

LARA AMBROSIO LEAL DUTRA

**ESTUDO PRELIMINAR DA PRESENÇA DE VÍRUS EM POPULAÇÕES DE  
CAPIVARAS EM DOIS BIOMAS BRASILEIROS**

**BELO HORIZONTE – MG**

**2015**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
LARA AMBROSIO LEAL DUTRA

**ESTUDO PRELIMINAR DA PRESENÇA DE VÍRUS EM POPULAÇÕES DE  
CAPIVARAS EM DOIS BIOMAS BRASILEIROS**

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

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Giliane de Souza Trindade

**BELO HORIZONTE – MG  
2015**

Aos meus meninos, Gregorio e Gabriel, que tornaram esta travessia mais real.

## AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do ICB/UFMG.

Às agências de fomento à pesquisa, CAPES, CNPq e FAPEMIG, por permitirem que este trabalho tivesse recursos financeiros para ser executado.

À minha orientadora, Giliane de Souza Trindade, por ter me recebido de portas abertas quando, no último período da graduação, eu resolvi me aventurar num mundo ainda muito desconhecido pra mim: a Microbiologia. Gi, obrigada por acreditar no meu trabalho e me deixar trazer um pouquinho do que aprendi lá na “Eco”, obrigada por me deixar expandir meus horizontes.

Ao grupo ECOVIR, obrigada por compartilhar bons momentos no campo, no “lab”, nas reuniões e, principalmente, nos botecos. Galileu, Poli, Carol e Júlia, obrigada pelos bons momentos em aula ou no laboratório, esperando um gel correr ou repicando uma Vero. Pedro, obrigada por me aturar naqueles momentos em que eu não conseguia parar de falar coisas aleatórias... e ia andando atrás de você pelo “lab” inteiro, falando na sua orelha, até EU cansar.

Iara, obrigada por me acolher e me ensinar sobre microbiologia quando cheguei ao Labvírus. Todos aqueles infinitos detalhes nas explicações sobre teoria e prática dos experimentos que realizamos juntas, aquelas horas infinitas escrevendo em tubos e os organizando nos suportes antes de começar de fato o experimento e a escrita dos protocolos nos mínimos detalhes foram muito importantes no meu treinamento. Obrigada pela companhia no campo, em Sabará, no Serro e na Serra do Cipó. Obrigada por confiar em mim e no meu trabalho.

Flavinha e Tati, eu não poderia me esquecer de vocês, cantando música baranga no campo ou na van do Seu Tião. Obrigada por me distrair do cansaço de subir aquelas pirambeiras da Fazendinha.

Aos colegas do Labvírus, obrigada pela companhia, pelo aprendizado e pela diversão! Obrigada aos que me receberam quando cheguei ao Labvírus em 2011... e obrigada aos que eu recebi ao longo da minha travessia por lá. Em especial, agradeço a Gigi e Marcela, que já seguiram seu caminho por outras bandas, que me receberam com carinho e tentaram me ensinar um pouquinho sobre o quão cansativo pode ser essa história de correr mil géis (me desculpem, mas não levei tão a sério na época, aprendi a lição na marra!)... ao Léo, que me ensinou da melhor (ou pior) maneira a estar sempre atenta e não largar a câmara de

Neubauer suja por aí. Gracinha, Alice, Ana P., Ana Moreira, Felipe, Danilo (*injuado!*), Fabio, Loren, Kety, Paulinha, Lud e quem mais eu não tiver mencionado... Obrigada pelas festas organizadas e desorganizadas... pelo *New Taste* de última hora... pela companhia nos almoços... pela disputa por capelas e maquinas de qPCR/PCR...

Grazi, muito mais que obrigada... valeu demais "véi"! Valeu pelas conversas, pelas dicas, pelas trocas de experiência na bancada, pelos sábados na sala de cultura ou *rodiando* uma estufa de vírus, pelas reações de PCR e sequenciamento, pela ajuda de última hora, pelo carinho e apoio. Valeu pelo carinho com meu filhote, é claro!

Aos meus amigos de (vários) outros cantos, da micro ou não, obrigada por me lembrar que existe vida além do lab!

Andréia, obrigada pelos encontros inesperados, mas muito propícios, na porta do elevador e pelas horas de conversas subsequentes...

Nadja, obrigada pelos encontros marcados e desmarcados, mas sempre muito esperados, e pelo carinho e apoio sempre... Este trabalho também é dedicado a você, que muito me ensinou sobre o campo!

À minha família, Caio, pai, mãe, L... Obrigada por compartilharem a minha alegria neste e em outros momentos da minha vida. Ao Caio, em especial, muito obrigada pelo apoio em diversos momentos (noutros nem tanto), pelas brigas desde sempre (apesar de tudo, fazem parte no nosso crescimento pessoal) e obrigada pelas cervejas artesanais!

À família que me adotou, ou que eu adotei, não sei... Cláudia, Pepê e Laurinha. Obrigada pelo carinho que tiveram comigo desde a primeira vez que nos encontramos. O apoio de vocês foi fundamental na reta final, principalmente nos cuidados com o Gregorio. Obrigada por cuidarem dele com amor e carinho. Amo vocês!

E, finalmente, aos meus meninos, Gabri e *Perereco*, esse trabalho é nosso!

Gabri, obrigada por tudo! Você tem transformado a minha vida... desde antes daquele dia, na porta de uma festa junina! Obrigada pela companhia surreal. Obrigada por acreditar em mim, por acreditar no meu potencial e me incentivar durante toda a travessia lá na micro. Obrigada por me escutar e me entender (ou não), inclusive nos piores momentos. Obrigada por me ensinar sempre alguma coisa nova, nem que seja sobre vídeo-game. Obrigada por aceitar o desafio da dupla identidade junto comigo, imagino que ser pai seja tão difícil quanto ser mãe (com as diferenças cabíveis, claro!). Obrigada por assumir os cuidados com

o neném por vários dias e várias noites seguidas para que eu pudesse escrever. Enfim, obrigada por esse neném lindo que ta mudando a nossa vida para todo sempre.

*Perereco*, hoje você não entende nada do que está acontecendo, só sente a falta da mamãe quando ela fica mil horas na frente do computador e nem te olha... mas um dia você vai entender o que isso tudo significa. Desculpe-me pela ausência nesse período tão importante pra você, mas tenho certeza que o papai tem se saído muito bem nos cuidados e no carinho e diversão. Este trabalho também é fruto do seu esforço... à sua maneira! Obrigada por trazer muita luz pra minha vida, obrigada por mudar o meu mundo para sempre!

*“Vivendo, se aprende; mas o que se aprende, mais, é só a fazer maiores perguntas.”*

(Riobaldo [Guimarães Rosa])

## Resumo

As capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) são os maiores roedores vivos conhecidos, são endêmicas da América do Sul e vivem em bandos que ocupam uma variedade de habitats, desde que próximos a corpos d'água. Apresentam duas importantes características que refletem um grande potencial na participação da transmissão de patógenos na zona de interface entre o ambiente silvestre e doméstico: possuem uma grande adaptabilidade à modificação do ambiente natural, sendo as áreas próximas às propriedades rurais seu habitat preferencial, e apresentam uma tendência à expansão das populações nestes ambientes, devido às condições favoráveis encontradas nestas áreas. Esta alteração na dinâmica de populações de capivaras representa também uma alteração nas relações ecológicas entre as espécies, que propicia o tráfego de agentes infecciosos conhecidos e desconhecidos através da movimentação das capivaras entre os ambientes silvestre e doméstico. Assim, as capivaras podem estar intimamente relacionadas à emergência de doenças em populações silvestres e domésticas. Pouco se sabe a respeito de vírus associados às capivaras, sendo que os estudos realizados até o presente momento tiveram o enfoque nos vírus já conhecidos por afetarem a saúde de animais de importância econômica e utilizaram principalmente técnicas sorológicas. O objetivo deste trabalho foi dar início a uma investigação preliminar a respeito da presença de diversos grupos de vírus em capivaras utilizando uma abordagem não invasiva. A investigação preliminar foi realizada através de testes de qPCR e isolamento viral a partir de amostra de fezes de capivaras. Os testes de qPCR buscaram evidências moleculares da presença de vírus em populações de capivaras presentes em dois biomas brasileiros, o Cerrado e o Pantanal. Os resultados apontaram suspeitas para a presença de vários vírus alvo em diversas amostras. A busca por mais evidências moleculares da presença de *Orthopoxvirus* foi conduzida em três amostras suspeitas e vários genes alvos foram investigados por qPCR e PCR. O resultado desta investigação apontou evidências moleculares da presença de DNA viral nas três amostras suspeitas. Neste trabalho também foram isolados dois vírus, que ainda devem ser caracterizados. Em conclusão, o presente trabalho descreve pela primeira vez a presença de evidências moleculares de OPV em capivaras, apresentando uma forte evidência da participação destes animais no ciclo natural de transmissão do *Vaccinia virus* no Brasil. Além disso, este trabalho apresenta suspeitas da presença de grupos diversos de vírus, de importância humana e animal, em capivaras, que devem ser alvo de uma investigação futura, a fim de entender o papel das capivaras na dinâmica de circulação desses agentes. Finalmente, este trabalho permite um direcionamento da investigação de vírus em sua relação com as capivaras a partir do estabelecimento das melhores populações para estudos futuros.

Palavras-chave: capivaras, viroses emergentes, detecção molecular, VACV.

## Abstract

Capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) are the largest known living rodents, being endemic of the New World and living in a diversity of habitats, as long as it is close to water bodies. Two main characteristics exhibited by this animal support its great potential of playing a role in diseases transmission at border zones between wild and domestic habitat: easy adaptation to modified habitats, showing preference to nearby farm areas, and they have a tendency to population growth in these environment, due to favorable conditions presented in these areas. These changes in population dynamics represents a change in ecological relationship between species that support the traffic of known and unknown infectious agents' through capybaras movements between environments. So, capybaras may be closely related to diseases emergence in wild and domestic populations. Its presence in these border areas is increasing recently promoted by the intense process in which man activities grows driving environments changes and, despite the potential risk presented, little is known about viruses in capybaras. The studies held on so far had presented only poor evidences of relationship and focused on viruses of domestic animals due to its economic value. The goal of this study was to start a preliminary investigation about the presence of various viral groups in capybaras using a non invasive approach. This research was performed by using capybaras fecal samples in qPCR tests and viral isolation. The qPCR tests searched for molecular evidences of the presence of virus in several capybaras population on two Brazilian biomes, Cerrado and Pantanal. The results pointed to the putative presence of several viruses targeted among several samples. Search for more molecular evidence of *Orthopoxvirus* (OPV) presence was held in three suspicious samples and several target genes were tested by qPCR and PCR. The results pointed to the presence of viral DNA in both three samples. This work also yielded isolation of two viruses that still must be characterized. So this work describes for the first time the presence of molecular evidence of OPV in capybaras, presenting strong evidence that this animal plays a role in the natural transmission chain of *Vaccinia virus* in Brazil. Besides that, this research presents suspicion on the presence of several viral groups in capybaras concerning human and animal health that must be target for future investigations in order to understand the role of capybaras on viral circulation dynamics. And finally, this work allows a guidance of virus's investigation in its relationship with capybaras by pointing the better population to conduct further investigations.

Keywords: capybaras, emerging viruses, molecular detection, VACV.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Árvore filogenética demonstrando a filogenia molecular da superfamília Caviioidea. ....	19
<b>Figura 2.</b> Distribuição das espécies de capivaras.....	20
<b>Figura 3.</b> Estrutura corporal da capivara.. ....	21
<b>Figura 4.</b> Modelo de emergência de pandemias de caráter zoonótico.....	33
<b>Figura 5.</b> Sítio de coleta das amostras. ....	40
<b>Figura 6.</b> Organização das sequências do gBlcok ARCoV .....	44
<b>Figura 7.</b> Plasmídeo pGEM ARCoV .....	47
<b>Figura 8.</b> Amplificação de fragmentos alvos para clonagem em plasmídeo .....	57
<b>Figura 9.</b> Triagem de colônias transformadas com o plasmídeo de interesse .....	58
<b>Figura 10.</b> Confirmação da presença do inserto ARCoV no pGEM. ....	58
<b>Figura 11.</b> Triagem por qPCR para vírus causadores de doenças vesiculares.....	61
<b>Figura 12.</b> Triagem por qPCR para vírus de importância médica humana e veterinária. ....	62
<b>Figura 13.</b> Triagem por qPCR para virus gigantes. ....	62
<b>Figura 14.</b> Triagem por qPCR para virus transmitidos pela água. ....	63
<b>Figura 15.</b> Resultados de qPCR para diferentes alvos de OPV.....	66
<b>Figura 16.</b> Resultado das reações de PCR para diferentes alvos de OPV .....	67
<b>Figura 17.</b> Análise das sequências do gene C11R.....	69
<b>Figura 18.</b> Alinhamento da sequência de A26L obtida para PAMP .....	70
<b>Figura 19.</b> Isolamento de vírus em células VERO .....	71
<b>Figura 20.</b> Microscopia eletrônica da 3ª passagem da amostra CAP10. ....	72
<b>Figura 21.</b> Investigação molecular da presença de EV em amostra de vírus isolada .....	74
<b>Figura 22.</b> Efeito citopático de vírus gigante em células de <i>A. castellani</i> .....	75
<b>Figura 23.</b> Ciclo hipotético de transmissão de VACV .....	85

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

<b>Tabela 1.</b> Vírus associados a capivaras. ....	27
<b>Tabela 2.</b> Vírus alvos para triagem de amostras.....	48
<b>Tabela 3.</b> Amostras de fezes coletadas. ....	56
<b>Tabela 4.</b> Resultado dos testes de triagem de amostras de fezes capivaras para a presença de vírus.....	59
<b>Tabela 5.</b> Resultados das reações de qPCR e PCR para investigação de amostras positivas para OPV.....	65
<b>Quadro 1.</b> Resultado geral da triagem por qPCR. ....	64

## LISTA DE ABREVIATURAS

µg - micrograma

µL – microlitro

µm – micrômetro

APMV – *Acanthamoeba polyphaga mimivirus*

APMaV – *Acanthamoeba polyphaga marseillevirus*

BAV - *BeAn 58058 virus*

BLV – *Bovine leukemia virus*

BoHV – *Bovine herpesvirus*

BVDV - *Bovine viral diarrhea virus*

cDNA – DNA complementar

cm - centímetros

CoV – Coronavírus

CPXV – *Cowpox virus*

CV - coxsackievirus

C<sub>t</sub> – *Cycle threshold*

d.p.i. – dias pós-infecção

DIE – Doença infecciosa emergente

DNA – *desoxiribonucleic acid*

dNTP – desoxirribonucleotídeos fosfatados

DTT – Ditioneitol

ECP – efeitos citopáticos

EDTA – ácido etilenodiaminotetracético

EEEV – *Eastern equine encephalitis virus*

EMCV – *Encephalomyocarditis virus*

EUA – Estados Unidos da América

EV - enterovírus

FMDV – *Foot-and-mouth disease virus*

g - gramas

h - hora

ha - hectares

HAV – *Hepatitis A virus*

HCoV – coronavírus humanos

HIV – *Human immunodeficiency virus*

IUCN – *International Union for Conservation of Nature*

kb - quilobases

KCl – cloreto de potássio  
kg - quilograma  
L – litro  
LB – Lysogeny broth  
M - molar  
MARV – *Mariana virus*  
MEM – meio mínimo essencial de Eagle  
MG – Minas Gerais  
MgCl<sub>2</sub> – cloreto de magnésio  
mL – mililitro  
mM - milimolar  
*M-MLV – Moloney Murine Leukemia Virus*  
MS – Mato Grosso do Sul  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – hidrogenofosfato de sódio  
NaCl – cloreto de sódio  
NaHCO<sub>3</sub> – bicarbonato de sódio  
ng - nanograma  
nm - nanômetros  
°C – graus Celsius  
OPV – *Orthopoxvirus*  
p/v – peso/volume  
PARNA – Parque Nacional  
pb – pares de bases  
PBS – tampão salina fosfato  
PCR – reação em cadeia da polimerase  
pH – potencial hidrogeniônico  
PV – *Poliovirus*  
PYG – *peptone yeast glucose*  
qPCR – PCR quantitativa  
RABV – *Rabies virus*  
RNA – *ribonucleic acid*  
rpm – rotações por minuto  
RT – transcrição reversa  
SAV – *SPAN232 virus*  
SFB – soro fetal bovino  
T<sub>m</sub> – temperatura de dissociação  
U - unidades

U/mL – unidade/mililitro

VACV – *Vaccinia virus*

VACV-BR – *Vaccinia virus* brasileiros

VARV – *Variola virus*

VB – Vaccínia Bovina

VE – Viroses emergentes

VEEV – *Venezuelan equine encephalitis virus*

VSV – vírus da estomatite vesicular

WEEV – *Western equine encephalitis virus*

## SUMÁRIO

<b>Resumo .....</b>	<b>vii</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>ix</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>x</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>xii</b>
<b>1. Introdução .....</b>	<b>18</b>
1.1. As Capivaras .....	18
1.1.1. Taxonomia e nomenclatura .....	18
1.1.2. Características gerais.....	20
1.1.3. Ameaças e conflitos.....	23
1.1.4. Agentes infecciosos associados às capivaras .....	24
1.1.5. Vírus associados às capivaras .....	26
1.2. Emergência de doenças infecciosas .....	31
<b>2. Justificativa .....</b>	<b>35</b>
<b>3. Objetivos .....</b>	<b>38</b>
3.1. Objetivos gerais.....	38
3.2. Objetivos específicos.....	38
<b>4. Fluxograma de trabalho .....</b>	<b>39</b>
<b>5. Metodologia .....</b>	<b>40</b>
5.1. Coleta das amostras .....	40
5.1.1. Sítio de Coleta .....	40
5.1.2. Método de coleta das amostras de fezes .....	41
5.1.3. Procedimentos iniciais no laboratório .....	42
5.2. Processamento das amostras de fezes .....	42
5.2.1. Amostras para isolamento de vírus.....	42
5.2.2. Amostras para ensaios de biologia molecular .....	43
5.3. Produção de estoque do controle positivo das reações .....	44
5.3.1. Multiplicação viral .....	44

5.3.2.	Amplificação de DNA/cDNA por PCR convencional .....	45
5.3.3.	Obtenção dos plasmídeos .....	46
5.4.	Triagem das amostras de fezes de capivara por qPCR.....	47
5.5.	Isolamento de vírus.....	49
5.5.1.	Cultivo de células.....	50
5.5.2.	Isolamento de vírus em célula animal.....	50
5.5.2.1.	Seleção de clones .....	51
5.5.3.	Isolamento de vírus gigantes.....	52
5.5.3.1.	Produção de estoque de vírus.....	52
5.5.3.2.	Titulação de vírus gigantes .....	52
5.5.4.	Microscopia eletrônica.....	52
5.6.	Confirmação molecular da presença de vírus.....	53
5.6.1.	Investigação de OPV.....	53
5.6.2.	Investigação de vírus isolado .....	54
5.6.3.	Sequenciamento .....	54
<b>6.</b>	<b>Resultados .....</b>	<b>55</b>
6.1.	Amostras coletadas e processadas .....	55
6.2.	Produção de controles de reação .....	56
6.3.	Triagem das amostras por PCR em tempo real.....	59
6.3.1.	Investigação de <i>Orthopoxvirus</i> .....	65
6.4.	Isolamento de vírus em célula animal.....	70
6.5.	Isolamento de vírus gigantes .....	75
<b>7.</b>	<b>Discussão.....</b>	<b>77</b>
7.1.	Triagem das amostras por PCR em tempo real.....	77
7.1.1.	Investigação molecular de OPV.....	83
7.2.	Isolamento de vírus.....	87
7.3.	Isolamento de vírus em célula animal.....	87
7.4.	Isolamento de vírus gigante .....	88

<b>8. Conclusões .....</b>	<b>90</b>
<b>9. Referência bibliográfica .....</b>	<b>91</b>

## 1. Introdução

### 1.1. As Capivaras

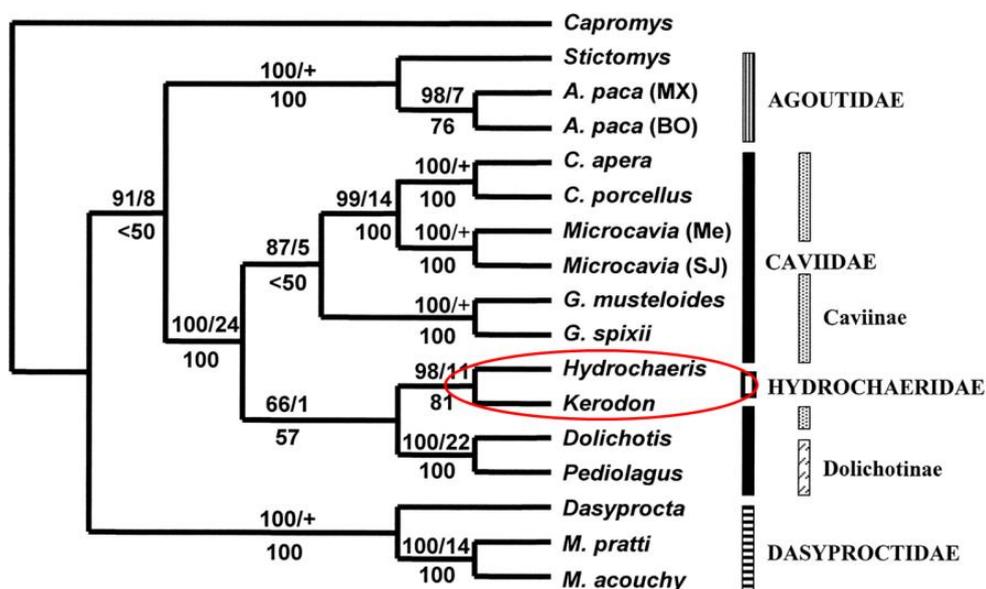
#### 1.1.1. Taxonomia e nomenclatura

As capivaras são os maiores roedores vivos conhecidos. Seu nome popular *capivara* tem origem na língua indígena Tupi, amplamente utilizada durante o século XVI, do termo *kapii'gwara* que significa comedor de capim [*kapii* capim; *gwara* comedor] (MOREIRA et al., 2013). Este é o nome popular mais comumente utilizado no Brasil, no entanto outros mais de 150 termos são utilizados para se referir a este animal ao longo da América do Sul. Entre os mais populares para este animal estão: *chigüire* ou *chigüiro*, utilizados na região da Colômbia e Venezuela; e *caprincho* ou *capincho*, utilizados na região da Argentina, Paraguai e Uruguai (MONES; OJASTI, 1986).

As capivaras pertencem à ordem Rodentia, porém a história da classificação taxonômica reflete a dificuldade em se estabelecer as relações filogenéticas, a partir de caracteres morfológicos e fisiológicos, entre espécies viventes e mesmo utilizando dados de registros fósseis. As capivaras foram oficialmente descritas por Linnaeus em 1766, e desde então diversos nomes científicos e combinações desses nomes foram utilizados na literatura até recentemente, quando uma publicação no *Bulletin of Zoological Nomenclature*, de 1984, reconheceu como oficiais os nomes genérico *Hydrochoerus* (Brisson, 1762), e específico *hydrochaeris* (Linnaeus, 1766). O nome científico reconhecido hoje é *Hydrochoerus hydrochaeris*, que tem sua origem do grego ὕδωρ (*hydor* = água) + χοίρος (*choiros* = porco), cujo significado é porco d'água (MOREIRA et al., 2013a).

Até bem pouco tempo atrás, os livros de inventário de fauna se referiam às capivaras como animais pertencentes à família Hydrochoeridae, dentro da ordem Rodentia (EMMONS; FEER, 1997; MCKENNA; BELL, 1997; NOWALK, 1991). Porém, estudos recentes de sistemática molecular têm apresentado evidências que sugerem a reclassificação da família Hydrochoeridae (Figura 1). Alguns marcadores genéticos utilizados por Rowe e Honeycutt (2002) para estabelecer as relações filogenéticas entre roedores da família Caviidae mostram uma relação próxima entre as capivaras e roedores sul-americanos do gênero *Kerodon*, indicando o rearranjo das capivaras como uma subfamília (Hydrochoerinae) dentro

da família Caviidae. Dados de Trillmich et al. (2009 apud HONEYCUTT, 2013) corroboram esta reclassificação<sup>1</sup>.



**Figura 1.** Árvore filogenética demonstrando a filogenia molecular da superfamília Cavoidea. As análises se basearam em dados de sequência de dois genes nucleares e um mitocondrial. Segundo a combinação de dados moleculares, *H. hydrochaeris* aparece como grupo irmão de *Kerodon*, dentro da família Caviidae. Adaptado de Rowe e Honeycutt (2002).

Outro aspecto interessante da história da classificação deste grupo de animais é o reconhecimento recente, no final do século XX, de uma nova espécie de capivaras *Hydrochoerus isthmius* (Goldman, 1912), cujo nome popular é “capivara Lesser” (MONES, 1984 apud MOREIRA et al., 2013a; MONES; OJASTI, 1986)<sup>2</sup>. Hoje a subfamília Hydrochoerinae apresenta duas espécies viventes: *H. hydrochaeris* e *H. isthmius*. Duas características principais distinguem estas duas espécies: a distribuição geográfica e o tamanho corporal. A espécie *H. hydrochaeris* está amplamente distribuída na América do Sul, sendo encontrada no leste da Colômbia, Venezuela, nas Guianas, Equador, Peru, Bolívia, Brasil, Paraguai, Uruguai e norte e nordeste da Argentina. Enquanto *H. isthmius* pode ser encontrada no Panamá e noroeste da Colômbia e Venezuela e apresenta estrutura corporal menor do que *H. hydrochaeris* (MONES; OJASTI, 1986; WOODS; KILPATRICK, 2005) (Figura 2). As capivaras são, portanto, espécies exclusivas do Novo Mundo.

<sup>1</sup> Trillmich F et al (2004) Species-level differentiation of two cryptic species pairs of wild cavies, genera Cavia and Galea, with a discussion of the relationships between social systems and phylogeny in the Caviinae. Can J Zool 82:516–524.

<sup>2</sup> Mones A. (1984) Estudios sobre la familia Hydrochoeridae. XIV. Revisión sistemática. Senckenb Biol 65:1–17



**Figura 2.** Distribuição das espécies de capivaras. A área sombreada representa a área de distribuição da espécie *H. hydrochaeris* e a área hachurada representa a área de distribuição da espécie *H. istmius*. Moreira, 2012.

### 1.1.2. Características gerais

As capivaras são os maiores roedores vivos, sua estrutura corporal é robusta e bastante peculiar (Figura 3). Indivíduos adultos apresentam altura de cerca de 50 cm (medido na altura da cernelha) e pesam em média 50 kg. O peso pode variar consideravelmente, entre 30 e 90 kg, de acordo com a disponibilidade de recursos. A cabeça é grande, com orelhas curtas e redondas, e o focinho é quadrado. A sua traseira é descendente e a cauda vestigial. As patas são curtas e apresentam quatro dedos no par anterior e três dedos no par posterior. Os dedos são unidos por uma pequena membrana interdigital, que permite um bom deslocamento em ambiente aquático. Seu pelo é grosso e a coloração pode variar bastante, de castanho escuro a castanho claro, incluindo tons avermelhados e cinzas. O macho pode ser diferenciado da fêmea pela presença de uma glândula protuberante no focinho, nomeada *morillo* (MONES; OJASTI, 1986; REIS et al., 2006).



**Figura 3.** Estrutura corporal da capivara. O macho possui uma glândula no focinho, o *morillo*, destacado pela seta branca. A altura média dos animais é dada pela cernelha, e está indicada pela linha pontilhada. Adaptado de ARKive, 2015.

Capivaras de vida livre atingem a maturidade sexual entre 6 e 12 meses de idade, dependendo da estação de reprodução e da qualidade do hábitat. A reprodução pode ocorrer em qualquer época do ano, com frequência de acasalamento mais acentuada na estação chuvosa. Dependendo da idade e das condições do hábitat, as fêmeas podem ter até duas ninhadas por ano. A gestação das capivaras é considerada longa, de cerca de 150 dias, e sua prole pequena, com cerca de seis filhotes por ninhada. No entanto seus filhotes já nascem bastante desenvolvidos e independentes. As capivaras têm longevidade de aproximadamente cinco anos (MOREIRA, 2013b; MIGLINO, 2013; MONES; OJASTI, 1986; OJASTI, 1973).

As capivaras são animais de hábitos gregários e territorialistas, vivem em grupos compostos por machos e fêmeas, desde filhotes até indivíduos adultos (AZCARATE, 1981; HERRERA; MACDONALD, 1989; MACDONALD et al, 1981). Os bandos são liderados por um macho alfa, que se destaca dos demais pelo tamanho. Não há correlação entre tamanho corporal e hierarquia entre os machos subordinados (HERRERA; MACDONALD, 1989). Os machos subordinados atuam como vigilantes para o bando, ocupando a periferia do grupo, enquanto o macho dominante, fêmeas e filhotes ocupam o cerne (HERRERA; MACDONALD, 1993; MACDONALD et al, 1981; YÁBER; HERRERA, 1994).

O tamanho dos bandos varia de acordo com o hábitat e a disponibilidade de recursos limitantes neste hábitat, e segundo Herrera (2013) pode variar entre 5 e 100 indivíduos, sendo mais estáveis os bandos formador por até 30 indivíduos. A área de vida dos bandos também é bastante variável. No pantanal foram observados bandos com área de vida desde 12 a 200 hectares (ha) (SCHALLER; CRAWSHAW, 1981). Estudos realizados na Venezuela

e Colômbia descrevem bandos com áreas de vida entre 10 e 14 ha e 10 e 56 ha, respectivamente (HERRERA, 2013). O perfil de dispersão do bando, no entanto, pode ser alterado diante de variações sazonais dos recursos no hábitat (MALDONADO-CHAPARRO; PALOMINO, 2010). Na estação de seca, por exemplo, em que os recursos estão escassos e distribuídos em uma área restrita, os animais de um bando podem se concentrar nessas áreas, diminuindo consideravelmente a sua área de vida.

As capivaras possuem uma dieta herbívora e apresentam adaptações anatômicas e fisiológicas para tal (BARRETO; HERRERA, 1998; FORERO-MONTAÑA; BETANCUR; CAVELIER, 2003; MONES; OJASTI, 1986; OJASTI, 1973). A dieta pode incluir algas, gramíneas e folhas de vegetação arbustiva, sendo que as espécies vegetais consumidas por estes animais variam de acordo com a composição do hábitat em que vivem (BARRETO; QUINTANA, 2013). A estratégia de forrageio das capivaras sofre variações durante o ano em resposta a variações sazonais do hábitat, sendo um forrageio mais seletivo e voltado principalmente para a vegetação mais palatável e rica em calorias durante a estação chuvosa (devido à abundância deste recurso) (BARRETO; HERRERA, 1998; BARRETO; QUINTANA, 2013; HERRERA; MACDONALD, 1989). Já na estação seca as capivaras são menos seletivas, se alimentando em maior quantidade de vegetação menos palatável e pobre em calorias (BARRETO; QUINTANA, 2013).

As capivaras são animais semi-aquáticos, ocupando uma variedade de hábitats, desde que este seja próximo a corpos d'água, incluindo lagos, lagoas, áreas alagadas ou rios. Elas são ótimas nadadoras e podem permanecer submersas por vários minutos. O ambiente aquático serve como abrigo contra a predação, para termorregulação e acasalamento. No ambiente terrestre utilizam áreas de pastagem para forrageio e áreas de mata tanto para descanso quanto para dar à luz aos filhotes, estas são também refúgio contra a predação. A forte dependência do ambiente aquático não permite que as capivaras se afastem muito do corpo d'água (HERRERA; MACDONALD, 1989; REIS et al., 2011). A atividade das capivaras pode ser acentuada no período do dia ou da noite, e isso vai depender do tipo de ameaça a que está sujeita esta população (EMMONS; FEER, 1997; NOWAK, 1991).

Estudos de dinâmica do uso do hábitat revelam que altas densidades das populações estão relacionadas à presença de grandes áreas de forrageio em campo aberto, claro, e sugerem que grandes áreas de mata preservada, ao invés de favorecer a espécie, reduzam a disponibilidade de recursos alimentares para estes animais, pois a produtividade primária das gramíneas é mais baixa (CORRIALE; ARIAS; QUINTANA, 2011). Então, as características e o manejo das propriedades rurais tornam estas áreas os hábitats preferenciais para as capivaras, com abundância de recursos alimentares providos pela

manutenção de áreas de pastagem para animais ou campos de cultura, água disponível mesmo nas estações secas e ausência de predadores naturais (FERRAZ et al., 2007, 2009; MONES; OJASTI, 1986).

### 1.1.3. Ameaças e conflitos

As ameaças que os animais, de uma forma geral, estão sujeitos podem ser relacionadas a processos naturais, que por si só são difíceis de estudar, e por atividades humanas, que talvez seja o aspecto mais importante e estudado. Estas ameaças podem levar ao declínio da(s) população (ões) e, em casos extremos (porém não incomuns) à extinção de espécies. Em relação às causas naturais podem ser citadas a predação, a desnutrição e as doenças. Quanto às atividades humanas, destacam-se a caça e a destruição ou alteração de ambientes, caracterizados pela colonização humana, agricultura, indústria, exploração de recursos naturais e introdução de espécies exóticas. E a maior ameaça às espécies de roedores, na América do Sul, é o conjunto de atividades humanas, que interferem no hábitat alterando o ambiente (GUDYNAS, 1989).

Apesar das atividades humanas representarem ameaça para os roedores de uma forma geral, as preferências das capivaras em relação ao uso habitat convergem para a facilidade de adaptação destes animais em ambientes antropizados. Assim, as atividades humanas podem até favorecer a dinâmica de populações de capivaras.

Segundo a Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas, as capivaras são animais que não correm atualmente o risco de extinção (IUCN, 2015). Dentro dos critérios utilizados pela IUCN a espécie *H. hydrochaeris* ocupa o *status* de baixo risco de extinção, enquanto para a espécie *H. isthmus* poucos dados estão disponíveis para que seja realizada a avaliação. Ainda segundo este banco de dados, a maior ameaça à espécie *H. hydrochaeris* é a caça para comercialização do couro, enquanto que a maior ameaça para *H. isthmus* é a degradação ambiental, que limita sua área de vida.

Outra forma de ameaça inerente é a predação, que pode ser natural ou relacionada às atividades humanas. Entre os predadores naturais das capivaras estão a onça (*Panthera onca*), o jacaré-de-óculos (*Caiman crocodilus*), o crocodilo-americano (*Crocodylus acutus*), o crocodilo-do-orinoco (*Crocodylus intermedius*), o jacaré-açu (*Melanosuchus niger*), urubus (*Coragyps atratus*), carcarás (*Polyborus plancus*), a cobra sucuri (*Eunectes murinus*), jibóia-constrictora (*Boa constrictor*) e canídeos silvestres. A maioria deles representa ameaça apenas aos jovens e filhotes recém-nascidos, em função do tamanho das capivaras (MONES; OJASTI, 1986).

Além dos predadores naturais, as capivaras enfrentam outra forma de ameaça relacionada à presença humana, a caça. Esta atividade tem várias finalidades, econômicas ou não, como o tráfico de animais, a diversão e a exploração dos produtos da capivara (a carne, o couro e a gordura, cada um com seu valor comercial). Neste contexto os cães domésticos ferozes – utilizados para caça - também podem entrar no rol de predadores, ameaçando principalmente filhotes (MONES; OJASTI, 1986; NOWAK, 1991). Estas atividades foram proibidas no Brasil em 1967, pela Lei Nº 5.197, que tornou crime ambiental qualquer atentado contra a fauna silvestre, principalmente a caça.

A facilidade que as capivaras têm de se adaptar a ambientes antrópicos e antropizados têm se tornado mais evidente com o acentuado avanço das cidades e das atividades humanas em direção aos ambientes silvestres (MOREIRA, 2013a). Este contato íntimo entre capivaras e humanos têm se mostrado passível de conflitos, cada vez mais frequentes e intensos. Em áreas de produção agrícola, no Estado de São Paulo, as capivaras estão presentes e são consideradas pragas e alega-se que as capivaras possam competir com animais de produção por recursos. Ferraz et al. (2003) relacionou a presença de capivaras à danos e perdas de produção agrícola, estimando a destruição de 25% do total da área estudada em função do forrageio destes animais. As capivaras também estão presentes em corpos d'água em áreas limítrofes da cidade, em parques e áreas residenciais. Os conflitos que ocorrem nestas áreas urbanizadas estão relacionados à invasão de propriedade e destruição de jardins ornamentais, infestação de carrapatos e acidentes de trânsito. As capivaras também podem se afogar em piscinas ou atacar humanos quando provocadas. No entanto, o conflito mais evidenciado entre capivaras e humanos em ambiente urbano é a possibilidade da transmissão de doenças zoonóticas, já que estes animais estão envolvidos no ciclo natural de transmissão da zoonose Febre Maculosa (MOREIRA, 2013a; LABRUNA, 2013).

#### **1.1.4. Agentes infecciosos associados às capivaras**

A literatura sobre agentes infecciosos associados às capivaras é escassa e impulsionada por dois principais fatores: a sobreposição de habitat entre estes animais e animais de criação gerando preocupações sobre a possibilidade de transmissão de patógenos entre os animais, podendo ocasionar perdas econômicas; e saúde de capivaras criadas em cativeiro para fins comerciais (CUETO, 2013; NOGUEIRA; CRUZ, 2007). Sabe-se hoje que as capivaras podem albergar uma diversidade de parasitas entre endo- e ectoparasitas, protozoários, fungos e bactérias. A respeito de fungos e bactérias os estudos são ainda mais escassos, geralmente baseados em técnicas que não permitem esclarecer a importância do

patógeno na saúde da capivara ou mesmo a importância da capivara como fonte de infecção para outros animais (NOGUEIRA; CRUZ, 2007).

As ectoparasitoses associadas às capivaras, segundo a revisão de Nogueira e Cruz (2007), são bernese, miíases, carrapatos e sarna. Bernese e miíase foram registradas em animais de cativeiro, no entanto Ojasti (1973) sugere que capivaras silvestres possam ter miíase. Infestações por carrapatos e sarna (*Sarcoptes scabiei*) são observadas tanto em animais de vida livre quanto animais de cativeiro (CUETO, 2013; NOGUEIRA; CRUZ, 2007). Segundo a revisão realizada por Nogueira e Cruz (2007), a infestação por carrapatos (observada em animais de criadouros) não parece ter efeito nocivo aos animais, no entanto há que se considerar que as capivaras podem ser fonte de infecção para outros animais presentes na mesma área, inclusive o homem.

As endoparasitoses podem ser causadas por nematódeos, cestódeos e trematódeos, como as microfilárias, *Oxiurys* sp., *Strongyloides* sp., *Taenia* sp., e *Fasciola hepática*, e estão associadas aos diversos tecidos, inclusive o sangue (CUETO, 2013; NOGUEIRA; CRUZ, 2007). Protozoários também são encontrados, principalmente do grupo dos tripanossomídeos (NOGUEIRA; CRUZ, 2007). Chama a atenção o *Tripanossoma evansi*, transmitido por artrópode, e que causa a doença conhecida como “Mal-dos-quartos”, que provoca sintomas como a perda de peso, apatia, perda de controle dos membros posteriores (MONES; OJASTI, 1986; OJASTI, 1973; WELLS et al., 1981) e que foi relacionado entre as principais causas de mortalidade entre capivaras no pantanal brasileiro (SCHALLER; CRAWSHAW, 1981). O comportamento de aglomeração durante a seca poderia ser um fator para aumentar as chances de infecção, enquanto que na cheia os animais se dispersam realizando um controle parasitário natural (MAYAUDON, 1980 apud CUETO, 2013)<sup>3</sup>.

As capivaras têm um papel muito importante na ecologia da febre maculosa e esta é hoje uma das principais preocupações em relação à presença das capivaras, tanto em ambiente urbano quanto rural (LABRUNA, 2013; NOGUEIRA; CRUZ, 2007). A febre maculosa é causada pela bactéria *Rickettsia rickettsii* e é transmitida a humanos, no Brasil, pela picada do carrapato *Amblyomma cajennense* (carrapato-estrela). Trata-se de uma doença grave em humanos e que pode causar a morte. As capivaras são o principal reservatório vertebrado amplificador da bactéria, porém não o único (HORTA et al, 2009; SOUZA et al, 2009). Além disso, as capivaras são hospedeiras para o carrapato-estrela em diversos estágios de vida do artrópode (LABRUNA, 2013). O aumento da população de capivaras e a

---

<sup>3</sup> Mayaudon H (1980) Sobre una colección de helmintos del chigüire ( *Hydrochoerus hydrochaeris* ) en Venezuela. Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias UCV 28:19–47

intensificação do contato entre capivaras e humanos e animais domésticos podem estar relacionados à re-emergência da febre maculosa no estado de São Paulo na última década (LABRUNA, 2009, 2013).

Além da febre maculosa, as capivaras estão associadas a outras doenças de etiologia bacteriana. Bactérias do gênero *Brucella* sp. e anticorpos específicos para este patógeno foram encontrados em capivaras (NOGUEIRA; CRUZ, 2007). A revisão de Nogueira e Cruz indica alguns estudos que sugerem as capivaras como reservatório alternativo para a bactéria causadora da brucelose. Outro grupo de bactérias também encontrado em capivaras é *Leptospira* sp., comum à roedores em geral e que não causam sintomas clínicos nestes, mas estão associados à doenças em humanos. *Mycobacterium bovis* foi isolada de capivaras de cativeiros após a morte destas com sintomatologia da doença, em animais de vida livre não se encontrou nem a bactéria e nem anticorpos (NOGUEIRA; CRUZ, 2007).

#### **1.1.5. Vírus associados às capivaras**

Os estudos de vírus em capivaras, realizados até o presente momento, tiveram o enfoque principal em grupos de vírus de importância veterinária relacionados à saúde de animais de produção. Este foco de estudo se deve principalmente à notável presença de capivaras nos arredores das fazendas, justificada pela preferência de uso do hábitat do animal. No entanto, um vírus de grande importância na saúde humana, o vírus da raiva, e vírus relacionados à doença de roedores/capivaras também foram estudados. O número de grupos virais associados à capivaras não é muito grande, e pouco se sabe sobre impacto da presença destes vírus em capivaras no ciclo de natural transmissão (Tabela 1).

**Tabela 1.** Vírus associados a capivaras. Alguns vírus, de diferentes grupos taxonômicos, foram associados à capivaras por diferentes técnicas de estudo.

<b>Vírus</b>	<b>Taxonomia</b>	<b>Técnica de estudo</b>	<b>Observações</b>	<b>Referência</b>
Vírus da raiva (RABV)	<i>Mononegavirales;</i> <i>Rhabdoviridae;</i> <i>Lyssavirus</i>	Isolamento e sorologia (soroneutralização).	Baixa positividade na sorologia.	NOGUEIRA; CRUZ, 2007
Vírus da estomatite vesicular (VSV)	<i>Mononegavirales;</i> <i>Rhabdoviridae;</i> <i>Vesiculovirus</i>	Infecção experimental, isolamento e sorologia (microneutralização).	Mostrou apenas a presença de anticorpos. Sugere infecção subclínica.	NOGUEIRA; CRUZ, 2007
Herpesvírus bovino tipo-1 (BoHV-1)	<i>Herpesvirales;</i> <i>Herpesviridae;</i> <i>Alphaherpesvirinae;</i> <i>Varicellovirus</i>	Sorologia: microaglutinação passiva (+) soroneutralização (-)	Positividade não encontrada no estudo mais recente. Viés de detecção de BoHV-5.	NOGUEIRA; CRUZ, 2007; MILAGRES, 2004
<i>Vaccinia virus</i> (VACV)	<i>Poxviridae;</i> <i>Chordopoxvirinae;</i> <i>Orthopoxvirus</i>	Infecção experimental e sorologia (soroneutralização)	Sorologia em animais de vida livre.	MOREIRA, 1955; BARBOSA. et al, 2014
Coronavírus	<i>Nidovirales;</i> <i>Coronaviridae</i>	Microscopia eletrônica.	Não foi realizado estudo molecular e nem isolamento viral	CATROXO et al., 2010
Vírus da febre aftosa (FMDV)	<i>Picornavirales;</i> <i>Picornaviridae;</i> <i>Aphthovirus</i>	Infecção experimental, isolamento e sorologia.	Susceptibilidade do animal e transmissão pelas fezes.	GOMES; ROSENBERG, 1984
Vírus EMCV	<i>Picornavirales;</i> <i>Picornaviridae;</i> <i>Cardiovirus</i>	Sorologia: soroneutralização.	Surto em zoológico, não foi isolado.	WELLS, et al, 1989; YEO et al., 2013.
Vírus da leucose bovina (BLV)	<i>Retroviridae;</i> <i>Deltaretrovirus</i>	Sorologia: Imunodifusão em ágar.	Positividade não encontrada no estudo posterior.	MARÍN et al., 1980; MILAGRES, 2004
Vírus de encefalite equina (VEEV, EEEV, WEEV)	<i>Togaviridae;</i> <i>Alphavirus</i>	Sorologia: Hemaglutinação e soroneutralização.	Positividade apenas em testes de hemaglutinação.	NOGUEIRA; CRUZ, 2007; WELLS et al., 1981
Vírus da influenza equina	<i>Orthomyxoviridae;</i> <i>Influenzavirus A</i>	Soroneutralização.	Positivo	WELLS et al., 1981

O primeiro vírus isolado de capivaras foi o vírus da raiva [*Rabies virus* (RABV)], isolado por um pesquisador brasileiro no início do século XX (em 1929). Esta espécie pertence ao gênero *Lyssavirus* (família *Rhabdoviridae*), um grupo de vírus zoonóticos que infecta uma ampla gama de hospedeiros entre os mamíferos, principalmente carnívoros, causando uma meningoencefalite aguda de rápida progressão e fatal na grande maioria dos casos

(HEMACHUDHA et al., 2013; LYLES; RUPPRECHT, 2007). Após seu isolamento a partir de amostras de capivaras foram realizados estudos sorológicos que mostraram baixa positividade de anticorpos nos animais (BELLO et al., 1974 apud NOGUEIRA; CRUZ, 2007)<sup>4</sup>.

Outro vírus, também pertencente à família *Rhabdoviridae*, estudado em capivaras foi o vírus da estomatite vesicular (VSV), hoje reconhecido como um grupo dentro do gênero *Vesiculovirus*. Este grupo de vírus está associado a hospedeiros mamíferos, como cavalos, bois, porcos e humanos, e insetos de grupos variados, de forma que são considerados arbovirus (DIETZGEN; KUZMIN, 2012; RODRÍGUEZ; PAUSZEK, 2012). Os VSV foram estudados em capivaras por infecção experimental por Restrepo et al. (1980 apud NOGUEIRA; CRUZ, 2007)<sup>5</sup>. Neste estudo foram utilizadas várias vias de inoculação do vírus, porém não foi possível observar manifestações clínicas e nem recuperar vírus no sangue ou órgãos dos animais infectados, no entanto anticorpos neutralizantes foram encontrados. Com este resultado, apesar de não ser possível estabelecer o grau de susceptibilidade dos animais ao VSV, os autores do trabalho sugeriram que uma explicação alternativa poderia ser a ocorrência de uma infecção subclínica.

Outro vírus já investigado em capivaras foi o *Bovine herpesvirus 1* (BoHV-1), do gênero *Varicellovirus* (família *Herpesviridae*), que apresenta grande importância na saúde animal. Este vírus foi inicialmente investigado por microaglutinação em um trabalho que apresentou 72,7% de soropositividade dos animais testados (BOHRER, 1987 apud NOGUEIRA; CRUZ, 2007)<sup>6</sup>. Posteriormente um estudo investigou a presença de anticorpos neutralizantes em populações de capivaras de Minas Gerais e São Paulo e não encontrou anticorpos neutralizantes (MILAGRES, 2004). Hoje sabemos que BoHV-1 e BoHV-5, ambos pertencentes ao mesmo gênero, são antigenicamente muito semelhantes e praticamente indistinguíveis em ensaios sorológicos de rotina (DELHON, 2003), portanto os resultados devem levar em consideração a presença/ausência também de BoHV-5 nas populações estudadas.

A investigação de *Vaccinia virus* (VACV) em capivaras teve início na década de 50. O VACV pertence ao gênero *Orthopoxvirus* (família *Poxviridae*), um grupo de vírus de grande importância humana pelo potencial zoonótico que apresentam (ESSBAUER; PFEFFER;

---

<sup>4</sup> BELLO, N. A.; LORD, V.; LASERNA, R. Enfermedades infecciosas que afectan el chiguire (*Hydrochaeris hydrochaeris*) en Venezuela. Revista Veterinaria Venezolana, v. 278 (jul/set), p. 32-46, 1984.

<sup>5</sup> RESTREPO S., G.; ESTUPINAN A., J.; GERARDINO, A. G.; RUEDA A. F.; JIMÉNEZ T, J. M. Susceptibilidad del chiguire (*Hydrochoerus hydrochoeris*) al virus de estomatitis vesicular. Revista ICA, v. 15, n. 2, p. 123-127, 1980

<sup>6</sup> BOHRER, J. L.; FILARDI, L. S.; SIMON, F.; IKUNO, A. A.; MUELLER, S. B. K. Presença de anticorpos contra o vírus da rinotraqueíte infecciosa dos bovinos/vulvovaginite pustular infecciosa (IBR/IPV) em capivaras (*Hydrochoeris hydrochoeris*, LIN.). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 54, n. 1/4, p. 45-48, 1987.

MEYER, 2010). A ocorrência natural das espécies pertencentes ao gênero é bastante específica, geralmente restrita a um único continente, exceto para os VACV, que estão distribuídos no Brasil (*Vaccinia virus* brasileiros - VACV-BR) e na Índia (*Buffalopox*) (DAMON, 2007; ESSBAUER; PFEFFER; MEYER, 2010; LEDERMAN et al., 2007; LEVINE et al., 2007; NAKAZAWA et al., 2013; REYNOLDS; CARROL; KAREM, 2012;). O VACV está relacionado a surtos de doença exantemática principalmente em humanos e bovinos de produção leiteira, apresentando, portanto, um grande impacto na saúde humana e animal. O ciclo natural de transmissão dos VACV-BR está, de alguma forma, relacionado a pequenos roedores uma vez que vírus já foram isolados destes animais (ABRAHÃO et al., 2009c FONSECA et al., 1998, 2002). O primeiro estudo de VACV em capivaras foi um trabalho de infecção experimental em animal de cativeiro, que incluía também outros animais da fauna brasileira. Neste estudo foi possível observar a multiplicação viral pela formação das lesões características no animal (MOREIRA, 1955). Recentemente uma investigação sorológica de populações silvestres de capivara encontrou indícios da circulação do vírus entre os animais, inclusive em regiões sem registro da presença do vírus (BARBOSA et al., 2014). Estas evidências, associadas às características ecológicas das capivaras, apontam uma possível participação destes animais no ciclo natural de transmissão do VACV. No entanto é preciso confirmar a presença de vírus nessas populações, e realizar mais investigações para entender o papel que as capivaras exercem no processo.

Outro grupo de vírus recentemente associado às capivaras são os coronavírus (CoV). Os coronavírus são vírus classificados na família *Coronaviridae* e compreendem vírus relacionados às infecções em diversos mamíferos inclusive ao homem, causando doenças do trato respiratório, entérico, hepático e neurológico com gravidades variadas (LAI; PERLMAN; ANDERSON, 2007). Estes vírus foram associados a capivaras após um estudo sobre um surto de diarreia em animais de cativeiro. Neste estudo, partículas virais com características de CoV foram visualizadas, por microscopia eletrônica, em amostras de fezes dos animais, no entanto nenhuma caracterização molecular ou mesmo o isolamento viral foi realizado (CATROXO et al., 2010). Apesar da evidência apresentada, não é possível determinar se as capivaras são hospedeiros naturais de CoV ou se este foi apenas um caso isolado de escape viral. Assim, estes dados mostram que muitas lacunas da relação dos CoV com as capivaras precisam ser preenchidas.

A investigação de vírus da febre aftosa [*Foot and mouth disease virus* (FMDV)] é a que apresenta os dados mais completos, com várias evidências que sugerem a participação de capivaras no ciclo natural do vírus. Inicialmente foi demonstrada a susceptibilidade das capivaras através da infecção experimental de animais mantidos em cativeiro e

posteriormente foi relatada a infecção natural de uma capivara mantida em cativeiro, junto a bovinos, onde havia ocorrido um surto da doença (NOGUEIRA; CRUZ, 2007). Neste caso foi registrada a presença de lesões nos animais, semelhantes às que acontecem em bovinos. No estudo de susceptibilidade, vírus foram isolados das fezes até dez dias pós-infecção (d.p.i.), e anticorpos neutralizantes foram encontrados por vários dias após a infecção. A transmissibilidade do vírus entre as capivaras e animais domésticos também foi relatada durante o estudo de infecção experimental (GOMES; ROSENBERG, 1984).

O vírus da encefalomiocardite [*Encephalomyocarditis virus* (EMCV)], que possui roedores como hospedeiros naturais, também foi associado às capivaras por estudos de sorologia. No estudo de Wells et al. (1989) foi investigado um surto de EMCV em animais de zoológico na Polônia, entre eles uma capivara que morreu possivelmente em decorrência da doença. Este animal apresentava os sinais clínicos comum da doença antes da morte e, pesquisa de anticorpos apresentou positividade para este vírus. No entanto, neste trabalho não se obteve sucesso no isolamento viral. Yeo et al. (2013) testaram amostras de soro de animais de um zoológico em Singapura, entre eles dez capivaras, contra uma amostra de EMCV isolado de tecidos coletados de felinos deste mesmo local, que haviam morrido por miocardite. Oito das capivaras testadas apresentaram anticorpos contra o vírus.

Anticorpos específicos para o vírus da leucose bovina [*Bovine leukemia virus* (BLV)] foram detectados por imunodifusão em ágar em amostras de capivaras silvestres da Venezuela, no estudo conduzido por Marín et al. (1980 apud NOGUEIRA, CRUZ, 2007)<sup>7</sup>. A população estudada por Milagres (2004) através da mesma técnica, composta por animais silvestres da região de São Paulo e Minas Gerais, não apresentou resultados positivos nas amostras testadas.

A revisão de Nogueira e Cruz (2007) cita a investigação da presença de anticorpos, através de duas técnicas sorológicas distintas, em 213 amostras para vírus da família *Togaviridae*. Neste trabalho foram investigadas a presença dos vírus da encefalite equina venezuelana [*Venezuelan equine encephalitis virus* (VEEV)], vírus da encefalite equina do leste [*East equine encephalitis virus* (EEEV)] e vírus da encefalite equina do oeste [*Western equine encephalitis virus* (WEEV)]. A técnica de hemaglutinação apontou oito amostras positivas, porém nada foi encontrado através da soroneutralização. Wells (1981) também não encontrou positividade em seu trabalho utilizando a técnica de soroneutralização para estes vírus. O vírus da influenza equina [*Influenza A virus*], da família *Orthomyxoviridae*, foi

---

<sup>7</sup> MARÍN, C.; LÓPEZ, N. de; ALVAREZ, L. de; CASTAÑOS, H.; ESPAÑA, W.; LÉON, A.; BELLO, A. Humoral spontaneous response to bovine leukaemia virus infection in zebu, sheep, buffalo and capybara. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON BOVINE LEUKEMIA, 40., 1980, Bologna, Itália. **Proceedings**...Bologna, 1980, p. 310-319.

investigado por Milagres (2004) através da técnica de inibição da hemaglutinação e a positividade encontrada foi de aproximadamente 2%.

A relação entre as capivaras e os vírus citados acima ainda não é bem estabelecida, mesmo com os dados apresentados (exceto para FMDV, que já apresenta dados bem robustos). São necessários mais estudos para confirmar a susceptibilidade e capacidade de transmissão dos vírus pelas capivaras, bem como o seu papel na dinâmica de circulação dos mesmos. Afinal estes animais estão na zona de transição entre ambiente silvestre e doméstico e podem carregar muitos patógenos ainda desconhecidos para o homem. Em sentido inverso, também podem carregar doenças relacionadas ao homem para ambientes silvestres, onde novos reservatórios podem surgir.

## **1.2. Emergência de doenças infecciosas**

O surgimento de doenças infecciosas desconhecidas ou mesmo o aumento significativo nos casos de doenças previamente conhecidas e/ou controladas não são eventos incomuns ao longo da história da humanidade, no entanto foi apenas no final do século passado que estas doenças foram categorizadas como “doenças infecciosas emergentes e re-emergentes” e os cientistas e autoridades/organizações de saúde pública se reuniram para começar a estudar os aspectos comuns na dinâmica destes processos. A descoberta do HIV na década de 1980, bem como sua implicação no aumento da incidência de outras doenças previamente controladas em populações humanas, e o surgimento de outras doenças de origem zoonótica foram fatores determinantes para dar início a estes estudos. O aumento do número de doenças infecciosas emergentes, principalmente depois de um período de controle de doenças humanas, como a erradicação da varíola e controle de outras doenças alavancou os estudos dessas doenças como um grupo e, desde o final da década de 80 vários eventos têm sido realizados, e esforços empregados no sentido de discutir sobre as doenças emergentes: origem; fatores relacionados e que direcionam a emergência; estratégias de detecção, controle, prevenção e até mesmo predição da emergência e re-emergência (LEDERBERG; SHOPE; OAKS, 1992; MORENS; FAUCI, 2012; MORSE, 1998; MORSE; SCHLUEDERBERG, 1990).

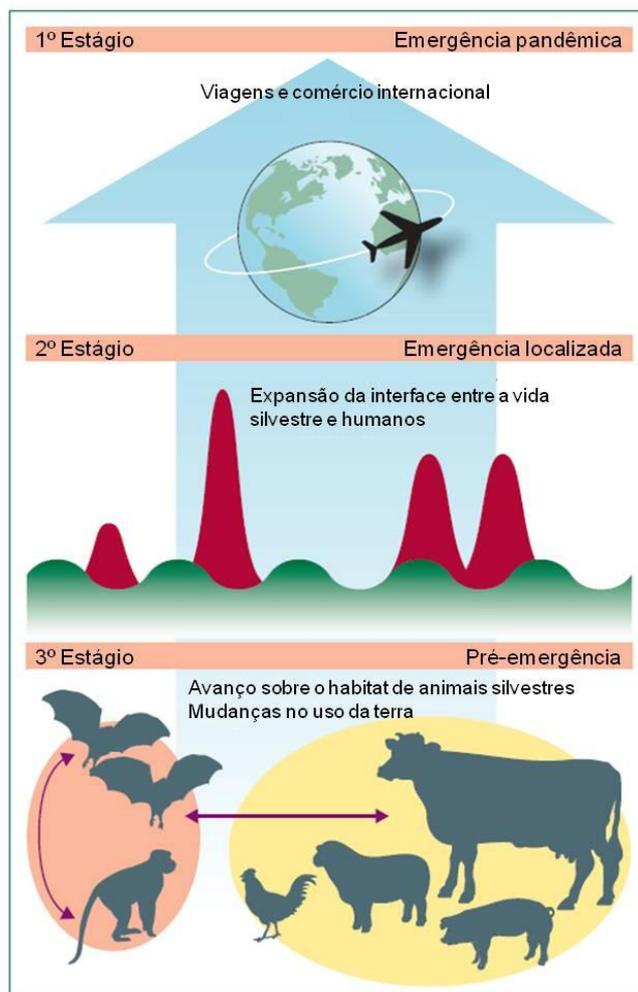
As doenças infecciosas emergentes e re-emergentes (DIE) podem ser definidas como (a) doenças infecciosas recém-descobertas ou (b) causada por patógenos recém-evoluídos, ou (c) doenças infecciosas que apresentam um recente aumento de incidência ou abrangência geográfica, ou (d) doenças infecciosas que passaram a infectar uma nova população hospedeira (DASZAK; CUNNINGHAM; HYATT, 2000; LEDERBERG; SHOPE; OAKS, 1992; MORSE, 1993, 1995; MORSE, 1998; MORSE; SCHLUEDERBERG, 1990). Apesar do

destaque das doenças emergentes humanas, estas definições se adequam também para doenças de caráter infeccioso em outras espécies, e em qualquer esfera apresenta um impacto na dinâmica dessas populações. Dessa forma, as doenças infecciosas emergentes apresentam grande importância para a saúde humana, saúde de animais domésticos e animais silvestres, além de outros aspectos da conservação ambiental.

Diante da importância das doenças emergentes, vários estudos têm focado em aspectos da prevenção e predição das DIE, principalmente aquelas de caráter desconhecido, no entanto entender o processo de emergência é o ponto de partida. Sabe-se que se trata de um processo de causa multifatorial, dependendo de fatores relacionados à tríade: ambiente – agente infeccioso – hospedeiro (MORSE, 1995). Ainda segundo Morse (1995), as alterações na dinâmica dessa tríade devem interferir em três pontos chave para favorecer o processo de emergência: no contato entre o agente infeccioso e o hospedeiro, no sucesso da infecção e na capacidade de transmissão entre indivíduos. Assim, aspectos comportamentais relacionados ao hospedeiro (homem e/ou animais), bem como fatores relacionados ao ambiente, podem favorecer o contato com o agente infeccioso. Enquanto que o sucesso da infecção pode ser favorecido por fatores intrínsecos e extrínsecos, relacionados ao agente e ao hospedeiro. Por fim, o comportamento do hospedeiro ou o ambiente podem determinar a transmissão do parasita para sua perpetuação (MORSE, 1995).

O modelo do processo de emergência de pandemias de caráter zoonótico proposto por Morse et al.(2012), baseado na dinâmica de infecção, sugere três estágios de emergência de acordo com o acometimento em humanos: (a) um estágio inicial de pré-emergência, no qual humanos não são infectados, no entanto a emergência do patógeno em novas populações ou espécies hospedeiras é favorecida; (b) um segundo estágio de emergência localizada, no qual humanos são infectados pelo contato direto ou indireto com animais domésticos e silvestres infectados; e (c) um terceiro estágio, no qual há a transmissão entre humanos e a disseminação generalizada do patógeno (Figura 4). A pré-emergência muitas vezes pode passar despercebida, uma vez que populações humanas não são afetadas. Este estágio ocorre em função de um desequilíbrio nas relações ecológicas, evento este que tem se tornado cada vez mais comum em função da interferência humana, e que propiciam o contato do agente infeccioso com uma nova população ou espécie susceptível. Os casos de emergência localizada, por sua vez, recebem mais atenção dos órgãos de saúde pública, já que populações humanas são afetadas. No entanto, podem passar despercebido como parte do processo de emergência de pandemias, tanto pela limitação no alcance da doença quanto pela sua gravidade. Os casos de emergência de pandemia, estes sim são mais frequentemente notificados, já que ocorre em escala global. Assim, estima-se ainda que a

ocorrência dos dois primeiros estágios seja muito comum do que é observado (MORSE et al., 2012).



**Figura 4** - Modelo de emergência de pandemias de caráter zoonótico. No estágio inicial de pré-emergência não há infecção em humanos, no entanto alterações na dinâmica de transmissão entre hospedeiros permitem que o patógeno alcance novas populações e/ou hospedeiras. No estágio de emergência localizada, humanos são infectados diretamente ou através de fômites por animais domésticos ou silvestres. No estágio de emergência pandêmica, há a transmissão sustentada pessoa-pessoa e em larga escala. Adaptado de MORSE et al., 2012.

No último século foi notório o aumento do número de DIE causando impactos na saúde pública e na economia. No levantamento realizado por Jones et al. (2008), das DIE no período entre 1940 e 2004, cerca de 60% das doenças identificadas tinham origem zoonótica, ou seja, a fonte eram outros animais que não humanos, e 71% delas estariam relacionadas a animais silvestres. Isso possivelmente se deveu à intensificação e ampliação das atividades humanas em direção ao ambiente silvestre neste século e indica que o principal sítio de emergência de doenças é a interface entre o ambiente doméstico e silvestre, onde o homem pode ter contato com animais portadores (hospedeiros ou reservatórios) dos agentes etiológicos destas doenças. Ainda neste estudo a diversidade de

espécies silvestres foi correlacionada com o número de DIE, de forma que as regiões tropicais, *hot-spot* de biodiversidade, são também *hot-spot* de emergência de novas doenças de origem zoonótica.

As doenças infecciosas emergentes podem ser causadas por agentes infecciosos diversos, até mesmo príons. As DIE causadas por vírus são chamadas Virozes Emergentes (VE), não são as DIE mais frequentes segundo o estudo de Jones (2008), porém não são menos importantes. O vírus são as entidades biológicas mais diversas do planeta e suas características revelam peculiaridades que refletem em uma grande plasticidade, assim os vírus estão presentes em todos os ambientes e podem infectar seres vivos em qualquer um dos três domínios da vida. A plasticidade dos vírus está relacionada à sua estratégia evolutiva de produção de uma enorme progênie, sujeita a processos que interferem na fidelidade da replicação do genoma, resultando em variabilidade genética. Além disso, os vírus podem exibir genoma de RNA, cuja taxa de mutações é ainda mais elevada que nos vírus de DNA. Essas mutações podem proporcionar adaptações aos vírus que permitem o alcance de novos hospedeiros, e mesmo a adaptação a um novo hospedeiro. E assim, o sucesso da infecção em um novo hospedeiro pode ser determinada, entre outros, pela plasticidade genética dos vírus.

## 2. Justificativa

O contato próximo entre as capivaras e o homem e os seus animais domésticos, seja em ambiente urbano ou rural, tem se intensificado em função de um processo relativamente recente de expansão das atividades humanas. Estas atividades implicam em destruição ou alteração de ambientes naturais, fragmentando e/ou reduzindo as áreas naturais preservadas e aumentando a faixa de transição entre o ambiente doméstico e silvestre. Ao contrário do que ocorre para outras espécies silvestres, estas mudanças possuem impacto positivo para as capivaras, pois elas se adaptam bem e encontram neste ambiente alterado condições favoráveis para a expansão das populações. Assim, as populações de capivara tendem a aumentar e se manter em sítios próximos ao contato com humanos e seus animais domésticos, sem deixar de frequentar o ambiente silvestre.

A presença de populações de capivaras em ambientes antrópico ou antropizado é passível de conflitos com humanos e uma das principais preocupações diz respeito à possibilidade de transmissão de doenças. Por transitarem entre ambientes domésticos e silvestres, as capivaras podem atuar em duas frentes no contexto da transmissão das doenças: transmitindo doenças de origem doméstica ao ambiente silvestre e do ambiente silvestre para o ambiente doméstico. No contexto das doenças infecciosas emergentes de origem silvestre, as capivaras podem ocupar um papel central, como reservatório e amplificador do agente infeccioso, ou um papel secundário, como vetor. Em ambos os casos, o seu próximo contato com populações de animais domésticos e com humanos favorece a introdução de agentes infecciosos no ambiente doméstico. Em relação às doenças infecciosas previamente conhecidas e associadas a animais domésticos, inclusive aquelas de caráter zoonótico, as capivaras podem representar um reservatório alternativo para os patógenos relacionados, uma vez que o controle destas doenças tem sua limitação nas ações e interferências apenas na sanidade destes animais domésticos. Assim, mesmo que seja realizado o controle da saúde de animais domésticos e humanos, uma vez que o agente infeccioso escapa para populações silvestres de capivaras é possível que ele volte a infectar os animais domésticos (e, conseqüentemente, humanos no caso das doenças zoonóticas), dado o contato tem aumentado das capivaras com estes animais.

A principal doença zoonótica até então associada às capivaras é a Febre Maculosa, causada pela bactéria *Rickettsia rickettsii* e transmitida pelo carrapato-estrela. As capivaras podem participar do ciclo da doença ao albergarem o carrapato vetor quando infectadas pela bactéria, de maneira que atuam tanto como reservatório amplificador da bactéria quanto hospedeira no ciclo de vida do seu vetor. A transmissão de carrapatos infectados a humanos e animais domésticos ocorreria por compartilhamento de habitat entre estes e as

capivaras. Alguns outros patógenos de importância médica e veterinária também já foram associados às capivaras, porém a participação deste animal no ciclo de transmissão de tais patógenos ainda permanece desconhecida.

Em relação aos vírus, pouco se sabe a respeito da diversidade viral associada às capivaras e o pouco que se sabe diz respeito a evidências indiretas da presença ou contato desses vírus com os animais. Dado o caráter ambivalente das capivaras em relação ao ambiente, que é tanto peridoméstico quanto silvestre, as capivaras ocupam então uma posição estratégica para o tráfego viral, promovendo a ponte entre os ambientes, uma premissa fundamental para a emergência de viroses. O modelo proposto para o processo de emergência de doenças de caráter zoonótico, por sua vez, aponta as alterações nas relações ecológicas entre espécies e o aumento da interface com a vida silvestre como dois pontos cruciais para a emergência destas doenças. Apesar do enfoque humano do modelo, estes pontos ressaltam a importância de outros animais no processo de emergência de zoonoses. Independente da ocorrência de infecções em humanos há um impacto na saúde animal que deve ser considerado, sejam estes animais domésticos ou silvestres. Entre os animais domésticos e de produção, além do bem estar animal, existe também uma questão econômica envolvida. Já entre animais silvestres a emergência de doenças infecciosas pode representar um risco para as espécies.

A investigação de agentes infecciosos e vigilância epidemiológica na zona de interface entre o ambiente doméstico e silvestre permitiriam delinear estratégias de prevenção e controle de doenças entre os ambientes. Ainda no início da década de 1980, os trabalhos de virologia já destacam a importância de se estabelecer um sistema de vigilância para garantir a segurança de animais domésticos que têm contatos com as capivaras. E de uma forma geral, os estudos sobre a dinâmica de doenças infecciosas emergentes têm destacado a importância da investigação e vigilância de patógenos em populações silvestres. Diante disso, a investigação se faz necessária e imprescindível, tanto para o conhecimento da diversidade viral hoje existente nesses animais, quanto para a vigilância epidemiológica do que já se conhece.

Uma abordagem que têm se mostrado bastante eficiente é a investigação molecular dos agentes virais, que permite detectar e identificar mais rapidamente estes vírus e, muitas vezes, independentemente (ou paralelamente) de isolamento. Esta abordagem tem sido usada tanto em estudos de investigação de biodiversidade viral quanto na identificação dos vírus envolvidos em surtos. Nos trabalhos de investigação de biodiversidade em hospedeiros vertebrados a amostragem é um ponto crítico dos trabalhos, pois geralmente envolve a captura e manipulação dos animais para a coleta de espécimes clínicos. A

investigação a partir de amostras de fezes compreende uma estratégia interessante e com abordagem não invasiva de amostragem, pois minimiza o contato e a interferência humana em relação à população estudada. Esta abordagem, além de ser bem vista do ponto de vista da conservação, minimiza os esforços empregados na coleta de amostras, pois não há necessidade de capturar e conter quimicamente o animal, e reduz gastos. Este tipo de abordagem têm se mostrado bastante eficiente, tanto na investigação de agentes virais emergentes quanto de aspectos da sua ecologia, como a identificação das populações mantenedoras e área de circulação do vírus.

Considerando as características ecológicas das capivaras e como estas características permitem que este animal tenha um contato próximo com humanos e animais domésticos, seria possível que estes animais exercessem um papel importante no desencadeamento da etapa de emergência localizada de doenças emergentes e re-emergentes, possibilitando que populações humanas fossem infectadas por vírus de origem silvestre, ou mesmo que estes animais se tornassem um reservatório alternativo para vírus já eliminado de populações humanas e de animais domésticos. Assim, a proposta deste trabalho é conduzir uma investigação sobre a presença de vários grupos virais em capivaras, evidenciando vírus com potencial para emergência ou re-emergência. O conhecimento sobre os agentes infecciosos associados às capivaras é um aspecto muito importante nos estudos a respeito da espécie, pois permite a realização de um manejo mais assertivo tanto para animais de vida livre quando animais de cativeiro.

### **3. Objetivos**

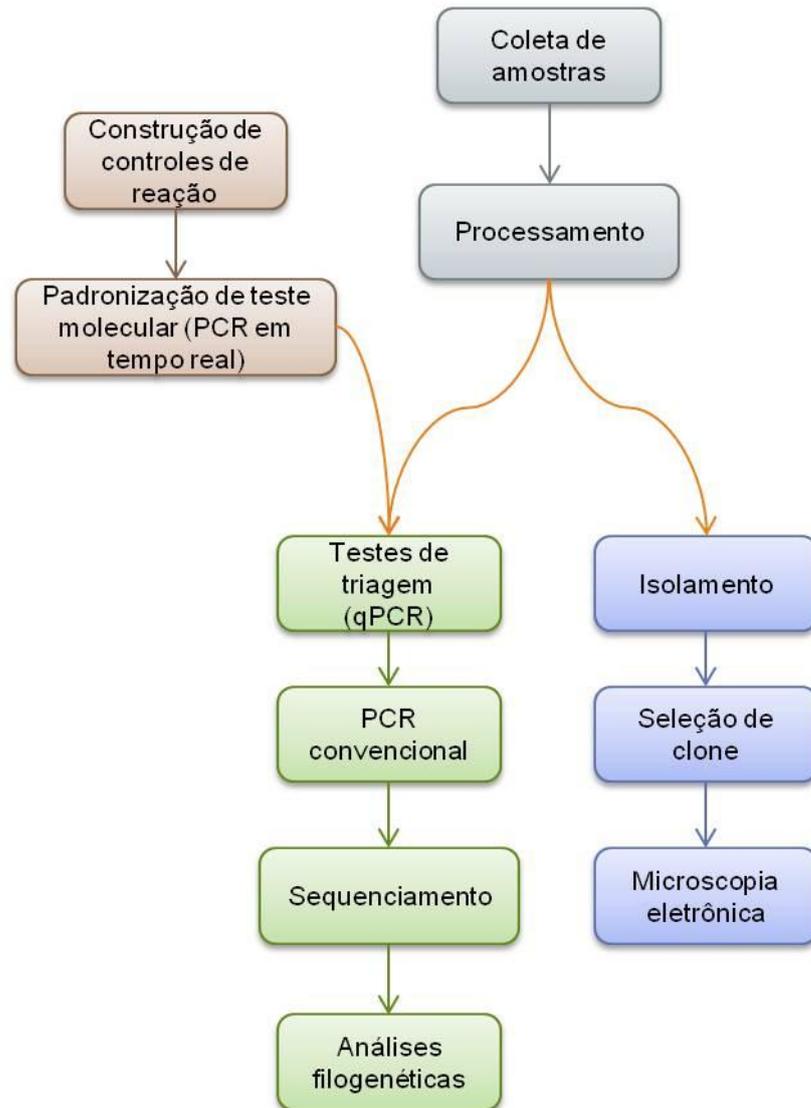
#### **3.1. Objetivos gerais**

O objetivo geral deste trabalho é detectar vírus de importância médica e ambiental em amostras de fezes de capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*).

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Realizar testes de triagem das amostras coletadas para os vírus de interesse;
- Identificar e confirmar as amostras positivas;
- Isolar vírus a partir das amostras coletadas.

#### 4. Fluxograma de trabalho



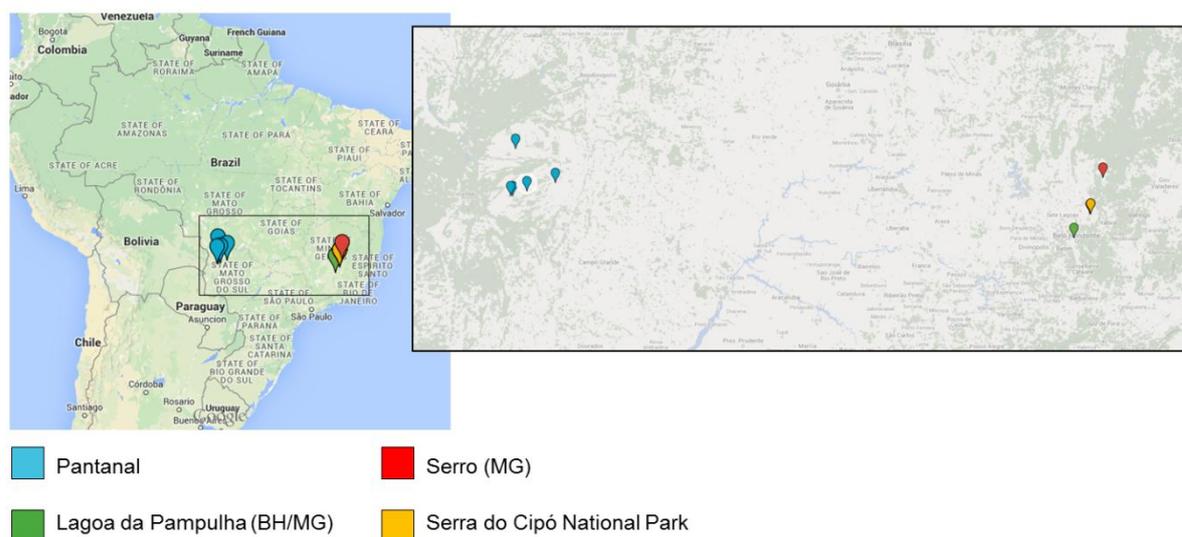
## 5. Metodologia

### 5.1. Coleta das amostras

A metodologia de coleta e processamento inicial das amostras foi definida baseando-se em dados obtidos em estudo anterior (AMBROSIO, 2013), no qual amostras de fezes de capivaras foram coletadas na Lagoa da Pampulha (43°58'46"W, 19°51'04"S) para a padronização de uma PCR em tempo real com o propósito de detectar OPV neste espécime clínico específico. Os testes de padronização levaram em consideração, além da biologia molecular envolvida, a definição de parâmetros de coleta para a garantia de obtenção de amostras de qualidade.

#### 5.1.1. Sítio de Coleta

A coleta das amostras ocorreu entre agosto de 2012 e março 2013 em dois biomas brasileiros: no Cerrado e no Pantanal (Figura 5). No Cerrado as amostras foram coletadas: (a) na zona rural do município do Serro (MG); (b) na Lagoa da Pampulha, município de Belo Horizonte (MG); e (c) no Parque Nacional da Serra do Cipó (MG). No Pantanal as coletas foram realizadas no interior do Mato Grosso do Sul (MS), na região noroeste do estado. As regiões de coleta divergiram entre si tanto na composição do hábitat quanto nos padrões de interação entre humanos, animais de produção e animais silvestres.



**Figura 5.** Sítio de coleta das amostras. As amostras de fezes foram coletadas em regiões distintas do Brasil, compreendendo dois biomas brasileiros: Cerrado e Mata Atlântica. Dez amostras foram coletadas próximo à Lagoa das Capivaras, na Serra do Cipó; uma amostra coletada na zona rural do município do Serro (MG); cinco amostras em pontos distintos na região do Pantanal; e uma na Lagoa da Pampulha, no município de Belo Horizonte (MG).

No município do Serro a principal atividade econômica é a produção leiteira, portanto, apesar de estar inserido numa região de Cerrado, apresenta paisagem bastante modificada para esta atividade. Além disso, o manejo do gado exige contato direto e muito intenso entre o animal e o produtor. A coleta nesta região ocorreu nos arredores de uma fazenda, próximo ao curso d'água, em um fragmento de vegetação nativa preservado.

O PARNA Serra do Cipó também está inserido no Cerrado e, por ser uma área de preservação, apresenta o ambiente pouco modificado e uma dinâmica de interação entre humanos e animais bastante diferente do que ocorre no Serro. Existem fazendas nas proximidades do Parque, então gado e cavalos circulam na região, porém o contato não é tão intenso. Já presença humana na região é bastante intensa, dado o caráter turístico do parque, porém o contato direto entre humanos e animais é pouco provável.

A Lagoa da Pampulha está situada numa região de transição entre Cerrado e Mata Atlântica, porém é um local de ambiente completamente alterado. Além de estar situada numa área urbana, a Lagoa da Pampulha é uma lagoa artificial que recebe água de oito afluentes da região metropolitana de Belo Horizonte. Por ser um ponto turístico da cidade, a Lagoa recebe muitos visitantes e também é utilizada pela população como área de lazer e de prática de esportes. Os bandos de capivaras são facilmente avistados na região e os animais não se intimidam com a presença humana na região, portanto o contato entre animais e humanos é muito próximo e intenso.

Na região do Pantanal a criação de gado é uma atividade bastante importante e em sua maioria é realizado o manejo extensivo destes animais. Assim o rebanho pasta livremente durante a maior parte do ano, sendo recolhido para inspeções e vacinação poucas vezes ao ano, uma dinâmica completamente diferente do que ocorre na região do Serro (MG). Com isso fica claro que o contato humano com estes animais é quase inexistente. No entanto, o contato do gado com animais silvestres é muito mais propício, principalmente durante as cheias, quando o gado se desloca para as terras altas onde se situam as áreas de mata nativa preservada.

### **5.1.2. Método de coleta das amostras de fezes**

As amostras foram coletadas a partir de fezes encontradas no ambiente, sendo coletados cinco péletes do topo de cada montículo de fezes. Estas amostras foram coletadas e acondicionadas em tubos cônicos de 50 mL, em condições estéreis, e armazenadas à seco sob baixas temperaturas (-20°C) ou imediatamente encaminhadas ao laboratório para processamento. Dados de georreferenciamento e aspecto relativo à hidratação também foram coletados. Todas as amostras foram processadas e a partir delas obtidos os materiais

para isolamento de vírus (diluições, filtragens e enriquecimento) e ensaios biologia molecular (diluições, extrações de DNA e RNA e produção de cDNA).

### **5.1.3. Procedimentos iniciais no laboratório**

Em laboratório, as amostras foram processadas em capelas de fluxo laminar, com material estéril conforme descrito a seguir. Inicialmente as amostras foram pesadas em balança semi-analítica para o cálculo da diluição inicial na proporção 1:10 p/v. Este material foi então macerado com água na proporção estabelecida e agitado em agitador do tipo vortex para garantir a máxima homogeneidade possível. Após esta homogeneização, o material foi brevemente centrifugado em baixa rotação (30' a 500 rpm, centrífuga Eppendorf® 5430R, rotor F-35-6-30) apenas para garantir a separação das fibras vegetais para que o material da fase aquosa pudesse ser coletado. Esta fase aquosa foi então coletada e utilizada para posterior processamento (AMBROSIO, 2013).

## **5.2. Processamento das amostras de fezes**

As amostras de fezes coletadas foram processadas para obtenção de diferentes materiais a serem utilizados nos ensaios que geraram este trabalho. A partir do sobrenadante obtido no procedimento inicial realizado em laboratório foram preparadas as amostras empregadas em tentativas de isolamento de vírus e testes de detecção viral. Para o isolamento foram preparados três tipos de amostras: (a) diluídas em meio, (b) filtradas e (c) enriquecidas. Para os ensaios de biologia molecular foram utilizados DNA e cDNA, obtidos a partir da extração de ácidos nucleicos, e diluições das amostras.

### **5.2.1. Amostras para isolamento de vírus**

Uma alíquota do sobrenadante de preparação inicial de fezes (item 5.1.3) foi diluída em meio para obtenção de amostra para isolamento. A diluição foi realizada em Meio Mínimo Essencial de Eagle (MEM) Gibco® suplementado com 2% de Soro Fetal Bovino (SFB) Cultilab®, anfotericina B (fungizona) [5 µg/µL], gentamicina [100 µg/mL] e penicilina [400 U/mL]. As amostras para isolamento foram diluídas nas proporções final de 1:200 e 1:400 p/v a serem utilizadas da primeira etapa de ensaios de isolamento de vírus em célula animal.

As amostras filtradas também foram obtidas a partir de uma alíquota do sobrenadante de preparação inicial de fezes (item 5.1.3). Inicialmente este sobrenadante foi submetido ao processo de lise celular por congelamento para liberação de possíveis partículas virais presentes no interior de células. Após o processo de lise cada amostra foi filtrada em

membrana de 1,2 µm, seguida da filtração em membrana de 0,2 µm, e o filtrado obtido foi diluído em meio para utilização na primeira etapa de isolamento. O filtrado foi diluído em meio MEM suplementado com antibióticos (conforme descrito acima) para a obtenção das diluições finais 1:50 e 1:200 p/v. Estas amostras foram utilizadas para isolamento de vírus em célula animal.

As amostras enriquecidas foram obtidas a partir da incubação de uma alíquota do sobrenadante de preparação inicial de fezes (item 5.1.3) em meio seguida de filtração. Após o enriquecimento as amostras foram utilizadas para o isolamento de vírus gigantes. O enriquecimento consistiu na inoculação de 500 µL do sobrenadante de amostras em 4,5 mL de meio água-arroz (40 grãos de arroz em 1L de água, sem adição de antibióticos) e incubação à temperatura ambiente e na ausência de luz. Nos dias 5º e 20º de incubação, as amostras receberam um inóculo contendo  $5 \times 10^3$  células de ameba, e no 30º dia as amostras foram filtradas. A primeira filtração foi realizada em membrana de 1,2 µm para remoção de partículas grandes de sujeira. A segunda filtração foi em membrana de 0,2 µm para a retenção de vírus gigantes. Esta membrana foi eluída em 500 µL de solução tampão salina fosfato (PBS) (NaCl 137mM; KCl 7mM;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1,4mM; pH 7,2) e utilizada no processo de isolamento.

### **5.2.2. Amostras para ensaios de biologia molecular**

A extração de DNA foi realizada com *QIAamp DNA Stool Mini Kit*® (QIAGEN, EUA) a partir de uma alíquota de sobrenadante de amostra de fezes (item 5.1.3). Utilizou-se o protocolo de isolamento de DNA de fezes para a detecção de patógenos, especificado pelo manual do fabricante do kit, para extração a partir de uma alíquota de 200 µL de amostra. Ao final do protocolo, o DNA foi diluído em 100 µL do tampão fornecido pelo fabricante. Este DNA foi armazenado a -20°C e utilizado em reações de PCR.

A extração de RNA foi realizada com o kit *QIAamp Viral RNA Mini Kit*® (QIAGEN, EUA) a partir de uma alíquota de sobrenadante de amostra de fezes (item 5.1.3). O protocolo de extração foi realizado conforme especificado pelo fabricante, utilizando 140 µL de amostra no início do processo e o produto final foi diluído em 60 µL de tampão. O RNA obtido foi utilizado para a produção de cDNA em um ensaio de transcrição reversa da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR).

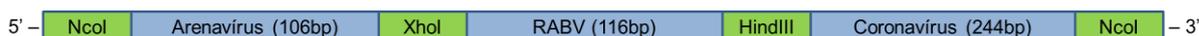
A RT-PCR foi realizada com a enzima *M-MLV Reverse Transcriptase* (Promega Corporation-EUA) utilizando o protocolo do fabricante com adequações. Na primeira etapa 14 µL de RNA obtido da amostra e 0,5µg de iniciadores aleatórios, no volume final de 15 µL, foram incubados por 5' a 70°C. Após incubação em gelo, foram adicionados tampão RT-

PCR 5X (Tris a 250 mM pH 8.9, MgCl<sub>2</sub> a 15 mM, KCl a 375 mM, DTT a 50 mM), 2,0 µL de dNTP (10 mM) e 1,0 µL (200 U) de enzima M-MLV RT (200 U/µL) à solução, que foi incubada a 37°C por 1h. O cDNA produzido foi diluído em 50µL de água de injeção e armazenado à -20°C.

### 5.3. Produção de estoque do controle positivo das reações

Neste trabalho foram utilizados como controle de reação DNAs ou produtos de PCR, alguns deles foram clonados em plasmídeo para a produção de estoques. Esses controles foram obtidos a partir da amplificação dos fragmentos de interesse por PCR, seguido de clonagem em plasmídeo e transformação de bactérias competentes. Em virtude das limitações de biossegurança para manipulação de alguns grupos de vírus, o controle positivo das respectivas reações foi produzido a partir de DNA sintético, construído em bloco gênico gBlocks® *Gene Fragments IDT* de 500pb. Outros controles foram obtidos a partir da multiplicação do vírus de interesse para a extração de ácidos nucleicos.

O bloco gênico utilizado neste trabalho, por ora denominado gBlock ARCoV, foi construído com sequências de *Alphacoronavirus*, *Arenavirus* e *Lyssavirus* intercaladas com sítios de enzimas de restrição para a produção de controle de reações (Figura 6) (ALVES, 2015). Além destes, foram preparados controles para reação de qPCR para detecção e PCR para identificação de enterovírus, utilizando como alvo a região 5'UTR e a proteína estrutural VP1 respectivamente.



**Figura 6.** Organização das sequências do gBlock ARCoV. A sequência de nucleotídeos do gBlock ARCoV compreende fragmentos da sequência de arenavírus, vírus da raiva e coronavírus, intercalados com sítios de enzimas de restrição.

#### 5.3.1. Multiplicação viral

Vírus da espécie *Enterovirus C*, sorotipos Poliovirus 1 (PV-1), PV-2 e PV-3, obtidos da vacina atenuada de pólio, Polio Sabin™ (SB Biologicals), foram multiplicados em células Vero. As células foram cultivadas de acordo com o protocolo descrito em 4.5.1. O vírus foi diluído na concentração 1x10<sup>7</sup>TCID<sub>50</sub> utilizando meio MEM suplementado com 2% SFB, L-glutamina [2 mM] e antibióticos (anfotericina B [2,5 µg/mL]; gentamicina [50 µg/mL]; e penicilina [200 U/mL]) e então inoculado em monocamada de células apresentando aproximadamente 90% de confluência. As células foram incubadas em estufa com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e temperatura de 37°C e foram observadas diariamente. Após a observação de efeito citopático (ECP), o sobrenadante foi coletado para extração de RNA. O

processo de extração de RNA e produção de cDNA foi realizado conforme descrito no ítem 5.2.2 e o cDNA utilizado em reação de PCR.

### 5.3.2. Amplificação de DNA/cDNA por PCR convencional

O bloco gênico sintético e fragmentos de interesse do genoma de PV foram amplificados em reações de PCR realizadas com enzima caseira ou com a enzima *GoTaq® Hot Start Colorless Mastermix* (Promega). A reação para amplificação do gBlock ARCoV utilizou iniciadores que flanqueiam o bloco gênico, em um programa cuja temperatura de pareamento foi de 50°C (ALVES, 2015). Esta reação utilizou como molde 1 e 10ng de ácido nucléico do gBlock e foi realizada em duplicata, uma utilizada no fracionamento em gel de agarose e a outra armazenada para utilização no processo de clonagem. As reações para a amplificação dos fragmentos alvo de interessem em Poliovírus, utilizaram as temperaturas de pareamento de 50 e 40°C para 5'UTR e VP1, respectivamente. Essas reações utilizaram 5 µL de cDNA de PV e foram realizadas em volume maior, uma fração do produto submetida ao fracionamento em gel e o restante utilizado no processo de clonagem.

Para as reações com enzima caseira foram utilizados DNA/cDNA molde, MgCl<sub>2</sub> [2,5 mM], iniciadores de interesse *forward* e *reverse* [200 nM], dNTP [0,4 mM] e 0,2 ou 0,5 µL de Taq polimerase (unidades “arbitrárias”) caseira de acordo com o volume da reação (20 ou 50 µL). Nas reações com enzima comercial utilizou-se o tampão de reação 2X (de pH 8.5 e com dNTP [0,4 mM] e MgCl<sub>2</sub> [4 mM]), iniciadores de interesse senso e anti-senso [200 nM], DNA/cDNA molde e água num volume final de 25 ou 50 µL, dependendo da reação.

As reações de amplificação foram realizadas em termociclador Mastercycler® (Eppendorf, Hamburg, Alemanha). As condições de reação utilizadas foram (a) uma etapa inicial de desnaturação a 95°C por 5 ou 10 minutos, (b) seguida de 30 ciclos de: etapa de desnaturação a 95°C por 30 segundos a 1 minuto, etapa de pareamento, com temperatura variável de acordo com os iniciadores, e etapa de extensão a 72°C por 1 minuto; seguida de (c) extensão final a 72°C por 10 minutos. Ao final das reações, os produtos obtidos foram fracionados por eletroforese em gel de agarose 1,5% com tampão Tris-acetato EDTA (40 mM Tris, 20 mM ácido acético, e 1 mM EDTA) e corado com SYBR® Safe (Invitrogen).

Após a amplificação, os fragmentos de interesse foram clonados em plasmídeo *pGEM®-T Easy Vector System I* da Promega e utilizado para a obtenção de uma preparação de DNA plasmidial.

### 5.3.3. Obtenção dos plasmídeos

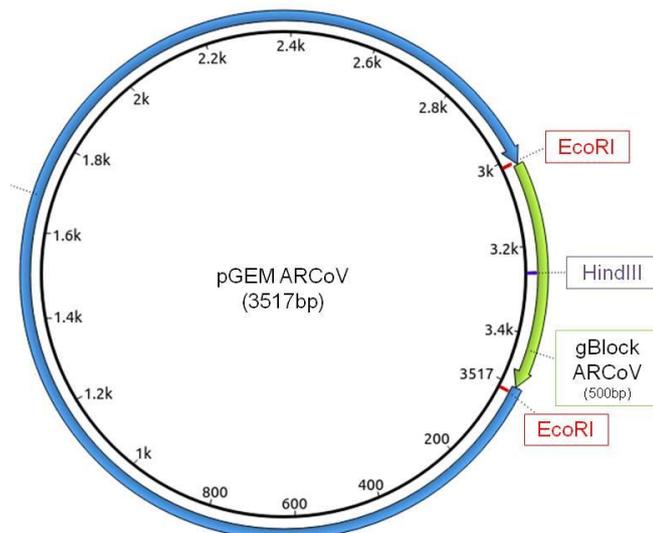
Cada fragmento de interesse, por ora denominado inserto, foi ligado em um plasmídeo *pGEM®-T Easy Vector System I*. O protocolo foi realizado conforme as especificações do fabricante. Vetor e inserto, na razão de 3:1, foram incubados na presença de 3 U de T4 DNA ligase e tampão, num volume final de 10 µL, por 24 horas à 4°C. Os plasmídeos resultantes foram utilizados para a transformação de bactérias competentes.

A transformação de bactérias DH5-alfa competentes foi realizada, seguindo o protocolo de Sambrook & Russel (2001) com algumas adaptações, para cada plasmídeo produzido. Vetor e inserto foram incubados em gelo por 30' e em seguida submetidos a choque térmico: incubação a 42°C por 2 minutos e incubação em gelo logo em seguida. A bactéria foi plaqueada em meio *Lysogeny broth* (LB) (Bertani, 1951) (triptona [1%], extrato de levedura [0,5%] e NaCl [1%]) suplementados com ágar [1%] e ampicilina [100 µg/mL] para a triagem das bactérias com o vetor *pGEM*. As placas foram incubadas em estufa de bactérias a 37°C por 12h. Após esse período de incubação, seis colônias foram selecionadas e incubadas em meio LB, suplementado com ampicilina [100 µg/mL], por 1 hora.

A confirmação da presença do vetor com o inserto nas bactérias da cultura foi realizada através da amplificação do inserto por PCR, conforme o protocolo descrito anteriormente. Ao final, 1 µL da cultura contendo vetor e inserto foi inoculado em 10 mL de meio LB com ampicilina [100 µg/mL] e incubado em agitação, a 37°C, por 16 h. A cultura foi utilizada em protocolo de minipreparação de plasmídeo (miniprep).

O protocolo de *miniprep* foi realizado com o kit *Miniprep – Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega), conforme preconiza o fabricante. A confirmação da presença do vetor *pGEM*, contendo inserto de interesse, na preparação plasmidial foi realizada por amplificação do fragmento de interesse ou por digestões individuais com as enzimas de restrição, seguida do fracionamento por eletroforese em gel de agarose. A amplificação dos fragmentos de interesse foi realizada conforme o protocolo descrito em 5.3.2. As digestões individuais com enzimas de restrição foram realizadas tendo como alvo os sítios de restrição exclusivos do gBlock.

No caso do gBlock era esperado que, após a digestão completa do plasmídeo, o fracionamento em gel da amostra digerida com HindIII apresentasse uma banda única na altura de 3500pb em função da presença de um único sitio de digestão para tal enzima no fragmento clonado. Já na amostra digerida por EcoRI era esperada uma banda de cerca de 500pb e uma de 3000pb, em função da presença de dois sítios de digestão específicos flanqueando a região de clonagem (Figura 7).



**Figura 7** – Representação esquemática do plasmídeo pGEM ARCoV. O plasmídeo pGEM ARCoV possui dois sítios de digestão para a enzima EcoRI, flanqueando o inserto, e um sítio de digestão para HindIII, no meio do inserto.

Para as digestões com enzima de restrição 900 ng da preparação plasmidial e 1,5 unidade das enzimas de interesse, HindIII ou EcoRI (Promega®), foram incubados em tampão adequado e volume final de 20 µL, por 3 h a 37°C. Após o período de incubação o produto da digestão foi fracionado em gel de agarose 1,5%.

#### 5.4. Triagem das amostras de fezes de capivara por qPCR

Foram selecionados para a investigação preliminar, por teste de qPCR, grupos de vírus de importância humana e veterinária. A seleção dos vírus alvo levou em consideração aspectos ecológicos, relacionados aos vírus, aos hospedeiros (animais de produção/humanos) e às capivaras, que pudessem sugerir uma possível forma de contágio das mesmas ou destes animais. Ao total, foram utilizados dezesseis pares de iniciadores, disponíveis na literatura e no Laboratório de Vírus, para a detecção de vírus de doze famílias virais: *Herpesviridae*, *Rhabdoviridae*, *Coronaviridae*, *Picornaviridae*, *Adenoviridae*, *Arenaviridae*, *Caliciviridae*, *Flaviviridae*, *Reoviridae*, *Poxviridae*, *Mimiviridae* e *Marseilleviridae* (Tabela 2).

Assim, foram selecionados alguns grupos de vírus previamente associados às capivaras: vírus da raiva (gênero *Lyssavirus*), vírus da estomatite vesicular (VSV, gênero *Vesiculovirus*), *Vaccinia virus* (VACV), herpesvírus bovino do tipo 1 (*Bovine herpesvirus 1*, BoHV-1) e coronavírus (CoV). Além dos estudos prévios, sugerindo a susceptibilidade das capivaras por ensaios sorológicos, isolamento ou infecção experimental, alguns aspectos ecológicos de cada grupo sugerem uma possível via de transmissão entre vírus e capivaras.

Entre os grupos de vírus selecionados sem indicações prévias de infecção ou susceptibilidade estão: o (a) Herpesvírus bovino do tipo 2 (*Bovine herpesvirus 2*, BoHV-2) e

(b) Vírus da diarreia bovina viral (*Bovine viral diarrhea virus*, BVDV), ambos relacionados a doenças vesiculares em bovinos; os (c) arenavírus (gênero *Arenavirus*), vírus de circulação em ambiente silvestre; os vírus gigantes (d) *Acanthamoeba polyphaga mimivirus* (APMV, família *Mimiviridae*), (e) Mamavírus e (f) *Acanthamoeba polyphaga marseillevirus* (APMaV, família *Marseilleviridae*), vírus ambientais com possível potencial zoonótico; (g) adenovírus (Família *Adenoviridae*), (h) norovírus (gênero *Norovirus*), (i) rotavírus (gênero *Rotavirus*), (j) Vírus da hepatite A (gênero *Hepatovirus*) e (k) enterovírus (gênero *Enterovirus*), vírus de importância para a saúde humana transmitidos/veiculados pela água.

Estes vírus foram categorizados em: (a) vírus causadores de doenças vesiculares em bovinos; (b) vírus de importância médica humana e veterinária; (c) vírus gigantes; e (d) vírus de transmissão pela água (Tabela 2).

**Tabela 2** – Vírus alvos para triagem de amostras. Iniciadores desenhados para detecção de 17 grupos de vírus foram utilizados para triagem das amostras de fezes.

<b>Categoria</b>	<b>Grupo alvo</b>	<b>Molde para qPCR</b>	<b>Referência</b>
<b>Doenças vesiculares de bovinos</b>	Ortopoxvírus	Diluição	Alves, PA
	Vírus da estomatite vesicular	cDNA	HOLE; CLAVIJO; PINEDA, 2006
	Vírus da diarreia bovina viral	cDNA	Barboa-Stancioli*
	Herpes bovino tipo 1 e 5	cDNA	Barbosa-Stancioli*
	Herpes bovino tipo 2	cDNA	Alves, PA*
<b>Doenças de importância humana e veterinária</b>	Coronavírus	cDNA	Alves, PA
	Arenavírus	cDNA	Alves, PA
	Vírus da raiva	cDNA	Alves, PA
<b>Vírus gigantes</b>	Marseillevírus	cDNA	GEPVIG
	Mamavírus	cDNA	GEPVIG
	Mimivírus	cDNA	GEPVIG
<b>Doenças humanas transmitidas pela água</b>	Adenovírus	cDNA	Alves, PA*
	Hepatovírus	cDNA	Alves, PA*
	Rotavírus	cDNA	Alves, PA*
	Norovírus	cDNA	Alves, PA*
	Enterovírus	cDNA	Dierssen, 2008 modificado por Oliveira, DB*

\* Dados não publicados.

A seleção de vírus relacionados à doenças vesiculares em bovinos levou em consideração a sobreposição de habitats entre capivaras e bovinos, que vêm se intensificando nos últimos tempos, e que poderia proporcionar uma via de transmissão destes vírus entre os animais. A seleção dos vírus de importância médica humana e veterinária, mencionados acima, levou em consideração o fato de capivaras transitarem entre ambientes silvestres e domésticos, podendo “transportar” os vírus entre estes dois ambientes, e a ocorrência destes vírus em uma ampla gama de animais (como é o caso de RABV e CoV) ou sua íntima relação com roedores (como é o caso dos arenavírus). A seleção de vírus gigantes para triagem neste estudo foi baseada no isolamento de amostras virais nas regiões de coleta das amostras de capivaras e no possível potencial zoonótico, recentemente atribuído a estes vírus por associação sorológica a animais silvestre e correlação a casos de pneumonia em humanos. A seleção dos vírus causadores de doenças exclusivamente humanas, acima mencionados, foi baseada na transmissão de tais vírus pela via fecal-oral, principalmente através de água contaminada, e no hábito semi-aquático das capivaras, que poderia facilitar a infecção destes animais em caso de susceptibilidade.

Os testes de triagem das amostras foram realizados na plataforma qPCR, StepOne™ (Applied Biosystems®), utilizando SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems®). As reações foram realizadas com cDNA ou amostra diluída como molde, iniciadores senso e anti-senso [400 nM] ou [800 nM], *master mix* e água em um volume final de 10 µL. As condições de reação utilizadas foram: (a) uma etapa de desnaturação a 95°C por 10 minutos; seguida de (b) 40 ciclos de: uma etapa de desnaturação a 95°C por 15 segundos, e uma etapa de pareamento e extensão de 60°C por 60 segundos; seguida de uma etapa final de dissociação. A análise dos resultados foi realizada utilizando o software StepOne® versão 2.1 da Applied Biosystems. Foram consideradas suspeitas as amostras que apresentaram amplificação, mesmo que em ciclos ( $C_i$ ) tardios, com temperatura de dissociação ( $T_m$ ) próxima (variando em até 3°C) ou igual ao controle da reação.

### **5.5. Isolamento de vírus**

Os ensaios de isolamento de vírus foram realizados em cultivos de células animais de linhagem contínua, dos tipos Vero e BHK-21, e em células de *Acanthamoeba castellanii*. As células de linhagem contínua foram utilizadas para o isolamento de vírus de animais e as células de *A. castellanii* foram utilizadas para o isolamento de vírus gigantes. As células Vero, oriundas de epitélio de rim de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*), foram utilizadas como um sistema celular mais propício ao isolamento de vírus de animais em geral. A linhagem de células BHK-21, oriundas de fibroblastos de rim de hamster neonato, foi utilizada como um sistema celular possivelmente relacionado às células de capivaras

dada a proximidade filogenética entre ambos. Foram realizados quatro diferentes ensaios: (a) em células Vero, utilizando amostras diluídas; (b) em células BHK-21, utilizando amostras diluídas; (c) em células Vero, utilizando amostras filtradas; e (d) em células de *A. castellanii*, utilizando amostras enriquecidas.

### 5.5.1. Cultivo de células

As células BHK-21 e Vero foram mantidas em cultura em estufas com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e temperatura em torno de 37°C. As células foram implantadas em garrafas de plástico de 75cm<sup>2</sup>, específicas para cultivo de células, com MEM (suplementado com 5% de SFB, L-glutamina [2 mM] e antibióticos) e repicadas a cada 2/3 dias. O repique consistiu na remoção do meio e lavagem da monocamada com PBS, destacamento das células com tripsina/EDTA (NaCl 136 mM; KCl 5 mM; glicose 55mM; NaHCO<sub>3</sub> 69 mM; 0,5 g p/v tripsina 1:250 [Difco]; EDTA 0,5 mM; 1% vermelho de fenol), implantação de 5,0 x10<sup>6</sup> células em uma nova garrafa de cultivo e adição de 25 mL de meio de cultura. Para os ensaios em células foram preparadas placas de seis poços (9,5 cm<sup>2</sup>/poço) com 4x10<sup>5</sup> células/poço e garrafas de 25 cm<sup>2</sup> com 1,0 x10<sup>6</sup> células. Estas preparações foram utilizadas entre 18 e 24 horas após implantação, com aproximadamente 85% de confluência.

As células de *A. castellanii* foram cultivadas em cultura em estufa com atmosfera livre de CO<sub>2</sub> a 28°C. Para a manutenção do cultivo, as células foram implantadas em garrafas de plástico de 75 cm<sup>2</sup> com Meio Peptona Levedura Glicose (PYG) suplementado com 7% de SFB e antibióticos, e repicadas a cada 2/3 dias. O repique consistiu em destacamento mecânico das células após 5 minutos de banho de gelo, implantação de 6,0 x10<sup>6</sup> células em uma nova garrafa de cultivo e adição de 25 mL de meio de cultura. Para os ensaios de isolamento e multiplicação de vírus em *A. castellanii* foram preparadas placas de 24 poços (1,9 cm<sup>2</sup>/poço) com 3,0 X10<sup>5</sup> células/poço, placas de 96 poços (0,32 cm<sup>2</sup>/poço) com 4,0x10<sup>4</sup> células e garrafas de 25 cm<sup>2</sup> com 3,5x10<sup>6</sup> células, ambas em meio PYG. Estas preparações foram utilizadas entre 18 e 24 horas após implantação.

### 5.5.2. Isolamento de vírus em célula animal

As amostras previamente preparadas (item 5.2.1) foram utilizadas em diferentes ensaios de isolamento de vírus em célula animal. As amostras diluídas em meio foram utilizadas para infecção em células Vero e BHK-21, as amostras filtradas foram utilizadas apenas em células Vero. O processo de isolamento foi realizado em placas de seis poços, preparadas conforme descrito no ítem 5.5.1, e foram utilizadas as duas diluições já preparadas, tanto as amostra filtradas como não filtradas.

O meio de cultura presente nos poços foi removido e 200 µL de amostra foram utilizados para adsorção durante uma hora em estufa, com intervalo de homogeneização a cada 10 minutos. Após a adsorção foi adicionado, por poço, 1,0 mL de meio MEM suplementado com 2% de SFB e antibióticos (o dobro da concentração de cultivo especificada no item 5.5.1). As células foram mantidas em estufa de CO<sub>2</sub> (5%), a 37°C, e observadas diariamente por um período de 3 a 5 dias. Após este período, célula e sobrenadante foram coletados para a realização de mais uma passagem.

Para a próxima passagem a solução contendo célula e sobrenadante foi submetida ao processo de lise celular por congelamento (três séries de congelamento/descongelamento), seguida da homogeneização em sonicador (3 ciclos de homogeneização por ultrassom em banho por 30 segundos, com intervalos de 30 segundos em banho de gelo), a solução foi diluída em meio suplementado com soro e com antibióticos (conforme descrito acima). As diluições 1:2 e 1:4 foram utilizadas para inoculação nos poços. Os processos de adsorções e manutenção das placas foram realizados conforme descrito acima. As células foram observadas diariamente por igual período e coletadas ao final. Cada ensaio foi realizado até a 3ª passagem. As células apresentando efeito citopático foram utilizadas no processo de seleção clonal através da purificação de placa.

#### **5.5.2.1. Seleção de clones**

No processo de seleção de clones foram utilizadas placas de seis poços, preparadas conforme descrito no item 5.5.1, utilizando o sistema celular em que o vírus foi isolado. As células, coletadas em processo anterior (item 5.5.2), foram lisadas por descongelamento, e diluídas para inoculação em monocamada. As células foram infectadas seguindo o protocolo descrito para o isolamento e, após a adsorção, foi adicionado 1,0 mL de preparação de meio sólido (MEM suplementado com 2% SFB, antibióticos na concentrações descrita para isolamento e 1% de agarose). A placa foi incubada em estufa e observada até o aparecimento do ECP que, quando observados, foram coletados pontual e individualmente. Foram coletados pontos apresentando efeitos isolados e com aspectos diferentes entre si. Cada clone coletado foi diluído em meio na proporção 1:10 e novamente inoculado em células utilizando as duas concentrações ( $10^0$  e  $10^{-1}$ ). O protocolo seguiu conforme descrito acima, após adsorção foi adicionado meio com agarose aos poços e a placa foi incubada em estufa. De cada clone utilizado foi selecionado um ponto específico de ECP para coleta, que ocorreu conforme descrito acima. Este protocolo se repetiu até a 5ª rodada de seleção de clones. O material coletado nesta última etapa foi armazenado a -70°C.

### **5.5.3. Isolamento de vírus gigantes**

O ensaio foi realizado inicialmente em placas de 24 poços, preparadas conforme descrito no item 5.5.1. Cada amostra foi diluída seriadamente na razão de 10 em PBS e utilizada em três concentrações: solução inicial,  $10^{-1}$  e  $10^{-2}$ . Cada poço recebeu 100  $\mu$ L de amostra e as placas foram incubadas em estufa (conforme descrito para o cultivo de amebas). As células foram observadas diariamente e, após 4 dias de incubação, coletadas para uma nova passagem. A coleta consistiu em raspagem das células e coleta, juntamente com o meio.

As passagens subsequentes foram realizadas em placas de 96 poços. As amostras coletadas anteriormente passaram pelo processo de lise celular por congelamento e foram então diluídas seriadamente na razão de dez em PBS. Para inoculação foram utilizados 100  $\mu$ L das seguintes concentrações de cada amostra: solução inicial,  $10^{-1}$  e  $10^{-2}$ . Novamente as células foram incubadas em estufa e observadas. Ao final de quatro dias as amostras foram coletadas conforme descrito anteriormente. Este processo foi repetido até a 5ª passagem.

#### **5.5.3.1. Produção de estoque de vírus**

Células apresentando ECP da multiplicação de vírus gigantes foram coletadas e utilizadas para a produção de estoque de vírus. Uma alíquota de 100 $\mu$ L da amostra coletada (célula e sobrenadante) foi lisada por congelamento e então inoculada em uma garrafa de células de 25  $\text{cm}^2$  previamente preparada (item 5.5.1). Após um período de incubação de quatro ou seis dias o vírus multiplicado foi coletado e alíquotado. Uma alíquota dos estoques produzidos foi utilizada em ensaios de titulação e de microscopia eletrônica.

#### **5.5.3.2. Titulação de vírus gigantes**

Os estoques de vírus foram titulados por TCID<sub>50</sub> conforme descrito a seguir. Inicialmente a amostra de vírus foi diluída seriadamente na razão de dez em PBS até a diluição  $10^{-11}$  e todas as diluições utilizadas para inoculação em células, exceto a solução inicial ( $10^0$ ). Um volume de 100 $\mu$ L de solução foi inoculado por poço, em um total de quatro poços por diluição. Ao final a placa foi incubada em estufa, conforme preconizado para o cultivo de amebas, e as leituras realizadas no 4º, 7º ou 11º d.p.i.

### **5.5.4. Microscopia eletrônica**

Amostras de vírus isolados foram preparadas para análise em Microscópio Eletrônico de Transmissão Tecnai G2-12 - SpiritBiotwin FEI - 120 kV. O preparo consistiu na fixação das células, previamente infectadas com vírus, para o envio ao Centro de Microscopia da UFMG (CEMEL). O processo de fixação foi precedido da remoção do meio e lavagem da

monocamada com tampão fosfato [0,2 M]. Após a remoção completa da solução de lavagem as células foram fixadas por um processo de incubação com uma solução contendo tampão fosfato [0,2M] e glutaraldeído [2,5%] a 4°C por 1 hora. Posteriormente a solução de fixação foi removida e a amostra incubada a 4°C em tampão fosfato [0,1 M] para envio ao Centro de Microscopia Eletrônica da UFMG (CEMEL), onde foram preparadas lâminas para visualização ao microscópio eletrônico (ME).

As células Vero foram implantadas em placa de Petri, de acordo com o protocolo de cultivo celular, para infecção após 24 horas, com aproximadamente 90% de confluência. A infecção consistiu na inoculação de 400µL de amostra, seguindo protocolo de infecção descrito anteriormente. Após a observação clara de ECP, as células foram fixadas e enviadas para análise.

Células de *A. castellanii* foram implantadas em garrafas de 150 cm<sup>2</sup>, conforme o protocolo de cultivo, e utilizadas após 6 horas. Uma alíquota do estoque de vírus foi inoculada no meio de cultura e as células incubadas em estufa. Após quatro dias de infecção as células foram destacadas mecanicamente do fundo da garrafa (por raspagem) e fixadas em tubo cônico de 1,5 mL. O sedimento de células e enviado ao CEMEL para análise microscópica.

## **5.6. Confirmação molecular da presença de vírus**

### **5.6.1. Investigação de OPV**

Após a triagem por qPCR, as amostras suspeitas para OPV foram submetidas a amplificação e sequenciamento de outros genes alvo para o grupo. Neste processo foram utilizados como molde a diluição de amostras em água e DNA e cDNA obtido das amostras em questão, e foram investigados os seguintes alvos: C11R (Nested PCR; ABRAHÃO et al., 2009b), B18R (qPCR e PCR; fragmentos de 72 e 1 kpb; ALMEIDA, G. dados não publicados), C23L (qPCR; fragmento de 124 pb; ALMEIDA, G. dados não publicados), A56R (qPCR; fragmento de 144 pb; OLIVEIRA, DB. dados não publicados) (PCR; ROPP et al., 1995) (PCR; de SOUZA TRINDADE et al., 2008), A26L (Nested PCR; fragmentos de 787 e 166 pb; Assis, FL. dados não publicados) (PCR; MEYER; PFEFFER, RZIHA, 1994), E3L (qPCR, fragmento de 70 pares pb) (ALMEIDA, G.; dados não publicados) e VH1 (PCR, fragmento de 120 pb) (ALMEIDA, G.; dados não publicados). As reações foram realizadas conforme descrito em itens anteriores (5.3.2 e 5.4), com variações na temperatura de pareamento de acordo com o alvo. Os produtos de PCR obtidos foram fracionados por eletroforese em gel de agarose 1,5% (conforme descrito anteriormente) ou em gel de acrilamida 8% e corado com prata. Após confirmação da amplificação, o DNA de interesse foi purificado e enviado para sequenciamento.

### 5.6.2. Investigação de vírus isolado

O vírus isolado em células Vero foi submetido a qPCR para alguns alvos utilizados neste estudo. Para isso, cDNA foi obtido com iniciadores aleatórios a partir de RNA extraído de células e sobrenadante, coletados separadamente em duas passagens do vírus em questão. Os resultados das reações de qPCR foram analisados conforme descrito em 4.4. Também foram realizados ensaios de PCR para o alvo VP1 de enterovírus (4.3.2). Os produtos de qPCR/PCR obtidos foram fracionados por eletroforese em gel de agarose 1,5% para confirmação da amplificação e o DNA de interesse foi preparado para posterior sequenciamento.

### 5.6.3. Sequenciamento

O produto de PCR das amostras positivas na etapa de confirmação foi purificado e o DNA amplificado foi enviado para sequenciamento. A purificação foi realizada a partir do próprio produto de PCR ou de gel nos casos de necessidade do fracionamento.

A purificação de produto de PCR foi realizada com o kit *MinElute® PCR Purification* (QIAGEN, EUA), e o protocolo utilizado de acordo com o descrito pelo fabricante. O DNA purificado foi enviado para sequenciamento e/ou armazenado a -20°C.

A purificação de DNA a partir de gel de agarose foi realizada com o kit *QIAquick® Gel Extraction* (QIAGEN, EUA), e o protocolo utilizado foi aquele descrito pelo fabricante. O DNA obtido foi diluído em tampão de eluição fornecido no kit (10 mM Tris-Cl, pH 8.5). O DNA purificado foi enviado para sequenciamento e/ou armazenado a -20°C.

Os amplicons preparados foram sequenciados por eletroforese capilar em aparelho ABI3130, utilizando-se polímero POP7 e BigDye v3.1, pela Myleus Biotecnologia e pelo Núcleo de Análise de Genoma e Expressão Gênica (NAGE, Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB/UFMG). As sequências obtidas foram analisadas com os programas Chromas Lite™ (Technelysium Pty Ltd) e CAP3 Sequence Assembling Program (HUANG & MADAN, 1999), através da *home-page* da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária do Brasil (Embrapa) (disponível em: <http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>).

As sequências foram comparadas com as sequências depositadas no *GenBank*, utilizando-se a ferramenta BLAST (ALTSCHUL et al., 1997; [www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)) e alinhadas com sequências de referência utilizando o *software* MEGA v6.1 (Arizona State University, Phoenix, AZ, USA, 2014).

## **6. Resultados**

### **6.1. Amostras coletadas e processadas**

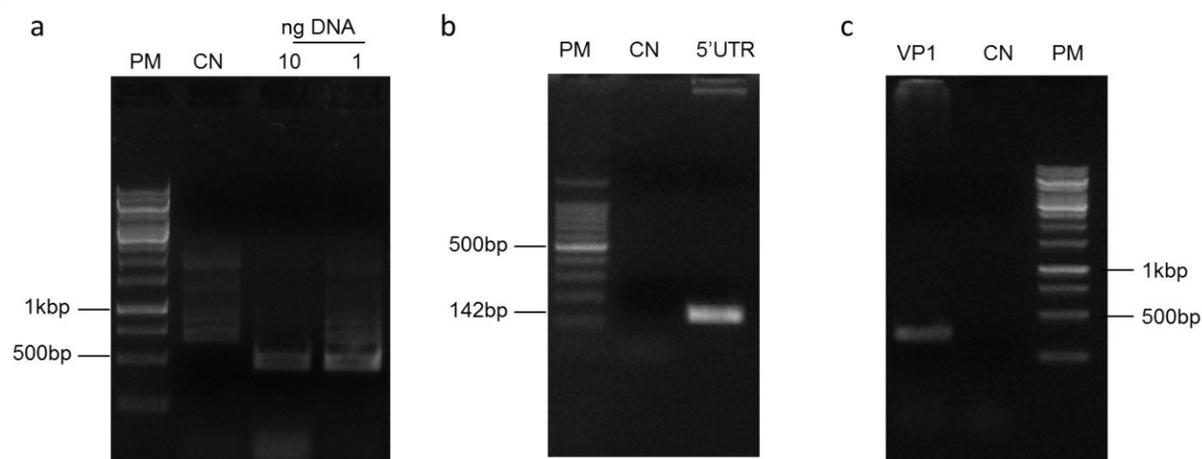
As amostras foram coletadas entre agosto de 2012 e março de 2013. Um total de 17 amostras foi coletado nas duas regiões do Brasil. Junto às amostras coletadas, foram relacionados dados relativos à sua condição de hidratação e local de coleta (Tabela 3). As amostras CAP1 a CAP10 foram coletadas no Parque Nacional da Serra do Cipó, próximo à Lagoa das Capivaras. Estas amostras foram armazenadas a 4°C durante o transporte até o laboratório e foram processadas no mesmo dia. A amostra CAP11 foi coletada no Serro, armazenada a -20°C até o transporte para o laboratório. As amostras CAP12 a CAP16 foram coletadas na região do Pantanal, armazenadas à temperatura de -20°C e encaminhadas ao laboratório para posterior processamento. A amostra PAMP foi coletada na Lagoa da Pampulha e imediatamente processada em laboratório, sem a necessidade de armazenamento.

Tabela 3. Amostras de fezes coletadas.

Amostra	Data da coleta	Coordenadas geográficas da coleta	Região de coleta	Aspecto
<b>CAP1</b>	Dez/12	19°20'45.7"S, 43°34'0.08"W	PARNA Serra do Cipó	Ressecadas
<b>CAP2</b>	Dez/12	19°20'45.7"S, 43°34'0.08"W	PARNA Serra do Cipó	Ressecadas
<b>CAP3</b>	Dez/12	19°20'45.7"S, 43°34'0.08"W	PARNA Serra do Cipó	Ressecadas
<b>CAP4</b>	Dez/12	19°20'41.8"S, 43°36'58.8"W	PARNA Serra do Cipó	Úmidas
<b>CAP5</b>	Dez/12	19°20'42.7"S, 43°36'37.4"W	PARNA Serra do Cipó	Úmidas
<b>CAP6</b>	Dez/12	19°20'42.8"S, 43°36'36.1"W	PARNA Serra do Cipó	Úmidas
<b>CAP7</b>	Dez/12	19°20'45.7"S, 43°34'0.08"W	PARNA Serra do Cipó	Ressecadas
<b>CAP8</b>	Dez/12	19°20'45.7"S, 43°34'0.08"W	PARNA Serra do Cipó	Ressecadas
<b>CAP9</b>	Dez/12	19°20'44.4"S, 43°37'0.08"W	PARNA Serra do Cipó	Úmidas
<b>CAP10</b>	Dez/12	19°20'45.7"S, 43°37'0.08"W	PARNA Serra do Cipó	Ressecadas
<b>CAP11</b>	Ago/12	18°34'53.4"S, 43°21'28.1"W	Serro (MG)	Úmidas
<b>CAP12</b>	Mai/13	17°56'54.4"S, 56°28'57.6"W	Pantanal	Ressecadas
<b>CAP13</b>	Mai/13	18°57'21.3"S, 56°32'43.4"W	Pantanal	Úmidas
<b>CAP14</b>	Mai/13	18°41'31.6"S, 55°35'40.5"W	Pantanal	Úmidas
<b>CAP15</b>	Mai/13	18°51'59.9"S, 56°14'01.3"W	Pantanal	Ressecadas
<b>CAP16</b>	Mai/13	18°58'17.4"S, 56°35'23.9"W	Pantanal	Ressecadas
<b>PAMP</b>	Dez/12	19° 51' 4" S, 43° 58' 46" W	Lagoa da Pampulha	Úmidas

## 6.2. Produção de controles de reação

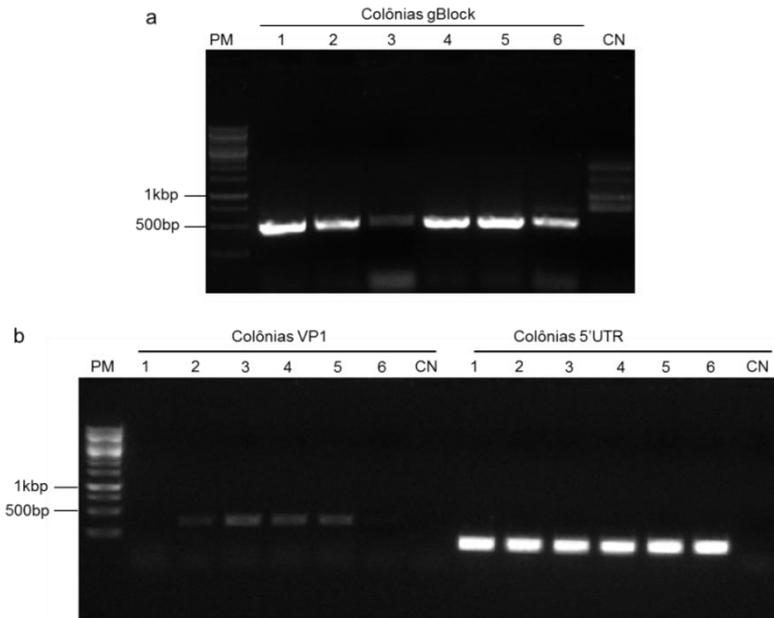
Os fragmentos de interesse foram amplificados em reações de PCR, conforme descrito anteriormente. Após o fracionamento em gel de agarose tanto a reação com 1 e 10ng de DNA de molde apresentaram amplificação (Figura 8a). A reação utilizando 10ng de DNA como molde foi selecionada para utilização posterior.



**Figura 8.** Amplificação de fragmentos alvos para clonagem em plasmídeo. O gBlock ARCoV e fragmento de sequências de interesse para investigação de enterovírus, 5'UTR e VP1, foram amplificados por PCR e fracionados em gel de agarose 1,5%. Após o fracionamento foi possível observar a amplificação (a) do gBlock nas duas condições de reação utilizadas, (b) do fragmento 5'UTR e (c) do fragmento de VP1.

Nas reações para os alvos de enterovírus foram utilizados os respectivos iniciadores-alvo, 5'UTR e VP1. Ambas as reações apresentaram amplificação de fragmento único, a de 5'UTR apresentou maior intensidade (Figura 8b) enquanto que a banda de VP1 apresentou intensidade um pouco menor (Figura 8c).

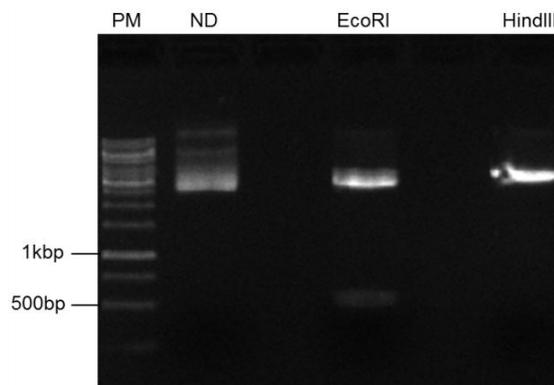
Todas as colônias testadas para confirmação da clonagem de gBlock apresentaram amplificação, no entanto variaram na intensidade sendo a colônia 5 selecionada para dar continuidade ao ensaio (Figura 9a). Apenas cinco das seis colônias testadas para confirmação da clonagem de VP1 apresentaram amplificação, sendo a colônia 3 selecionada para dar continuidade aos testes (Figura 9b). Quanto às colônias testadas para confirmação da clonagem de 5'UTR, todas as seis apresentaram amplificação de igual intensidade, sendo a colônia 3 selecionada para dar continuidade aos testes (Figura 9b).



**Figura 9.** Triagem de colônias transformadas com o plasmídeo de interesse. Seis colônias de cada transformação foram selecionadas aleatoriamente para triagem por PCR. Após o fracionamento em gel dos produtos de PCR foi possível confirmar a presença (a) do gBlock ARCoV e (b) de VP1 e 5'UTR nas colônias selecionadas. As bandas referentes à amplificação do gBlock ARCoV e VP1 apresentaram intensidades diferentes nos gel, sugerindo variação da concentração de DNA no inóculo na reação.

A presença dos alvos de enterovírus foi confirmada por PCR seguida de fracionamento em gel de agarose (dados não mostrados), enquanto a presença do gBlock foi confirmada por digestão com as enzimas EcoRI e HindIII.

O fracionamento dos produtos de digestão do plasmídeo apresentou o padrão esperado (Figura 10).



**Figura 10.** Confirmação da presença do inserto ARCoV no pGEM. A presença do gBlock na preparação plasmidial foi realizada por digestão com enzimas de restrição. O fracionamento, em gel de agarose, do produto da restrição com as enzimas de interesse apresentou o padrão esperado, ou seja, dois fragmentos na digestão com EcoRI (de aproximadamente 3 kpb e 500 pb) e um fragmento na digestão com HindIII (aproximadamente 3,5 kpb).

A digestão com HindIII cortou o plasmídeo em um único ponto (no meio da sequência do inserto) deixando o plasmídeo linear, conforme evidenciado pela forte banda na altura de aproximadamente 3000 pares de bases (pb). O fracionamento do produto da digestão com EcoRI mostra a presença das bandas esperadas na altura aproximada de 500 pb e 3000 pb, indicando que o plasmídeo foi digerido em dois pontos flanqueando o inserto.

### 6.3. Triagem das amostras por PCR em tempo real

As amostras coletadas foram testadas para todos os vírus alvos, exceto as amostras CAP12 – CAP16 (coletadas no Pantanal) em relação às reações para Mimivirus. As amostras que apresentaram pelo menos uma réplica com  $T_m$  próximo ou igual ao controle foram consideradas suspeitas. Nestes testes foi encontrada ao menos uma amostra suspeita para os seguintes alvos: OPV, BVDV, BoHV-1/5, BoHV-2, HCoV, arenavírus, mimivírus, adenovírus, norovírus e enterovírus. Os dados de amplificação foram compilados na Tabela 4.

**Tabela 4.** Resultado dos testes de triagem de amostras de fezes capivaras para a presença de vírus.

Alvo	Amostra suspeita	Positividade	Média de $C_t$	Média de $T_m$ ( $\neq T_m$ CV)	Média de $T_m$ do CV
OPV	CAP5	3/5	33,78	74,41 (-1,17)	75,58
	CAP13	4/5	32,94	74,41 (-1,17)	75,58
	PAMP	18/20	31,86	74,62 (-0,96)	75,58
BVDV	CAP2	1/3	36,02	81,62 (-0,51)	82,13
	CAP9	3/3	36,21	82,07 (-0,06)	82,13
	CAP10	2/3	33,04	81,92 (-0,21)	82,13
	CAP12	1/3	36,74	81,42 (-0,71)	82,13
BoHV-1/5	CAP1	3/3	32,66	86,77 (+1,9)	84,67
	CAP2	3/3	31,49	86,68 (+2,01)	84,67
	CAP3	1/3	30,31	86,53 (+1,86)	84,67
	CAP4	1/3	35,58	86,82 (+2,15)	84,67
	CAP7	2/3	32,69	86,75 (+2,08)	84,67
	CAP8	3/3	31,33	86,73 (+2,06)	84,67
	CAP9	1/3	37,02	82,04 (-2,63)	84,67
	CAP10	1/3	30,20	86,53 (+1,86)	84,67
	CAP12	3/3	30,52	84,45 (-0,22)	84,67
	CAP13	3/3	31,06	86,09 (+1,42)	84,67
	CAP14	1/3	36,21	83,51 (-1,16)	84,67
	CAP16	3/3	29,62	84,95 (+0,28)	84,67
	BoHV-2	PAMP	1/3	35,91	83,54 (-1,13)
CAP15		1/3	33,70	81,94 (-0,07)	82,01

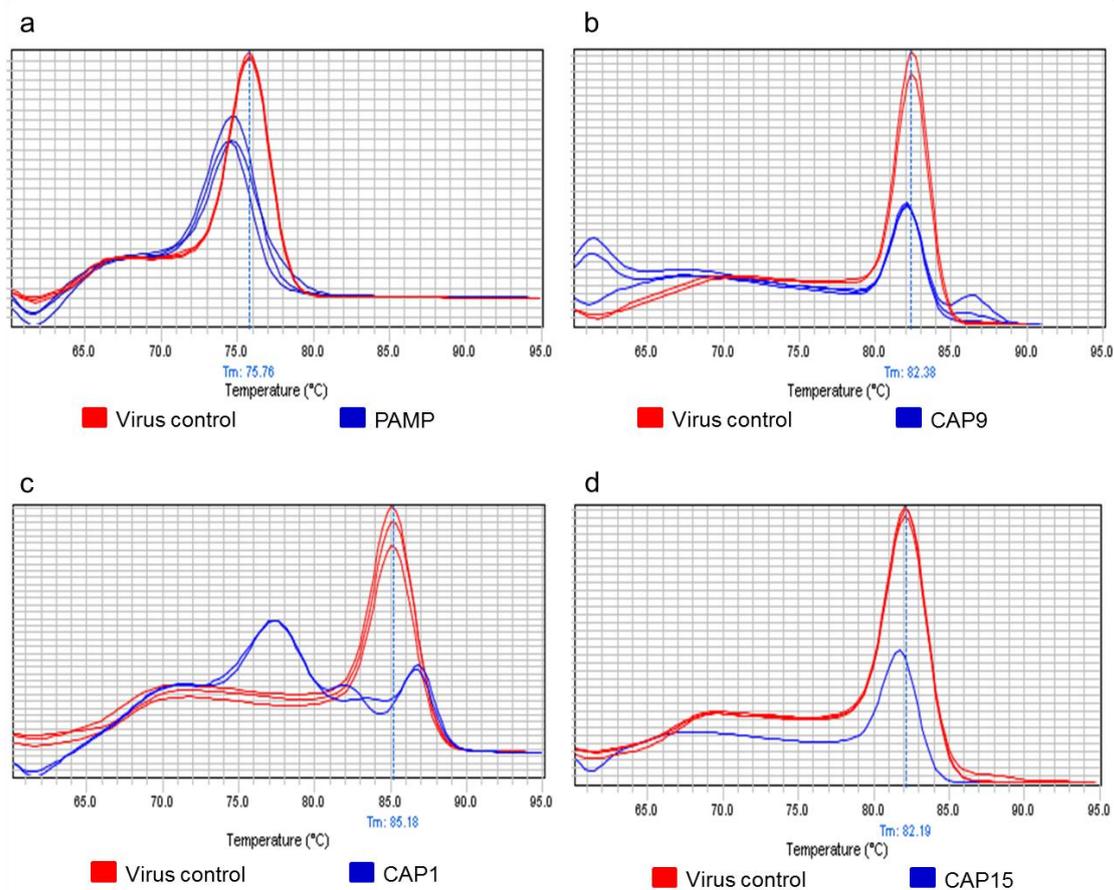
<b>HCoV</b>	CAP12	2/3	35,83	70,84 (+0,12)	70,72
	CAP13	1/3	32,79	70,69 (-0,03)	70,72
<b>Arena</b>	CAP7	1/3	36,72	78,58 (+0,94)	77,64
	CAP12	1/3	35,91	77,55 (-0,09)	77,64
<b>APMV</b>	CAP3	1/3	35,13	73,38 (+0,30)	73,08
	CAP4	3/3	35,34	73,58 (+0,50)	73,08
<b>Adeno</b>	CAP1	1/3	33,18	85,75 (+0,18)	85,57
	CAP4	3/3	31,11	85,70 (+0,13)	85,57
<b>Noro</b>	CAP2	1/3	36,90	78,03 (-1,54)	79,57
	CAP3	1/3	31,82	79,22 (-0,35)	79,57
	CAP5	1/3	32,88	79,97 (+0,40)	79,57
	CAP8	1/3	35,91	79,52 (-0,05)	79,57
	CAP10	1/3	34,43	80,42 (+0,85)	79,57
	CAP11	1/3	32,81	79,97 (+0,50)	79,57
	PAMP	1/3	34,92	78,03 (-1,54)	79,57
<b>Rota</b>	CAP2	1/3	33,90	70,84 (-2,55)	73,39
<b>EV</b>	CAP1	1/3	32,29	82,92 (-0,45)	78,08/83,37
	CAP3	1/3	36,21	81,43 (-1,94)	78,08/83,37
	CAP4	1/3	30,86	77,84 (-0,24)	78,08/83,37
	CAP8	1/3	32,43	83,37	78,08/83,37
	CAP10	1/3	34,71	82,02 (-1,35)	78,08/83,37
	CAP12	2/3	33,19	77,10 (-0,98)	78,08/83,37
	<b>*CAP12</b>	<b>1/3</b>	<b>29,61</b>	<b>83,06 (-0,31)</b>	<b>78,08/83,37</b>
	CAP15	2/3	30,22	78,14 (+0,06)	78,08/83,37
	PAMP	2/3	31,14	83,37	78,08/83,37

A taxa de positividade foi medida pelo número de réplicas suspeitas em relação ao total testado.

\*A amostra CAP12 apresentou dois perfis de dissociação diferentes, condizentes com os perfis de dissociação de referência.

Nos testes para triagem de vírus de doenças vesiculares foram encontradas amostras positivas para os alvos OPV, BVDV, BoHV1/5 e BoHV2. Não foram encontradas amostras positivas para VSV.

Três amostras foram consideradas suspeitas para OPV: CAP5, CAP13 e PAMP, coletadas respectivamente no PARNA Serra do Cipó, Pantanal e Lagoa da Pampulha. As três amostras apresentaram  $T_m$  próximo a 74,5°C, valor 1°C menor que o apresentado pelo controle de vírus (Figura 11a).



**Figura 11.** Triagem por qPCR para vírus causadores de doenças vesiculares. A análise das curvas de dissociação das amostras, após os testes de triagem, permitiu identificar amostras suspeitas para (a) OPV, (b) BVDV, (c) BoHV 1/5 e (d) BoHV 2. Apenas as curvas referentes a uma das amostras suspeitas para cada alvo foi representada nesta figura.

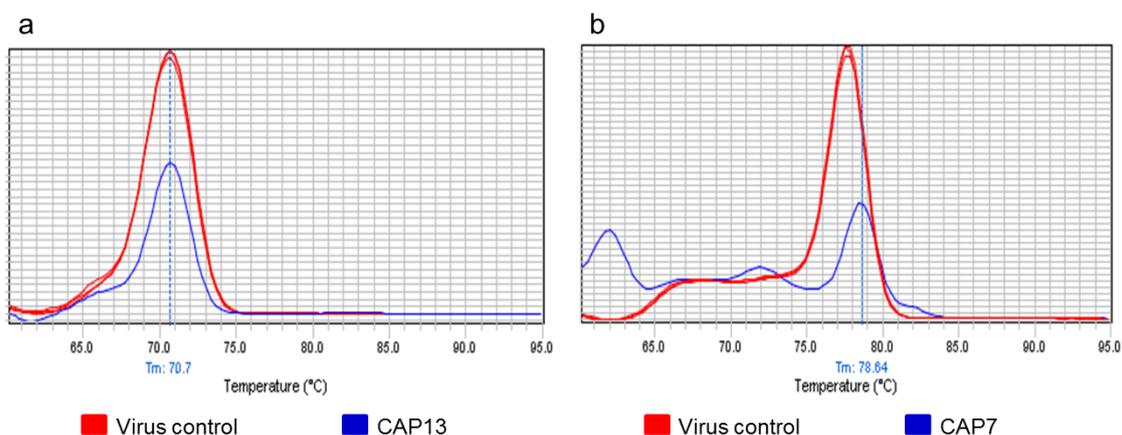
O teste de triagem para BVDV apontou quatro amostras suspeitas: CAP2, CAP9 e CAP10, coletadas no PARNA Serra do Cipó, e CAP12, coletada no Pantanal. As amostras apresentaram  $T_m$  com variação menor que  $1^\circ\text{C}$  em relação ao valor de referência (Figura 11b).

A triagem para BoHV-1/5 revelou treze amostras suspeitas: CAP1 a CAP4 e CAP7 a CAP10, coletadas no PARNA Serra do Cipó; CAP12 a CAP14 e CAP16, coletadas no Pantanal; e PAMP, coletada na Lagoa da Pampulha. Os valores de  $T_m$  apresentados pelas amostras variaram de  $-2,63$  a  $+2,15^\circ\text{C}$  em relação ao controle de vírus (Figura 11c).

E o testes para BoHV-2 revelaram apenas uma amostra suspeita: CAP15, que apresentou valor de  $T_m$  muito próximo ao valor de referência (Figura 11d).

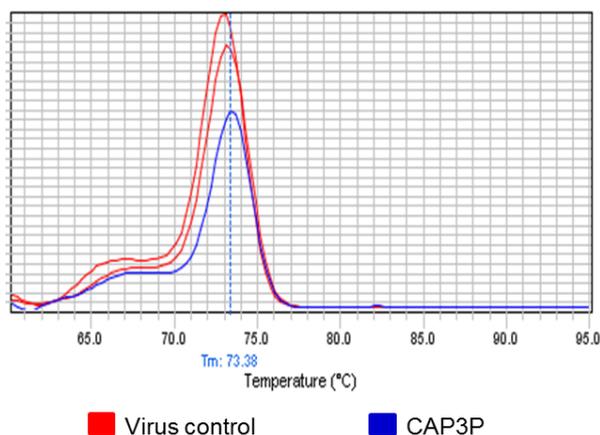
Os testes para triagem de vírus de importância médica humana e veterinária mostraram amostras suspeitas apenas para coronavírus e arenavírus. Para coronavírus as amostras CAP12 e CAP13 foram consideradas suspeitas, ambas coletadas no Pantanal e

apresentando  $T_m$  com valor semelhante ao controle de vírus (Figura 12a). No teste para Arenavírus as amostras CAP7, coletada no PARNA Serra do Cipó, e CAP12, coletada no Pantanal, foram consideradas suspeitas. Apenas CAP7 apresentou variação de  $T_m$  em relação ao controle de vírus de  $+0,94^\circ\text{C}$  (Figura 12b).



**Figura 12.** Triagem por qPCR para vírus de importância médica humana e veterinária. A análise das curvas de dissociação das amostras, após os testes de triagem, permitiu identificar amostras suspeitas para (a) HCoV e (b) Arenavírus. Apenas as curvas referentes a uma das amostras suspeitas para cada alvo foi representada nesta figura.

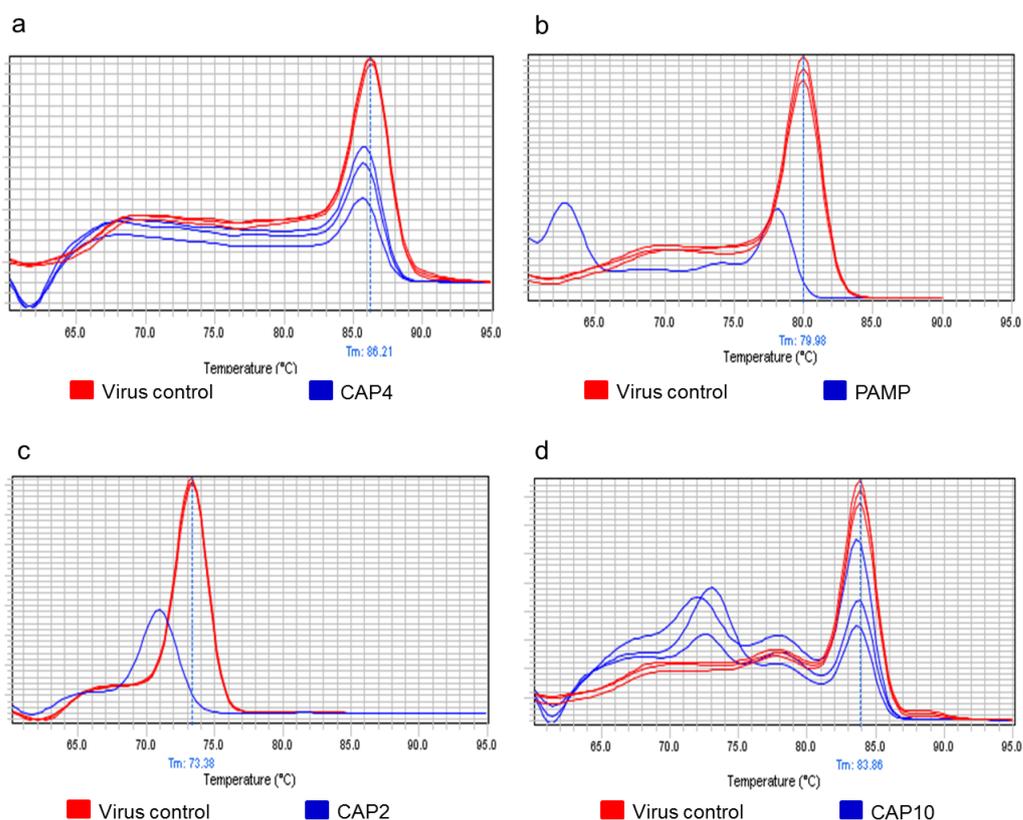
Nos testes para triagem para vírus gigantes apenas amostras suspeitas para APMV foram encontradas. As amostras CAP3 e CAP4, ambas coletadas no PARNA Serra do Cipó, apresentaram variação de  $T_m$  de  $+0,30$  e  $+0,50^\circ\text{C}$ , respectivamente (Figura 13).



**Figura 13.** Triagem por qPCR para vírus gigantes. A análise das curvas de dissociação das amostras, após os testes de triagem, permitiu identificar amostras suspeitas para Mimivirus. Apenas as curvas referentes a uma das amostras suspeitas para cada alvo foi representada nesta figura.

Os testes de triagem para vírus de doenças humanas, transmitidos pela água, mostraram amostras suspeitas para adenovírus, norovírus, rotavírus e enterovírus. O teste para detecção de norovírus apresentou duas amostras suspeitas, CAP1 e CAP4, ambas foram

coletadas no PARNA Serra do Cipó e apresentaram  $T_m$  com valor próximo ao controle de vírus (Figura 14a). No teste para norovírus as amostras CAP2, CAP3, CAP5, CAP8, CAP10 e CAP11 foram consideradas suspeitas e apresentaram valor de  $T_m$  próximo ao controle de vírus. No entanto, as amostras CAP2 e PAMP apresentaram variação de  $-1,54^\circ\text{C}$  no valor de  $T_m$  (Figura 14b). O teste para rotavírus detectou uma amostra suspeita, CAP2, cujo  $T_m$  apresentou variação de  $-2,55^\circ\text{C}$  em relação ao valor de referência (Figura 14d). E, por fim, o teste para enterovírus apresentou oito amostras suspeitas: CAP1, CAP3, CAP4, CAP8 e CAP10, coletadas no PARNA Serra do Cipó; CAP12 e CAP15, coletadas no Pantanal; e PAMP coletada na Lagoa da Pampulha (Figura 14c). Neste teste em particular, foram considerados dois valores de  $T_m$ ,  $78,08$  e  $83,37^\circ\text{C}$ , baseando nos valores observados em outras reações utilizando cDNA viral (Figura 20a). Considerando estes valores de referência, as amostras suspeitas apresentaram pequenas variações no valor de  $T_m$ . A amostra CAP12, no entanto, apresentou um perfil bastante peculiar: duas réplicas testadas apresentaram  $T_m$  próximo ao valor de referência  $78,08^\circ\text{C}$ , e a terceira réplica testada apresentou valor próximo a  $83,37^\circ\text{C}$ .



**Figura 14.** Triagem por qPCR para vírus transmitidos pela água. A análise das curvas de dissociação das amostras, após os testes de triagem, permitiu identificar amostras suspeitas para (a) Adenovirus, (b) Norovirus, (c) Rotavirus e (d) Enterovirus. Apenas as curvas referentes a uma das amostras suspeitas para cada alvo foi representada nesta figura.

Os resultados foram compilados no Quadro 1 para melhor visualização do resultado.

**Quadro 1.** Resultado geral da triagem por qPCR. Após a triagem por qPCR as amostras que apresentaram amplificação de ao menos uma réplica testada, independente do ciclo de amplificação, e temperatura de dissociação com valor próximo ( $\pm 3^{\circ}\text{C}$ ) ao controle de vírus foram consideradas suspeitas. As amostras CAP12 a CAP16 não foram testadas para mimivírus.

Localidade	Amostra	Vírus de doenças vesiculares de bovinos					Vírus de importância humana e veterinária			Virus Gigantes			Vírus transmitidos pela água				
		OPV	VSV	BVDV	BoHV1/5	BoHV2	HCoV	ArenaV	RabV	APMaV	MamaV	APMV	AdenoV	HAV	RotaV	NoroV	EV
SERRA DO CIPÓ MG	Cap1																
	Cap2																
	Cap3																
	Cap4																
	Cap5																
	Cap6																
	Cap7																
	Cap8																
	Cap9																
	Cap10																
SERRO	Cap11																
PANTANAL	Cap12																
	Cap13																
	Cap14																
	Cap15																
	Cap16																
BH MG	PAMP																

### 6.3.1. Investigação de *Orthopoxvirus*

As amostras consideradas suspeitas para OPV nos testes de triagem, foram investigadas para a presença de outros alvos de OPV em reações de qPCR e PCR. Os ensaios resultaram na amplificação de fragmentos de pelo menos três genes alvos diferentes nas três amostras (Tabela 5). As reações para amplificação de VH1 e A26L foram realizadas apenas para a amostra PAMP, e as reações de qPCR para B18R e E3L não foram realizadas para CAP13. A reação para C23L ainda foi realizada em plataforma de PCR convencional e fracionada em gel de poliacrilamida (corado com prata). Os fragmentos amplificados para C23L, C11R, A26L e A56R foram preparados e submetidos ao seqüenciamento.

**Tabela 5.** Resultados das reações de qPCR e PCR para investigação de amostras positivas para OPV.

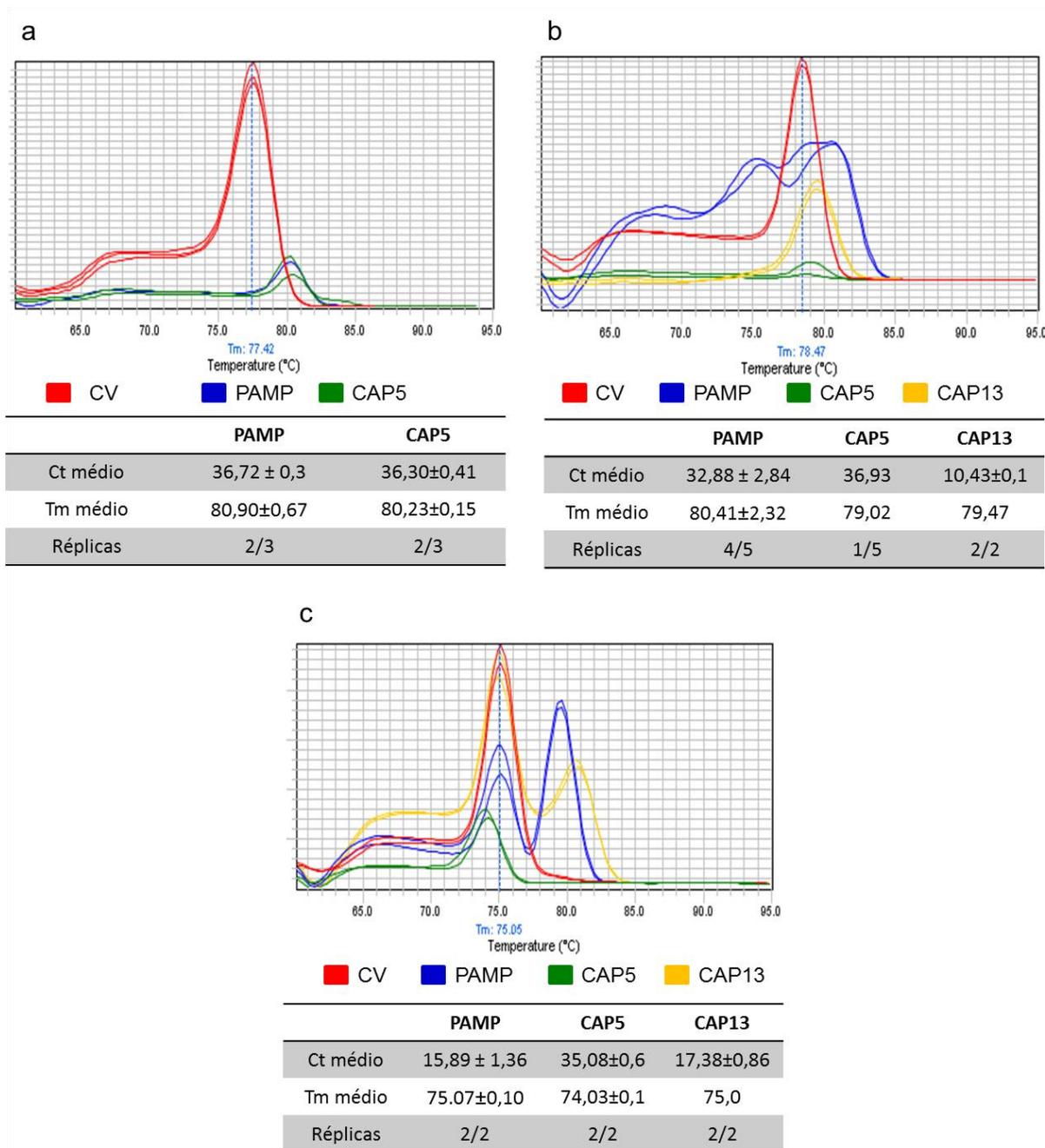
<b>Gene alvo</b>	<b>Tamanho do amplicon *</b>	<b>Resultado PAMP</b>	<b>Resultado CAP5</b>	<b>Resultado CAP13</b>	<b>Referências</b>
<b>B18R</b>	72pb	Positivo	Positivo	N/A	Almeida, GMF***
<b>C23L</b>	124pb	Positivo	Positivo	Positivo	Almeida, GMF***
<b>E3L</b>	70pb	Negativo	Negativo	N/A	Almeida, GMF***
<b>A56R</b>	144	Positivo	Positivo	Positivo	Oliveira, DB***
<b>VH1</b>	120pb	Negativo	N/A	N/A	Almeida, GMF***
<b>C11R</b>	381pb (1ª reação) 180pb (2ª reação)	Positivo	Positivo	Positivo	ABRAHÃO et al., 2009b
<b>A26L</b>	1596pb	Positivo**	N/A	N/A	MEYER; PFEFFER, RZIHA, 1994
<b>A26L</b>	787pb (1ª reação) 166pb (2ª reação)	Positivo	N/A	N/A	Assis, FL***
<b>A56R</b>	948pb	Positivo**	Positivo**	Positivo**	ROPP et al., 1995
<b>A56R</b>	184pb	Negativo	Negativo	Negativo	de SOUZA TRINDADE et al., 2008
<b>B18R</b>	1kpb	Negativo	Negativo	Negativo	Almeida, GMF***

\* Tamanho do amplicon baseado na sequência de VACV-WR. \*\* Fragmento amplificado de tamanho incomum.

N/A: amostras não testadas

Os resultados das reações de qPCR apontam amplificação de ao menos uma réplica das amostras testadas para B18R, C23L e A56R. No teste para B18R, realizado em triplicata, as amostras PAMP e CAP5 apresentaram amplificação de duas réplicas e temperatura de dissociação com valor maior que o controle de vírus (Figura 15a). Nos testes para C23L o número de réplicas amplificadas foi quatro em cinco para PAMP, uma em cinco para CAP5 e duas em duas para CAP13 e as três amostras apresentaram valores de  $T_m$  ligeiramente

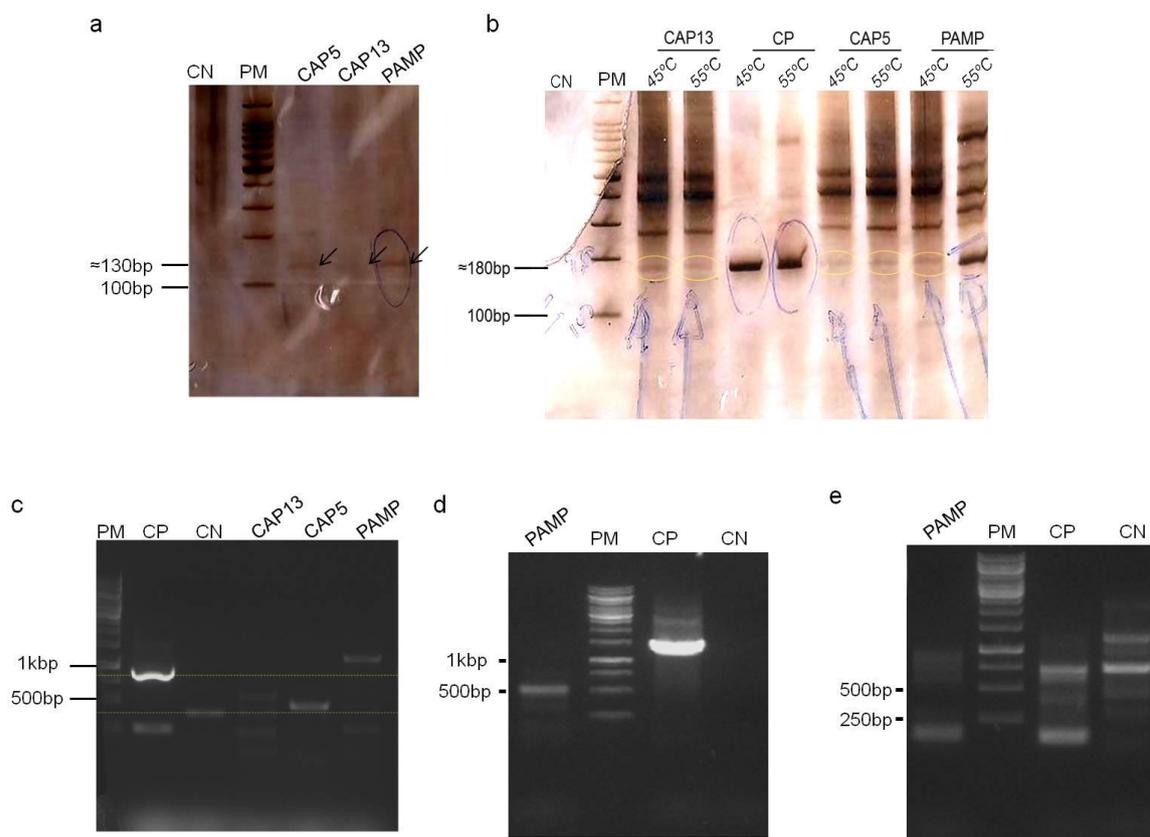
maiores que o do controle de vírus (Figura 15b). Nos testes para a detecção de A56R as amostras apresentaram amplificação nas duas réplicas testadas, no entanto CAP5 apresentou um valor de  $T_m$  ligeiramente menor que o controle de vírus (Figura 15c).



**Figura 15.** Resultados de qPCR para diferentes alvos de OPV. A análise das curvas de dissociação apontou a amplificação de ao menos uma das réplicas de cada amostra testada nos ensaios para (a) B18R, (b) C23L, e (c) A56R.

Os ensaios de PCR convencional revelaram a amplificação dos alvos C23L, C11R e A56R para as três amostras, e de A26L (dois conjuntos de iniciadores diferentes) para PAMP. Após o fracionamento do produto de PCR da reação para C23L foi possível observar a

presença de banda de fraca intensidade no tamanho esperado (aproximadamente 130 pb) para as três amostras (Figura 16a). Essas bandas foram purificadas e enviadas para o sequenciamento.



**Figura 16.** Resultado das reações de PCR para diferentes alvos de OPV. As reações para os genes (a) C23L, (b) C11R e (c) A56R foram utilizadas para testar as três amostras suspeitas. A amostra PAMP ainda foi testada em duas reações diferentes para A26L: (d) uma reação para amplificação de um fragmento de aproximadamente 1500 pb, na qual a amostra apresentou amplificação de fragmento de 500 pb, e (e) uma reação semi-nested na qual o fragmento da 2ª reação apresentou tamanho compatível com o controle (<250 pb).

A reação para C11R foi realizada em duas condições de temperatura diferente e apenas o produto da 2ª reação fracionado em gel de acrilamida. Após o fracionamento foi possível observar amplificação de fragmentos com o tamanho esperado (aproximadamente 180 pb) para as três amostras, porém com intensidades diferentes (Figura 16b). Ainda foi possível observar a presença de um amplicon de aproximadamente 380 pb em cada amostra, possivelmente referente ao fragmento amplificado na 1ª reação. Os dois amplicons de cada amostra, de aproximadamente 130 e 380 pb, foram purificados e enviados para o sequenciamento.

A reação de PCR para o gene A56R foi realizada em diversos ensaios diferentes e o padrão de bandas apresentado, após o fracionamento do produto da reação em gel, se repetiu em todos. A amostra PAMP apresentou amplificação de um fragmento de tamanho maior que o esperado (>1k pb), CAP5 apresentou fragmento pouco menor que 500 pb e CAP13 de aproximadamente 500 pb (Figura 16c). Os fragmentos amplificados para cada amostra foram purificados e enviados para sequenciamento.

A amostra PAMP, testada em mais duas reações para A26, apresentou amplificação em ambos os testes. Na reação de amplificação do fragmento de 1596 pb a amostra apresentou a amplificação de um fragmento de aproximadamente 500 pb (Figura 16d). E na reação semi-nested, o fracionamento do produto da 2ª reação apresentou um fragmento do tamanho esperado (Figura 16e). O produto das duas reações foi purificado e enviado para sequenciamento.

Foram realizadas reações de sequenciamento com os fragmentos amplificados nas seguintes reações: C23L (PAMP, CAP5 e CAP13), C11R (PAMP, CAP5 e CAP13), A26L fragmento maior e semi-nested (PAMP) e A56R (PAMP, CAP5 e CAP13). Não foi possível obter uma sequência com qualidade para análise das amostras amplificadas para o alvo C23L, as sequências obtidas para os outros fragmentos foram analisadas.

As sequências obtidas para C11R nas três amostras foram analisadas e alinhadas com sequências de amostras brasileiras de OPV. Obteve-se uma sequência de 192 bases para a amostra CAP5 e 317 bases para as amostras CAP13 e PAMP (Figura 17a). O alinhamento destas sequências com algumas amostras de referência mostrou alta similaridade entre elas, confirmando a presença de DNA de OPV nas amostras de fezes (Figura 17b).

a

```

CAP5      TAT GAT TAT GGA TCC TGC GAG AGA TGG ATA TTG TTT TTA CAC GGT GAC TGT ATC
          CAC GCT AGA GAT ATT GAC GGT ATG TAT TGT AGA TGC TCT CAT GGT TAT ACA GGC
          ATT AGA TGT CAG CAT GTA GTA TTA GTA GAC TAT CAA CGT TCA GAA AAC CCA AAC
          ACT ACA ACG TCA TAT ATC CCA TCT CCC GGT

CAP13     GCC GAT AGT GGT AAC GCT ATC GAA ACG ACA TTG CCA GAA ATT ACA AAC GCT ACA
          ACA GAT ATT CCA GCT ATC AGA TTA TGC GGT CCA GAG GGA GAT GGA TAT TGT TTA
          CAC GGT GAC TGT ATC CAC GCT AGA GAT ATT GAC GGT ATG TAT TGT AGA TGC TCT
          CAT GGT TAT ACA GGC ATT AGA TGT CAG CAT GTA GTA TTA GTA GAC TAT CAA CGT
          TCA GAA AAC CCA AAC ACT ACA ACG TCA TAT ATC CCA TCT CCC GGT ATT ATG CTT
          GTA TTA GTA GGC ATT ATT ATT ACG TGT TGT CTA TTA TCT GTT TAT AA

PAMP      GCC GAT AGT GGT AAC GCT ATC GAA ACG ACA TTG CCA GAA ATT ACA AAC GCT ACA
          ACA GAT ATT CCA GCT ATC AGA TTA TGC GGT CCA GAG GGA GAT GGA TAT TGT TTA
          CAC GGT GAC TGT ATC CAC GCT AGA GAT ATT GAC GGT ATG TAT TGT AGA TGC TCT
          CAT GGT TAT ACA GGC ATT AGA TGT CAG CAT GTA GTA TTA GTA GAC TAT CAA CGT
          TCA GAA AAC CCA AAC ACT ACA ACG TCA TAT ATC CCA TCT CCC GGT ATT ATG CTT
          GTA TTA GTA GGC ATT ATT ATT ACG TGT TGT CTA TTA TCT GTT TAT AA
  
```

b

```

WR      TAT CAG ATT ATG CGG TCC AGA GGG AGA TGG ATA TTG TTT --A CAC GGT GAC TGT ATC CAC GCT AGA GAT
CAP5    --- --A --- T.C .A. --- TT.
CAP13   ---
PAMP    ---
MARV    ---
ARAV    ---
PSTV    ---
DMTV    ---
GP1V    ---
GP2V    ---
BeAn58058 ---
SPAN_232 ---
Lister  ---
Tiantan ---

WR      ATT GAC GGT ATG TAT TGT AGA TGC TCT CAT GGT TAT ACA GGC ATT AGA TGT CAG CAT GTA GTA TTA GTA
CAP5    ---
CAP13   ---
PAMP    ---
MARV    ---
ARAV    ---
PSTV    ---
DMTV    ---
GP1V    ---
GP2V    ---
BeAn58058 ---
SPAN_232 ---
Lister  ---
Tiantan ..C

WR      GAC TAT CAA CGT TCA GAA AAC CCA AAC ACT ACA ACG TCA TAT ATC CCA TCT CCC GGT
CAP5    ---
CAP13   ---
PAMP    ---
MARV    ..G
ARAV    ..G
PSTV    ---
DMTV    ---
GP1V    ---
GP2V    ---
BeAn58058 ..G ..C
SPAN_232 ..C
Lister  ---
Tiantan ---
  
```

**Figura 17.** Análise das sequências do gene C11R. (a) Obteve-se uma sequência de 192b para a amostra CAP5 e 317b para as amostras CAP13 e PAMP. (b) O alinhamento com sequências de referência apontou alta similaridade das amostras com VACV-WR, no entanto CAP5 apresenta alguns polimorfismos distintos de VACV. Sequências de referência: VACV-WR (AY243312.1); VACV MARV (GQ226041.1); VACV ARAV (AF503170.1); VACV PSTV (DQ085462.1); VACV DMTV (JX678782.1); VACV GP1 (DQ206440.1); VACV GP2 (DQ206441.1); VACV BeAn58058 (U79140.1|BOU79140); VACV SPAN 232 (AY523995.1); Lister (AY678276.1); VACV Tiantan (JX489137.1); VACV

Obeve-se uma sequencia parcial do gene A26L da amostra PAMP, com 111 bases. O alinhamento desta sequência apontou similaridade com a sequência de VACV-WR (Figura 18). Neste alinhamento, utilizando as amostras brasileiras *SPAN232 virus*, *Serro human 2 virus*, *Muriae virus*, *Guarani P2 virus*, *Araçatuba virus* e *Passatempo virus*, a amostra PAMP ainda apresentou polimorfismos condizentes com as amostras brasileiras do grupo virulento (Figura 17).

WR	TCC	CGT	TTG	TAT	TGG	TCC	ATG	TTT	CCA	TTG	CTA	CCA	CCA	TTA	GAT	TTA	CAG	GCT	GCT	AGT
<b>PAMP</b>	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
SPAN232	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
SH2V	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Muriae	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
GP2	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
ARAV	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
PSTV	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
WR	TGT	CGT	TCG	AGA	TCA	GAA	ATA	CGG	GTT	TTC	TTG	GAA	TTG	ATT	TCG	TCG	ATG			
<b>PAMP</b>	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
SPAN232	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
SH2V	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Muriae	...	...	...	.A.	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..A	...	...	...
GP2	..A	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..A	...	...	...
ARAV	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..A	...	...	...
PSTV	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..A	...	...	...

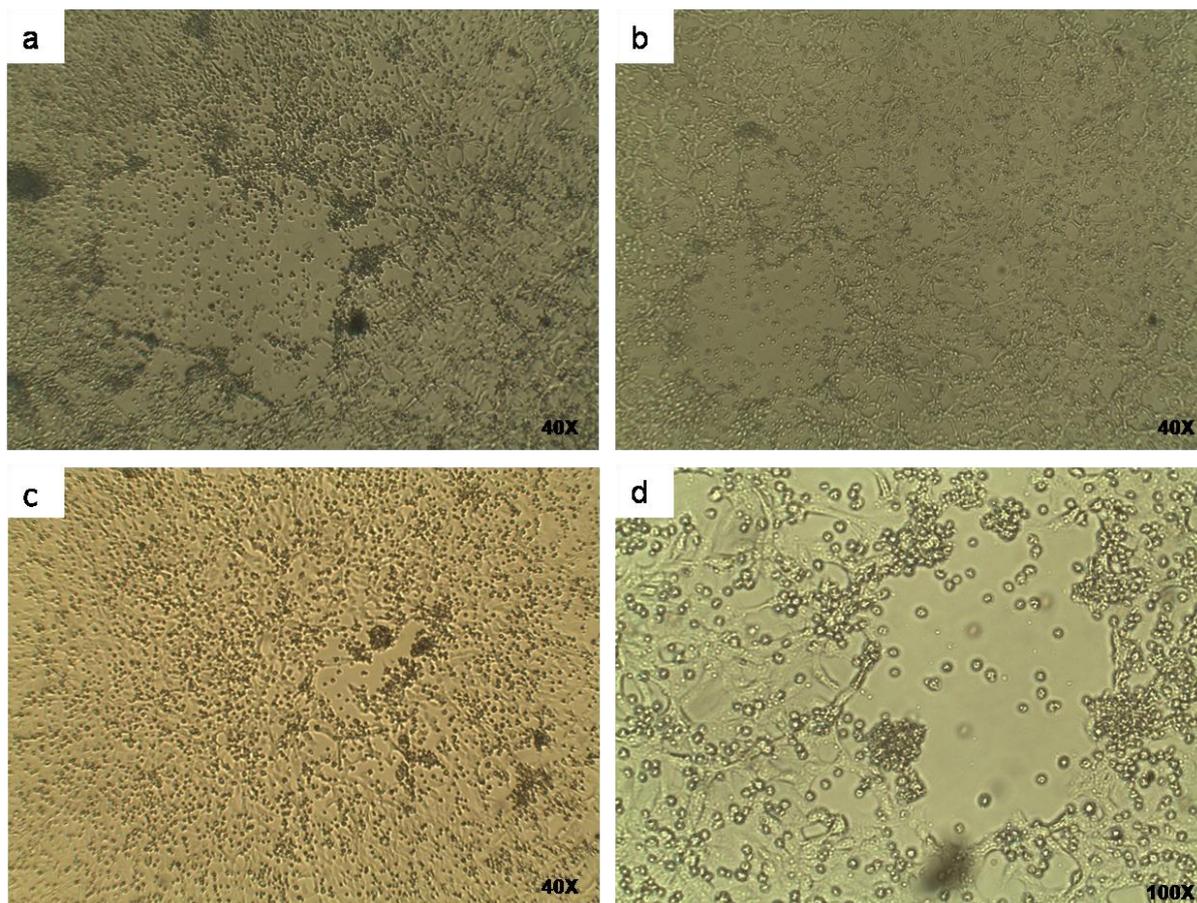
**Figura 18.** Alinhamento da sequência de A26L obtida para PAMP. A sequência parcial obtida na amostra PAMP alinha com VACV-WR e com amostras brasileiras pertencentes ao grupo virulento. Sequências utilizadas no alinhamento: VACV-WR (AY243312.1); VACV SPAn232 (DQ516056.1); VACV SH2V (JQ361140.1); VACV\_Muriae (DQ516059.1|:582-692); VACV GP2 (DQ516058.1|:582-692); VACV ARAV (DQ516057.1); VACV PSTV (DQ516060.1).

O sequenciamento de A56R das três amostras revelou sequências bastante distintas entre si e, quando utilizadas em buscas no genbank com o programa BLASTn e BLASTx, não resultou em nada conhecido até o momento.

#### 6.4. Isolamento de vírus em célula animal

Foram utilizadas três diferentes estratégias para isolamento de vírus em célula animal. Ao final de três passagens não foi observado nenhum ECP evidente nas células no ensaio realizado em células BHK-21 e no ensaio em células Vero, utilizando amostras filtradas.

O isolamento de um vírus em célula animal foi observado pela formação de placas de lise na monocamada de células Vero. A observação foi feita ao final do 5º d.p.i., durante a segunda passagem da amostra CAP10 (Figura 19a e 19b). Na terceira passagem desta amostra o mesmo efeito foi confirmado também ao final do 5º d.p.i. (Figura 19c e 19d). As placas de lise, observadas em ambas as passagens, apresentavam borda irregular. As células coletadas em ambas as passagens foram armazenadas a -70°C. Outras amostras não apresentaram efeitos de multiplicação viral visíveis.

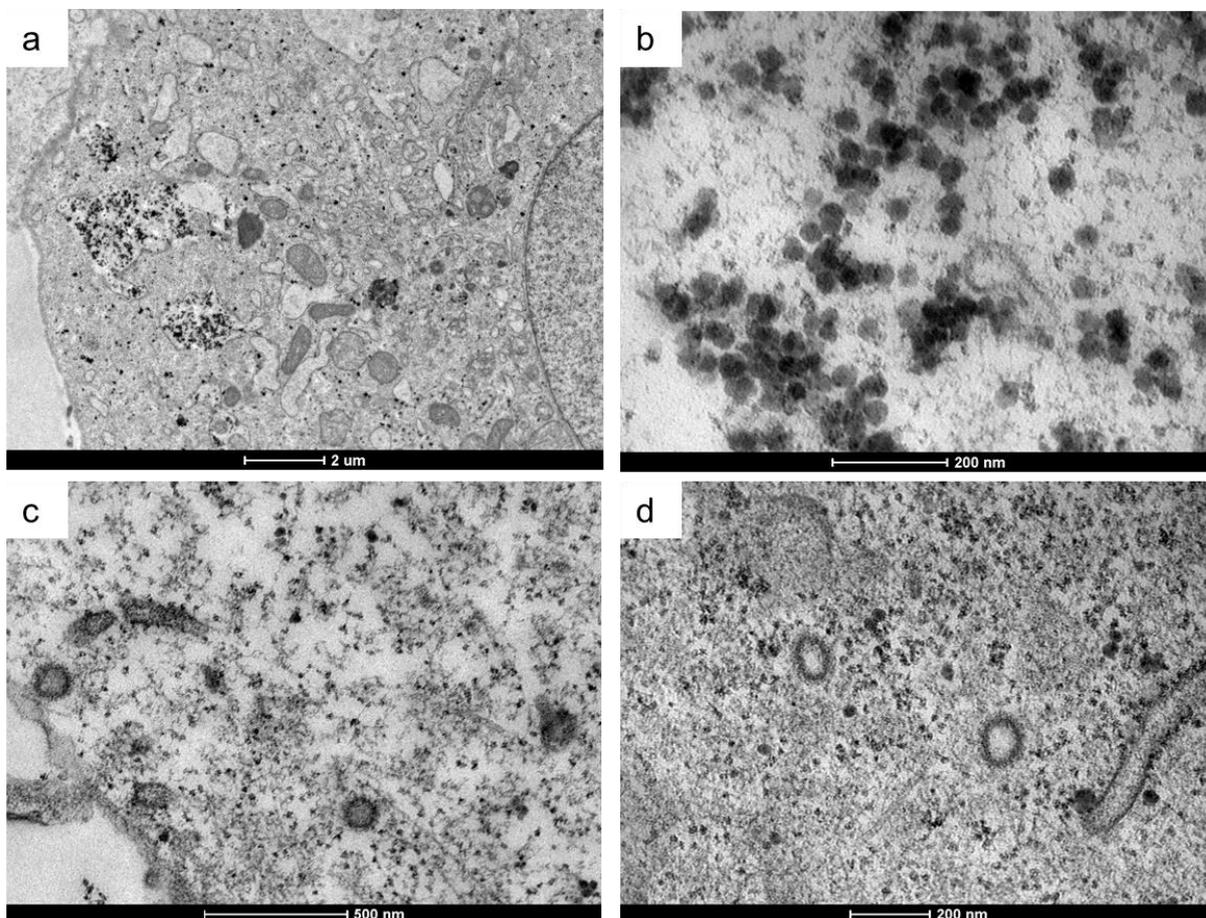


**Figura 19.** Isolamento de vírus em células VERO. A formação de placas de lise foi observada na amostra CAP10 durante o ensaio de isolamento a partir de diluição de amostra. (a e b) Os primeiros ECP foram observados ao final de cinco dias de incubação da segunda passagem da amostra. (c e d) Na terceira passagem também foram observadas a formação de placas de lise.

O procedimento de seleção clonal foi realizado por cinco passagens, devido à dificuldade de visualização de efeito homogêneo na monocamada. Ao longo das passagens foram observadas além da formação de placas de lise, bem como formações se assemelhando a sincícios e áreas de crescimento celular exacerbado (dado não mostrado). Contudo, mesmo após cinco rodadas de coletas em pontos apresentando efeito aparentemente isolado não foi possível obter clones com ECP homogêneo para formação de sincício e cordões de células. Apenas o clone cujo efeito era caracterizado pela existência de placa de lise apresentou efeito homogêneo ao longo das passagens e, na quinta passagem, foi incubado em meio líquido para ser coletado e armazenado para estudos posteriores.

O ensaio de microscopia eletrônica foi realizado com amostras coletadas na 3ª passagem. Esta amostra foi utilizada para infectar monocamada de células Vero que foram fixadas quando do aparecimento dos ECP (5º d.p.i). As imagens obtidas por microscopia eletrônica permitiram observar em muitas células partículas elétron-densas no citoplasma, concentradas em regiões delimitadas por membrana dentro do citoplasma (Figuras 20a).

Essas partículas apresentam de 40 a 60nm de tamanho e não possuem forma geométrica regular (Figura 20b). Em outras células foi possível ainda observar formações arredondadas, com cerca de 90nm, possivelmente delimitadas por membrana (Figuras 20c e 20d).



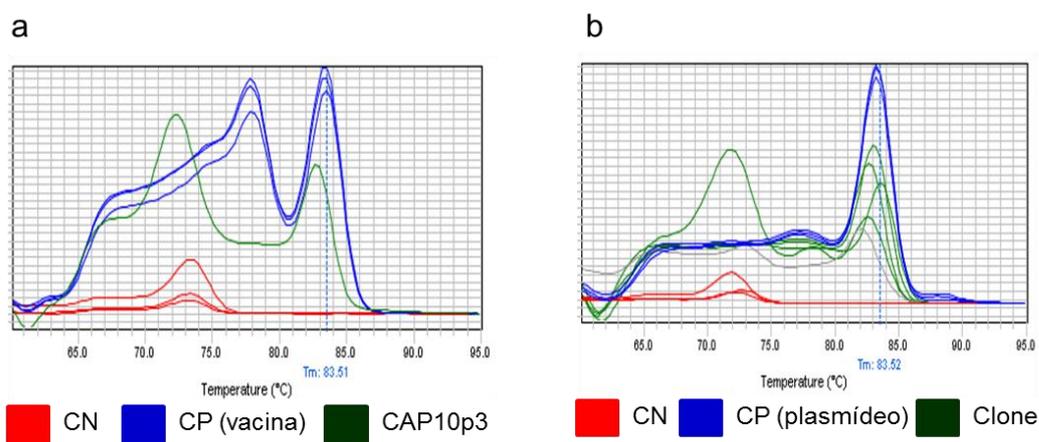
**Figura 20.** Microscopia eletrônica da 3ª passagem da amostra CAP10. As imagens obtidas por microscopia eletrônica mostram: em (a) regiões do citoplasma delimitadas por membrana envolvendo partículas eletrondensas; em (b) partículas eletrondensas de formato irregular com tamanho entre 40 e 60nm; em (c) e (d) formações arredondadas, possivelmente delimitadas por membrana, com cerca de 90nm de diâmetro.

Uma investigação molecular foi conduzida a partir de cDNA obtido de célula e de sobrenadante (separadamente) de amostras de 3ª passagem do isolamento e 5ª passagem de seleção clonal. Amostras de cDNA proveniente de RNA extraído de célula e sobrenadante (separadamente) na 3ª passagem do isolamento foram testadas em reações de qPCR para detecção dos vírus transmitidos pela água utilizados neste trabalho: adenovírus, norovírus, rotavírus, hepatovírus e enterovírus. Estas amostras de cDNA ainda foram utilizadas como molde em reações de PCR para VP1 de enterovírus e os fragmentos amplificados foram enviados para sequenciamento.

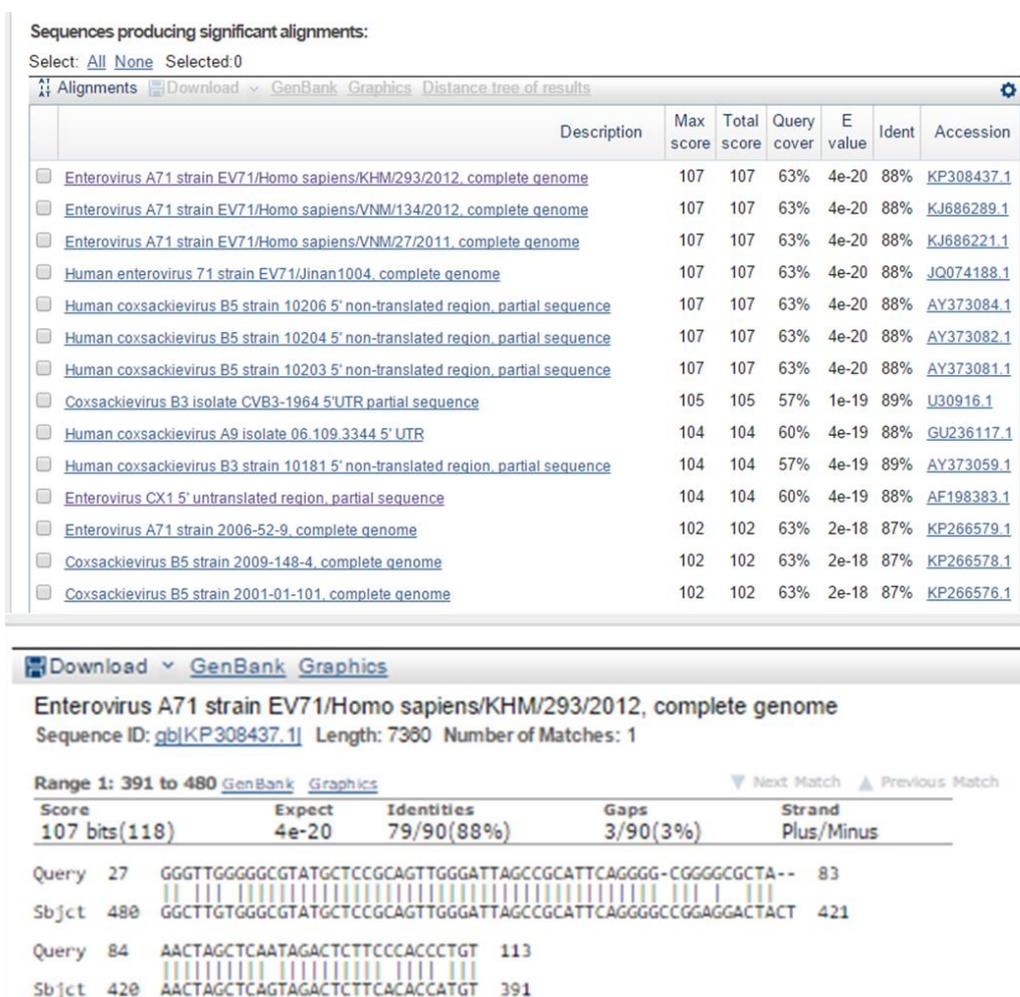
No teste de qPCR realizados com amostra de 3ª passagem de CAP10 houve amplificação apenas para enterovírus (Figura 21a), este resultado foi obtido também no teste de qPCR

realizado posteriormente com amostra de 5ª passagem da seleção clonal (Figura 21b). O produto da reação foi fracionado em gel de agarose e apresentou uma banda na altura de aproximadamente 140pb, o tamanho esperado para o fragmento (dados não mostrados). Este fragmento foi purificado do gel e sequenciado em ambos os sentidos, com os iniciadores senso e anti-senso. As sequências obtidas não apresentaram qualidade muito boa, no entanto quando utilizadas em buscas com o BLASTn resultaram cobertura e similaridade em sequências de *Human enterovirus A* sorotipo Enterovirus A71 (EV-A71) e *Human enterovirus B* sorotipos coxsackievirus A9 (CV-A9), CV-B3 e CV-B5 (Figura 21c).

A partir destes resultados, a amostra foi utilizada em PCR para a região VP1 de enterovírus. Foram realizadas várias reações em condições diferentes, porém não foi possível obter amplificação.



C

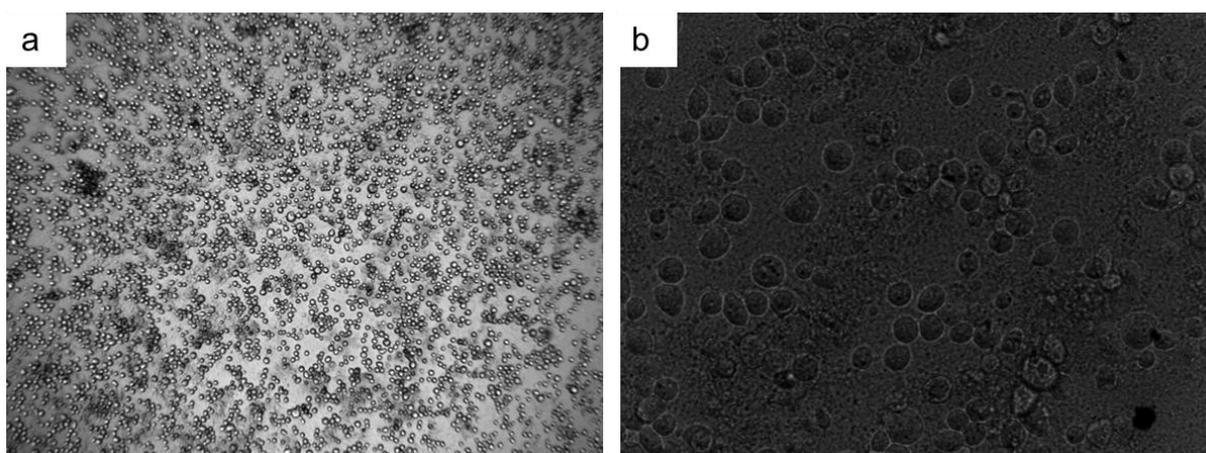


**Figura 21.** Investigação molecular da presença de EV em amostra de vírus isolada. (a) O teste da amostra de 3ª passagem mostrou amplificação em 1 das 6 réplicas testadas, no  $C_t$  31,9 e apresentou  $T_m$  de 82,79°C. Neste teste o controle de vírus utilizado foi cDNA de poliovírus vacinal, e observou-se uma curva de dissociação com dois valores de  $T_m$ , 78,08 e 83,37°C. (b) O teste de amostras de 5ª passagem de seleção clonal apontou a amplificação das seis réplicas testadas. (c) O sequenciamento do produto da primeira reação revelou um fragmento com similaridade a amostras de EV-A e EV-C.

## 6.5. Isolamento de vírus gigantes

O isolamento de vírus gigantes foi observado pela formação de ECP característico da multiplicação viral, ou seja, arredondamento e destacamento das células de *A. castellani* do fundo da garrafa. Além disso, observou-se a presença de partículas em suspensão no meio, dando o aspecto de uma nuvem de poeira, às quais supôs-se serem partículas de vírus gigantes.

No 4º d.p.i. da 3ª passagem a amostra CAP2 apresentou sinais bastante discretos da multiplicação viral, deixando ainda dúvidas quanto ao isolamento. A amostra foi então coletada e utilizada para infectar células em uma nova passagem, assim como as outras amostras em teste. Apenas no 4º d.p.i. da 4ª passagem é que foi possível ver sinais claros da multiplicação viral (Figura 22). A amostra coletada na 4ª passagem foi utilizada para a produção de estoque de vírus.



**Figura 22.** Efeito citopático de vírus gigante em células de *A. castellani*. A alteração de morfologia característica da multiplicação de vírus gigantes em ameba foi observada com maior clareza na 4ª passagem (4º d.p.i.). A imagem das células em (a) menor aumento permite visualizar um grande número de células arredondadas e algumas já encistadas. A observação no (b) maior aumento permite observar com mais detalhe as células arredondadas, em suspensão no meio, algumas poucas células amebóides, e partículas em suspensão no meio.

A partir da amostra isolada foram produzidos dois estoques de vírus em ensaios independentes. No primeiro ensaio a coleta foi realizada no 4º d.p.i., independentemente da observação de ECP. Já no segundo ensaio a coleta foi realizada no 6º d.p.i., após o aparecimento de claro ECP.

Uma alíquota do estoque de vírus coletado no 4º dia foi utilizada em dois ensaios de titulação, realizados em duplicata. No primeiro ensaio não foi possível realizar a leitura no 4º dia e a placa foi descartada. No segundo ensaio a leitura foi realizada no 7º e no 11º dia. A

leitura das réplicas do ensaio no 7º d.p.i. foi  $10^{3,667}$  e  $10^4$  TCID<sub>50</sub>. E no 11º d.p.i.  $10^9$  e  $10^{8,77}$  TCID<sub>50</sub>.

Uma alíquota do estoque de vírus coletado no 6º d.p.i. foi utilizada em um ensaio de titulação, realizado em duplicata. A leitura da titulação foi realizada no 7º e 11º d.p.i.. No 7º d.p.i. a leitura foi  $10^{6,333}$  TCID<sub>50</sub> em ambas as réplicas, já no 11º d.p.i. uma réplica apresentou  $10^{9,23}$  e a outra  $10^9$  TCID<sub>50</sub>.

O ensaio de microscopia eletrônica, para visualização do vírus isolado, foi realizado apenas com um dos estoques de vírus produzidos, aquele que foi coletado no 4º d.p.i.. Durante a realização deste ensaio o vírus não havia sido titulado, portanto a infecção foi realizada com um volume de 800µL de amostra supondo ser um valor adequado para uma infecção com MOI baixa. O material foi coletado no 4º d.p.i., ainda que não apresentasse ECP evidente. Ao final do processo não foi possível visualizar partículas virais na amostra.

## 7. Discussão

### 7.1. Triagem das amostras por PCR em tempo real

A triagem das amostras é apenas um direcionamento para que a investigação da presença de agentes virais ocorra de maneira mais objetiva. Neste estudo buscou-se dar início ao processo de identificação de agentes virais, de importância médica humana e veterinária, que poderiam estar presentes em populações de capivaras. Partiu-se do pressuposto que: (a) estudos anteriores sugeriram a susceptibilidade dos animais a alguns dos alvos de investigação deste trabalho; (b) há sobreposição no uso de hábitat de capivaras e bovinos, o que facilitaria o tráfego viral em casos de susceptibilidade; (c) o hábito semi-aquático possibilitaria contágio por agentes de transmissão pela água em caso de susceptibilidade; e (d) sua presença em ambientes silvestres as colocam em contato com vírus de importância ambiental com potencial zoonótico.

Neste trabalho foram utilizadas amostras de fezes de capivaras como material de estudo, mesmo sem evidências que comprovassem a transmissão de todos os vírus alvo pela via fecal-oral em outro hospedeiro. No entanto, como foi mencionado anteriormente, este é um estudo inicial da investigação de vírus relacionados a capivaras e não se pode excluir a possibilidade de eliminação de partículas virais pelas fezes nas capivaras, a não ser por infecção experimental. Além disso, a investigação de vírus nas fezes de capivaras compreende uma abordagem não invasiva de amostragem, pois minimiza o contato e a interferência humana em relação à população estudada. Esta abordagem, além de ser bem aceita do ponto de vista da conservação, minimiza os esforços empregados na coleta de amostras e reduz gastos, pois não há necessidade capturar ou conter o animal. O estudo a partir de amostras de fezes também tem se mostrado bastante eficiente, tanto na investigação de agentes virais emergentes quanto de aspectos da sua ecologia, como a identificação das populações mantenedoras e área de circulação do vírus (KEELE et al., 2006; LIU et al., 2008).

A análise dos testes de triagem foi baseada na presença/ausência de amplificação (em qualquer ciclo de reação) com valores de  $T_m$  iguais ou próximos ao controle de vírus, de forma que se pudessem classificar as amostras que se encaixaram dentro dessas características como suspeitas. Esta flexibilidade de parâmetros na análise dos resultados leva em consideração a possibilidade da detecção de vírus relacionados aos alvos deste trabalho e sua importância biológica, evolutiva e epidemiológica. A classificação das amostras como suspeitas não implica na obtenção de resultados falso-positivos, já que é um resultado que carece de confirmação. Além disso, trata-se de uma investigação preliminar

que direcionará os esforços para a realização de um estudo mais completo com um número menor de amostras, evitando o uso excessivo e, por ora, desnecessário de recursos.

Os estudos anteriores associaram apenas nove grupos de vírus às capivaras, em sua maioria vírus de importância veterinária, dentre os quais cinco são alvos dos testes de triagem deste estudo: VSV, BoHV-1, VACV, RABV e CoV. No geral, estes estudos se mostraram bastante incompletos no quesito esclarecimento da participação das capivaras no ciclo natural de transmissão dos agentes infecciosos, geralmente baseados na utilização de apenas uma técnica de estudo, sugerindo a susceptibilidade das capivaras a estes agentes (BARBOSA et al., 2014; CATROXO et al., 2010; GOMES; ROSENBERG, 1984; MARÍN et al., 1980; MILAGRES, 2004; MOREIRA, 1955; NOGUEIRA; CRUZ, 2007; WELLS et al., 1981; WELLS et al., 1989; YEO et al., 2013). A complementação dos dados é uma peça fundamental para compreender a importância das capivaras em relação à epidemiologia destas doenças.

Os testes de triagem realizados neste trabalho apontaram amostras suspeitas para vários alvos, mas não todos. Os testes realizados para RABV e VSV, dois grupos de vírus previamente associados às capivaras, não apontaram amostras suspeitas.

RABV é uma espécie de distribuição mundial e apresenta uma ampla gama de hospedeiros, sendo transmitidos diretamente pelos mamíferos infectados através, principalmente, da mordida (KUZMIN; TORDO, 2012). Estão associados principalmente aos mamíferos da ordem Carnivora devido a aspectos ecológicos destes animais que podem favorecer a dispersão do vírus. Devido à gravidade da doença causada pelo RABV (assim como outros *Lyssavirus*), este vírus possui grande importância para a saúde humana e animal. Apesar da ampla gama de hospedeiros e do isolamento do vírus em capivaras, a dinâmica de circulação do vírus nestes animais não está clara. O teste de qPCR realizado no presente estudo apontou resultado negativo, sugerindo a ausência de RNA viral nas amostras de fezes. Este resultado, no entanto, condiz com o conhecimento sobre as vias de eliminação de RABV, no qual não se inclui o espécime clínico utilizado. O esclarecimento do papel das capivaras na dinâmica de transmissão do vírus não deixa de ser um aspecto importante a ser estudado, já que pode representar um risco para esta espécie.

Os VSV causam uma doença caracterizada pela ocorrência de lesões vesiculares nas mucosas dos animais, levando a um quadro bastante debilitante, que ocorre principalmente em bovinos e equinos, podendo ocorrer também em suínos e humanos (RODRÍGUEZ & PAUSZEK, 2012). Estes vírus podem ser transmitidos tanto por insetos quanto por contato, aumentando o potencial de dispersão, no entanto estudos de infecção experimental em

suínos e em cavalos mostram a ausência de viremia nestes animais (STALLKNECHT et al., 1999; HOWERTH et al., 2006). Investigações sorológicas mostraram a presença de anticorpos neutralizantes em animais silvestres (RODRÍGUEZ, 2002). A infecção experimental de VSV em capivaras mostrou a soroconversão dos animais, no entanto a multiplicação viral não pôde ser determinada nos animais infectados (NOGUEIRA; CRUZ, 2007). Apesar de ser possível detectar vírus nas fezes de animais infectados (STALLKNECHT et al., 1999), não se sabe se nas capivaras esta é uma das formas de eliminação deste vírus. O teste de qPCR realizado no presente estudo apontou resultado negativo, sugerindo a ausência de RNA viral nas amostras de fezes. Este resultado pode ser considerado, portanto, bastante inconclusivo, pois a ausência de RNA viral nas amostras de fezes testadas não permite fazer sugestões ou inferências. Não é possível saber se a ausência de RNA viral é decorrente: (a) da não circulação de vírus na população estudada; ou se (b) realmente as capivaras são animais refratários à infecção pelo VSV (como sugerem alguns autores) e não eliminam partículas virais; ou se (c) nestes animais os vírus não são eliminados pelas fezes; ou se (d) o teste é pouco sensível neste espécime clínico estudado.

Várias amostras foram consideradas suspeitas para mais de um alvo viral. Estes resultados podem sugerir uma co-infecção, no entanto as suspeitas precisam ser confirmadas através do sequenciamento do fragmento amplificado e amplificação de outros genes alvos dos grupos em questão.

A investigação preliminar de vírus causadores de doença vesicular se justificou principalmente pela questão da sobreposição de hábitat entre as capivaras e o gado, além disso, alguns desses grupos já haviam sido associados às capivaras anteriormente. A sobreposição de hábitat entre capivaras e bovinos ocorre devido a adaptação das capivaras aos ambientes modificados pelo homem, como é o caso de fazendas. Esta sobreposição permite um maior contato entre as espécies, o que facilitaria o tráfego viral em caso de susceptibilidade do animal. Dentro deste grupo foram encontradas amostras suspeitas para OPV, BVDV, BoHV-1/5 e BoHV-2.

O teste para BVDV apontou quatro amostras suspeitas, oriundas do PARNA Serra do Cipó e do Pantanal. A variação dos valores de  $T_m$ , em relação ao valor de referência (de até 0,5°C para as amostras coletadas no PARNA e 0,71°C para a amostra coletada no Pantanal) está dentro do esperado segundo o trabalho de descrição deste par de iniciadores (ALVES, 2015).

Os herpesvirus bovinos do gênero *Varicellovirus* estão relacionados à ocorrência de doença de manifestações diversas (doença respiratória, rinotraqueíte infecciosa bovina/vulvovaginite pustular infecciosa, balanopostite, abortos e encefalites em bovinos) (JONES; CHOWDHURY, 2007). A dificuldade de distinção entre as espécies BoHV-1 e BoHV-5 resultam em investigações sorológicas que geralmente detectam ambas as espécies, gerando dados epidemiológicos enviesados. A soropositividade encontrada em rebanhos no sul do Brasil é de até 36,5% dos animais, dependendo da região, segundo um estudo que levou em consideração a reatividade cruzada dos vírus (HOLZ et al., 2009). A investigação da soroprevalência de BoHV-1 em capivaras, realizado na década de 70, apontou 72,7% de positividade em ensaios de microaglutinação (BOHRER et al., 1987 apud NOGUEIRA; CRUZ, 2007). Um trabalho de infecção experimental em búfalos, realizado por Scicluna et al. (2010), mostrou a presença de partículas virais viáveis nas fezes nos animais. Nos testes realizados neste trabalho foram consideradas suspeitas as amostras cujas ampliações apresentam  $T_m$  variando de -2,63 a +2,15°C em relação ao valor de referência. Dessa forma, treze amostras, de um total de dezessete, foram consideradas suspeitas no teste. A confirmação da presença e a identificação de BoHV-1 ou 5 nas amostras de fezes de capivara pode ajudar a compreender a ampla disseminação destes herpesvírus nos rebanhos brasileiros.

Em relação aos OPV, a susceptibilidade das capivaras já havia sido demonstrada por estudos anteriores e uma possível participação no ciclo natural de transmissão do VACV sugerida (MOREIRA, 1955; AMBROSIO, 2013; BARBOSA et al., 2014). A investigação preliminar realizada neste trabalho apontou três amostras suspeitas: CAP5 (PARNA Serra do Cipó), CAP13 (Pantanal) e PAMP (Lagoa da Pampulha). A confirmação da presença de DNA nas amostras de fezes complementaria os dados anteriores, corroborando a hipótese de participação das capivaras no ciclo natural de transmissão do VACV. Neste trabalho foi dada a continuidade a esta investigação e os resultados serão discutidos no próximo tópico.

Em relação à investigação de vírus de importância médica humana e veterinária foram encontradas amostras suspeitas para coronavírus e arenavírus. Os CoV já haviam sido associados a doença em capivaras de cativeiro anteriormente, porém a associação entre vírus e capivaras de vida livre é desconhecida (CATROXO et al., 2010). No presente trabalho apenas duas amostras suspeitas para CoV foram detectadas, ambas coletadas no Pantanal e com valor de  $T_m$  bem próximo ao valor de referência. A confirmação deste resultado pode sugerir a circulação de CoV entre capivaras em ambientes silvestres, e a identificação do vírus pode apontar se eles apresentam importância para saúde humana ou de animais domésticos. No entanto o alvo utilizado no teste de qPCR é bastante seletivo

para a detecção de amostras relacionadas a espécie HKU1, de importância humana (ALVES, 2015). Esta especificidade pode interferir na investigação preliminar, levando à subdetecção de CoV em geral nas populações estudadas.

Os arenavírus são vírus zoonóticos que causam infecção persistente em roedores, podendo ser excretados inclusive nas fezes destes animais, e em humanos causam febre hemorrágica (ZAPATA; SALVATO, 2013). Supunha-se que apenas os animais das famílias *Cricetidae* e *Muridae* (Subordem: *Myomorpha*; Superfamília: *Muroidea*), entre os roedores, poderiam albergar vírus deste grupo, mas um estudo recente mostrou que estes vírus não são tão espécie-específicos como se acreditava (LI, 2015). Estes dados recentes corroboram o achado neste estudo. O presente trabalho apontou duas amostras suspeitas para arenavírus, uma na região do PARNA Serra do Cipó e outra no Pantanal. A amostra coletada no PARNA Serra do Cipó apresentou variação de  $T_m$  em aproximadamente  $+1^\circ\text{C}$ . Este teste também apresentou como viés a especificidade do grupo alvo, já que apenas uma amostra de referência foi utilizada para desenhar os iniciadores (ALVES, 2015). Apesar da amostra de referência (*Sabia virus*) ser a de maior importância no território brasileiro, especificidade do alvo é um ponto crítico desta investigação, pois limita a detecção de outras amostras de arenavírus que poderiam estar presentes nos espécimes clínicos investigados.

O isolamento de vírus gigantes a partir de amostras ambientais coletadas nas mesmas regiões de coleta de amostras de capivara, e a proposição de um potencial zoonótico para este grupo de vírus foram os argumentos que determinaram a inclusão deste alvo no nosso trabalho (SILVA et al., 2014; DORNAS et al., 2014). Foram apontadas duas amostras suspeitas, ambas coletadas na PARNA Serra do Cipó, próximo ao sítio de coleta da amostra da qual foi isolado o vírus. As amostras suspeitas apresentam variação de  $T_m$  de até  $+0,5^\circ\text{C}$ . A confirmação da presença de DNA de vírus gigantes nas amostras de fezes de capivara, no entanto, não representa uma relação de infecção das capivaras, visto que esses vírus são associados a parasitas que poderiam estar albergados nos animais. Para responder esta questão é necessária a realização de uma investigação mais completa, utilizando outras técnicas de investigação e outros espécimes clínicos. A confirmação da presença de DNA, no entanto, indicaria a população de capivaras a ser estudada.

A investigação preliminar de vírus de importância na saúde humana, transmitidos pela água, foi delimitada pela dinâmica de disseminação destes vírus e pela importância do ambiente aquático no comportamento e fisiologia das capivaras. Supondo que as capivaras fossem susceptíveis aos vírus (não há indícios da susceptibilidade das capivaras a tais vírus, porém

não existem estudos nesse sentido), o fato de frequentarem ambientes contaminados com tais vírus seria uma forma de contágio.

Os testes de triagem apontaram amostras suspeitas para adenovírus, norovírus, rotavírus e enterovírus. As amostras suspeitas para os três primeiros grupos se concentraram nas regiões onde a presença humana é bastante intensa: PARNA Serra do Cipó, Lagoa da Pampulha e Serro.

A investigação de enterovírus foi a que apontou o maior número de amostras suspeitas, depois de BoHV-1/5. Sabendo que a reação foi elaborada para detecção de diferentes sorogrupos de enterovírus, dentro das espécies EV-A, -B, -C e -D (DIERSSEN, 2008), este resultado pode estar relacionado tanto com a presença de enterovírus já conhecidos (de humanos ou outros animais) quanto com a presença de um possível enterovírus natural de capivaras nas amostras.

A análise dos resultados levou em consideração dois valores de  $T_m$ : 78,08 e 83,37°C, observados na reação que utilizou cDNA de *Polivirus-1*, -2, e -3 (Figura 20a). As amostras CAP1, CAP3, CAP8, CAP10 e PAMP, coletadas em regiões de grande circulação de pessoas (PARNA Serra do Cipó e Lagoa da Pampulha), apresentaram  $T_m$  próximos a 83,37°C, variando até -1,94°C. As amostras CAP4 e CAP15 apresentaram  $T_m$  com valores próximos a 78,08, -0,24 e +0,06°C respectivamente. A amostra CAP12, no entanto, apresentou os dois perfis distintos: duas réplicas com  $T_m$  próximo a 78,08 e uma réplica com valor próximo a 83,37°C. Este resultado sugere a possibilidade da presença de dois enterovírus diferentes. A confirmação dos resultados e a realização de testes de identificação dos vírus permitirão a resolução desta questão.

Em relação aos outros grupos investigados, as amostras suspeitas para adenovírus apresentaram pequena variação de  $T_m$ , já as amostras suspeitas para norovírus variaram o  $T_m$  entre -1,54 e +0,85°C. A única amostra suspeita para rotavírus apresentou  $T_m$  com valor 2,55°C menor em relação ao valor de referência.

A variação de valores de  $T_m$ , no geral, podem refletir variações nas sequências amplificadas em relação à sequência controle ou mesmo uma variação na concentração de sais nas reações. De qualquer forma, estes resultados ainda são preliminares e devem ser confirmados, por reações de qPCR e/ou PCR para outros genes alvos.

A confirmação de tais resultados é de suma importância para determinar a abordagem de estudo que irá responder as questões acerca da relação entre as capivaras e os vírus apresentados. Uma vez confirmada a positividade das amostras, por evidências moleculares

da presença do vírus, as populações ideais para o estudo de cada grupo de vírus poderão ser indicadas. E, com isso, uma nova amostragem da população de interesse poderá ser realizada, de acordo com as características do grupo de animais e de vírus alvo. Outras técnicas de estudo mais adequadas para cada espécime clínico e grupo de vírus poderão ser utilizadas.

O estabelecimento das relações entre vírus e capivaras, e o estudo destes vírus em diferentes populações será de grande importância epidemiológica, além de trazer hipóteses sobre a dinâmica de doenças silvestres.

### **7.1.1. Investigação molecular de OPV**

Os *Orthopoxvirus* (OPV) são vírus com potencial zoonótico e de grande importância para a saúde humana. Dentro do grupo, as espécies relacionadas a infecções zoonóticas são *Monkeypox virus* (MPV), *Cowpox virus* (CPXV) e *Vaccinia virus* (VACV), que após a erradicação da varíola (*Variola vírus*, VARV) tem sido detectados com mais frequência. No Brasil apenas a espécie VACV foi identificada até o momento (ESSBAUER; PFEFFER; MEYER, 2010).

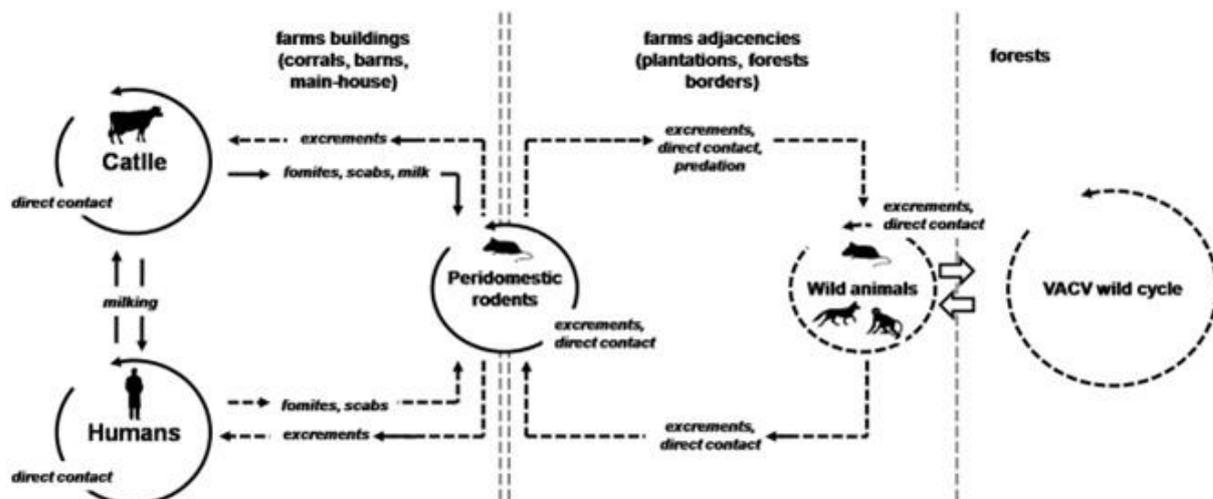
A emergência do VACV no Brasil está relacionada a surtos de doença exantemática em fazendas de produção leiteira, onde as vacas infectadas apresentam as lesões características no úbere e, através do contato com estas lesões, o vírus é transmitido aos ordenhadores. A doença, conhecida como Vaccinia Bovina (VB), pode ser transmitida pelo ordenhador infectado para outros animais dentro da mesma fazenda ou para animais de fazendas diferentes, já que muitas vezes trabalham em mais de uma fazenda. Durante os surtos de VB a produção de leite diminui consideravelmente e os sintomas da doença podem afastar o ordenhador do trabalho por vários dias. Diante disso a emergência do VACV apresenta sérias implicações sociais e econômicas numa região onde a economia funciona em função da produção de leite (DAMASO et al., 2000; LEITE et al., 2005; MEDAGLIA et al., 2009; MEGID et al., 2008; TRINDADE et al., 2004, 2006; de SOUZA TRINDADE et al., 2007)

O registro da ocorrência de surtos de VB no Brasil é recente, sendo que os primeiros surtos diagnosticados oficialmente como VB ocorreram no final da década de 1990. Em 1999 foram isoladas duas amostras de VACV em duas regiões diferentes (de SOUZA TRINDADE et al., 2003; DAMASO et al., 2000). Desde então, vários outros surtos foram registrados no Brasil, e várias amostras diferentes isoladas (SILVA-FERNANDES et al., 2009; MEGID et al., 2008; NAGASSE-SUGAHARA et al., 2004; DONATELLE, et al; 2007; QUIXABEIRA-SANTOS et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2013; ABRAHÃO et al., 2015; MEDAGLIA, et al, 2009; LEITE et

al., 2005; TRINDADE et al., 2006; ABRAHÃO et al., 2009b; ASSIS et al., 2012, 2013; CAMPOS et al., 2011). A circulação dos VACV-BR no território brasileiro, entretanto, é bem anterior à ocorrência dos surtos de VB e não está restrita aos últimos 15 anos. Em 1998 e 2002 foram publicadas a caracterização de duas amostras de VACV coletadas na década de 1960, respectivamente SPAn232 (SAV) e BeAn 58058 (BAV), demonstrando que estes vírus circulam no Brasil há mais tempo (FONSECA et al., 1998; 2002).

O SAV foi isolado a partir de amostras de um camundongo sentinela utilizado no início da década de 1960, na vigilância de arboviroses em área de floresta na região de Cotia - SP (FONSECA, et al 2002). O BAV foi isolado a partir de amostras de um roedor silvestre capturado em 1963, em borda de mata na região de Utinga, Amazônia (FONSECA et al., 1998), bastante distante das áreas de surto de VB hoje. Além disso, dados sorológicos de populações de mamíferos da região amazônica, em relação a anticorpos anti-OPV, demonstraram a circulação de OPV nesta região (ABRAHÃO et al., 2010; MOTA et al., 2010), corroborando com a distribuição mais abrangente dos OPV no Brasil.

Mesmo com todos estes dados relacionando os VACV-BR com animais silvestres, o papel destes animais no ciclo e manutenção dos VACV na natureza ainda não está esclarecido. Estudos em modelo murino demonstraram a disseminação de vírus nas fezes de roedores (FERREIRA et al., 2008; D'ANUNCIAÇÃO et al., 2012), sugerindo ser esta uma possível rota de transmissão do vírus do ambiente silvestre para o ambiente rural. E em 2009, o isolamento do *Mariana virus* (MARV), em um surto na região rural de Mariana (MG), veio trazer mais uma peça deste quebra-cabeça, ao estabelecer por técnicas moleculares a ligação entre roedores e a ocorrência do surto. Este vírus foi isolado do gado, do ordenhador e de roedores peridomésticos da espécie *Mus musculus* (ABRAHÃO et al., 2009c). A partir deste dado foi proposto um ciclo hipotético de transmissão do VACV (Figura 23), no qual animais silvestres mantêm o vírus circulando na natureza e podem transportá-lo para as proximidades do ambiente doméstico quando se aproximam desses ambientes ou de animais que frequentam estes ambientes. Schatzmayr et al. (2011) também encontraram evidências da participação de roedores no ciclo natural de transmissão do VACV. Posteriormente, Peres et al. (2013) demonstraram, por testes de sorologia, a circulação de VACV entre roedores silvestres em uma região sem notificação de casos em humanos e animais domésticos.



**Figura 23.** Ciclo hipotético de transmissão de VACV. O vírus circula em ambientes silvestres e pode ser levado para áreas limítrofes de atividades humanas por animais silvestres, transmitido para animais peridomésticos através do contato direto ou por contato com excremento desses animais. Os animais peridomésticos podem carregar o vírus para o contato com humanos e animais domésticos, desencadeando então os surtos. Fonte: ABRAHÃO et al., 2011.

Capivaras apresentam características que permitem que elas se encaixem perfeitamente no modelo proposto para a circulação de VACV. O seu hábitat preferencial são áreas próximas à fazendas, na zona de transição entre o ambiente silvestre e doméstico. Há sobreposição das áreas utilizadas por capivaras e animais de produção, o que poderia favorecer o tráfego viral. Além disso, as capivaras compartilham características biológicas e estruturais e estão filogeneticamente relacionadas aos pequenos roedores previamente associados ao vírus.

A susceptibilidade das capivaras ao VACV foi sugerida em dois trabalhos até o presente momento, um estudo de infecção experimental e um estudo sorológico. No estudo de infecção experimental em capivara de cativeiro, realizado na década de 40, observou-se a formação da lesão característica nos animais após inoculação do vírus por escarificação. O segundo estudo, recentemente publicado, observou a soroconversão por soroneutralização de capivaras de vida livre, inclusive em áreas sem relatos oficiais da circulação do vírus. Estes dados sugerem um contato dos animais com o vírus, porém não estabelecem a sua participação no ciclo natural de transmissão. (MOREIRA, 1955; BARBOSA et al., 2014).

Nos testes preliminares realizados no presente trabalho, utilizando a plataforma qPCR e gene alvo C11R, três amostras suspeitas foram observadas: CAP5, da população do PARNA Serra do Cipó; CAP13, da população do Pantanal; e PAMP, da população da Lagoa da Pampulha. Estas amostras apresentaram ampliações em várias das réplicas testadas (CAP5: 3/5, CAP13: 4/5, PAMP: 18/20), e exibiram valores de  $T_m$  1°C menor que o controle de vírus (Tabela 5). Para a confirmação deste resultado foram realizados mais testes

moleculares utilizando outros genes alvos de OPV e os resultados mostraram a amplificação de diversos fragmentos de interesse (Tabela 7).

A PCR semi-nested realizada para o gene C11R apresentou resultado positivo para as três amostras. As sequências parciais obtidas foram analisadas e comparadas com sequências de VACV-BR e mostraram similaridade bastante alta, o que seria esperado para o gene. A análise da sequência parcial obtida para a amostra PAMP em relação ao fragmento amplificado na reação para o gene A26L também mostrou alta similaridade com sequências de VACV. Estes resultados permitiram a confirmação da presença de DNA de OPV em amostras de fezes de capivaras.

No entanto, um resultado bastante peculiar encontrado foi em relação ao gene A56R. Os fragmentos amplificados nas três amostras na PCR para o gene A56R (fragmento maior) apresentaram tamanhos bastante diferentes do esperado e entre si, enquanto a PCR para amplificação do fragmento menor apresentou resultado negativo para as três amostras. O sequenciamento revelou três sequências bastantes diferentes do que existe depositado em banco de dados quando utilizado como objeto de busca com a ferramenta BLAST (programas blastn e blastx).

Este estudo apresenta, pela primeira vez, evidência molecular da presença de VACV em amostras de fezes de capivaras. As sequências parciais obtidas para os genes C11R e A26L confirmam que estes vírus são VACV. Infelizmente não foi possível isolar o vírus de nenhuma das amostras, provavelmente devido à composição da matriz fecal ou fatores relacionados ao vírus ou hospedeiro.

Os dados sugerem que capivaras podem ser incluídas como prováveis participantes do ciclo natural de transmissão de VACV, aumentando a vigilância em relação à presença destes animais em fazendas e até mesmo em áreas urbanas. Elas poderiam carregar o vírus do ambiente silvestre para animais domésticos ao forragearem nas áreas de pastagem do gado, ou levar o vírus do ambiente doméstico para o ambiente silvestre quando retornam para estas áreas.

A detecção de uma amostra positiva para VACV em um ambiente supostamente urbano também foi uma importante observação. Entretanto não é possível excluir fatores como a introdução de capivaras a partir de outras regiões. Além disso, não é incomum encontrar pequenos roedores, cavalos ou gado próximo a Lagoa da Pampulha, e estes animais poderiam ser considerados uma fonte de infecção para o grupo de capivaras do local. E, finalmente, na lagoa utilizada pelas capivaras deságuam vários afluentes da bacia da Pampulha, que recebem água de esgoto provavelmente ao longo de toda a sua extensão.

Esta água contaminada também pode ser considerada a fonte de contaminação dos animais. Ainda é difícil determinar como este vírus chegou neste grupo particular de capivaras, mas uma vez que um indivíduo é infectado é possível especular que ele possa espalhar o vírus através das fezes, infectando outros animais do bando ou se reinfectando por coprofagia.

Mais estudos são necessários para a elucidação completa do papel das capivaras no ciclo natural de transmissão do VACV, mas estes resultados são um importante ponto de partida neste aspecto. Dados sorológicos, busca de lesões típicas e isolamento do vírus serão pontos importantes a serem explorados no futuro. Mais importante, a associação de dados ecológicos a resultados de laboratório permitirão entender como estes animais participam e qual o seu impacto na circulação de VACV no Brasil.

### **7.2. Isolamento de vírus**

Para o isolamento de vírus foram utilizadas várias estratégias diferentes, tanto em relação ao sistema células quanto em relação ao tratamento das amostras, com o objetivo de aumentar as chances de sucesso. Como mencionado anteriormente, as células Vero foram utilizadas como um sistema permissivo para vírus animais em geral, as células BHK-21 como um sistema mais específico para vírus relacionados a roedores e as amebas como um sistema permissivo aos vírus gigantes. Todo este esforço culminou no sucesso do isolamento de um vírus animal e um vírus gigante.

### **7.3. Isolamento de vírus em célula animal**

Para o isolamento de vírus de animal, a estratégia de isolamento que alcançou sucesso foi a de utilização de amostra diluída em sistema de células Vero. O isolamento de vírus foi observado pela formação de placas de lise no 5º d.p.i., na segunda passagem da amostra CAP10. Na terceira passagem a formação de ECP foi observada novamente no 5º d.p.i.. Uma observação bastante interessante realizada nessas duas passagens do isolamento é que o efeito só era observado na diluição 1:4 da amostra.

A partir da 3ª passagem foi realizado o ensaio de seleção clonal, que só conseguiu obter efeito homogêneo na 5ª passagem. Ao longo do processo de seleção de clones foram observadas formações semelhantes a sincícios e formações semelhantes a cordões de células, que não eram observados no controle de célula. Estas formações podem ser efeito da multiplicação do vírus em questão ou de outro vírus isolado simultaneamente.

O ensaio de microscopia eletrônica, realizado com amostra de 3ª passagem, mostrou a presença de duas estruturas diferentes: (a) uma partícula elétron-densa de 40 a 60nm, forma geométrica irregular, aglomeradas em regiões do citoplasma delimitado por membrana; e (b) formações arredondadas de cerca de 90nm, possivelmente delimitadas por membrana. Estes resultados sugerem a hipótese de co-infecção, no entanto não a confirmam. Outros testes biológicos serão necessários para confirmação.

O resultado do teste molecular da amostra inicial (fezes diluídas) apontou suspeitas para BVDV, norovírus e enterovírus, já os resultados pós-isolamento apontaram apenas para enterovírus. O sequenciamento do fragmento amplificado pós-isolamento confirmou o resultado apresentando uma sequência de enterovírus com similaridade a EV-A e EV-B, no entanto trata-se de uma sequência muito pequena e de uma região muito conservada entre eles, o que dificulta a identificação.

Mais ensaios biológicos e moleculares serão necessários para a identificação satisfatória do vírus isolado.

#### **7.4. Isolamento de vírus gigante**

A estratégia utilizada para o isolamento de vírus gigantes foi bem específica para este grupo: enriquecimento e filtragem das amostras e isolamento em células de amebas. O resultado obtido foi o isolamento de vírus a partir da amostra CAP2. A amostra da qual o vírus foi isolado não apresentou resultado suspeito no teste de qPCR. Isto pode ser devido à baixa carga viral pré-enriquecimento.

O vírus isolado foi multiplicado em dois ensaios, com coletas em dias diferentes, onde se observou uma lentidão na apresentação de efeito citopático. Este dado sugeriu uma lenta multiplicação deste vírus em relação a outros vírus gigantes já isolados, um resultado condizente com o que fora observado para o vírus gigante já isolado na mesma região (Abrahão, informação pessoal).

A lenta multiplicação do vírus isolado foi observada também no processo de titulação e isto interferiu na leitura do resultado. O vírus multiplicado por apenas 4 dias apresenta valores mais baixos na leitura do 7º quando comparado ao vírus multiplicado por 6 dias, e ambos apresentam valores semelhantes na leitura do 11º dia. Estes resultados sugerem que: (a) o vírus coletado precocemente possui título menor, condizente com o tempo de multiplicação viral e (b) no 11º dia o vírus de maior título já atingiu a saturação do sistema e não se multiplica tão eficientemente, de forma que o vírus de menor título consegue alcançar a sua multiplicação.

Não foi possível visualizar partículas virais nas imagens de microscopia eletrônica deste vírus isolado e isto se deve, provavelmente, à infecção das células com baixo título viral e a possível taxa de multiplicação baixa deste vírus.

## **8. Conclusões**

Este trabalho é uma investigação preliminar da presença de vírus em populações de capivaras em dois biomas brasileiros e os dados obtidos sugerem a suspeita da presença de diversos dos vírus pesquisados nas populações amostradas. É importante ressaltar, no entanto, que os resultados preliminares tratam apenas da suspeita da presença dos vírus e que a confirmação da presença destes vírus é necessária, seja ela realizada a partir das amostras atuais ou em outro estudo independente. A partir da confirmação desses dados será possível delinear estudos futuros, selecionando de maneira mais assertiva metodologias, alvos virais e as populações a serem utilizadas como objeto de estudo em trabalhos futuros.

Neste trabalho foram isolados dois vírus, um vírus animal e um vírus gigante. Mais ensaios biológicos e moleculares devem ser realizados para identificar e caracterizar ambos os vírus isolados.

Em relação aos OPV, neste trabalho foi possível identificar amostras suspeitas para a presença deste grupo de vírus e, utilizando mais testes, confirmar a presença de DNA viral nas fezes de capivara. Então, este estudo apresenta, pela primeira vez, evidência molecular da presença de VACV em fezes de capivaras. Para esclarecer o papel das capivaras no ciclo natural de transmissão do VACV outros estudos serão necessários.

## 9. Referência bibliográfica

ABRAHÃO, Jonatas Santos et al. One more piece in the VACV ecological puzzle: could peridomestic rodents be the link between wildlife and bovine vaccinia outbreaks in Brazil? PLoS One. 2009c Oct 19;4(10):e7428. doi: 10.1371/journal.pone.0007428.

ABRAHÃO, Jonatas Santos et al. Outbreak of severe zoonotic vaccinia virus infection, southeastern Brazil. Emerg Infect Dis. V. 21, n. 4, p. 695-698. 2015

ABRAHÃO, Jonatas Santos et al. Nested-multiplex PCR detection of Orthopoxvirus and Parapoxvirus directly from exanthematic clinical samples. Virol J. 2009b Sep 11;6:140. doi: 10.1186/1743-422X-6-140.

ABRAHÃO, Jonatas Santos et al. Vaccinia virus infection in monkeys, Brazilian Amazon. Emerg Infect Dis. 2010 Jun;16(6):976-9. doi: 10.3201/eid1606.091187.

ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic acids research, v. 25, n.17, p.3389-3402, 1997.

ALVES, Pedro Augusto. *Desenvolvimento de plataformas de qPCR para diagnóstico de doenças vesiculares de bovinos e detecção de vírus em pequenos mamíferos*. 2015. 281 f. Tese (Doutorado em Microbiologia), Universidade Federal de Minas Gerais – Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Belo Horizonte, Minas Gerais. 2015.

AMBROSIO, Lara. *Desenvolvimento de um teste de PCR em tempo real para detecção de DNA de Orthopoxvirus a partir de amostras de fezes de capivaras (Hydrochoerus hydrochaeris, Linnaeus 1766)*. 2011. 41 f. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas), Universidade Federal de Minas Gerais – Instituto de Ciências Biológicas, Belo Horizonte, Minas Gerais. 2011.

ANTHONY, Simon J. et al. Coronaviruses in bats from Mexico. Journal of General Virology, 2013. 94, 1028-1038. DOI 10.1099/vir.0.049759-0

ARKive. Disponível em: <http://www.arkive.org/explore/images/mammals?q=capybara>. Acesso em 31 de ago. 2012.

ASSIS, Felipe Lopes et al. Characterization of a new Vaccinia virus isolate reveals the C23L gene as a putative genetic marker for autochthonous Group 1 Brazilian Vaccinia virus. PLoS One. 2012;7(11):e50413. doi: 10.1371/journal.pone.0050413. Epub 2012 Nov 26.

ASSIS, Felipe Lopes et al. Reemergence of vaccinia virus during zoonotic outbreak, Pará State, Brazil. Emerg Infect Dis. V. 19, n. 12, p. 2017-2020. 2013

AZCARATE, Tomas. Sociobiología y manejo del capibara. Donana Acta Vertebrata, 7, 1981.

BARBOSA, André Victor et al. Presence of neutralizing antibodies to Orthopoxvirus in capybaras (Hydrochoerus hydrochaeris) in Brazil. J. Infect Dev Ctries. v. 8, n. 12, p. 1646-1649, 2014.

BARRETO, Guillermo R.; HERRERA, Emilio A. Foraging patterns of capybaras in a seasonally flooded savanna of Venezuela. Journal of Tropical Ecology. 14 (1), 87-98. 1998. Doi 10.1017/S0266467498000078.

- BARRETO, Guillermo R.; QUINTANA, Rúben D. Foraging Strategies and Feeding Habits of Capybaras. In: \_\_\_\_\_. *Capybara: Biology, Use and Conservation of an Exceptional Neotropical Species*. New York: Springer Science+Business Media, 2013. p. 83 – 96.
- CAMPOS, Rafael Kroon et al. Assessing the variability of Brazilian Vaccinia virus isolates from horse exanthematic lesion: coinfection with distinct viruses. *Arch Virol*. V. 156, n. 2, p. 275-283. 2011
- CATROXO, M.H.B. et al. Detection of coronavirus in capybaras (*Hydrochoeris hydrochaeris*) by transmission electron microscopy, in São Paulo, Brazil. *Int. J. Morphol.*, 2010. 28(2):549-555.
- CORRIALE, Maria J.; ARIAS, Santiago M.; QUINTANA, Rubén D. Forage Quality of Plant Species Consumed by Capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) in the Paraná River Delta, Argentina. *Rangeland Ecol Manage* 64:257–263. 2011. Doi 10.2111/REM-D-10-00024.1
- CUETO, Gerardo Rubén. Diseases of Capybaras. In: \_\_\_\_\_. *Capybara: Biology, Use and Conservation of an Exceptional Neotropical Species*. New York: Springer Science+Business Media, 2013. p. 169 – 184.
- D'ANUNCIAÇÃO, L. et al. Filling one more gap: experimental evidence of horizontal transmission of *Vaccinia virus* between bovines and rodents. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2012 Jan;12(1):61-4. doi: 10.1089/vbz.2011.0671. Epub 2011 Sep 16.
- DA FONSECA, FG. et al. Characterization of a vaccinia-like virus isolated in a Brazilian forest. *J Gen Virol*. 2002 Jan;83(Pt 1):223-8.
- DAMASO, CR. et al. An emergent poxvirus from humans and cattle in Rio de Janeiro State: Cantagalo virus may derive from Brazilian smallpox vaccine. *Virology*. 2000 Nov 25;277(2):439-49.
- DAMON, Inger K. Poxviruses. In: KNIPE, David M.; HOWLEY, Peter M. *Fields Virology*. 5ª Ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. cap. 75.
- DASZAK, Peter; CUNNINGHAM, Andrew A.; HYATT, Alex D. Emerging Infectious Diseases of Wildlife – Threats to Biodiversity and Human Health. *Science*, 2000. 287, 443. Doi: 10.1126/science.287.5452.443
- DE SOUZA TRINDADE, G. et al. Real-time PCR assay to identify variants of *Vaccinia virus*: implications for the diagnosis of bovine vaccinia in Brazil. *J Virol Methods* 2008 Sep 152(1-2):63-71.
- DE SOUZA TRINDADE, G. et al. Zoonotic vaccinia virus infection in Brazil: clinical description and implications for health professionals. *J Clin Microbiol*. 2007 Apr;45(4):1370-2. Epub 2007 Feb 7.
- de SOUZA TRINDADE, G. et al. Araçatuba virus: a vaccinia-like virus associated with infection in humans and cattle. *Emerg Infect Dis*. 2003 Feb;9(2):155-60.
- DELHON, G. et al. Genome of bovine herpesvirus 5. *Journal of virology*, v. 77, n. 19, p. 10339-10347, 2003.
- DESBIEZ, ALJ. et al. Forage use in domestic cattle (*Bos indicus*), capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) and pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*) in a seasonal Neotropical wetland. *Mammalian Biology*, 2011. 76 p.351–357.

DIERSSEN, Uta et al. Rapid routine detection of enterovirus RNA in cerebrospinal fluid by a one-step real-time RT-PCR assay. *J Clin Virol.* 2008 May;42(1):58-64. doi: 10.1016/j.jcv.2007.11.016. Epub 2007 Dec 27.

DIETZGEN, Ralf G.; KUZMIN, Ivan V. Taxonomy of Rhabdoviruses. In: \_\_\_\_\_. *Rhabdoviruses: molecular taxonomy, evolution, genomics, ecology, host-vector interactions, cytopathology and control.* Norwich, UK: Caister Academic Press. 2012. cap. 3.

DONATELLE, D. M. et al. Epidemiologia da poxvirose bovina no Estado do Espírito Santo, Brasil. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 44, n. 4, p. 275-282. 2007.

DORNAS, Fábio Pio et al. Mimivirus circulation among wild and domestic mammals, Amazon Region, Brazil, *Emerging infectious diseases*, v. 20, n. 3, p. 469–472, 2014.

DUNNUM, Jonathan L.; SALAZAR-BRAVO Jorge. Molecular systematics, taxonomy and biogeography of the genus *Cavia* (Rodentia: Caviidae). *J. Zool. Syst. Evol. Res.* 48(4), 376–388. 2010. doi: 10.1111/j.1439-0469.2009.00561

EMBRAPA. Electropherogram quality analysis. Disponível em: <HTTP://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>. Acesso em 10 jun. 2015

EMMONS, Louise H.; FEER, Francois. *Neotropical Rainforest Mammals: A Field Guide.* 2ª Ed. Chicago: University of Chicago Press, 1997.

ESSBAUER Sandra; PFEFFER, Martin; MEYER, Hermann. Zoonotic poxviruses. *Vet Microbiol.* 2010 Jan 27;140(3-4):229-36. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.08.026. Epub 2009 Aug 26.

FERRAZ, KMPMB. et al. Capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) distribution in agroecosystems: a cross-scale habitat analysis. *Journal of Biogeography.* 2007. 34, 223-230.

FERRAZ, KMPMB. et al. Damage Caused By Capybaras In A Corn Field. *Scientia Agricola*, 2003. v.60, n.1, p.191-194.

FERRAZ, KMPMB. et al. Distribution of Capybaras in an Agroecosystem, Southeastern Brazil, Based on Ecological Niche Modeling. *Journal of Mammalogy*, 2009. 90(1):189-194.

FERREIRA, JM. et al. Vaccinia virus: shedding and horizontal transmission in a murine model. *J Gen Virol.* 2008 Dec;89(Pt 12):2986-91. doi: 10.1099/vir.0.2008/003947-0.

FONSECA, FG. et al. Morphological and molecular characterization of the poxvirus BeAn 58058. *Arch Virol.* 1998;143(6):1171-86.

FORERO-MONTAÑA, Jimena; BETANCUR, Julio; CAVELIER, Jaime. Dieta del capibara *Hydrochaeris hydrochaeris* (Rodentia: Hydrochaeridae) em Caño Limón, Arauca, Colombia. *Rev. biol. trop* 51(2).. 2003

GOMES, Ivo; ROSENBERG, Felix J. et al. A possible role of capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris hydrochaeris*) in foot-and-mouth disease (FMD) endemicity. *Preventive Veterinary Medicine*, 1984. 3:197-205.

GUDYNAS, Eduardo. The Conservation Status of South American Rodents: Many Questions but Few Answers. In: LIDICKER, William Zander (ed). *Rodents: A World Survey of Species of Conservation Concern*. IUCN, Gland, Switzerland: Kelvyn Press, Inc.,. 1989. cap. 4.

HEMACHUDHA, T. et al. Human rabies: neuropathogenesis, diagnosis and amangement. *The Lancet Neurology*, 2013. 12 (5), 498-513.

HERRERA, Emilio A. Capybara Social Behavior and Use of Space: Patterns and Processes. In: \_\_\_\_\_. *Capybara: Biology, Use and Conservation of an Exceptional Neotropical Species*. New York: Springer Science+Business Media, 2013. p. 195 – 207.

HERRERA, Emilio A.; MACDONALD, David W. Aggression, dominance, and mating success among capybara males (*Hydrochaeris hydrochaeris*). *Behavioral Ecology*. 4 (2): 114-119. 1993. doi: 10.1093/beheco/4.2.114

HERRERA, Emilio A.; MACDONALD, David W. Resource Utilization and Territoriality in Group-Living Capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*). *Journal of Animal Ecology*, 58, 667-679. 1989.

HERRERA, Emilio A.; SALAS, Viviana; CONGDON, Elizabeth R.; , María José Corriale, Zuleyma Tang-Martínez. Capybara social structure and dispersal patterns: variations on a theme. *Journal of Mammalogy*, 2011. 92 (2) 12 - 20. DOI: <http://dx.doi.org/10.1644/09-MAMM-S-420.1> 12-20 First published online: 16 February 2011

HOLE, K; CLAVIJO, A; PINEDA, L. A. Detection and serotype-specific differentiation of vesicular stomatitis virus using a multiples, real-time, reverse transcription-polymerase chain reaction assay. *Journal of veterinary diagnostic investigation*, v. 18, n. 2, p. 139-146, 2006.

HOLZ, Carine L. et al. Seroprevalence of bovine herpesvirus types 1 and/or 5 in the state of Rio Grande do Sul. *Pesq. Vet. Bras.* v. 29, n. 9, 2009.

HONEYCUTT, Rodney L. Phylogenetics of Caviomorph Rodents and Genetic Perspectives on the Evolution of Sociality and Mating Systems in the Caviidae. In: MOREIRA, José Roberto et al. *Capybara: Biology, Use and Conservation of an Exceptional Neotropical Species*. New York: Springer Science+Business Media, 2013. p. 61 – 82.

HORTA, Maurício C. et al. Experimental infection of opossums *Didelphis aurita* by *Rickettsia rickettsii* and evaluation of the transmission of the infection to ticks *Amblyomma cajennense* *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2009 9:109–117.

HOWERTH, E.W. et al. Experimental vesicular stomatitis virus infection in horses: effect of route of inoculation and virus serotype. *Veterinary Pathology*,v. 43, n. 6, p. 943-955, 2006.

HUANG, X; MADAN, A. CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome research*, v. 9, n. 9, p. 868-877, 1999.

IUCN. Disponível em: <http://maps.iucnredlist.org>. Acesso em 31 de ago. 2012.

IUCN. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2015-4. <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>. Acesso em: 15 de junho 2015

JONES, C; CHOWDHURY, S. A review of the biology of bovine herpesvirus type 1 (BHV-1), its role as a cofactor in the bovine respiratory disease complex and development of improved vaccines. *Animal Health Research Reviews*, v. 8, n. 2, p. 187-205, 2007.

JONES, KE. et al. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature*, 2008. Vol 451, 990-994. doi:10.1038/nature06536

KEELE, BF. et al. Chimpanzee reservoirs of pandemic and nonpandemic HIV-1. *Science*. 2006 Jul 28;313(5786):523-6. Epub 2006 May 25

KUZMIN, Ivan V.; TORDO, Noel. Genus *Lyssavirus*. In: DIETZGEN, Ralf G.; KUZMIN, Ivan V. (eds). *Rhabdoviruses: molecular taxonomy, evolution, genomics, ecology, host-vector interactions, cytopathology and control*. Norwich, UK: Caister Academic Press. 2012. cap. 5.

LABRUNA, Marcelo B. Brazilian Spotted Fever: The Role of Capybaras. In: \_\_\_\_\_. *Capybara: Biology, Use and Conservation of an Exceptional Neotropical Species*. New York: Springer Science+Business Media, 2013. p. 371 – 384.

LAI, Michael M.C.; PERLMAN, Stanlei; ANDERSON, Larry J. *Coronaviridae*. In KNIPE, David M.; HOWLEY, Peter M. *Fields Virology*. 5ª Ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. cap. 36.

LEDERBERG, Joshua; SHOPE, Robert E.; OAKS, Stanley C. Jr. (eds). *Emerging Infections: Microbial Threats to Health in the United States*. Washington, DC: The National Academies Press, 1992.

LEDERMAN, ER. et al. Prevalence of antibodies against orthopoxviruses among residents of Likouala region, Republic of Congo: evidence for monkeypox virus exposure. *Am J Trop Med Hyg*. 2007 Dec;77(6):1150-6.

LEITE, JA. et al. *Passatempo virus*, a vaccinia virus strain, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2005 Dec;11(12):1935-8.

LEVINE, RS. et al. Ecological niche and geographic distribution of human monkeypox in Africa. *PLoS One*. 2007 Jan 31;2(1):e176.

LI, Kun. et al. Isolation and characterization of a novel arenavirus harbored by Rodents and Shrews in Zhejiang province, China. *Virology*. 2015 Feb;476:37-42. doi: 10.1016/j.virol.2014.11.026. Epub 2014 Dec 12.

LIU, W. et al. Molecular ecology and natural history of simian foamy virus infection in wild-living chimpanzees. *PLoS Pathog*. 2008 Jul 4;4(7):e1000097. doi: 10.1371/journal.ppat.1000097.

LYLES, Douglas S.; RUPPRECHT, Charles E. *Rhabdoviridae*. In KNIPE, David M.; HOWLEY, Peter M. *Fields Virology*. 5ª Ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. cap. 39.

MACDONALD, David W. et al. Dwindling resources and the social behaviour of Capybaras, (*Hydrochoerus hydrochaeris*) (Mammalia). *Journal of Zoology*, 194: 371–391. 1981. doi: 10.1111/j.1469-7998.1981.tb04588.x

MALDONADO-CHAPARRO, Adriana; PALOMINO, Pedro S. Seasonal spatial distribution patterns of a capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) population in the flooded savannas of Colombia. *Mastozoologia Neotropical*, 17(2): 287 – 294. 2010

- MARÍN, C. et al. Humoral spontaneous response to bovine leukaemia virus infection in zebu, sheep, buffalo and capybara. In: International symposium on bovine leukemia, 40. 1980, Bologna, Itália. Proceedings...Bologna, 1980, p. 310-319.
- MCKENNA, Malcom C.; BELL, Susan K. Classification of mammals above the species level. New York: Columbia University Press, 1997.
- MEDAGLIA, M. L. G. et al. Spread of Cantagalo virus to northern Brazil. *Emerging infectious diseases*, v. 15, n. 7, p. 1142, 2009.
- MEGID, Jane et al. Vaccinia virus in human and cattle in southwest Region of São Paulo State, Brazil. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 79, n. 5, p. 647-651, 2008.
- MEYER, Hermann; PFEFFER, Martin; RZIHA, Hanns-Joachim. Sequence alterations within and downstream of the A-type inclusion protein genes allow differentiation of Orthopoxvirus species by polymerase chain reaction. *J. Gen. Virol* 1994 75, 1975-1981.
- MIGLINO, Maria Angélica et al. Morphology and Reproductive Physiology of Female Capybaras. In MOREIRA, José Roberto et al. *Capybara: Biology, Use and Conservation of an Exceptional Neotropical Species*. New York: Springer Science+Business Media, 2013. p. 131 – 146.
- MILAGRES, Bruno Silva. *Perfil sorológico de algumas infecções em capivara (Hydrochaeris hydrochaeris) capturadas nos estados de São Paulo e Minas Gerais, Brasil. 2004.* 65 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Universidade Federal de Viçosa – Medicina Veterinária, Viçosa, Minas Gerais.
- MONES, Alvaro; OJASTI, Juhani. *Hydrochoerus hydrochaeris*. *Mammalian Species* 1986. 264: 1-7.
- MOREIRA, Cicero Alves. Notas sobre a evolução do vírus vacínico em animais silvestres da fauna brasileira\*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 1955. 93-94.
- MOREIRA, Jose Roberto. et al. Taxonomy, Natural History and Distribution of the Capybara. In: \_\_\_\_\_. *Capybara: Biology, Use and Conservation of an Exceptional Neotropical Species*. New York: Springer Science+Business Media, 2013a. p. 3 – 37.
- MOREIRA, Jose Roberto. et al. Capybaras Demographic Traits. In: \_\_\_\_\_. *Capybara: Biology, Use and Conservation of an Exceptional Neotropical Species*. New York: Springer Science+Business Media, 2013b. p. 147 – 167.
- MORENS, David M.; FAUCI, Anthony S. Emerging Infectious Diseases in 2012: 20 Years after the Institute of Medicine Report. *mBio*, 2012. 3(6):e00494-12. doi:10.1128/mBio.00494-12.
- MORSE, Stephen A. About the International Conference on Emerging Infectious Diseases. *Emerging Infectious Diseases*, 1998. 4, 3, 353.
- MORSE, Stephen S. et al. Prediction and prevention of the next pandemic zoonosis. *The Lancet* , 2012. 380, 1956-65.

MORSE, Stephen S. Examining the origins of emerging viruses. In: MORSE, Stephen S. *Emerging viruses*. New York: Oxford University Press, 1993: 10-28.

MORSE, Stephen S. Factors in the emergence of infectious diseases. *Emerg Infect Dis*. 1995 Jan-Mar;1(1):7-15.

MORSE, Stephen S.; SCHLUEDERBERG, Ann. From the National Institute of Allergy and Infectious Diseases, the Fogarty International Center of the National Institutes of Health, and the Rockefeller University. Emerging viruses: the evolution of viruses and viral diseases. *J Infect Dis*. 1990 Jul;162(1):1-7.

MOTA, Bruno Eduardo. Seroprevalence of orthopoxvirus in na Amazonian rural village, Acre, Brazil. *Arch Virol*. V. 155, n. 7, p. 1139-1144. 2010.

NAGASSE-SUGAHARA, T. K. et al. Human vaccinia-like virus outbreak in São Paulo and Goiás States, Brazil: virus detection, isolation and identification. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 46, n. 6, p. 315-322, 2004.

NAKAZAWA, Yoshinori. et al. Phylogenetic and ecologic perspectives of a monkeypox outbreak, southern Sudan, 2005. *Emerg Infect Dis*. 2013 Feb;19(2):237-45. doi: 10.3201/eid1902.121220.

NOGUEIRA, Márcia Furlan; CRUZ, Taís Fukuta. *Doenças da Capivara*. Corumbá, MS: Embrapa Pantanal, 2007.

NOWAK, Ronald M. *Walker's Mammals of the World*. 6ª ed. Baltimore e London: The Johns Hopkins University Press, 1991.

OJASTI, Juhani. *Estudio biológico del chigüiro o capibara*. Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias, Caracas, Venezuela. 1973

OLIVEIRA, Danilo Bretas et al. Group 1 Vaccinia virus Zoonotic outbreak in Maranhão State, Brazil. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 89, n. 6, p. 1142-1145, 2013.

PERES, Marina Gea. et al. Serological study of vaccinia virus reservoirs in áreas with and without official reports outbreak in cattle and humans in São Paulo, Brazil. *Arch Virol*. V. 158, n.12, p. 2433-2441. 2013.

QUINTANA, Rubén D.; MONGE, S; MALVÁREZ, AI. Feeding habits of capybara (*Hydrochaeris hydrochaeris*) in afforestation áreas of the Lower Delta of the Paraná River, Argentina. *Mammalia* 58 (4) 569-580. 1994.

QUIXABEIRA-SANTOS, J. C. et al. Animal movement and stablishment of vaccinia virus Cantagalo strain in Amazon biome, Brazil. *Emerging infectious diseases*, v. 17, n. 4, p. 726, 2011.

REIS, Nélio R. et al. *Mamíferos do Brasil*. Londrina. 2006.

REYNOLDS, Mary G.; CARROLL, Darin S.; KAREM, Kevin L. Factors affecting the likelihood of monkeypox's emergence and spread in the post-smallpox era. *Curr Opin Virol*. 2012 Jun;2(3):335-43. doi: 10.1016/j.coviro.2012.02.004. Epub 2012 Mar 6.

RODRÍGUEZ, Luis L. Emergence and re-emergence of vesicular stomatitis in the United States. *Virus Research*, v. 85, p. 211-219, 2002.

- RODRIGUEZ, Luis L.; PAUSZEK, Steven J. Genus *Vesiculovirus*. In: DIETZGEN, Ralf G.; KUZMIN, Ivan V. (eds). *Rhabdoviruses: molecular taxonomy, evolution, genomics, ecology, host-vector interactions, cytopathology and control*. Norwich, UK: Caister Academic Press. 2012. cap. 4.
- ROPP, Susan L. et al. PCR strategy for identification and differentiation of smallpox and other orthopoxviruses. *J. Clin. Microbiol.* 1995 33, 2069–2076.
- ROWE, Diane L.; HONEYCUTT, Rodney L. Phylogenetic Relationships, Ecological Correlates, and Molecular Evolution Within the Caviioidea (Mammalia, Rodentia). *Mol. Biol. Evol.* 19(3):263–277. 2002.
- SAMBROOK, Joseph.; RUSSEL, David W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. CSHL Press, 2001.
- SCHALLER, George B.; CRAWSHAW, Peter G. Social organization in a capybara population. *Säugetierkundliche Mitteilungen*, v.29, p.3-16,1981.
- SCHATZMAYR, H. G. et al. Human and animal infections by vaccinia-like viruses in the state of Rio de Janeiro: a novel expanding zoonosis. *Vaccine*. V. 29, n. 4, p. D65-D69. 2011.
- SCICLUNA, Maria Teresa. et al. Should the domestic buffalo (*Bubalu bubalis*) be considered in the epidemiology of Bovine Herpesvirus 1 infection? *Veterinary Microbiology*, v. 143, p. 81-88, 2010.
- SILVA, Lorena C. et al. A resourceful giant: APMV is able to interfere with human type I interferon system. *Microbes and infection*, v. 16, n. 3, p. 187-195, 2014.
- SILVA-FERNANDES, André T. et al. Natural human infections with Vaccinia virus during bovine vaccinia outbreaks. *Journal of Clinical Virology*, v. 44, n. 4, p. 308-313, 2009.
- SOUZA Celso E. Experimental infection of capybaras *Hydrochoerus hydrochaeris* by *Rickettsia rickettsii* and evaluation of the transmission of the infection to ticks *Amblyomma cajennense*. *Vet Parasitol.* 2009. 161:116–121
- STALLKNETCH, D.E. et al. Potential for contact and mechanical vectos transmission of vesicular stomatitis virus New Jersey in pigs. *American Journal of Veterinary Research*, v. 60, n. 1, p. 43-48, 1999.
- TRINDADE, Giliane de Souza. et al. Belo Horizonte virus: a vaccinia-like virus lacking the A-type inclusion body gene isolated from infected mice. *Journal of general virology*, v. 85, n. 7, p. 2015-2021, 2004.
- TRINDADE, Giliane de Souza. et al. Brazilian vaccinia viruses and their origins. *Emerg Infect Dis.* 2007 Jul;13(7):965-72. doi: 10.3201/eid1307.061404.
- TRINDADE, Giliane de Souza. et al. Short report: Isolation of two vaccinia virus strains from a single bovine vaccinia outbreak in rural area from Brazil: Implications on the emergence of zoonotic orthopoxviruses. *Am J Trop Med Hyg.* 2006 Sep;75(3):486-90.
- WELLS, EA. et al. Mammalian wildlife diseases as hazards to na na livestock in na área of the llanos orientales of Colombia. *Journal of Wildlife Diseases*, 1981. 17, 1, 153 - 162.
- WELLS, Susan K. et al. Encephalomyocarditis virus: epizootic in a zoological collection. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 1989. v. 20, n. 3, p. 291-296.

WOODS, Charles A.; KILPATRICK, C. William . Infraorder Hystricognathi. In: WILSON, Don E.; REEDER, DeeAnn M. (Eds.). *Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference*. 3. ed. Baltimore: John Hopkins University Press, 2005. v. 2, p. 1538-1600.

YÁBER, M. Carolina; HERRERA, Emilio A. Vigilance, group size and social status in capybaras. *Anim. Behav.* 48, 1301-1307. 1994.

YEO, Dawan Su-Yin et al., A highly divergent Encephalomyocarditis virus isolated from nonhuman primates in Singapore. *Virology Journal* 2013. 10:248

ZAPATA, Juan C.; SALVATO, Maria S. Arenavirus Variations Due to Host-Specific Adaptation. *Viruses*, v. 5, p. 241-278, 2013.

ZARA, John L. Breeding and husbandry of AL- capybara *Hydrochoerus hydrochaeris* at Evansville Zoo. *International Zoo Yearbook*, 1973. 13: 137–139. doi: 10.1111/j.1748-1090.1973.tb02128.x