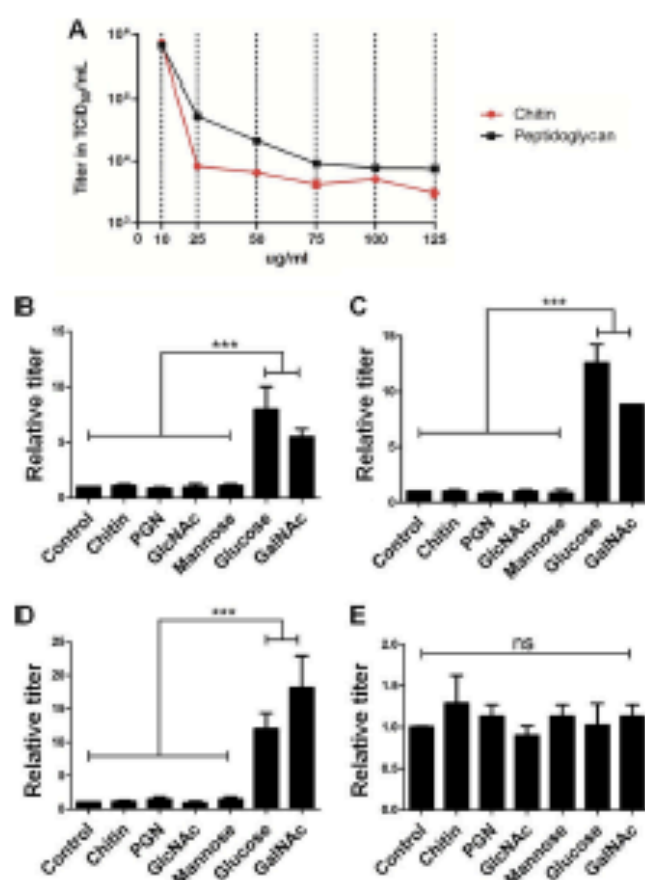
because interactions between amoebae and bacterial biofilms, insects, and microcommunities containing fungal species have already been described (18–20). To test this hypothesis, viral particles were incubated with distinct representatives of the microbial world, such as fungi (which have mannose and chitin on their cell walls) and both Gram-positive and Gram-negative bacteria (which have peptidoglycans on their cell walls). APMV was also incubated with mosquito (*Aedes*) legs as a model for an arthropod organism (which has a chitin exoskeleton).

The recovery of viral particles when the virus was incubated with *Staphylococcus aureus* (a Gram-positive bacterium) was 23.4-fold higher than the recovery of the particles when they were incubated alone, indicating that APMV attached abundantly to the bacteria (Fig. 3A). When the virus was associated with the legs of an *Aedes* sp., an 18-fold higher recovery of the viral particles compared with that for the control was observed (Fig. 3B). There was also attachment of viral particles to *Aspergillus fumigatus* cells, even though the efficiency of attachment was lower, because the recovery of the viruses was 7.32-fold higher than that for the control (Fig. 3C). Lastly, the recovery of viral particles when the virus was incubated with *Escherichia coli* (a Gram-negative bacterium) was the same as their recovery in the absence of the bacteria (Fig. 3D). The viral attachment to different organisms was statistically corroborated ( $P < 0.05$ ). The differential attachment of viral particles to distinct organisms was also supported by SEM analysis (Fig. 3E to H).

Because APMV has an affinity for some glycans (Fig. 2F) and attaches to different organisms that contain either mannose or GlcNAc in their structure, the giant virus could also bind the polymers constituted by these sugars. Furthermore, the carbohydrates could somehow block adhesion to other organisms, as seems to be the case for its natural host. Viral particles were saturated with chitin and peptidoglycan, as well as with simple carbohydrates. The viral attachment was verified as described above. The presence of both polymers interfered with viral adhesion to *Acanthamoeba* cells. There were no differences in the viral titer at a concentration of 10  $\mu\text{g/ml}$  for both polymers. For peptidoglycan, there was an approximately 10-fold reduction in the viral titer at a concentration of 25  $\mu\text{g/ml}$ , and its maximum inhibitory effect was reached at 75  $\mu\text{g/ml}$ , when the particle concentration was reduced by a factor of 100. For chitin, there was a 100-fold reduction in the viral titer starting at a concentration of 25  $\mu\text{g/ml}$ . This effect was observed up to a chitin concentration of 125  $\mu\text{g/ml}$  (Fig. 4A). The same was done for LAPMV, DAPMV, and mimivirus M4, and, just like for the monomers, the viral titer did not alter when the viruses were incubated with the polymers at any concentration tested (data not shown). Therefore, our results suggest that the APMV particles most likely bind not only to simple sugars but also to polymers built by GlcNAc.

To verify whether carbohydrates could interfere with viral adhesion to other organisms, viral particles saturated with different sugars were incubated with distinct organisms. Our results dem-





**FIG 4** APMV has an attraction for different sugars, and this attraction can prevent interactions between viruses and other organisms. (A) APMV has an attraction for chitin and peptidoglycan. APMV particles were immersed in a solution of both polymers at different concentrations, recovered, and titrated in *A. castellanii* cells. (B to E) Differences in the recovery of viral particles treated with distinct sugar monomers and polymers were observed when the particles were either isolated from or attached to *S. aureus* (B), an *Aedes* sp. (C), *A. fumigatus* (D), or *E. coli* (E). The differences in the recovery of treated viral particles associated with different organisms were not significant except when the glycan used was glucose or GalNAc. PGN, peptidoglycan. There was no significant difference in the recovery of viral particles associated with *E. coli* independently of the sugar used. \*\*\*,  $P < 0.001$ ; ns, not significant (two-tailed Student's *t* test).

onstrate that when the viral particles are covered with mannose, GlcNAc, chitin, or peptidoglycan, the attachment to organisms that contain at least one of these glycans in their structure (*S. aureus*, *A. fumigatus*, and an *Aedes* sp.) is compromised. However, when the particles were saturated with glucose or GalNAc, the capacity for adherence to those organisms was maintained, as indicated by the higher level of recovery of viral particles compared with that for the control. This confirmed that APMV does not have an affinity for these glycans and indeed attaches to other organisms through glycoside interactions (Fig. 4B to D) ( $P < 0.001$ ). We also confirmed that APMV does not efficiently attach to Gram-negative bacteria (*E. coli*). Independently of the sugar in which the APMV particles were saturated, it was not possible to recover an amount of particles that was significantly higher than that for the control group (Fig. 4E). Altogether, our findings presented here support our previous data, indicating that the giant

virus interacts with glycans as well as polymers formed by these glycans, such that it can attach to different organisms that possess these carbohydrates on their surfaces. When the viral particles are completely covered by these sugars, the adherence to other organisms is blocked.

## DISCUSSION

APMV is one of the most complex known members of the virosphere. The mimivirus captured the attention of the scientific community due to its genetic and structural characteristics. Many aspects about this giant virus remain unknown, such as the function of its surface fibrils. Some hypotheses have already been raised. For example, they may increase viral resistance to adverse conditions and act as a natural host decoy (5). However, the role of these structures has not been conclusively shown. In the present work, we predicted that the fibrils are involved in the initial adhesion of APMV to its hosts.

The fibrils do not seem to be essential for viral replication because even when their levels are drastically reduced, the viral particles remain viable (17). Our results confirm this and show that, in the absence of peptidoglycan, the particles can still replicate inside *A. castellanii*. However, particle attachment to the host cell in the absence of fibrils seems to be compromised. When we quantified only the viruses that attached to the cells, the viral titer decreased 100-fold compared with that of the prototype virus. This attachment alteration was corroborated by electronic microscopy analysis. The amount of viral particles without peptidoglycans on their surface that attached to the cell surfaces was reduced ~5-fold compared with the amount for complete viral particles. This difference was even higher when the fibrils were practically absent, as observed in viruses treated with enzymes or mimivirus M4. These results confirm the hypothesis that the fibrils are involved in the initial adhesion of APMV to the host cells.

The initial adhesion of a particle to a phagocytic cell is an essential step in the initiation of phagocytosis, the process by which mimiviruses enter their hosts (11). Surface carbohydrates have already been described to be factors that allow adhesion between phagocytes and microorganisms (9). Glucose, mannose, GalNAc, and GlcNAc have already been identified on the surface of organisms of the *Acanthamoeba* genus (10). These can be considered adhesion factors for distinct microorganisms, including representatives of the *Mimiviridae* family. Our results demonstrate that APMV particles interact with mannose and GlcNAc with different avidities but do not interact well with glucose or GalNAc. The interaction of viral particles with glycans impacted their adhesion to *A. castellanii* cells, as verified by a reduction in the viral titer. When glucose and GalNAc are considered, there was no reduction in the viral titer, indicating that these carbohydrates do not interact well with the APMV particles. When the fibrils are drastically reduced (as in viruses treated with enzymes and mimivirus M4), the particles are not able to interact with mannose or GlcNAc on the surface of *A. castellanii*, explaining the low level of viral attachment observed in this study. According to our data, viral attachment via glycans seems to be important for the function of APMV, at least considering its natural host. Because it is able to infect human monocytes and macrophages by phagocytosis and different glycans are present on the surfaces of those cells, it is reasonable to infer that viral adhesion to these cells occurs through the interaction between the sugars and fibrils of the giant mimivirus.

GlcNAc is a glycan widely distributed in nature. It is a mono-



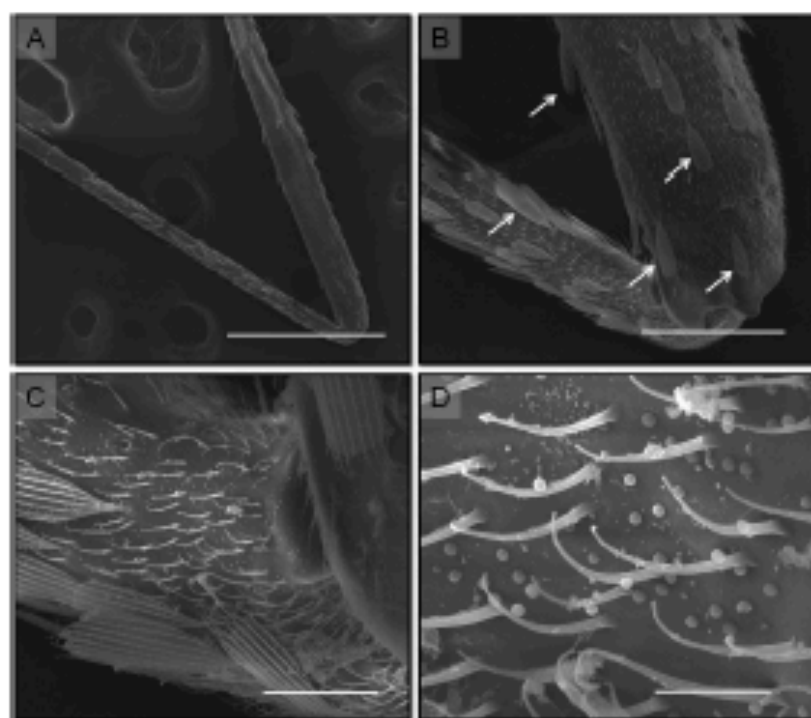


FIG 5 Electron microscopy images of *Acanthamoeba polyphaga* mimivirus attached to mosquito legs. (A) A mosquito leg at low magnification ( $\times 220$ ). (B) The same leg shown in panel A at a magnification of  $\times 1,000$ . White arrows, mechanoreceptors. (C) A higher-magnification image (magnification,  $\times 4,000$ ) of the mosquito leg, where some viral particles can be observed. (D) APMV particles attached to the entire surface of the mosquito leg. The test was performed only with insect legs, but it is reasonable to expect that the virus should be able to attach to other parts of the arthropod's body made of chitin. Bars, 500.0  $\mu\text{m}$  (A), 100.0  $\mu\text{m}$  (B), 20.0  $\mu\text{m}$  (C), and 5.0  $\mu\text{m}$  (D).

mer of many polymers, such as peptidoglycan and chitin, which are structural components of several organisms. Peptidoglycan is the major component of Gram-positive bacterial cell walls and is also present in the cell walls of Gram-negative bacteria but in amounts smaller than those in the cell walls of Gram-positive bacteria (21). Chitin is present in the cell walls of fungi, forming a thin structure covered by a dense mannose layer (22). Several invertebrates have chitin in their structures, such as the exoskeletons of arthropods (23) and mollusk shells (24). It was verified that mimivirus indeed has an attraction for both of these polymers, similar to its attraction for the monomers making up the polymers. Taking this into account, it would be reasonable to think that mimiviruses could attach to distinct living organisms that possess some of these polymers in their structures. The differential adhesion of APMV to different organisms was noted, where the most intense attachment was to Gram-positive bacteria, followed by insects, fungi, and then Gram-negative bacteria, to which it exhibited the lowest viral adhesion. This differential adhesion was justified by the natural composition of each one of the organisms tested. Because Gram-positive bacteria (represented in this work by *S. aureus*) possess a thick layer of peptidoglycan in their external structure, the viral fibrils intensively attached to the bacterial cell wall. The opposite was observed for Gram-negative bacteria (represented in this work by *E. coli*), where the polymer layer is overlapped by large lipopolysaccharide chains, leading to less intense viral adherence. In fungi (represented in this work by *A. fumigatus*), viral adhesion was less intense than the adhesion to *S. aureus*. Once again, the organism's structure might explain this

difference, which also applies to the higher level of attachment to fungi than to the Gram-negative bacteria that was observed. In the latter case, chitin was found to be present in the basal part of the fungal cell wall, thus hindering interactions between this carbohydrate and viral particles. In the case of arthropods (represented in this work by an *Aedes* sp.), the chitin exoskeleton allows APMV adhesion more intense than that to fungal cells, with adhesion being as intense as that to Gram-positive bacteria. Although our test was performed only with insect legs, it is reasonable to expect that the virus should be able to attach to other parts of the arthropod's body made of chitin. In fact, it was possible to observe viral particles all over the insect leg (Fig. 5). It was verified that when mimivirus was covered by one of the sugars studied here (GlcNAc, mannose, peptidoglycan, or chitin), the particles were not able to attach efficiently to other organisms, even though they presented one of these carbohydrates in their external structure. It seems that there is a heterologous glycoside inhibition between the glycans. Independently of the sugar that first interacted with the mimivirus particles, attachment to any sugar prevents interaction of the viral particles with other molecules, because the fibrils are completely saturated by the carbohydrate.

Mimiviruses have already been isolated from distinct animals, such as the Shan virus and the LBA111 virus from humans (25, 26), Hirudovirus from the invertebrate *Hirudo medicinalis* (27), and some viruses that have not yet been characterized from oysters (28). Furthermore, it has already been demonstrated that mimiviruses circulate among nonhuman mammals (29). These findings show that animals might be a good source for isolation of



these giant viruses. Because mimivirus fibrils attach to the arthropod exoskeleton, it is only a matter of time until other mimiviruses are isolated from this group of invertebrates. Moreover, insects may be efficient dispersers of mimiviruses. By attaching to the body of the organism, the viruses would be taken to places beyond their origin, which may allow them to encounter other natural hosts and propagate more efficiently. We also raise a second hypothesis, namely, that the association of mimiviruses with fungi or bacteria could permit a higher phagocytosis rate by the amoeba because it feeds on the latter microorganisms. Thus, mimiviruses are ingested by the amoeba as a collateral effect of feeding behavior, leading to successful replication and the generation of APMV progeny.

In conclusion, the results obtained in this work corroborate our initial hypothesis and go further, identifying possible factors that interact with the fibrils to allow viral adhesion not only to amoebae of the *Acanthamoeba* genus but also to other organisms of distinct groups. In this context, the fibrils act as viral adhesion structures, which further allow phagocytosis of APMV by its natural hosts.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank our colleagues from Gepvig and the Laboratório de Vírus for their excellent technical support. We thank CNPq for scholarship and the Center of Microscopy of UFMG. We thank Álvaro Elras, UFMG, for the donation of mosquitoes. We also thank Daniel Helsey, Virginia Commonwealth University School of Medicine, for English corrections.

We declare no conflicts of interest.

#### REFERENCES

- La Scola B, Audic S, Robert C, Jungang L, de Lamballerie X, Drancourt M, Birites R, Claverie JM, Raoult D. 2003. A giant virus in amoebae. *Science* 299:2033. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1081867>.
- Raoult D, La Scola B, Birites R. 2007. The discovery and characterization of mimivirus, the largest known virus and putative pneumonia agent. *Clin Infect Dis* 45:95–102. <http://dx.doi.org/10.1086/518608>.
- Raoult D, Audic S, Robert C, Abergel C, Renesto P, Ogata H, La Scola B, Suzan M, Claverie JM. 2004. The 1.2-megabase genome sequence of mimivirus. *Science* 306:1344–1350. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1101485>.
- Legendre M, Santini S, Rico A, Abergel C, Claverie JM. 2011. Breaking the 1000-gene barrier for mimivirus using ultra-deep genome and transcriptome sequencing. *Virology* 418:99. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2011.08.011>.
- Xiao C, Kuznetsov YG, Sun S, Hafenstein SL, Kostyuchenko VA, Chipman PR, Suzan-Monil M, Raoult D, McPherson A, Rossmann MG. 2009. Structural studies of the giant mimivirus. *PLoS Biol* 7:e92. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.1000092>.
- Zauberan N, Mutsaers Y, Halevy DB, Shimon E, Klein E, Xiao C, Sun S, Minsky A. 2008. Distinct DNA exit and packaging portals in the virus *Acanthamoeba polyphaga* mimivirus. *PLoS Biol* 6:e114. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.0060114>.
- Siddiqui R, Khan NA. 2012. Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. *Parasit Vectors* 5:6. <http://dx.doi.org/10.1186/1756-3305-5-6>.
- La Scola B. 2014. Looking at protists as a source of pathogenic viruses. *Microb Pathog* 77:131–135. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2014.09.005>.
- Sharon N. 1984. Surface carbohydrates and surface lectins are recognition determinants in phagocytosis. *Immunol Today* 5:143–147. [http://dx.doi.org/10.1016/0167-5699\(84\)90237-8](http://dx.doi.org/10.1016/0167-5699(84)90237-8).
- Elloway EA, Armstrong RA, Bird RA, Kelly SL, Smith SN. 2004. Analysis of *Acanthamoeba polyphaga* surface carbohydrate exposure by FITC-lectin binding and fluorescence evaluation. *J Appl Microbiol* 97:1319–1325. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02430.x>.
- Ghigo E, Kartenbeck J, Lien P, Pelkmans L, Capo C, Mege JL, Raoult D. 2008. Amoebal pathogen mimivirus infects macrophages through phagocytosis. *PLoS Pathog* 4:e1000087. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1000087>.
- Abraham JS, Boratto P, Dornas FP, Silva LC, Campos RK, Almeida GM, Kroon EG, La Scola B. 2014. Growing a giant: evaluation of the virological parameters for mimivirus production. *J Virol Methods* 207:6–11. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jvmet.2014.06.001>.
- Kuznetsov YG, Xiao C, Sun S, Raoult D, Rossmann M, McPherson A. 2010. Atomic force microscopy investigation of the giant mimivirus. *Virology* 404:127–137. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2010.05.007>.
- Reed LJ, Muench H. 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am J Hyg* 27:493–497.
- Campos RK, Boratto PV, Assis FL, Aguiar ER, Silva LC, Albarnaz JD, Dornas FP, Trindade GS, Ferreira PP, Marques JT, Robert C, Raoult D, Kroon EG, La Scola B, Abrahão JS. 2014. Samba virus: a novel mimivirus from a giant rain forest, the Brazilian Amazon. *Virology* 459:11–19. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2014.02.022>.
- Sobhy H, La Scola B, Pagnier I, Raoult D, Colson P. 2015. Identification of giant mimivirus protein functions using RNA interference. *Front Microbiol* 6:345. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2015.00345>.
- Boyer M, Azza S, Barras L, Klose T, Campocasso A, Pagnier I, Fournous G, Borg A, Robert C, Zhang X, Desnues C, Henrissat B, Rossmann MG, La Scola B, Raoult D. 2011. Mimivirus shows dramatic genome reduction after intraamoebal culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:10296–10301. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1101118108>.
- Verhoeven AB, Durham-Colleran MW, Pierson T, Boswell WT, Van Hoek ML. 2010. *Francisella philomiragia* biofilm formation and interaction with the aquatic protist *Acanthamoeba castellanii*. *Biol Bull* 219:178–188.
- Ott DA, Roth MB, Carlesso AM, da Silva OS. 2012. Prevalence of *Acanthamoeba* spp. (Sarcocystidophora: Acanthamoebidae) in wild populations of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Parasitol Res* 111:2017–2022. <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-012-3050-3>.
- Steenbergen JN, Nosanchuk JD, Mallari SD, Casadevall A. 2004. Interaction of *Blastomyces dermatitidis*, *Sporothrix schenckii*, and *Histoplasma capsulatum* with *Acanthamoeba castellanii*. *Infect Immun* 72:3478–3488. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.72.6.3478-3488.2004>.
- Silbavy TJ, Kahne D, Walker S. 2010. The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2:a000414. <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a000414>.
- Latge JP. 2007. The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. *Mol Microbiol* 66:279–290. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05872.x>.
- Lease HM, Wolf BO. 2010. Exoskeletal chitin scales isometrically with body size in terrestrial insects. *J Morphol* 271:759–768. <http://dx.doi.org/10.1002/jmor.10835>.
- Weiss IM. 2012. Species-specific shells: chitin synthesis and cell mechanics in molluscs. *Z Kristallogr* 227:723–738.
- Saad H, Reteno DG, Colson P, Aherfi S, Mimodier P, Pagnier I, Raoult D, La Scola B. 2013. Shan virus: a new mimivirus isolated from the stool of a Tunisian patient with pneumonia. *Intervirology* 56:424–429. <http://dx.doi.org/10.1159/000354564>.
- Saad H, Pagnier I, Colson P, Cherif JK, Beji M, Boughalmi M, Azza S, Armstrong N, Robert C, Fournous G, La Scola B, Raoult D. 2013. First isolation of mimivirus in a patient with pneumonia. *Clin Infect Dis* 57:e127–e134. <http://dx.doi.org/10.1093/cid/cit354>.
- Boughalmi M, Pagnier I, Aherfi S, Colson P, Raoult D, La Scola B. 2013. First isolation of a giant virus from wild *Hirudo medicinalis* leech: Mimiviridae isolation in *Hirudo medicinalis*. *Viruses* 5:2920–2930. <http://dx.doi.org/10.3390/v5122920>.
- Andrade KR, Boratto PP, Rodrigues FP, Silva LC, Dornas FP, Pilotto MR, La Scola B, Almeida GM, Kroon EG, Abrahao JS. 2015. Oysters as hot spots for mimivirus isolation. *Arch Virol* 160:477–482. <http://dx.doi.org/10.1007/s00705-014-2257-2>.
- Dornas FP, Rodrigues FP, Boratto PV, Silva LC, Ferreira PC, Bonjardim CA, Trindade GS, Kroon EG, La Scola B, Abrahao JS. 2014. Mimivirus circulation among wild and domestic mammals, Amazon Region, Brazil. *Emerg Infect Dis* 20:469–472. <http://dx.doi.org/10.3201/eid2003.131050>.