

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

DETECÇÃO DE VÍRUS COM POTENCIAL ZONÓTICO
ASSOCIADOS À GASTROENTERITE E RAIVA EM *Cerdocyon*
***thous* DA MATA ATLÂNTICA DO ESPÍRITO SANTO**

ANA PAULA JEJESKY DE OLIVEIRA

VILA VELHA
JULHO / 2016

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

DETECÇÃO DE VÍRUS COM POTENCIAL ZONÓTICO
ASSOCIADOS À GASTROENTERITE E RAIVA EM *Cerdocyon*
***thous* DA MATA ATLÂNTICA DO ESPÍRITO SANTO**

Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, para a obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

ANA PAULA JEJESKY DE OLIVEIRA

VILA VELHA
JULHO / 2016

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

O48d Oliveira, Ana Paula Jejesky.
Detecção de vírus com potencial zoonótico associados á gastroenterite e raiva em *Cercopithecus thomasi* da Mata Atlântica do Espírito Santo / Ana Paula Jejesky Oliveira – 2016.
110 f.: il.

Orientador: João Luiz Rossi Junior
Co-orientador: Fernando Vicentini.
Dissertação (mestrado em Ciência Animal)
Universidade Vila Velha, 2016.
Inclui bibliografias.

1. Zoonose- Raiva. 2. Vírus. 3. Gastroenterologia veterinária.
I. Rossi, Junior, João Luiz. II. Vicentini, Fernando.
III. Universidade Vila Velha. VI. Título.

CDD 614.563

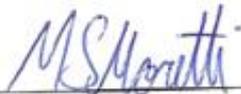
ANA PAULA JEJESKY DE OLIVEIRA

**DETECÇÃO DE VÍRUS COM POTENCIAL ZONÓTICO
ASSOCIADOS À GASTROENTERITE E RAIVA EM *Cerdocyon
thous* DA MATA ATLÂNTICA DO ESPÍRITO SANTO**

Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, para a obtenção do grau de Ciência Animal.

Aprovada em 29 de julho de 2016,

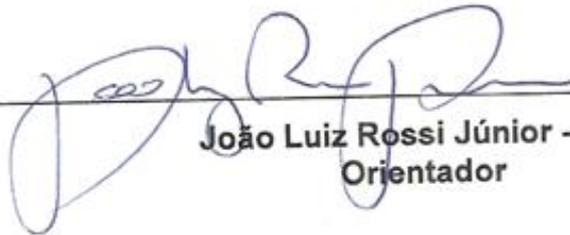
Banca Examinadora:



Marcelo da Silva Moretti - UVV



Fernando Luiz Tobias - UVV



**João Luiz Rossi Júnior - UVV
Orientador**

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho primordialmente aos meus pais, Margareth e Jorge, meus exemplos de perseverança e força, que foram meus alicerces e tornaram possível essa jornada até aqui.

Dedico a minha irmã Thais, pelo companheirismo e incentivo, sempre com palavras e frases inspiradoras.

Dedico também ao restante de minha família e amigos pela ajuda, pelos momentos de distração e pela paciência nos momentos de crise.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ser essencial em minha vida, autor de meu destino, meu guia, socorro presente na hora da angústia.

À FAPES, que possibilitou a realização desse trabalho.

Agradeço a Universidade Vila Velha e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal que me recebeu de braços abertos e viabilizou este trabalho.

À Concessionária Rodosol S.A. e a equipe Sinhá Laurinha por recolher os animais atropelados e possibilitar trabalhos como este.

Ao Dr. João Luiz Rossi Jr. pela oportunidade e por ter aceitado esse grande desafio de ser meu orientador, que me abriu portas e compartilhou comigo seu conhecimento.

Ao Dr. Fernando Vicentini pela disponibilidade e que apesar das minhas dificuldades e limitações não mediu esforços para me ajudar, compartilhando seu saber.

À Universidade Federal do Espírito Santo campus de São Mateus pela recepção e assistência indispensável.

Ao Dr. Balazs Harrach da Academia de Ciências da Hungria, bem como o Dr. Gyozo Viktor Kajan, Dra. Maria Benko, Dr. Andor Doszpoly, pela parceria indispensável à elaboração desta pesquisa.

Aos colegas do laboratório de anatomia veterinária da UVV, Daniela Neris Nossa, M.V. Maria Cristina Valderato Rangel e o funcionário Carlos Roberto Paiva, pela parceria.

Aos colegas do laboratório de microbiologia do CEUNES, Carliane Nogueira dos Passos, Débora de Meneses Souza, Mayara Caetano, Iago Mello e Déborah Jacome Rodrigues, pela grande vontade de ajudar, esforço e companheirismo.

Ao Instituto de Defesa Agropecuária e Florestal do Estado do Espírito Santo, em especial ao Departamento de Diagnóstico Laboratorial pela grande parceria.

Agradeço a todos os meus professores que participaram e contribuíram para a minha formação.

Agradeço também a banca examinadora pelas valiosas contribuições.

*“In the end will conserve only what we love,
we will love only what we understand, and we will
understand only what we have been taught.”(Baba
Dioum)*

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE TABELAS.....	XII
LISTA DE ABREVIATURAS	XIII
RESUMO	1
ABSTRACT	2
1. Introdução	3
2. Revisão de Literatura	5
2.1. <i>Cerdocyon thous</i>	6
2.2. Vírus da raiva	9
2.2.1. Agente etiológico	9
2.2.2. Transmissão, fisiopatologia e epidemiologia	11
2.3. <i>Rotavirus</i>	13
2.3.1. Agente etiológico	13
2.1.2 Transmissão, fisiopatologia e epidemiologia	16
2.4. <i>Picobirnavirus</i>	19
2.4.1. Agente etiológico	19
2.4.2. Transmissão, fisiopatologia e epidemiologia	21
2.5. Adenovírus	23
2.5.1. Agente etiológico	23
2.5.2. Transmissão, fisiopatologia e epidemiologia	28
2.6. <i>Circovirus</i> e <i>Cyclovirus</i>	30
2.6.1. Agente etiológico	30
2.6.2. Transmissão, fisiopatologia e epidemiologia	32
4. Materiais e métodos	35
4.1. Área de estudo	35
4.2. Coleta de espécimes biológicos	36
4.3. Processamento das amostras	40
4.3.1. Preparo da suspensão fecal	40
4.3.2. Preparo da suspensão de tecido (rins e fígado)	40
4.3.3. Extração de ácido Nucleico	40
4.4. Processamento das amostras de tecido nervoso encefálico	41
5. Detecção viral	42
5.1. Vírus da raiva	42
5.1.1. Imunofluorescência direta	42
5.1.2. Prova biológica -inoculação intracerebral em camundongos suíços	42
5.2. <i>Rotavirus</i> e <i>Picobirnavirus</i>	42
5.2.1. Eletroforese de gel de poliacrilamida – EGPA	42
5.3. Adenovírus	43
5.3.1 Reação em cadeia pela polimerase (PCR)	43
5.3.2. PCR e Sequenciamento	44
5.4. <i>Circovirus</i> e <i>Cyclovirus</i>	45
5.4.1. PCR e Sequenciamento	45
6. Resultados	46
6.1. Registro da ocorrência e caracterização do local dos atropelamento	46
6.2. Dados Biométricos	47
6.3. Avaliação do vírus da raiva	49
6.4. Detecção de <i>Rotavirus</i> e <i>Picobirnavirus</i>	49
6.5. Detecção de Adenovírus	50
6.6. Detecção de <i>Circovirus</i> e <i>Cyclovirus</i>	54
7. Discussão	55
7.1. Vírus da raiva	55

7.2. <i>Rotavirus e Picobinarvirus</i>	57
7.3. Adenovirus	59
7.4. <i>Circovirus</i>	61
7.5. <i>Cyclovirus</i>	62
8. Conclusão	64
REFERENCIAS	65
ANEXOS	85

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Cachorro-do-mato (<i>Cerdocyon thous</i>).	7
Figura 2	Distribuição geográfica do <i>Cerdocyon thous</i> no Brasil.	8
Figura 3	Representação esquemática do vírion da raiva.	10
Figura 4	Esquema do genoma do vírus da raiva. O genoma do vírus da raiva é de cadeia simples, “anti-sense”, não segmentado, RNA de aproximadamente 12 kb. O genoma codifica a nucleoproteína (N), fosfoproteína (P), matriz (M), glicoproteína (G) e RNA - polimerase (L).	10
Figura 5	Organização estrutural dos RV: (A) Estruturas de superfície dos RV. (B) Representação das estruturas do capsídeo interno e do core. (C) Organização estrutural dos dímeros de VP2. (D) Representação ampliada de um dos canais de classe I. As imagens de A a F são reconstruções a partir de criomicroscopia eletrônica.	13
Figura 6	Gel de poliacrilamida demonstrando os 11 segmentos de RNAs de RV com as respectivas proteínas que eles codificam.	14
Figura 7	Principais características da estrutura do genoma dos rotavírus. Na extremidade 5' e 3' as regiões não codificadoras estão indicando os nucleotídeos conservados. Em branco a região codificadora.	15
Figura 8	Classificação e diversidade genética dos <i>Rotavirus</i> pela análise filogenética do gene da VP6.	16
Figura 9	Representação esquemática do vírion dos <i>Picobirnavirus</i> .	19
Figura 10	Organização estrutural dos segmentos genômicos de <i>Picobirnavirus</i> baseado na sequência protótipo de PBV humano.	20
Figura 11	Relação filogenética entre sequências genômicas de PBV do genogrupo I, relativas a produto de 201pb do gene RpRd.	21
Figura 12	Diversidade filogenética de adenovírus representando seus gêneros <i>Mastadenovirus</i> , <i>Aviadenovirus</i> , <i>Ichtadenovirus</i> e	

	<i>Testadenovirus, Atadenovirus e Siadenovirus.</i>	24
Figura 13	Taxonomia da família Adenoviridae	25
Figura 14	Representação esquemática da estrutura organizacional das proteínas estruturais do vírion de adenovírus.	27
Figura 15	Diagrama do genoma linear dos adenovirus, mostrando os primeiros (E) e últimos (L) genes.	28
Figura 16	Representação esquemática do vírion <i>Circovirus</i> .	30
Figura 17	Organização genômica dos circovírus e cyclovirus em animais.	31
Figura 18	Análise filogenética com membros representativos da família <i>Circoviridae</i> .	32
Figura 19	Mapa do Brasil e do Estado do Espírito Santo, indicando a extensão da Rodovia do Sol.	36
Figura 20	Exemplar de <i>Cerdocyon thous</i> submetido aos exames biométricos e exames necroscópicos.	38
Figura 21	Abertura da caixa craniana de um exemplar de <i>Cerdocyon thous</i> , feita por meio de broca cirúrgica de uso odontológico, acoplado a uma caneta de alta rotação e micromotor odontológico.	39
Figura 22	Utilização da cuba LCV 10x10 (Loccus) para realização da eletroforese em gel de poliacrilamida.	43
Figura 23	Identificação dos quilômetros em que foi feito recolhimento dos <i>Cerdocyon thous</i> pela Rodosol, representados quanto à presença de vírus (cor vermelha) ou não (cor amarela) nas amostras.	46
Figura 24	Identificação de propriedades rurais próximas à extensão da ES-060.	47
Figura 25	Eletroforese em gel de agarose com resultado positivo para amostra VS40 realizada com produtos de PCR de 550 pb e 300 pb respectivamente, a partir das amostras de fezes e tecido de <i>Cerdocyon thous</i> .	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Identificação dos exemplares de <i>Cerdocyon thous</i> necropsiados no período de 2014 a 2015.	37
Tabela 2	Identificação do material biológico de <i>Cerdocyon thous</i> , para avaliação dos vírus relacionados à gastroenterite e raiva.	39
Tabela 3	Iniciadores utilizados nas reações de PCR e Nested-PCR para detecção do genoma de adenovírus, conforme descrito por Wellehan et al. (2004).	44
Tabela 4	Resultados das avaliações biométricas e identificação das amostras de <i>Cerdocyon thous</i> necropsiados no período de 2014 a 2015.	48
Tabela 5	Resultados das análises das amostras de tecido nervoso de <i>Cerdocyon thous</i> de vida livre, utilizando as técnicas de Imunofluorescência direta e Prova Biológica por inoculação intracerebral em camundongos suíços.	49
Tabela 6	Resultados das análises de RNAds de rotavírus e picobirnavírus, utilizando a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) em amostras fecais de <i>Cerdocyon thous</i> de vida livre.	50
Tabela 7	Resultado dos testes de PCR e Nested-PCR na detecção de sugestivas bandas com 550 pb e 300 pb em amostras de fezes e tecido de <i>Cerdocyon thous</i> de vida livre.	51
Tabela 8	Detecção de DNAfd de adenovírus, por PCR em <i>Cerdocyon thous</i> de vida livre.	53

LISTA DE ABREVIATURAS

BLAST – Basic Local Alignment Search Tool

°C - Graus Celsius

µL - Microlitro

C. brachyurus - *Chrysocyon brachyurus*

CAV-1 – Canine Adenovirus type 1

CAP - Gene da proteína do capsídeo

CCN - Cérebro de Camundongo Normal

CCI - Cérebro de Camundongo Infectado

CEUNES - Centro Universitário norte do Espírito Santo

CPV - *Canino parvovirus*

C. thous - *Cerdocyon thous* (cachorro-do-mato)

CyCVs - *Cyclovirus*

EGPA - Eletroforese de gel de poliacrilamida

dNTP - Desoxirribonucleotídeos Tri-Fosfatados (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)

DNA - Ácido desoxirribonucleico

EIE - Ensaio Imuno-Enzimático (ELISA)

g – Grama

HAdV - *Human adenovirus*

IBEES - Instituto Biológico do Estado do Espírito Santo

IDAF - Instituto de Defesa Agropecuária e Florestal do Espírito Santo

IUCN - *International Union for Conservation of Nature*

kg – Kilo/grama

KM – Quilômetro

L. pardalis - *Leopardus pardalis*

m - Metros

min - Minutos

mL – Mililitro

pb – pares de base

P. cancrivorus - *Procyon cancrivorus*

P. concolor - *Puma concolor*

ONU - União das Nações Unidas

PBV - *Picobirnavirus*

PCR - Reação em cadeia pela polimerase

PCV- *Porcine Circovirus*

REP – Gene da proteína iniciadora da replicação em círculo rolante

RNA - Ácido ribonucléico

RV - *Rotavirus*

s - Segundos

S. venaticus - *Speothos venaticus*

UVV - Universidade Vila Velha

RESUMO

OLIVEIRA, ANA PAULA JEJESKY, M.Sc, Universidade Vila Velha – ES, Julho de 2016. **Detecção de vírus com potencial zoonótico associados á gastroenterite e raiva em *Cerdocyon thous* da Mata Atlântica do Espírito Santo.** Orientador: Dr. João Luiz Rossi Junior e Coorientador: Dr. Fernando Vicentini.

Conhecer as doenças infecciosas que acometem espécies selvagens é importante não só para a saúde e conservação das mesmas, mas também é de grande relevância para saúde pública e animal, onde 60% das doenças infecciosas humanas são zoonóticas. *Cerdocyon thous* é um hospedeiro em potencial e infecções por vírus nesta espécie foram pouco relatadas. No Espírito Santo o território é recortado por rodovias estaduais e federais, que muitas vezes, atravessam ambientes naturais, um problema crescente para a manutenção de espécies selvagens, pelo estreito contato com criações domésticas, pelo grande número de animais que morrem por acidentes com veículos automotores e ainda levando ao isolamento populacional de algumas espécies. O objetivo deste trabalho foi registrar os atropelamentos e avaliar a ocorrência do vírus da raiva, *Rotavirus*, *Picobirnavirus*, *Adenovirus*, *Circovirus* e *Cyclovirus* em *Cerdocyon thous* de vida livre, oriundos de atropelamento na rodovia estadual ES-060. Na detecção do vírus da raiva foi utilizado à técnica de Imunofluorescência direta e prova biológica. Para detecção dos demais vírus, foi utilizada a técnica de Eletroforese em gel de poliacrilamida para detecção de RNAs dos RV e dos PBV. Para detecção dos adenovírus, amostras, foram submetidas ao PCR e encaminhadas a Academia de Ciências da Hungria para confirmação e sequenciamento. Do total de 29 exemplares de *C. thous*, 11 amostras fecais foram enviadas para sequenciamento, resultando em uma amostra (VS41) positiva para Adenovirus Aviário E 8b e *Cyclovirus* equino 1, outra amostra (VS40) foi positiva para *Circovirus* suíno tipo 2. Para os testes do vírus da raiva, *Rotavirus* e *Picobirnavirus*, as 29 amostras testadas apresentaram resultados negativos. A detecção de vírus de outras espécies de animais nas fezes do *C. thous*, sugere que os animais não foram infectados pelos três vírus detectados, mas possivelmente se alimentaram de alimentos infectados, podendo atuar como vetor mecânico dos vírus que infectam suas presas, restando ainda a possibilidade de serem vírus zoonóticos que circulam entre diferentes hospedeiros. Outras análises são necessárias para esclarecer a origem dos vírus detectados.

Palavras chaves: Saúde única, atropelamento da fauna, vírus, canídeo selvagem, zoonose.

ABSTRACT

OLIVEIRA, ANA PAULA JEJESKY DE OLIVEIRA, M.Sc, University of Vila Velha – ES, July de 2016. **Detection of viruses with zoonotic potential associated with gastroenteritis and anger in thous thous of the Atlantic Forest of the Holy Spirit.** Advisor: Dr. João Luiz Rossi Junior and Co advisor: Fernando Vicentini.

Knowing the infectious diseases that affect wild species is not only important for the health and maintenance of the same, but is also of great relevance to public and animal health, where 60% of human infectious diseases are zoonotic. *Cerdocyon thous* is a potential host and virus infections in this species were poorly reported. In the Espírito Santo the territory is cut by state and federal highways, which often cross natural environments, a growing problem for the maintenance of wildlife at close contact with domestic livestock, the large number of animals that die from motor vehicle accidents and further leading to the isolation of some species population. The objective of this study was to record the roadkill and evaluate the occurrence of rabies virus, *Rotavirus*, *Picobirnavirus*, *Adenovirus*, *Circovirus* and *Cyclovirus* in *Cerdocyon thous* free life, coming from trampling the ES-060 state highway. In the detection of rabies virus was used to direct immunofluorescence technique and biological evidence. For detection of other viruses, it used the technique of electrophoresis on polyacrylamide gel RNAs for detection of the RV and PBV. For detection of adenovirus samples were submitted to PCR and sent the Hungarian Academy of Sciences for confirmation and sequencing. Of the total of 29 specimens of *C. thous*, 11 fecal samples were submitted for sequencing, resulting in a sample (VS41) positive for Avian adenovirus and 8b and equine cyclovirus 1, another sample (SV40) was positive for porcine circovirus type 2. To virus tests rage, Rotavirus and Picobirnavirus, the 29 samples tested were negative. Detection of viruses in other animal species in the feces of *C. thous*, suggests that the animals were not infected by the three viruses detected, but possibly fed on infected food may act as mechanical vector of viruses that infect their prey, leaving yet the possibility of zoonotic viruses that circulate among different hosts. Further analysis is needed to clarify the origin of detected viruses.

Keywords: Only health, fauna trampling, viruses, wild canid, zoonosis.

1. INTRODUÇÃO

A ocorrência de doenças infecciosas vem sendo relatada como uma importante ameaça para a conservação de animais selvagens de vida livre e saúde pública e animal, assim como por outros diversos fatores, fragmentação e redução de *habitat* naturais, caça e redução de presas. Fatores estes relacionados com atividades antrópicas, devido ao crescimento da população humana em consequência o aumento da densidade de animais domésticos no entorno de áreas protegidas, que propicia o aumento do contato entre essas populações favorecendo a transmissão de doenças (Cleaveland et al., 2001 e Barbosa et al., 2011).

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (2009), 60% dos patógenos humanos são zoonóticos e 75% das enfermidades emergentes humanas são de origem animal. Dessa forma, os animais selvagens podem ser fonte de infecção, agindo como reservatórios para agentes que afetam os domésticos e os seres humanos. E por outro lado, não se pode descartar a possibilidade do inverso também acontecer, ocasionando declínios significativos em populações selvagens devido a agentes oriundos de animais domésticos e do próprio homem, uma vez que possui poucas informações sobre a exposição de doenças infecciosas em canídeos selvagens (Daszak et al., 2000).

A Mata Atlântica é listada como um *hotspot* de conservação pela organização conservacionista *Conservation International* (Tabarelli et al., 2005a; Instituto Florestal, 2006), por ser uma região biologicamente rica, porém ameaçada. O bioma constitui o mais rico em biodiversidade do planeta, possui 1.300.000km² e atinge 15% do território nacional englobando 17 Estados Brasileiros, incluindo o Espírito Santo. Somado a magnitude desses números, outro dado modifica a percepção sobre a imensidão desse bioma, já que está reduzida a aproximadamente 7% da sua extensão original e mais de 80% dos fragmentos possuem menos de 50 hectares (Tabarelli et al., 2005b e Ribeiro et al., 2009), devido a ação humana e a pressão de sua ocupação (SOS Mata Atlântica, 2012).

Associado ao domínio da Mata Atlântica, a restinga é um ecossistema que compreende um conjunto geomorfológico formado pela deposição de sedimentos arenosos de origem marinha e flúvio-marinha. Possui diversas formações como barras, esporões e planícies ao longo do litoral do Brasil e estas formações abrigam coberturas vegetais de fisionomia diferentes, dispostas em

mosaicos e com grande diversidade ecológica (Araújo e Maciel, 1998; Falkenberg 1999, Scarano, 2002; Souza, 2004). Devido a seu tipo de flora, está exposta a soterramento pela areia, frequência do vento, falta de água ou em alguns locais o alagamento, alta salinidade, pobreza de nutrientes no solo, excesso de calor e luminosidade (Rizzini, 1997). Em função destes fatores, a restinga é considerada um ambiente de extrema fragilidade (Guedes et al., 2006) e são legalmente Áreas de Proteção Permanente - APPs (Lei 4.771/65 do Código Florestal, art. 2º).

O *Cerdocyon thous* (Linnaeus, 1766), pertence à família Canidae, ordem Carnívora, é uma espécie de médio porte encontrada em vários habitats diferentes e tem sido considerada comum em planícies costeiras (restingas) (Zubiri et al., 1990; Motta Jr. et al., 1994; Pessoa et al., 2010). É uma espécie considerada oportunista e generalista, se beneficiando, assim, em parte, de algumas alterações antrópicas (Faria-Corrêa, 2004). Se alimenta de uma vasta lista de itens como frutos, insetos, crustáceos, pequenos mamíferos, aves, répteis, anfíbios, ovos de diversas espécies (Motta Jr. et al., 1994; Beisiegel, 1999; Juarez e Marinho Filho, 2002; Facure et al., 2003) e carcaças de animais domésticos, como bovinos (Lemos et al., 2011a). Devido isso são animais mais suscetíveis a várias doenças.

A ocorrência de mortes por colisões com veículos automotores com essa espécie tem aumentado em todo o Brasil devido á grande fragmentação dos *habitats*, a disponibilidade de alimento ao longo da rodovia que atraem os animais (Clevenger et al., 2003) e por *C. thous* habitarem principalmente as bordas de florestas (Vieira e Port 2007 e Di Bitetti et al., 2009). Com isso a espécie tem sido muito impactada sendo uma das mais atropeladas (Vieira, 1996; Rosa e Mauhs, 2004; Prada, 2004; Cherém et al., 2007; Rezini, 2010; Lemos et al., 2011b).

A Rodosol, uma das principais rodovias da grande Vitória, faz um trabalho de monitoria e recolhimento de animais para averiguação da ocorrência de incidentes, acidentes e atropelamentos de fauna. Os animais encontrados mortos e/ou vivos são recolhidos, identificados e posteriormente são encaminhados a instituições de pesquisas.

A partir de trabalhos como este desenvolvido pela Rodosol, a utilização de animais mortos às margens de rodovias tem proporcionado material para estudo sem a necessidade de captura, além de facilitar o acesso dos pesquisadores a esse material, permitindo avaliar fatores ecológicos e epidemiológicos que podem influenciar na distribuição de infecções entre as populações (Fiorello et al., 2007; Giannitti et al., 2012; Majláthová et al., 2007).

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Se comparado à perda de *habitats*, caça e poluição, a ocorrência de doenças está camuflada no que diz respeito à conservação de espécies selvagens por não ser um problema visível. Entretanto, a ocorrência de patógenos pode afetar a abundância e distribuição de animais. Ao longo dos anos o impacto das doenças nas populações de espécies selvagens de vida livre tem chamado à atenção de conservacionistas (Murray et al., 1999).

Alguns animais são mais susceptíveis a diversas doenças infecciosas. Assim como o *C. thous*, que rotineiramente cobrem vastas áreas para obter suas necessidades alimentares, ou mesmo a procura de parceiros, passando principalmente por bordas de matas e áreas alteradas pelo homem, dessa forma aumentando seu contato com o meio urbano (Reilly et al., 1970).

O crescimento da população humana, o aumento da densidade de animais domésticos, junto à invasão, destruição e fragmentação do ambiente natural, tem propiciado o aumento do contato entre animais selvagens e domésticos, tornando mais comum à ocorrência de epidemias de doenças infecciosas nas populações selvagens de agentes provenientes dos animais domésticos (Funk et al., 2001). Entretanto, não se pode descartar a possibilidade de animais selvagens servirem de fonte de infecções para animais domésticos e em alguns casos para seres humanos, ameaçando a eficácia de programas nacionais e internacionais de controle e erradicação de doenças, implantados mediante alto investimento financeiro gerando sério impacto socioeconômico e de saúde coletiva (Bengis et al., 2002). Uma vez que em relação aos canídeos selvagens como o cachorro-do-mato, doenças infecciosas como a raiva, já vem sendo relatada na região Nordeste, incluindo episódios de transmissão destes para seres humanos (Carnieli et al., 2006 e Carnieli et al., 2008).

As populações de carnívoros selvagens são de vital importância para o equilíbrio da maioria dos ecossistemas além de serem potencialmente susceptíveis a várias doenças devido a seus hábitos alimentares (Fiorello, 2007). Eles são predadores topo da cadeia alimentar, ou seja, são espécies sentinelas e o declínio destas populações pode resultar em uma ameaça ao meio ambiente (Murray, 1999). Outro aspecto relevante é que carnívoros podem agir como reservatório de

patógenos, visto que, por ocuparem o topo da cadeia trófica, o consumo de hospedeiros infectados resulta em altas taxas de infecção. Desta forma, algumas espécies de carnívoros, como o *C. thous*, sendo alvos estratégicos em programas de vigilância para a detecção de patógenos (Aguirre, 2009).

Embora alguns estudos já tenham sido realizados com animais em cativeiro, há poucos relatos sobre infecções em carnívoros selvagens de vida livre (Giannitti et al., 2012 e Hübner et al., 2010). Informações sobre a mortalidade da fauna e suas possíveis causas relacionadas às doenças infecciosas virais ainda são pouco avaliadas, possivelmente por causa da dificuldade na realização de estudos, considerando o alto custo e o tempo necessário para tal fim (Curi et al., 2010; Deem e Emmons, 2005) .

A maioria das recentes emergências de doenças infecciosas é causada por mudanças nas interações ecológicas entre patógenos e hospedeiros. Tais mudanças podem ser naturais ou de origem antropogênica, incluindo expansão das atividades humanas e fronteiras agropecuárias, fragmentação de habitats, poluição, entre outras. Essas mudanças ecológicas podem permitir o aumento do contato entre espécies de patógenos e novas populações de hospedeiros, onde a seleção natural pressiona para a dominância de patógenos que se adaptem a essas novas condições ambientais (Daszak et al., 2001).

2.1. *Cerdocyon thous*

Cerdocyon thous (Linnaeus, 1766) conhecido como cachorro-do-mato ou graxaim-do-mato, é um canídeo selvagem, da família Canidae, da ordem Carnivora. Possui sua distribuição mais ampla na América do Sul (Cheida et al., 2006 e Hunter, 2011). Com pelagem cinza-claro, amarelo e faixa de pelos pretos no dorso (Figura 1), tem massa corporal na fase adulta entre 5 a 9 kg e pode chegar a 1,2 m entre a extremidade rostral e a cauda (Kasper et al., 2014).

O *C. thous* não é considerado uma espécie em extinção, consta no apêndice II da Convenção sobre o Comércio Internacional de Espécies Ameaçadas de Fauna e Flora Silvestres (CITES 2012) e não se encontra na lista vermelha das espécies do IBAMA (2004). É uma espécie considerada como Menos Preocupante (LC) pela IUCN - *Union for Conservation of Nature and Natural Resources* (IUCN, 2006), provavelmente por ser relativamente comum ao longo de sua área de distribuição, mas não há estimativas de tamanho populacional.



Figura 1: Cachorro-do-mato (*Cercocyon thous*). Fonte: www.procarnivoros.org.br

A distribuição geográfica dos *C. thous* vai desde o Uruguai e norte da Argentina até as terras baixas da Bolívia e Venezuela (Figura 2), ocorrendo também na Colômbia, Guiana, Suriname e Brasil (Reis et al., 2006). No Brasil a espécie é encontrada nos biomas Cerrado, Caatinga, Pantanal, Mata Atlântica e Campos Sulinos, utilizando bordas de matas e áreas alteradas e habitadas pelo homem (Reis et al., 2006). Possui hábito preferencialmente noturno, desloca-se solitário ou aos pares, por trilhas, bordas de mata e estradas à procura de alimentos (Nakano-Oliveira, 2006).

C. thous é uma espécie territorialista sendo que as áreas de uso, ou seja, a área mínima que pode sustentar os requerimentos energéticos dessa espécie varia muito ao longo da sua distribuição geográfica. A maior área descrita por *C. thous* no Brasil chegou a atingir 12.8 km² em ambientes alterados de Mata Atlântica e região de Cerrado (Michalski, 2000; Juarez e Marinho-Filho, 2002).

Aparentemente, é uma espécie tolerante a perturbações antrópicas, (Courtenay e Maffel, 2004; Beisiegel et al., 2013) e por esse motivo tem sido muito impactada (Vieira e Port, 2007; Di Bitetti et al., 2009), principalmente por colisões com veículos automotores (Vieira, 1996; Cherém e al., 2007; Rosa e Mauhs, 2004; Prada, 2004; Rezini, 2010; Lemos et al., 2011a). Sendo as principais causas relacionadas ao atropelamento da fauna, a disponibilidade de alimento ao longo da

rodovia e a fragmentação da área natural, que interfere no deslocamento da espécie (Forman e Alexander, 1998; Clewenger et al., 2003).



Figura 2: Distribuição geográfica do *Cerdocyon thous* no Brasil. Fonte: Beisiegel, 2013.

É uma espécie onívora e oportunista, cuja dieta varia sazonalmente. Por se alimentar de uma vasta lista de itens como roedores, insetos, répteis, anfíbios, ovos de diversas espécies, aves, frutos e vegetais, ele se torna um importante

agente controlador de populações além de um agente dispersor de sementes (Motta Jr. et al., 1994; Beisiegel, 1999; Juarez e Marinho Filho, 2002; Facure et al., 2003; Courtenay e Maffei 2004).

De acordo com Rocha et al. (2004), Courtenay e Maffei, (2004) e Cheida et al. (2006) citam que esses animais podem, ocasionalmente, alimentar-se de carcaça de animais em putrefação. Devido ao fato de suportar bem a interferência antrópica em seu hábitat, aproveitam-se, em alguns casos, da maior oferta de alimento proporcionada pelo contato próximo com a espécie humana.

Em ambientes de restinga, estudos com *C. thous*, tem demonstrado o consumo de material vegetal, animal e rejeitos humanos (Rocha et al., 2004 e Rocha et al., 2008). No estado do Espírito Santo, os itens mais importantes na dieta foram, em ordem de frequências, frutos, artrópodes e pequenos vertebrados (Gatti et al., 2006).

Estas características comportamentais, associados à fragmentação e perda de *habitat*, podem ser consideradas como os fatores negativos mais significativos para a conservação desse carnívoro selvagem em relação às doenças infecciosas, principalmente pelo fato de consumir hospedeiros infectados, o que pode resultar em altas taxas de infecção. (Alexander et al., 2010; Courtenay et al, 2001; Daszak et al, 2001; Hübner et al., 2010; Mattos et al., 2008).

2.2. Vírus da raiva

2.2.1. Agente etiológico

A raiva é uma enfermidade zoonótica e ocorre pela ação de um vírus de RNA do gênero *Lyssavirus*, da família Rhabdoviridae, a qual junto com as Famílias Bornaviridae, Filovirida, Mymonaviridae, Nyamiviridae, Paramyxoviridae, Pneumoviridae, Sunviridae e Unassigned, constituem a Ordem Mononegavirales, onde todos os membros apresentam genoma de RNA não-segmentado, de sentido negativo e de RNA de fita simples (Fenner et al., 1992; Mayo e Pringle, 1997; International Committee on Taxonomy of Viruses, 2015).

O gênero *Lyssavirus* possui sete genótipos. Entretanto nas Américas, atualmente, somente o genótipo I tem sido identificado como causador da doença (Batista et al., 2007).

O virion é envelopado, formado por uma dupla membrana fosfolipídica da qual emergem espículas de composição glicoproteíca, que cobrem o filamento de RNA (Brasil, 2009a). Possui forma de projétil ou cilindro denso com extremidades

arredondadas e apresenta um diâmetro que pode variar entre 50 a 100 nanômetros (nm) e comprimento de 100 a 430 nm (Figura 3), dependendo da espécie do vírus (Mccoll et al., 2000 e Bleck, 2006).

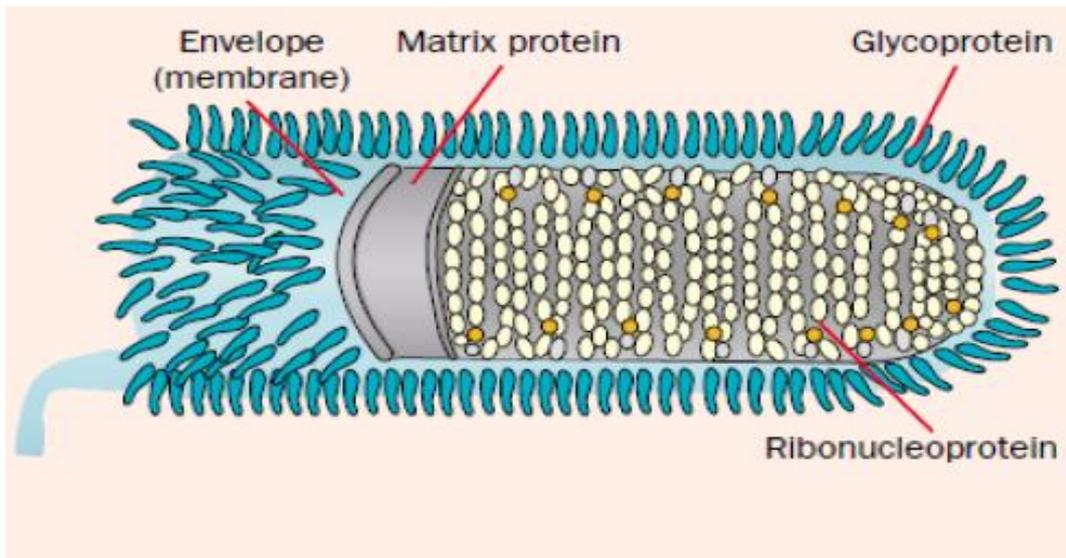


Figura 3: Representação esquemática do vírion da raiva. Fonte: Rupprecht et al. (2002).

O RNA genômico da partícula infecciosa contém cinco genes e cada qual codifica uma proteína estrutural do virion. Assim, cinco proteínas distintas compõem a partícula viral: N, P, M, G e L (Figura 4). A proteína N (nucleoproteína), a proteína P (“não- estrutural”) que associada à transcriptase L e ao RNA formam um complexo ribonucleocapsídeo (RNP); a proteína M (matriz) e a proteína G (glicoproteína) juntamente com as duas membranas lipídicas formam o envelope viral (Francki et al., 1991).

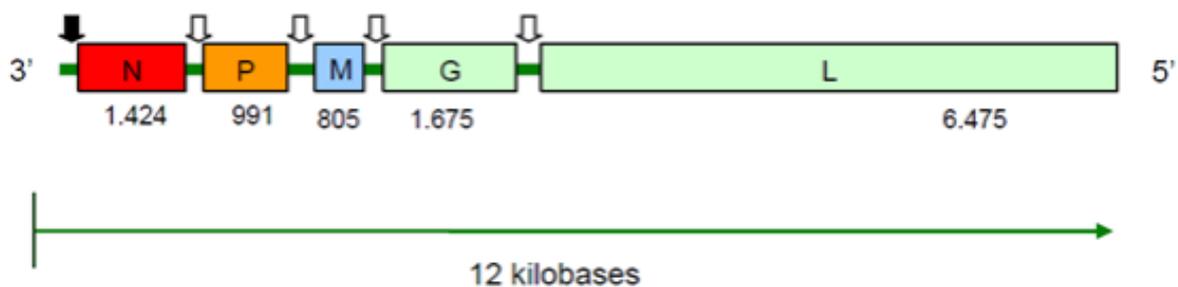


Figura 4: Esquema do genoma do vírus da raiva. O genoma do vírus da raiva é de cadeia simples, “anti-sense”, não segmentado, RNA de aproximadamente 12 kb. O

genoma codifica a nucleoproteína (N), fosfoproteína (P), matriz (M), glicoproteína (G) e RNA -polimerase (L). Fonte: CDC, 2011.

A classificação antigênica com anticorpos monoclonais, desenvolvida por Wiktor e Koprowski desde 1978 e a análise de sequências nucleotídicas têm sido utilizadas para identificar variantes virais associadas a focos de raiva em todo o mundo. No Brasil, desde 1996, pela realização de um teste de imunofluorescência indireta com a utilização de um painel de anticorpos monoclonais contra a nucleoproteína viral, produzido pelo Centers for Disease Control and Prevention (CDC), para o estudo de amostras isoladas nas Américas, puderam ser identificados seis perfis antigênicos preestabelecidos: variante 2 - isolada em cães, humanos e animais silvestres terrestres; variante 3 - isolada em *Desmodus rotundus* (Geoffroy, 1810), também em outras espécies de morcegos, animais de companhia, domésticos, silvestres terrestres e humanos; variante 4 - isolada em *Tadarida brasiliensis* (Geoffroy, 1824), também em outras espécies não hematófagas e animais de companhia; variante 5 - também relacionada a isolamentos de morcegos hematófagos, isolada de morcegos não hematófagos e em animais de companhia; variante 6 - *Lasiurus cinereus* (Beauvois, 1796), isolada de morcego insetívoro, observada em amostras de morcego não hematófago, cão e humano (Wiktor e Koprowski, 1980).

2.2.2. Transmissão, fisiopatologia e epidemiologia

Transmitido pela saliva de mamíferos terrestres e quirópteros infectados nos episódios de mordedura, o agente ocasiona um quadro de encefalomielite viral aguda de caráter progressivo, afetando o sistema nervoso central de todas as espécies de mamíferos incluindo o homem, o que acarreta níveis de mortalidade elevados (Rupprecht et al., 2001; Megid 2007).

Com a entrada do agente etiológico, o vírus se replica no local onde foi inoculado, nas células musculares ou nas células do tecido subepitelial, para então alcançar terminações nervosas. Após a replicação no sistema nervoso central, o vírus da raiva se espalha para vários tecidos por meio de nervos periféricos e atinge as glândulas salivares possibilitando a transmissão e eliminação, principalmente através de mordedura ou por outras formas de contato que possibilitem a entrada da saliva infectada na pele lesionada ou nas mucosas, como arranhaduras e lambeduras. (Rodriguez et al., 2007; Jorge et al., 2010).

O vírus possui um ciclo urbano e rural, mais fácil de controlar, e outro silvestre, que contribui para circulação e reintrodução do vírus (Jorge, 2010).

No ciclo urbano a raiva é presente em cães e gatos, enquanto que o ciclo rural da raiva é representado pelos animais de interesse econômico, como bovinos, equinos, suínos, caprinos e ovinos, sendo o principal transmissor da doença a estes animais, o morcego hematófago *Desmodus rotundus*. O ciclo silvestre caracteriza a circulação viral entre os animais selvagens, sendo subdividido em: silvestre aéreo, onde são encontrados os morcegos hematófagos e não hematófagos, e silvestre terrestre, caracterizado pela raiva em animais como as raposas, cachorros-do-mato, saguis, guaxinins e outros animais selvagens (Brasil, 2009b), sendo este último representado principalmente por saguis (*Callithrix jacchus*, Linnaeus, 1758) e também pelo cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) na região nordeste do país (Carnieli et al., 2008; Gomes, 2004).

A raiva apresenta distribuição mundial e os países se empenham em diminuir a incidência de raiva em humanos através do controle da doença nos cães. É provável que a raiva silvestre, mantida em uma variedade de hospedeiros mamíferos, venha a surgir como um novo problema para a saúde pública (Bernardi et al., 2005), pois o Brasil ainda atinge uma quantidade expressiva de óbitos nos anos em que são registrados surtos da doença. Em 2005, foram registrados, 44 óbitos, concentrados principalmente na região Norte e Nordeste (Brasil, 2007a; Brasil, 2007b).

No Brasil, a raiva é uma doença endêmica em muitas partes do país. Nos ciclos silvestres, observa-se maior número de registros em canídeos, seguidos por primatas não humanos (Albas et al., 2011; Wada et al., 2011). Sendo a espécie *C. thous* um dos principais reservatórios silvestres do vírus rábico no Brasil, assim como o sagui (*Callithrix jacchus*), o morcego hematófago (*Desmodus rotundus*) e outras 40 espécies de quirópteros (Aguar, 2011).

A partir de dados da Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS/MS), os canídeos selvagens foram responsáveis por 7,9% dos 165 óbitos de humanos com raiva, no período de 1986-2006. No Estado da Paraíba entre os anos de 2007 e 2010, foram notificados sete casos de raiva em cães e gatos, e cinco casos em canídeos silvestres (SVS, 2012).

Existem relatos de casos de *C. thous* com raiva e transmissão para humanos nos estados do Ceará, Paraíba, Pernambuco, Bahia e Minas Gerais (Araújo, 2002 e Bernardi et al., 2005) e dos 329 casos de raiva notificados no

período de 2002 a 2009, cerca de 88% eram de canídeos selvagens, todos ocorridos na região Nordeste, onde muitos desses eram mantidos como animais de estimação.

Além da destacada importância para a saúde pública, o vírus da raiva representa uma grande ameaça para a conservação de canídeos de vida livre. Uma doença de alta letalidade pode trazer graves consequências para populações de carnívoros selvagens com a introdução deste agente (Gascoyne et al., 1993)

Assim, para se compreender o vírus da raiva no ciclo silvestre, é preciso entender a relação entre agente hospedeiro e ambiente, incluindo a interação vírus-hospedeiro (susceptibilidade e infecção), a história natural dos hospedeiros (Rupprecht et al., 2001), as modificações ambientais provocadas pelo homem, ou mesmo a introdução do agente em áreas originalmente livres por transporte de indivíduos portadores.

2.3. Rotavirus

2.3.1. Agente etiológico

O rotavírus é um vírus não envelopado, possui formato icosaédrico, diâmetro de aproximadamente 70 nm e possui genoma viral formado por 11 segmentos de RNA dupla-fita (RNAs) (Figura 5), que codifica seis proteínas estruturais que compõem o capsídeo viral (VP1-VP4, VP6 e VP7) e seis proteínas não estruturais (NSP1-NSP6) (Clark e McKendrick, 2004; Estes e Kapikian, 2007).

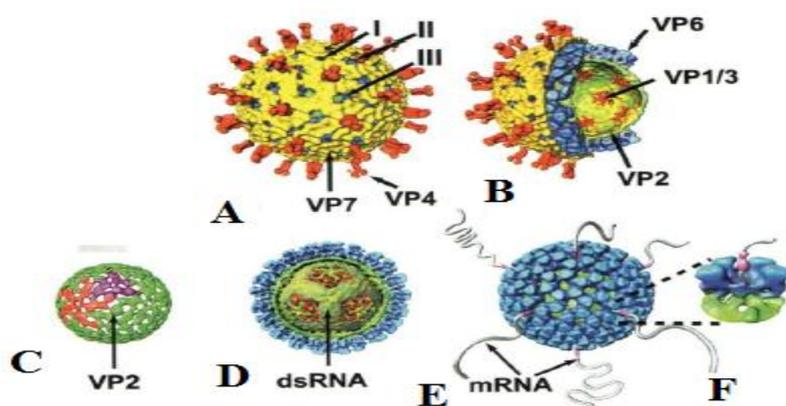


Figura 5: Organização estrutural dos RV: (A) Estruturas de superfície dos RV. (B) Representação das estruturas do capsídeo interno e do core. (C) Organização estrutural dos dímeros de VP2. (D) Representação ampliada de um dos canais de classe I. As imagens de A a F são reconstruções a partir de criomicroscopia eletrônica. Fonte: Dr B. V. Venkataram Prasad.

O tamanho dos segmentos genômicos varia entre 3302 pares de base (pb) para o maior e o menor com 667 pb. Essa diferença de tamanho permite caracterizar o perfil de migração singular dos segmentos genômicos para os rotavírus quando separados por eletroforese em gel de poliacrilamida (Figura 6) (Than e Kim, 2013).

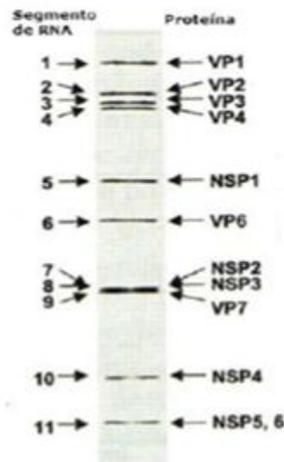


Figura 6: Gel de poliacrilamida demonstrando os 11 segmentos de RNAs de RV com as respectivas proteínas que eles codificam. Fonte: Desselberger, (2009); Angel et al. (2007).

Dessa forma, podem ser classificados de acordo com peso molecular e pelo padrão eletroforético de migração de cada segmento genômico através da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida, apresentando um perfil eletroforético típico para este vírus (Gombold et al., 1994). Este padrão apresenta uma migração distinta sendo 4 segmentos de RNAs de alto peso molecular (1 a 4), dois segmentos de médio peso molecular (5 a 6), um com segmento diferencial (7 ao 9) e por fim um grupo com 2 mais leves e menores (10 e 11) (Estes, 2001).

No genoma viral de cada segmento do RNAs codifica uma proteína, com exceção do segmento 11 que em muitos isolados do vírus codifica duas proteínas, NSP5 e NSP6 (Mattion et al., 1991; Estes e Greenberg, 2013).

Os rotavírus são compostos por três camadas concêntricas de proteínas que envolvem o genoma composto de 11 segmentos de RNAs. O tamanho completo do genoma apresenta em média 18550 pb (Estes, 1996)

Cada segmento de RNAs apresenta uma guanina na extremidade 5' seguida por uma sequência conservadora de nucleotídeos, que é parte da região não codificadora dessa extremidade do genoma. Segue-se uma região aberta de leitura, correspondente à proteína codificada pelo gene e outra região não codificadora com uma sequência também conservada. Na extremidade 3', o códon de terminação é seguido por um conjunto de sequências não-codificadoras. Estas sequências são altamente conservadas e terminam com duas citidinas. Quase todos os RNAm possuem no fim a sequência consenso 5'-UGUGACC-3', e essas sequências contêm sinais importantes para a expressão dos genes e replicação do genoma. Os comprimentos das regiões 3' e 5'-não codificadoras variam de acordo com diferentes genes (Figura 7) (Estes, 2001).

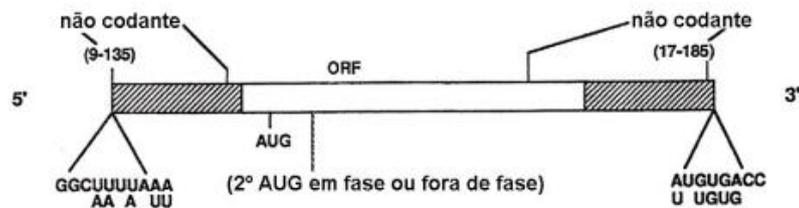


Figura 7: Principais características da estrutura do genoma dos rotavírus. Na extremidade 5' e 3' as regiões não codificadoras estão indicando os nucleotídeos conservados. Em branco a região codificadora. Fonte: Estes, (2001).

O vírus é constituído de um capsídeo triplo: externo, intermediário e interno, este último também pode ser chamado de core e confere proteção ao RNAs. O capsídeo externo compreende duas proteínas, a glicoproteína VP7 e a VP4, que definem os genótipos G e P, respectivamente, e estão relacionados à especificidade do hospedeiro, virulência e a imunidade protetora (Estes e Cohen, 1989; Kapikian et al., 2001). O capsídeo intermediário é composto pela VP6, a proteína viral mais abundante e que é utilizada na classificação dos grupos (Parashar, 1998; Desselberger, 1999).

São classificados sorologicamente em grupos, subgrupos e sorotipos em função de seus antígenos de capsídeo externo e interno, assim como em genótipos, o que caracteriza um sistema binário de classificação associado aos genes que codificam as proteínas VP4 e VP7, denominado genótipo P (para VP4) e G (para VP7) (Estes et al., 2001). Além da nomenclatura G e P, proposta pelo *Rotavirus Classification Work Group* (RCWG), pretende-se uniformizar a nomenclatura dos

rotavírus, utilizando o sequenciamento completo ou parcial de todos os 11 segmentos do material genético que inclui I, R, C, M, A, N, T, E e H, para os genes de VP4, 7, 6, 1 e 3 e as NSP 1 a 5/6 respectivamente (Matthijssens, 2012).

O vírus é classificado em oito grupos (A-H). Os grupos A, B, C são reconhecidos por infectar seres humanos e animais, enquanto que os vírus dos grupos D, E, F e G foram confirmados apenas em animais até agora (Figura 8). No entanto, em 1997, um novo grupo de rotavírus (H) foi descoberto infectando humanos adultos e que não pertencia a nenhuma outra espécie estabelecida (Yang et al., 1998; Matthijssens et al., 2012). Este novo vírus foi nomeado “novo rotavírus da diarreia adulta” (ADRV-N) (Yang et al., 2004; Alam et al., 2007). Recentemente, um vírus correlacionado ao ADRV-N foi isolado em porcos (Wakuda et al., 2011).

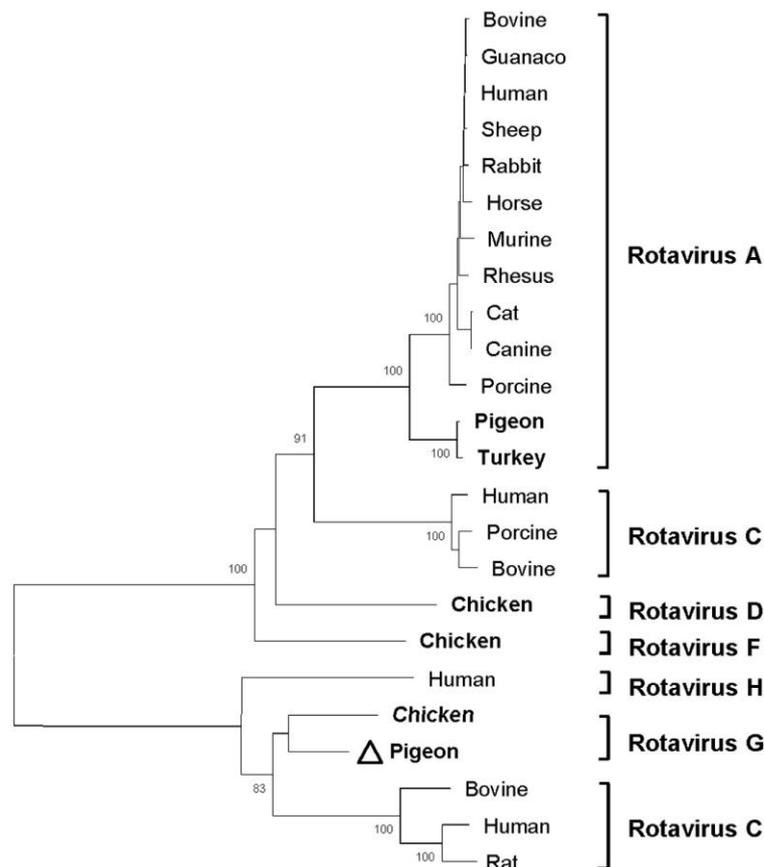


Figura 8: Classificação e diversidade genética dos *Rotavirus* pela análise filogenética do gene da VP6. Fonte: Phan et al. (2013).

2.3.2. Transmissão, fisiopatologia e epidemiologia

O *Rotavirus* do grupo A pertencente à família Reoviridae, sub-família Sedoreovirinae e gênero Rotavirus. É historicamente o principal agente causador da

gastroenterite viral aguda e responsável por alta taxa de hospitalização (Estes, 2001; Clark e McKendrick, 2004; Ramani e Kang; 2009 e Madsen et al., 2014).

Os *Rotavirus* do grupo A são os mais importantes agentes associados à diarreia nos países em desenvolvimento e responsáveis por alta taxa de hospitalização (Natchu e Bhatnagar, 2013). Ele é o principal causador de diarreia infantil humana grave e em muitas espécies de animais em todo o mundo, podendo levar a desidratação grave e morte, estando associada com, aproximadamente, mais de 500 mil mortes anuais de crianças menores de cinco anos, estimadas antes da introdução da vacina (Parashar et al., 2003; Natchu e Bhatnagar, 2013).

Algumas pesquisas sobre a prevalência de anticorpos contra o RV em mamíferos selvagens em cativeiro revelaram soropositividade em uma grande variedade de animais, indicando a susceptibilidade à infecção RV, podendo ser assintomáticas ou se expressarem por diarreia de forma moderada ou grave (Ward, 1990).

O modo de transmissão é oral-fecal através de alimentos e água contaminados com o vírus, mas alguns autores relatam a transmissão pelas vias respiratórias. O período de incubação é de 48 horas, e logo depois surgem os primeiros sinais de diarreia e o vírus é excretado nas fezes. O tempo de liberação do vírus pelo agente contaminado dura em média 10 dias, mas pode chegar até 57 dias (Richardson et al., 1998; Linhares et al., 1981; Estes e Cohen, 1989).

É sensível a detergente e solventes lipídicos (éter, clorofórmio), e sua resistência fora do hospedeiro é baixa. O vírus é rapidamente inativo a temperaturas altas, sendo destruído a 50°C durante 15 minutos. É sensível ao dessecamento, luz solar, radiação ultravioleta, hipoclorito de sódio, soda cáustica a 2%, sabões, detergentes, formalina a 10%, glutaraldeído a 2%, fenóis a 5%, cresóis. É um vírus estável por longos períodos a 4°C, entre pH 3 e 9, se conservado a -20°C em tecido mergulhados em glicerina tamponada, o vírus se mantém por vários anos. (Flores, 2012; Mayr e Guerreiro, 1972).

Os rotavírus infectam os enterócitos das vilosidades do intestino delgado e replica exclusivamente no citoplasma celular e são capazes de realizar rearranjo genético. *In vitro* o cultivo do vírus é facilitado pelo tratamento com enzimas proteolíticas, que aumentam a capacidade por infecção pela clivagem da proteína VP4, um polipeptídeo localizado no capsídeo externo. As partículas virais são formadas por brotação no retículo endoplasmático e são evidentes transitoriamente

nesta etapa da morfogênese, as partículas maduras são liberadas a partir da lise (Estes e Kapikian, 2007; Trask et al., 2012).

Esses vírus são predominantemente espécie-específicos. Entretanto, infecções heterólogas são relatadas com grande frequência. Cepas virais que são geneticamente relacionadas com vírus de origem bovina, suína, canina, felina e aviária têm sido isoladas de crianças com infecções sintomáticas ou assintomáticas. Ademais, combinações genótípicas comumente associadas com cepas de rotavírus do grupo A de origem humana têm sido identificadas em animais (Rahman et al., 2003; Steyer et al., 2008).

No Brasil, a primeira descrição de RV em humanos ocorreu em 1976, a partir de material fecal proveniente de crianças admitidas em um hospital público de Belém, PA (Linhares et al., 1977). Já a primeira descrição da presença de RV em animais foi nas décadas de 1960 e 1970 por detectar as partículas do tipo RV no intestino de animais apresentando doenças diarreicas (Estes e Kapikian, 2007).

Estudos demonstram que animais jovens de várias espécies, têm sido acometidos por infecções por RVs, mostrando que a diversidade genética de tais vírus pode ser mais frequente, principalmente nos países em desenvolvimento. Provavelmente devido aos baixos níveis de higiene, defesas imunológicas deprimidas, infecções parasitárias, desnutrição, além do estreito relacionamento entre o homem, animais domésticos e selvagens. Isso colabora para o surgimento de infecções mistas e, conseqüentemente, rearranjos genômicos (Mascarenhas et al., 2007).

Segundo uma estimativa da Organização Mundial de Saúde (OMS) feita em 2008, cerca de 453.000 mortes por ano no mundo ocorre devido à infecção por rotavírus em crianças menores de cinco anos (Tate et al., 2012).

No Brasil, a rotavirose, por se tratar de uma doença de grande magnitude, é de notificação compulsória, segundo o Ministério da Saúde, foram notificados 9.812 casos suspeitos no país de 2006 a 2012, sendo 2.347 casos confirmados, o que representa uma positividade de 23,9%. Dessa forma a vigilância epidemiológica é de extrema importância para avaliar os perfis de genótipos de rotavírus circulantes, promover medidas de prevenção e controle (Assis et al., 2013).

2.4. Picobirnavirus

2.4.1. Agente etiológico

Picobirnavirus (PBV) pertence à família Picobirnaviridae. De acordo com o Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus (ICTV) são classificados em duas espécies *Human picobirnavirus* e *Rabbit picobirnavirus*. Sua nomenclatura está diretamente relacionada às características estruturais do vírus. Seu diâmetro de 30 a 35 nm lhe rendeu o prefixo “pico”, que se refere ao diminuto tamanho do virion e “birna” (figura 9), representa o genoma viral constituído por dois segmentos de RNAs (Pereira et al., 1988a; Nates, Gatti e Ludert, 2011; ICTV, 2013).

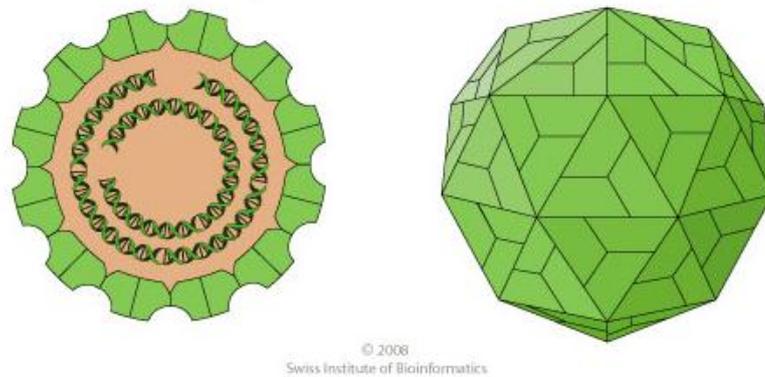


Figura 9: Representação esquemática do vírion dos *Picobirnavirus*. Fonte: http://viralzone.expasy.org/all_by_species/602.html.

O PBV é um vírus não envelopado, constituído por um capsídeo icosaédrico que protege os dois segmentos do RNAs genômico (Mondal, et al., 2014). O tamanho dos segmentos genômicos de PBV tem sido estimado utilizando como referência o perfil de migração eletroforética do genoma de estirpes de rotavírus padrão em eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) (Pereira et al., 1988b; Ludert et al., 1991).

Assim como ocorre com outros vírus de genoma RNAs, tais como rotavírus e birnavírus, as bandas que constituem os segmentos genômicos do PBV podem apresentar perfis de mobilidade eletroforética distintos (longo ou curto) em diferentes amostras submetidas à EGPA. No PBV de perfil curto, o maior segmento possui 1,75 kpb e o menor 1,55 kpb. No perfil longo, os tamanhos estimados dos segmentos maior e menor dos PBV são de 2,3 a 2,6 kpb e de 1,5 a 1,9 kpb, respectivamente (Gatti et al., 1989).

A organização do genoma desse vírus é baseada na amostra de PBV humano (Hy0050102), originária da Tailândia. Esta era a única sequência de

genoma de PBV completo conhecida até 2012, mas Woo et al. (2012) relataram o genoma completo de PBV detectado em fezes de um leão marinho. (Nates, Gatti e Ludert, 2011).

Se tratando da amostra humana Hy005012, o Segmento 1 e o Segmento 2 possuem tamanhos de 2525 e 1745 pares de bases, respectivamente. O segmento 1 possui duas regiões abertas de leitura (ORF1 e ORF2) responsáveis pela expressão de uma proteína de função ainda desconhecida e a proteína do capsídeo. O segmento 2 possui uma única região aberta leitura (ORF1) que codifica um peptídeo de 534 aminoácidos (Figura 10) (Nates et al., 2011). Com base na variabilidade genética do segmento 2, os PBVs tem sido classificados em dois genogrupos: genogrupo I (GI) e genogrupo II (GII). A maioria das amostras descritas pertence ao GI do PBV e infecta uma ampla variedade de espécies hospedeiras (Bhattacharya et al., 2007). Na figura 11 é possível observar a relação filogenética entre sequências genômicas de PBV do GI.

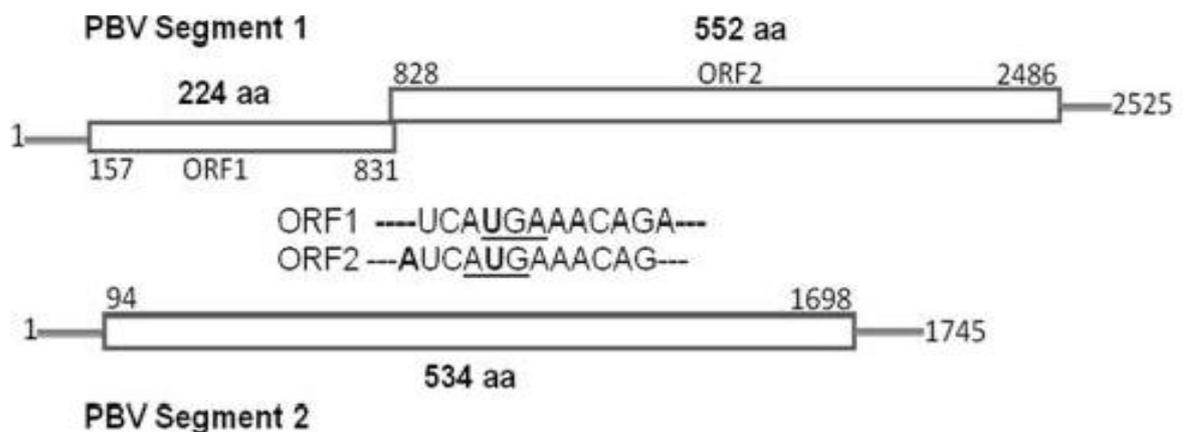


Figura 10: Organização estrutural dos segmentos genômicos de *Picobirnavirus* baseado na sequência protótipo de PBV humano. Fonte: Ganesh et al. (2014).

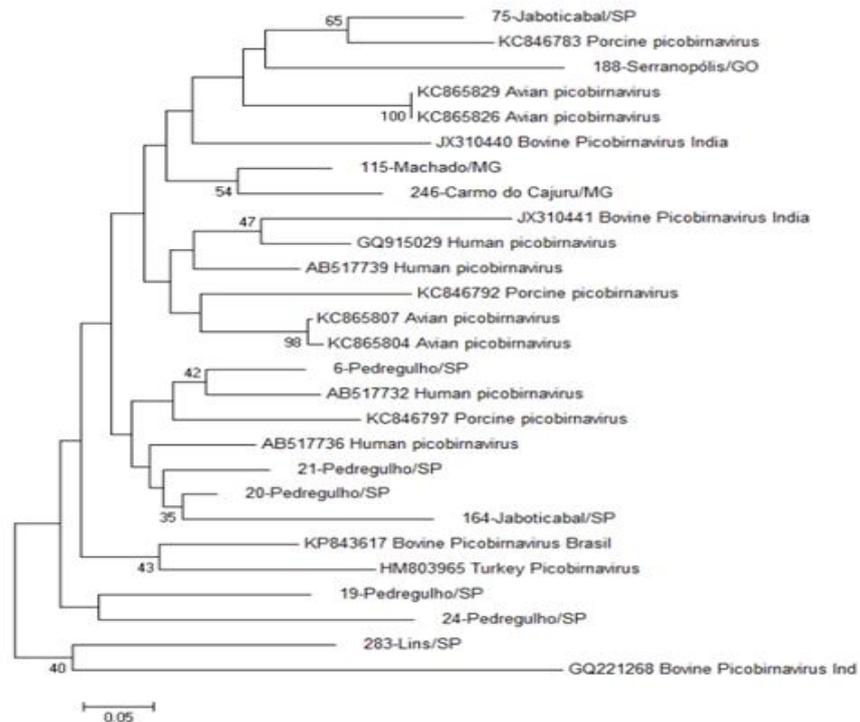


Figura 11: Relação filogenética entre sequências genômicas de PBV do genogrupo I, relativas a produto de 201pb do gene RpRd. Fonte: Navarro, (2015).

2.4.2. Transmissão, fisiopatologia e epidemiologia

O vírus já foi encontrado em amostras de fezes diarreicas ou não de diferentes hospedeiros mamíferos, incluindo o homem, aves e répteis. São descritos vários estudos de detecção e/ou caracterização molecular de PBV encontrados em diversas espécies incluindo coelhos (Gallimore et al., 1993; Ludert et al, 1995) , cães (Costa et al, 2004; Fregolente et al., 2009), gado (Buzinaro et al.,2003; Malik et al., 2014) potros, suínos (Bányai et al., 2008; Ganesh et al, 2011; Martínez et al., 2010;), cobaias (Oliveira et al., 1989), ratos (Pereira et al., 1988b; Fregolente et al., 2009), macacos (Wang et al., 2012), tamanduá-bandeira (Haga et al., 1999), orangotangos, tatus (Masachessi et al., 2007), cavalos (Browning et al., 1991), leão, onça-pintada, onça-parda, gato-do-mato (Gillman et al., 2013), serpentes (Fregolente et al, 2009), frangos (Tamehiro et al., 2003), gansos, faisões, pelicanos (Masachessi et al., 2007) e humanos (Ganesh et al., 2010, 2011).

A transmissão do vírus se dá por via fecal-oral, em função de ser um vírus entérico. Estudos mostram que os torovírus, pestivírus e picobirnavírus, em geral são responsáveis por quadros diarreicos em animais e também estão associados a casos de diarreia em humanos (Wilhelmi et al., 2003). Em estudos envolvendo animais de cativeiro, não houve associação do PBV com diarreia, sugerindo que

estes animais atuem como reservatórios ou portadores assintomáticos persistentes, enquanto que nos animais domésticos o PBV participe como patógeno oportunista (Malik et al., 2014).

A excreção de PBV nas fezes de humanos tem sido relatada tanto em indivíduos com diarreia como também em hospedeiros assintomáticos. Embora alguns estudos epidemiológicos tenham relatado a presença do vírus em amostras fecais de adultos e crianças com diarreia, a relação etiológica do PBV com a síndrome diarreica ainda não pode ser claramente estabelecida. Atribui-se a esta relação inconclusiva a escassez de estudos epidemiológicos controlados, os resultados conflitantes das frequências detectadas nos indivíduos sintomáticos e assintomáticos e a associação com outros micro-organismos de patogenia bem esclarecida (Ganesh et al., 2010).

Os mecanismos da infecção por PBV e sua associação a gastroenterites ainda não estão esclarecidos, embora em humanos haja indícios de que estes vírus atuem como agentes emergentes, oportunistas, principalmente em indivíduos imunocompromissados e inclusive com potencial zoonótico, após comparação de sequências de nucleotídeos de PBV identificados em humanos e em animais (Giordano et al., 2008. Ganesh et al., 2010).

Haga et al. (1999), em análises semanais, relataram a eliminação do PBV, durante quatro meses nas fezes de tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*, Linnaeus, 1758) mantidos em cativeiro em um zoológico do Brasil, sugerindo a participação do vírus em infecções crônicas ou persistentes. Pesquisas com tatus e orangotangos de um zoológico na Argentina, confirmaram a excreção intermitente do PBV por um período de seis a sete meses, respectivamente (Masachessi et al., 2007). De forma semelhante, também já foram relatados longos períodos de excreção do PBV nas fezes de humanos infectados pelo HIV (Grohmann et al., 1993; Giordano et al., 1999).

Uma vez que ainda não foram estabelecidas linhagens celulares ou modelos animais permissivos para a replicação do PBV, testes imunodiagnósticos para a detecção e/ou caracterização do PBV ainda não estão disponíveis (Fregolente, 2009). As técnicas rotineiramente utilizadas para a detecção de PBV são a EGPA e a RT-PCR.

2.5. Adenovírus

2.5.1. Agente etiológico

Os adenovírus pertencem à família Adenoviridae, a qual é composta por cinco gêneros oficiais e um gênero proposto na família. Quatro gêneros (*Mastadenovirus*, *Aviadenovirus*, *Ichtadenovirus* e *Testadenovirus*) compreendem AdVs que provavelmente co-evoluíram com mamíferos, pássaros, peixes e tartarugas, respectivamente. Os outros dois gêneros (*Atadenovirus* e *Siadenovirus*) têm uma ampla gama de hospedeiros. Somente os adenovírus pertencentes ao gênero *Mastadenovirus* possuem importância clínica, podendo infectar diversos mamíferos como morcegos, bovinos, equinos, caninos, murinos, ovinos, porcinos, primatas incluindo os humanos (International Committee on Taxonomy of Viruses – ICTV 2013). Uma análise de probabilidade máxima de sequências de aminoácidos de DNA polimerase disponíveis de adenovírus é representada pela figura 12.

Infecções por AdVs já foram descritas em mamíferos, aves, répteis, anfíbios, e peixes; partículas virais já foram isoladas de pelo menos 40 espécies de vertebrados (Figura 13) (Benko e Harrach, 2003; Davison et al., 2000; Schrenzel et al., 2005; Wellehan et al., 2004).

Figura 13: Taxonomia da família Adenoviridae^a. Fonte: Harrach B, (2014).

Genus/species	Type	Strain	Genome
<i>Mastadenovirus</i>			
<i>Bat mastadenovirus A</i>	BtAdV-3		G
<i>Bat mastadenovirus B</i>	BtAdV-2		G
unassigned bat AdVs	BtAdV-4, dozens of bat AdVs		-
<i>Bovine mastadenovirus A</i>	BAdV-1		G
<i>Bovine mastadenovirus B</i>	BAdV-3		G
<i>Bovine mastadenovirus C</i>	BAdV-10		-
<i>Canine mastadenovirus A</i>	CAdV-1, 2		G
<i>Equine mastadenovirus A</i>	EAdV-1		G
<i>Equine mastadenovirus B</i>	EAdV-2		-
<i>Human mastadenovirus A</i>	HAdV-12, 18, 31		G
<i>Human mastadenovirus B</i>	HAdV-3, 7, 11, 14, 16, 21, 34, 35, 50, simian AdV-21 (SAdV-21), 27–29, 32, 33, 35, 41, 46, 47		G
<i>Human mastadenovirus C</i>	BAdV-9, HAdV-1, 2, 5, 6, SAdV-31, 34, 40, 42–45		all HAdVs and SAdVs
<i>Human mastadenovirus D</i>	HAdV-8–10, 13, 15, 17, 19, 20, 22–30, 32, 33, 36–39, 42–49, 51		G
<i>Human mastadenovirus E</i>	HAdV-4, SAdV-22–26, 30, 36–39		G
<i>Human mastadenovirus F</i>	HAdV-40, 41		G
<i>Human mastadenovirus G</i>	HAdV-52, SAdV-1, 2, 7, 11, 12, 15		52, SAdV-1, 7
<i>Murine mastadenovirus A</i>	MAdV-1		G
<i>Murine mastadenovirus B</i>	MAdV-2		G
<i>Murine mastadenovirus C</i>	MAdV-3		G
<i>Ovine mastadenovirus A</i>	BAdV-2, OAdV-2–5		BAdV-2
<i>Ovine mastadenovirus B</i>	goat AdV-2 (GAdV-2), OAdV-1		-
<i>Ovine mastadenovirus C</i> (cand)	OAdV-6		-
<i>Porcine mastadenovirus A</i>	PAdV-1–3		3
<i>Porcine mastadenovirus B</i>	PAdV-4		-
<i>Porcine mastadenovirus C</i>	PAdV-5		G
<i>Simian mastadenovirus A</i>	SAdV-3, 4, 6, 9, 10, 14, 48		3, 6, 48
<i>Simian mastadenovirus B</i> (cand)	SAdV-5, 8, 49, 50, + 9 untyped strains, baboon AdV-1 (BaAdV-1)		49, 50, + 9 strains, BaAdV-1
<i>Simian mastadenovirus C</i> (cand)	BaAdV-2, 3, SAdV-19		G
unassigned simian AdVs	SAdV-13, 16, 17, 18, 20, titi monkey AdV-1, colobus and tamarin AdVs, etc.		18, 20, titi
<i>Tree shrew mastadenovirus A</i>	TSAV-1		G
<i>Guinea pig mastadenovirus A</i> (cand)	GPAdV-1		-
<i>Sea lion mastadenovirus A</i> (cand)	California sea lion AdV-1		G
<i>Squirrel mastadenovirus A</i> (cand)	SqAdV-1		-
unassigned mastadenoviruses	from alpaca, deer mouse, harbor porpoise, rabbit		-
<i>Aviadenovirus</i>			
<i>Falcon aviadenovirus A</i>	FaAdV-1		-
<i>Fowl aviadenovirus A</i>	FAdV-1	CELO	G
<i>Fowl aviadenovirus B</i>	FAdV-5	340	G
<i>Fowl aviadenovirus C</i>	FAdV-4, 10	ON1, C-2B	4
<i>Fowl aviadenovirus D</i>	FAdV-2, 3, 9, 11	P7-A, 75, A2-A, 380	9
<i>Fowl aviadenovirus E</i>	FAdV-6, 7, 8a, 8b	CR119, YR36, TR59, 764	8
<i>Goose aviadenovirus A</i>	GoAdV-1–4		4
<i>Turkey aviadenovirus B</i>	TAdV-1	D90/2	G
<i>Turkey aviadenovirus C</i> (cand)	TAdV-4		G
<i>Turkey aviadenovirus D</i> (cand)	TAdV-5	1277BT, D1648	G

Continuação

Genus/species	Type	Strain	Genome
unassigned turkey adenovirus	TAdV-2		-
Duck aviadenovirus B (cand)	DAdV-2		G
Pigeon aviadenovirus A (cand)	PIAdV-1	IDA	G
Psittacine adenovirus A (cand)	PsAdV-1		-
unassigned aviadenoviruses	from gull, Meyer's parrot		-
<i>Atadenovirus</i>			
<i>Bovine atadenovirus D</i>	BAdV-4, 5, 8		4
Bovine atadenovirus E (cand)	BAdV-6		G
Bovine atadenovirus F (cand)	BAdV-7		-
<i>Duck atadenovirus A</i>	DAdV-1		G
<i>Ovine atadenovirus D</i>	GAdV-1, OAdV-7		7
<i>Possum atadenovirus A</i>	PoAdV-1		-
<i>Snake atadenovirus A</i>	SnAdV-1	corn snake, python	G
unassigned snake AdVs	SnAdV-2, 3		-
Cervine atadenovirus A (cand)	Odocoileus AdV-1 (OdAdV-1)		-
Lizard atadenovirus A (cand)	LiAdV-1, 2	gila monster, Mexican beaded lizard	2
unassigned atadenoviruses	from agama, anolis, bearded dragon, blue-tongued skink, chameleon, emerald monitor, fat-tailed gecko, Tokay gecko, tree dragon		-
<i>Siadenovirus</i>			
<i>Frog siadenovirus A</i>	FrAdV-1		G
<i>Great tit siadenovirus A</i>	GTAdV-1		-
<i>Raptor siadenovirus A</i>	RAdV-1	Harris hawk, eagle owls	G
<i>Skua siadenovirus A</i>	South Polar skua AdV-1 (SPSAdV-1)		G
<i>Turkey siadenovirus A</i>	TAdV-3		G
Psittacine adenovirus B (cand)	PsAdV-2		-
unassigned siadenoviruses	from budgerigar, Gouldian finch, penguin, Sulawesi tortoise		-
<i>Ichtadenovirus</i>			
<i>Sturgeon ichtadenovirus A</i>	white sturgeon AdV-1 (WSAdV-1)		-
Testadenovirus (candidate genus)			
Box turtle testadenovirus A (cand)	box turtle AdV-1, eastern box turtle AdV-1		-
Pancake tortoise testadenovirus A (cand)	pancake tortoise AdV-1		-
Slider testadenovirus A (cand)	slider AdV-1	red-eared slider, yellow-bellied slider	-
Unassigned Viruses in the Family ?	crocodile adenovirus		-

^a Gêneros oficiais e os nomes das espécies tal como publicado na página web oficial do ICTV estão em itálico. Devido à confusão na numeração do serotipo, em alguns casos (por exemplo, entre os adenovírus aviário), certas características de estirpes são apresentadas para facilitar a identificação. Genomas completos disponíveis estão marcados em G ou pelo número do tipo do sorotipo sequenciado (s).

Adenovírus são vírus icosaédricos, não são envelopados, possuem diâmetro de aproximadamente 90 nm, com genoma constituído por DNAfd apresentando 34.100pb e codifica 36 proteínas, das quais 13 são estruturais. (Figura 14) (Russel et al., 2009).

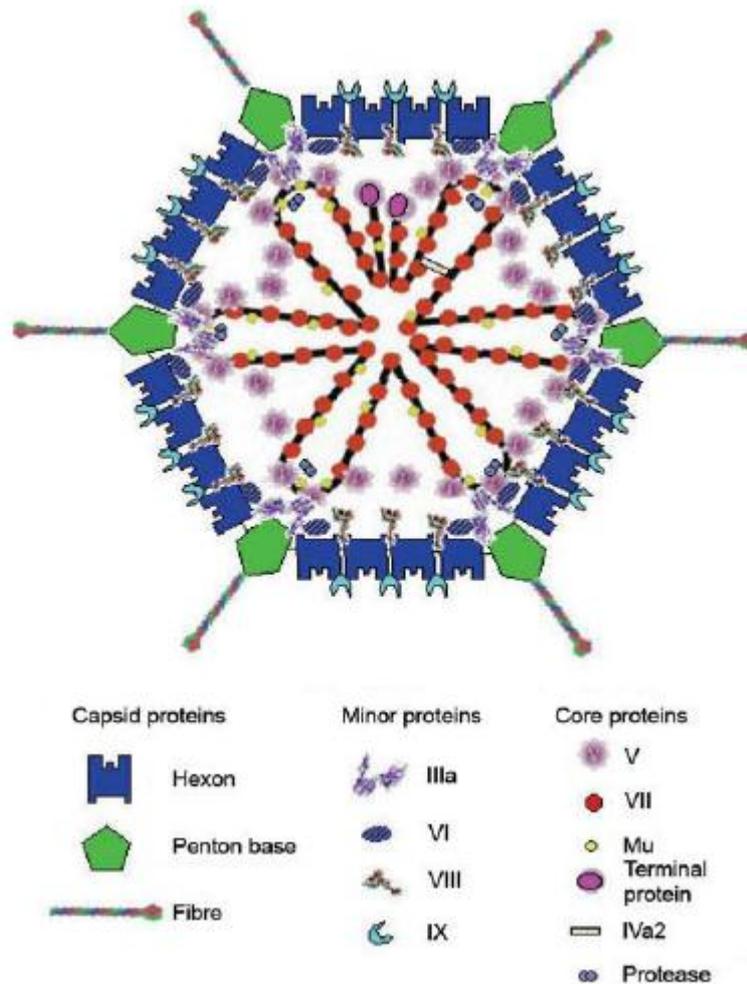


Figura 14: Representação esquemática da estrutura organizacional das proteínas estruturais do vírion de adenovírus. Fonte: Russel et al. (2009).

O capsídeo proteico é composto por 252 subunidades, das quais 240 são hexons e 12 são pentons. A principal proteína do capsídeo é a proteína hexon, composta de 924 resíduos de aminoácidos. Outras proteínas estruturais compõem o capsídeo como a penton e a fibra, além das proteínas secundárias associadas a elas como a proteína VI, VIII, IX. Nos vértices do ícosaedro, ocorrem os parâmetros proteína penton e sobre eles, os trímeros da proteína fibra que representa três regiões: cauda, eixo e botão (Russel et al., 2009).

O genoma codifica aproximadamente 40 proteínas, com genes presentes nas duas cadeias de DNA, transcritos em direções opostas e é dividido em onze regiões de transcrição, baseadas na regulação temporal da expressão, sendo cinco delas iniciais (E1A, E1B, E2, E3 e E4), duas intermediárias (IX e IVa2) e uma tardia (que origina cinco mRNAs – L1 a L5)(figura 15). Destas regiões, os genes iniciais codificam proteínas não-estruturais, e as tardias codificam proteínas estruturais

(Moraes e Costa, 2007).

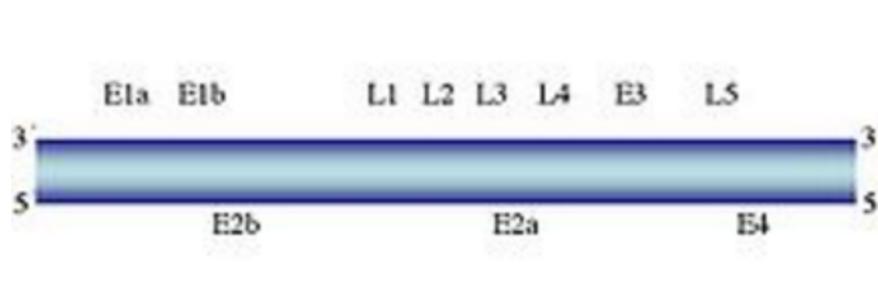


Figura 15: Diagrama do genoma linear dos adenovírus, mostrando os primeiros (E) e últimos (L) genes. Fonte: Meier e Greber, (2004).

A biossíntese viral ocorre no núcleo celular e a etapa inicial compreende a adsorção, penetração e transporte até o núcleo, onde ocorre a transcrição e tradução de genes precoces (Russel, 2009). Simultaneamente à replicação, ocorre uma fase tardia, caracterizada pela expressão de genes estruturais. Os capsômeros são estruturados no núcleo e logo em seguida inseridos o DNA e as 12 proteínas do tipo penton, com liberação viral por exocitose ou lise celular (Allard et al. 1992; Horwitz 2001).

Em humanos, ao todo 52 sorotipos de adenovírus (hAdVs) já foram identificados e classificados em sete grupos, designados “A” a “G”, classificados de acordo com suas características biológicas, imunológicas, genéticas e bioquímicas. Foram oficialmente reconhecidos, 57 sorotipos, classificados por meio de reações de hemaglutinação e soroneutralização, e agrupados da seguinte forma: espécie A (Ad12, 18, 31), espécie B (Ad3, 7, 11, 14, 16, 21, 34, 35, 50, 55), espécie C (Ad1, 2, 5, 6, 57), espécie D (Ad8-10, 13, 15, 17, 19, 20, 22-30, 32, 33, 36-39, 42-49, 51, 53, 54, 56), espécie E (Ad4), espécie F (Ad40 e 41) e espécie G (Ad52) (De Jong et al. 1999, Jones et al. 2007, ICTV 2013, Wold e Ison 2013).

Uma nova classificação baseada em análises da sequência genômica completa dos adenovírus utilizando bioinformática foi proposta, sugerindo a existência de 68 diferentes tipos de HAdV, incluindo novos vírus emergentes e recombinantes (Seto et al. 2011, Buckwalter et al. 2012, Ghebremedhin 2014).

2.5.2 Transmissão, fisiopatologia e epidemiologia

Os adenovírus podem ser transmitidos pela via fecal-oral, pelo contato direto de indivíduo susceptível com fezes ou objetos contaminados contendo

partículas virais viáveis, pela via respiratória, através do contato do vírus com a conjuntiva ocular ou até mesmo por transplante de órgãos que contém os vírus na forma latente (Runde et al. 2001, CDC 2011, Wold e Ison 2013).

Por não possuírem envelope, apresentam capsídeo bem organizado. São vírus bastante estáveis em condições ambientais, resistindo por longos períodos em meio líquido ou em superfícies em estado dessecado, resistindo até mesmo a agentes químicos desnaturantes, dependendo de suas concentrações e tempo de incubação (Gordon et al. 1993, Mattner et al. 2008). Alguns sorotipos de adenovírus apresentam resistência também ao processo de tratamento de águas de esgoto (Mena e Gerba 2009).

O período de incubação dos adenovírus em indivíduos saudáveis varia de dois a quatorze dias (CDC 2011, Tebruegge e Curtis 2012). As infecções causadas ocorrem em indivíduos de todas as idades e em diversas partes do mundo (Ramani e Kang, 2009, CDC 2011, Luksic et al. 2013, Walker e Ison 2014)

Os vírus se replicam em células maduras das vilosidades do intestino delgado, além de poderem se replicar de forma limitada em linfócitos, ou em células do epitélio respiratório não-ciliado, como nas tonsilas e adenoides dependendo do sorotipo viral (Lukashok e Horwitz 2006). A partir dos sítios primários de infecção, os adenovírus podem atingir as vias circulatórias e produzir infecções em diversos tecidos do organismo, de forma que esses vírus já foram detectados em praticamente todos os órgãos dos humanos. São excretados em elevado número de partículas virais nas fezes e pelas vias respiratórias de indivíduos infectados, podendo atingir as vias urinárias de alguns indivíduos, dependendo da espécie e sorotipo (Wold e Ison 2013).

Os AdVs são muito comuns na população humana podendo causar doenças respiratórias, conjuntivite e gastroenterite (Vogels et al., 2003). Entre os adenovírus animais, os mais importantes pode-se citar os AdVs canino tipo 1 e tipo 2, agentes de hepatite, além das síndromes respiratórias e entéricas causadas em cães (Buonavoglia e Martella, 2007). Nas aves, alguns adenovirus podem ser agentes da síndrome da queda da postura, doença economicamente importante que leva a queda súbita na postura e na produção de ovos (Li et al., 2010).

Em mamíferos terrestres os AdVs possuem uma gama de hospedeiros. Na maioria dos casos são considerados espécie-específicos, com algumas exceções como é o caso do CAV-1 que é conhecido por infectar um grande número

de espécies de carnívoros silvestres tais como raposas, lobos, guaxinins, gambás e ursos (Woods, 2001).

Provas obtidas a partir da análise de amostras de fezes de *Lycalopex gymnocercus* e *Cerdocyon thous*, em relação ao consumo de lixo e presença de altas taxas de HAdV, já é relatado. Possivelmente a passagem do vírus de origem humana por uma espécie de canídeos selvagens, eventualmente, constitui um marcador que aponta para a contaminação dos alimentos ou água pela atividade antrópica invasiva sobre os ecossistemas que vivem os animais (Monteiro et al., 2015).

2.6. *Circovirus* e *Cyclovirus*

2.6.1. Agente etiológico

Os membros da família Circoviridae são conhecidos por infectar uma ampla gama de hospedeiros vertebrados e compreende 3 gêneros: *Circovirus*, *Gyrovirus* e o recentemente descrito, *Cyclovirus*. Os membros dessa família apresentam partículas virais de aproximadamente 20 nm de diâmetro, não envelopados, com capsídeo de simetria icosaédrica (Figura 16), que envolve um genoma constituído de uma molécula de fita simples de DNA circular de aproximadamente 2 kb (Todd et al., 2005).

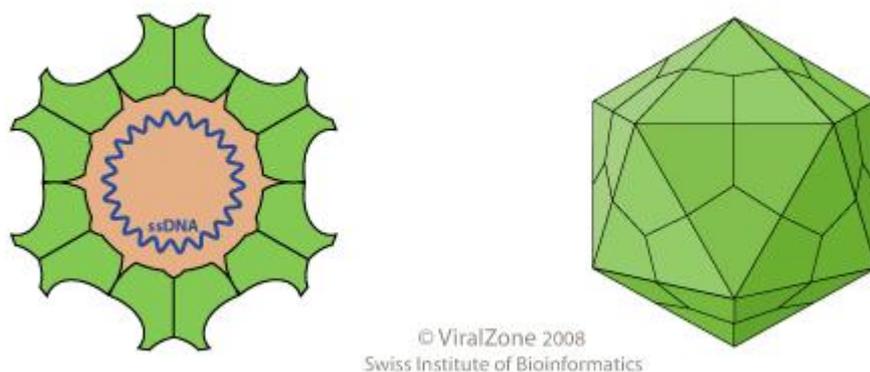


Figura 16: Representação esquemática do vírion *Circovirus*. Fonte: http://viralzone.expasy.org/all_by_species/118.html.

Os circovírus são os menores vírus capazes de infectar animais de que se tem conhecimento. Tanto os membros do gênero *Circovirus* como os do gênero *Cyclovirus* possuem genomas com duas “ORFs” (Regiões abertas de leitura) principais (Figura 17), que codificam o gene da proteína iniciadora da replicação em

círculo rolante (REP) e o gene da proteína do capsídeo (CAP), (Todd et al., 2005).

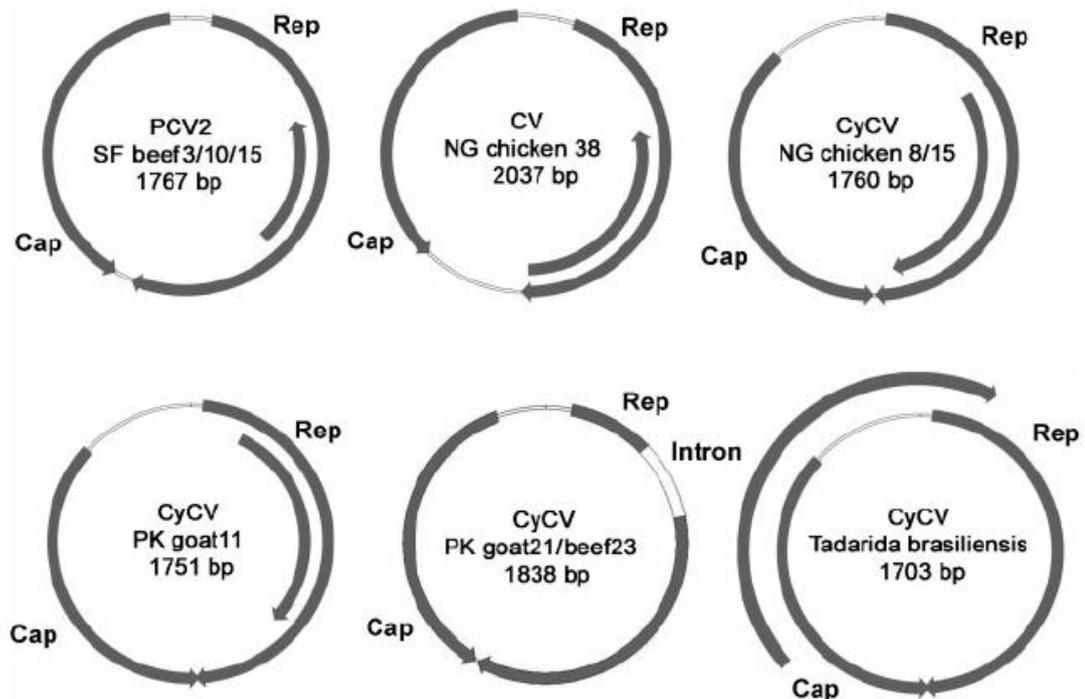


Figura 17: Organização genômica dos *Circovirus* e *Cyclovirus* em animais. Fonte: Li et al. (2011).

Uma estrutura em alça cuja extremidade consiste em uma sequência de nove nucleotídeos (nonâmero) altamente conservada, localizada entre as porções 5' das duas principais ORFs, tem papel fundamental na iniciação da replicação viral em ambos os gêneros (Hattermann et al., 2003; Johne et al., 2006; Mankertz et al., 2000; Niagro et al., 1998; Stewart et al., 2006; Todd et al., 2001, 2007). No entanto, em comparação com os circovírus, os cyclovírus possuem proteínas Rep e Cap menores e a região intergênica (IGR) 3' entre os códons de parada das duas ORFs está ausente ou é formada somente por poucas bases (Li et al., 2010, 2011).

Os cyclovírus ainda apresentam modificações em pequenas sequências de aminoácidos localizadas na região terminal da Rep associadas com a replicação em círculo rolante e com a ligação de desoxirribonucleotídeos. Em contrapartida, a porção terminal de Cap nos cyclovírus, assim como nos circovírus, tem caráter altamente básico e é rica em arginina. Portanto, cyclovírus são distintos dos circovírus com relação a diversas características únicas do seu genoma, além de filogeneticamente formarem um grupo distinto (figura 18) (Delwart e Li, 2011).

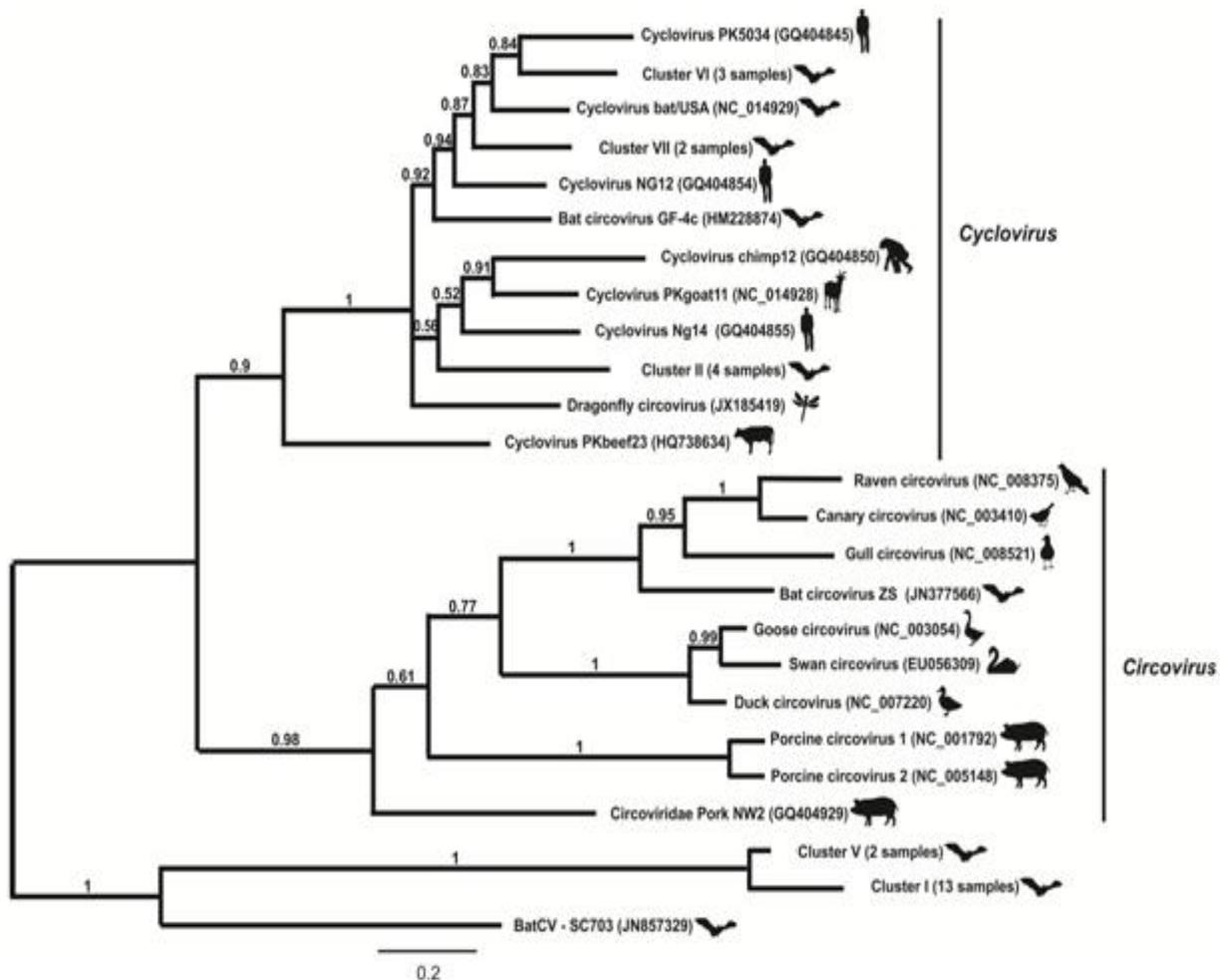


Figura 18: Análise filogenética com membros representativos da família *Circoviridae*. Fonte: Lima et al. (2015).

2.6.2. Transmissão, fisiopatologia e epidemiologia

Estudos demonstraram que tanto circovírus como cyclovírus são altamente prevalentes em amostras de fezes de humanos de países em desenvolvimento (Ge et al., 2011; Li et al., 2011).

O circovírus e cyclovirus são extremamente estáveis sob condições ambientais, podendo conservar seu potencial infectivo, em cultivo celular, após incubação a altas temperaturas (56 – 70°C), tratamentos em pH ácido (próximo de 3,0) e solvente orgânico (clorofórmio) (Allan et al., 1994). Essa resistência à inativação desempenha um importante papel na epidemiologia do agente, implicando no controle das infecções por esses vírus.

Os *Circovirus* infectam inúmeras espécies de aves incluindo papagaios, pombas, gaivotas, patos, gansos, cisnes, corvos, canários, tentilhões, estorninhos e galinhas (Niagro et al., 1998; Mankertz et al., 2000; Todd et al., 2001, 2007;

Hattermann et al., 2003; Johne et al., 2006; Stewart et al., 2006; Halami et al., 2008; Li et al., 2011). E também já foram detectados em amostras ambientais (Rosario et al., 2009; Blinkova et al., 2009; López-Bueno et al., 2009; Kim et al., 2008).

Em aves, os circovírus têm sido associados com depleção linfóide, imunossupressão e problemas de desenvolvimento com deformidades do bico e das garras, crescimento retardado e problemas nas penas (Stewart et al., 2006 e Todd, 2000).

Até o momento, apenas dois circovírus demonstraram ser capazes de replicar extensivamente em mamíferos, os circovírus suíno tipos 1 e 2 (PCV-1 e PCV-2). Desses, o PCV-1 é considerado não-patogênico, enquanto a infecção pelo PCV-2 pode ser tanto assintomática, quanto causar uma variedade de sinais clínicos com um significativo impacto econômico para animais de produção por exemplo (Opriessnig et al., 2007; Grau-Roma et al., 2011).

A infecção por PCV-2 pode causar uma variedade de sinais clínicos em suínos, incluindo a síndrome multissistêmica do definhamento, dermatite, nefropatia e problemas reprodutivos em suínos (Darwich et al., 2004; Ellis et al., 1998, Ellis et al., 2004; Firth et al., 2009).

A transmissão dos vírus em questão ocorre principalmente por via oronasal e infecta células do sistema imunológico, como macrófagos, linfócitos e células dendríticas (Segalés et al., 2005, Grau-Roma et al., 2011). Portanto, pobre biossegurança e higiene inadequada nos procedimentos de criação ou manejo do rebanho são fatores de risco significativos (Madec et al., 2008; Schmoll et al., 2008).

Após a infecção e replicação em células do sistema imunológico, o PCV-2 produz viremia e se dissemina sistemicamente no organismo. Um desequilíbrio das substâncias mediadoras da imunidade, morte de linfócitos e falhas na reposição de células linfóides colaboram para esta imunodeficiência. As lesões macroscópicas mais importantes em suínos incluem a hipertrofia de linfonodos (inguinais, submandibulares, mesentéricos e mediastínicos), atrofia do timo e ausência de colabamento pulmonar (Zanella, 2003).

Os *Cyclovirus* já foram detectados em diversos mamíferos (homens, chimpanzés, bovinos, caprinos, suínos, ovinos, morcegos, cavalos e camelos), em aves (galinhas e patos) e em insetos (libélulas e baratas da espécie *Eurycotis floridana*) (Li et al., 2011; Rodriguez, et al., 2013; Dayaram, 2013). Apesar de uma elevada diversidade genética, a transmissão cruzada entre espécies parece ser provável, pelo menos em mamíferos (Dayaram, 2013; Li, et al. 2011; Tan Le et al.,

2013). A detecção em diferentes amostras humanas e animais de criação sugere que cycloviruses pode causar infecções sistêmicas em mamíferos (Li et al., 2011, Tan Le et al., 2013). No entanto, em contraste com os circovírus, a importância da infecção por cyclovírus para o desenvolvimento das doenças ainda é pouco relatada.

Cyclovirus têm sido relacionados com infecções respiratórias e neurológicas em seres humanos. A presença do vírus foi demonstrada no soro, fezes ou líquido cefalorraquidiano (LCR) de pacientes com paralisia flácida aguda, paraplegia ou suspeita de infecção do sistema nervoso central no Paquistão, Tunísia, Malawi e nas regiões Sul e Central do Vietnã (Li et al., 2011, Tan Le et al., 2013; Phan, 2014).

Proteínas Rep de cycloviruses também já foram encontradas em amostras de secreções nasais de cavalos que apresentavam problemas respiratórios, indicando que os vírus podem ser inalados no ambiente (Li, et al., 2015).

Testes com amostras de fezes de suínos e aves no Vietnã também foram encontrado DNA de cyclovírus, sugerindo possíveis fontes de infecção humana. Uma vez que cyclovírus presentes em amostras de tecido muscular de frango, gado, cabra, chimpanzés, ovelha e camelo possuem características similares a cyclovírus detectados em amostras de fezes de humanos, indicando uma possível transmissão interespecífica (Li et al., 2010, 2011).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Área de estudo

A Rodovia do Sol atravessa os municípios de Vitória, Vila Velha e Guarapari (Figura 19). Esta região compreende um clima tropical chuvoso com temperatura acima de 18° C, sendo fevereiro e julho os meses mais quente e frio, respectivamente. A vegetação marginal da rodovia é composta, principalmente por Restinga, a qual é considerada uma área fundamental para a biodiversidade, em espécies vegetais e animais presentes em grande parte da área adjacente à rodovia (Incaper, 2015). Ao longo do Sistema Rodovia do Sol existem três importantes reservas ambientais: o Parque Natural Municipal de Jacarenema (307 ha), Área de Preservação Ambiental de Setiba (12.960 ha) e Parque Estadual Paulo César Vinha (1,500 ha).

Regularmente, a Rodosol monitora 67,5 km de pista, a cada 1h e 30min, 24 horas por dia, para averiguação da ocorrência de incidentes, acidentes e atropelamentos de fauna. Os animais encontrados mortos e/ou vivos são prontamente recolhidos, registrados quanto ao local, hora da ocorrência e espécie. Em seguida, os animais mortos são identificados, congelados e posteriormente são encaminhados ao Laboratório de Anatomia Veterinária da UVV.

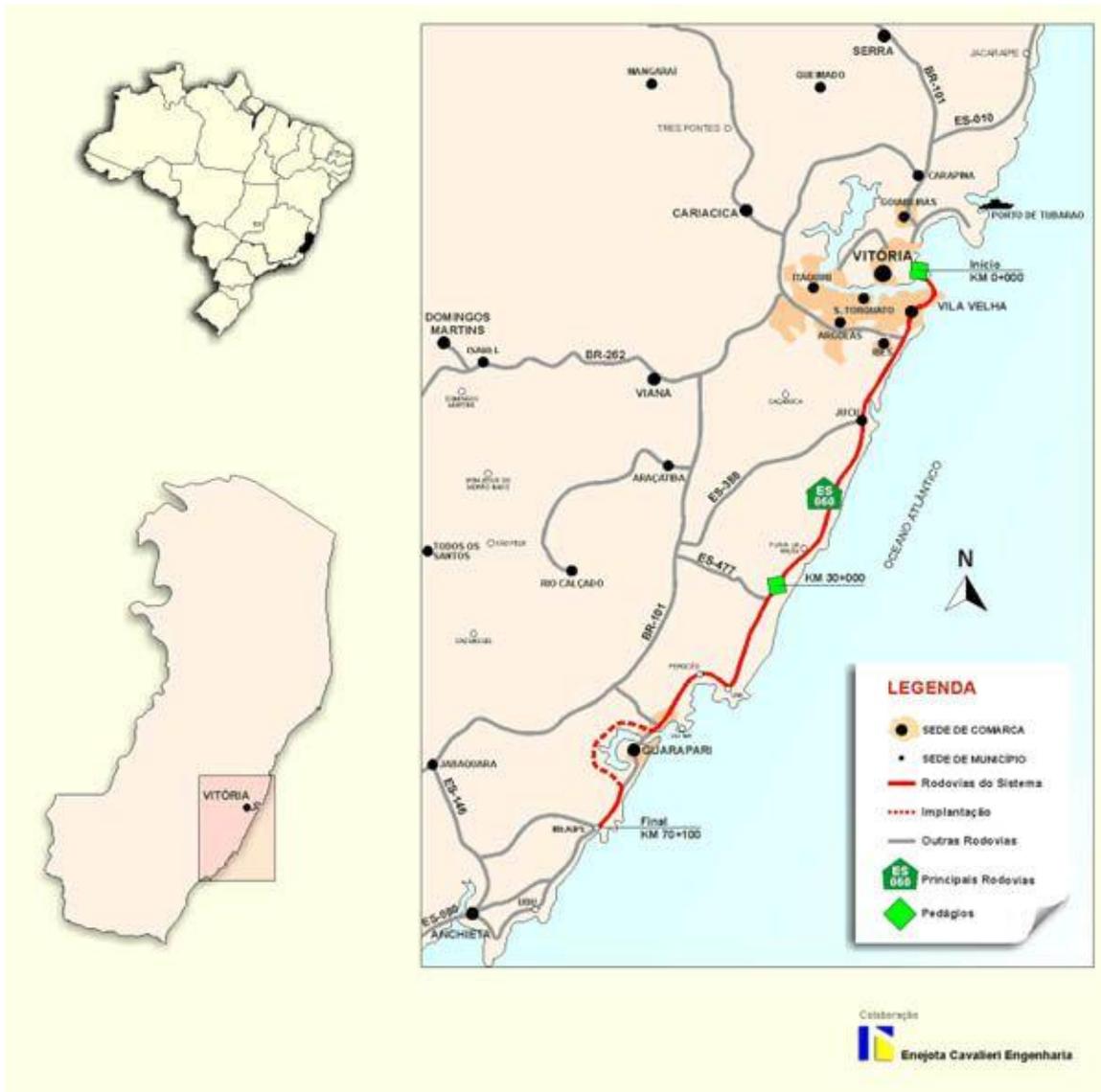


Figura 19: Mapa do Brasil e do Estado do Espírito Santo, indicando a extensão da Rodovia do Sol. Fonte: www.e-pedagio.com.br.

3.2. Coleta de espécimes biológicos

O presente estudo avaliou exemplares de *Cerdocyon thous* de vida livre, que foram recolhidos mortos, devido colisão com veículos automotores, no trecho concessionado da rodovia estadual ES-060, no período entre os anos de 2012 a 2015, autorizado pelo SISBIO com registro nº 49417-1 e pela comissão de ética da Universidade Vila Velha com registro nº M03-2016MS9.

Inicialmente todos os indivíduos de *C. thous* foram identificados (Tabela 1) e examinados quanto aos seus dados biométricos, como sexo, tamanho do corpo (cm), peso (g) e quanto à classe etária. Os animais foram classificados como jovens quando apresentavam o peso menor que 3,5 kg, os que apresentavam peso entre

3,6 e 5,5 Kg foram classificados como sub-adultos e acima de 5,5 kg foram considerados adultos (Tabela 4) (Michalski 2000; Wilson et al. 1996).

Tabela 1: Identificação dos exemplares de *Cerdocyon thous* necropsiados no período de 2014 á 2015.

Identidade	Ano de recolhimento	Km do atropelamento	Data da necropsia
00x2M12	2012	41	26/09/2014
1329M12	2012	57,2	26/09/2014
1395M12	2012	35,7	02/10/2014
1420M12	2012	39,5	02/10/2014
2374M14	2014	45	10/10/2014
1876M13	2013	44,6	10/10/2014
2355M14	2014	17,9	17/10/2014
24571M14	2014	29	04/11/2014
24572M14	2014	40,7	04/11/2014
1745M13	2013	19,6	07/11/2014
522M13	2013	24	07/11/2014
2397M14	2014	41,5	07/11/2014
2289M13	2013	38,2	07/11/2014
1626M13	2013	37	14/11/2014
1619M13	2013	28	14/11/2014
15000M13	2013	40	14/11/2014
1631M13	2013	22	14/11/2014
2555M14	2014	52	13/03/2015
2764M15	2015	61	25/03/2015
27M3815	2015	20,5	07/05/2015
2748M15	2015	19,9	07/05/2015
2747M15	2015	19	08/05/2015
2734M15	2015	55,3	11/05/2015
2755M15	2015	38	08/05/2015
2771M15	2015	36	04/08/2015
2150M14	2014	22,3	12/09/2014
00x3M13	2013	34,6	27/10/2015

00x1M14	2014	32	12/09/2014
2754M15	2015	38	07/05/2015

(Km) Quilômetro.

Em seguida foram submetidos a exames necroscópicos para coleta das amostras de fezes, recolhidas diretamente da ampola retal dos animais (Figura 20).



Figura 20: Exemplar de *Cerdocyon thous* submetido ao exame biométrico e exame necroscópico para coleta de material biológico. Fonte: Arquivo pessoal.

Também foram recolhidos pequenos fragmentos de rins e fígado e ainda, amostras de tecido nervoso, recolhidas após abertura da caixa craniana, feita por meio de broca cirúrgica de uso odontológico, acoplado a uma caneta de alta rotação e micromotor odontológico (Figura 21). Posteriormente todas as amostras biológicas foram identificadas, congeladas e armazenadas no Laboratório de Anatomia Veterinária da UVV.



Figura 21: Abertura da caixa craniana de um exemplar de *Cerdocyon thous*, feita por meio de broca cirúrgica de uso odontológico, acoplado a uma caneta de alta rotação e micromotor odontológico. Fonte: Arquivo pessoal.

Pelo fato dos animais terem ido a óbito em colisão por veículo automotor, não foi possível recolher o material biológico de tecido nervoso de todos os 29 exemplares (Tabela 2).

Tabela 2: Identificação do material biológico de *Cerdocyon thous*, para avaliação dos vírus entéricos e raiva.

N° total de animais	Material biológico	Quantidade de material coletado
	Fezes	29
29	Rins / Fígado	29
	Tecido nervoso	16

As amostras fecais, rins e fígado foram encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Espírito Santo, campus São Mateus (CEUNES) e em seguida submetidas a análises pelas técnicas: eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) para detecção de rotavírus e picobirnavírus. Utilizou-se também da PCR para investigar a ocorrência a sequência de possíveis adenovírus presentes nas amostras. Posteriormente, a partir das amostras que apresentaram tamanhos (pesos moleculares) esperados (específicos) para adenovírus, foram

feitas novas extrações e estas foram encaminhadas ao Laboratório Dra. Maria Benko do Instituto de Pesquisa Médica Veterinária no Centro de Investigação Agrícola, da Academia de Ciências da Hungria para o sequenciamento.

As amostras de tecido nervoso encefálico foram encaminhadas ao Laboratório de Diagnóstico da Raiva – Instituto de Defesa Agropecuária e Florestal do Espírito Santo (IDAF-ES), onde foram submetidas aos testes de imunofluorescência direta e prova biológica por meio de inoculação intracerebral em camundongos suíços, conforme preconizado pela OMS.

3.3. Processamento das amostras

3.3.1. Preparo da suspensão fecal

Todas as amostras coletadas foram mantidas a 4°C até o momento da suspensão fecal.

Para a suspensão fecal foi utilizado aproximadamente 200mg de amostra fecal de cada animal e diluídas a uma concentração de 20% (g/ml) de 1000 µL tampão Tris-Cálcio com pH 7,2 (anexo1), homogeneizadas em agitador tipo Vortex (Biomixer) e centrifugadas em micro centrífuga refrigerada (Novatecnica) a 3000 rpm por 10 min. Depois da transferência do sobrenadante de 700 µL, foram mantidas a -20°C até a extração do ácido nucleico viral.

3.3.2. Preparo da suspensão de tecido (rins e fígado)

Para a suspensão fecal foi utilizado aproximadamente 100 á 200mg de amostra rins e fígados de cada animal, triturados, congelados e descongelados por três vezes, em seguida diluídas a uma concentração de 20% (g/ml) de 1000 µL tampão Tris-Cálcio com pH 7,2 (anexo1), homogeneizadas em agitador tipo Vortex (Biomixer) e centrifugadas em micro centrífuga refrigerada (Novatecnica) a 3000 rpm por 10 min. Depois da transferência do sobrenadante de 700 µL, foram mantidas a -20°C até a extração do ácido nucleico viral.

3.3.3. Extração de ácido Nucleico

O ácido nucleico foi extraído através da metodologia descrita por Boom et al. (1990), utilizando isotiocianato de guanidida-EDTA e partículas de sílica.

3.4. Processamento das amostras de tecido nervoso

As amostras de encéfalo foram encaminhadas congeladas e identificadas para o Instituto Biológico do Estado do Espírito Santo (Ibees) do Instituto de Defesa Agropecuária e Florestal do Espírito Santo (IDAF) em Cariacica. A realização do exame de diagnóstico de raiva foi de inteira responsabilidade do laboratório, seguindo o protocolo preconizado pela Organização Mundial da Saúde.

Para detecção do vírus, o Laboratório de Diagnóstico da Raiva utilizou a técnica de imunofluorescência direta e a prova biológica por meio de inoculação intracerebral em camundongos suíços.

4. DETECÇÃO VIRAL

4.1. *Vírus da raiva*

4.1.1 *Imunofluorescência direta*

Essa etapa foi realizada pelos servidores do Instituto Biológico do Estado do Espírito Santo (IBEES) no IDAF, utilizando a técnica da forma descrita na Instrução Normativa nº 8, de 12 de abril de 2012 (Anexo 4), com algumas modificações.

Utilizam de dois controles positivos e um negativo e fixam as lâminas em acetona por 30 min. No preparo de suspensões de CCS e CCI, foi utilizado soro fetal bovino na diluição ao invés de soro equino estéril ou gema de ovo embrionado. Esses padrões estão de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) e da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE).

4.1.2. Prova biológica por meio de inoculação intracerebral em camundongos suíços.

Essa etapa foi realizada pelos servidores do Instituto Biológico do Estado do Espírito Santo (IBEES) no IDAF, utilizando a técnica da forma descrita na Instrução Normativa nº 8, de 12 de abril de 2012 (Anexo 4), com algumas modificações. Cada amostra foi inoculada em 8 camundongos e a observação dos camundongos após inoculação das amostras de *C. thous* procedeu por 30 dias. Esses padrões estão de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) e da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE).

4.2. *Rotavirus e Picobirnavirus*

4.2.1. *Eletroforese de gel de poliacrilamida – EGPA*

A detecção de picobirnavírus e rotavírus através de EGPA, foi realizada segundo o procedimento proposto por Pereira et al. (1983), com algumas adaptações (figura 22). A eletroforese foi realizada em gel descontínuo, constituído de duas fases, uma concentradora a 3,5% (Anexo 3.1) e uma separadora a 7% (Anexo 3.2).



Figura 22: Utilização da cuba LCV 10x10 (Loccus) para realização da eletroforese em gel de poliacrilamida. Fonte: Arquivo pessoal.

A corrida eletroforética foi realizada em cuba LVC 10 x 10 (Loccus) a uma tensão constante de 150 V e corrente elétrica inicial de 15 mA por aproximadamente 2:00 horas.

O gel foi corado pelo método de impregnação pela prata (Hering et al., 1982). O gel removido das placas da cuba de eletroforese foi fixado em solução aquosa de ácido acético a 0,5% e etanol a 10% (Anexo 3.3), permanecendo em agitação por 30 min. Depois de fixado, o gel foi transferido para uma solução aquosa de nitrato de prata a 0,11 M (Anexo 3.4), no escuro e após 30 min, foi lavado rapidamente por três vezes com água destilada e então revelado em solução de hidróxido de sódio a 3% (Anexo 3.5), acrescido com formalina a 0,2 M. O gel foi mantido nessa solução por um período de 5 a 10 min, até o aparecimento nítido das bandas de ácido nucleico. A revelação foi interrompida pela transferência do gel para uma solução de ácido acético a 5% (Anexo 3.6).

4.3. Adenovírus

4.3.1. Reação em cadeia pela polimerase (PCR)

A partir do ácido nucléico extraído, foi realizada reação de PCR seguida por nested-PCR utilizando os pares de iniciadores POL_OUT_RE/POL_OUT_FO e POL_IN_RE/POL_IN_FO, gerando fragmento de 550 pb e 300 pb, respectivamente, descritos por Wellehan et al. (2004)(tabela 3), com algumas modificações.

Para assegurar a gama excepcionalmente ampla, que, muito provavelmente, inclui todos os membros da família de adenovírus, iniciadores de consenso foram concebidos para atingir a região mais conservada do DNA viral, o gene DNA-polimerase.

O volume final de cada reação de PCR foi de 25µL, contendo 2,5µl de 10x PCR buffer(-Mg), 0,75µl de MgCl₂, 0,5µl de 10 µM dNTP, 0,5µM de cada primer, 0,1µl de Taq DNA polimerase, 2,0µl de amostra e 18,15µl de h₂O MilliQ + Depc. Os ciclos de reação foram executados da seguinte forma: PCR = 5 min a 94° C, seguidos de 44 ciclos de 94° C por 30 s, 58,7° C por 1 min, 72° C por 1 min e 72° C por 5 min. Com o produto de PCR, foi feita o Nested-PCR = 5 min a 94° C, seguidos de 44 ciclos de 94° C por 30 s, 53,6° C por 1 min e 72° C por 1 min, finalizando á 72° C por 5 min. Os produtos foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%.

Tabela 3: Iniciadores utilizados nas reações de PCR e Nested-PCR para detecção do genoma de adenovírus, conforme descrito por Wellehan et al. (2004).

Round	Primer	Sequência *5'-3'	Fragmento (pb)
Outer	polFouter	TNMGNGGNGGNMGNTGYTAYCC	550bp
	polRouter	GTDGCRAANSHNCCRTABARNGMRTT	
Inner	polFinner	GTNTWYGAYATHHTGYGGHATGTAYGC	300bp
	polRinner	CCANCCBCDRTRTGNARNGTRA	

N = G/A/T/C, M = A/C, R = A/G, W = A/T, S = C/G, Y = C/T, K = G/T, H = A/C/T, D = A/G/T, B = C/G/T

4.3.2 PCR e Sequenciamento

Os PCRs foram realizados de acordo com a descrição original (Wellehan et al., 2004) com ligeiras modificações. O volume de reação foi de 50 µl, constituída por 37µl de água ultrapura esterilizada, 5 µl de 10x buffer de REDTaq DNA Polymerase (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 1 µl de solução MgCl₂ (25 mM), 1.5 µl de mistura de desoxirribonucleótido (10 mM), 1 µl de cada primer (50 mM) (tabela 3), 2.5 µl REDTaq DNA Polymerase enzyme (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e 1 µl amostra. Os fragmentos de DNA foram purificados com a utilização do kit NucleoSpin II (Macherey-Nagel, Düren, Alemanha).

O sequenciamento direto dos produtos amplificados e purificados foi determinada com iniciadores internos apropriados em volume de 10 µl usando o kit

comercial “Big Dye Terminator® v1.3 Cycle Sequencing Kit” (Applied Biosystems, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante. A eletroforese foi realizada pela máquina ABI PRISM 3100.

As sequências de DNA foram editadas usando o pacote Staden (Staden et al., 2000) e foram avaliadas e comparadas a outras sequencias já depositadas no GenBank, usando o programa BLAST(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

4.4. Circovirus e Cyclovirus

4.4.1. PCR e Sequenciamento

Os iniciadores foram selecionadas para alinhamento da sequencia do genoma de circovírus usando o MegAlign do pacote DNASTar (Lasergene Inc, USA). Para a PCR foram utilizados: Primers Cv-s 5 -AGA GGT GGG TCT TCA CNH TBA AYA A-3 e Cv-as 5 -AAG GCA GCC ACC CRT ARA ART CRT C-3 e para a Nested-PCR: primers Cn-s 5 -AGC AAG GAA CCC CTC AYY TBC ARG G-3 e Cn-as 5 ACG ATG ACT TCN GTC TTS MAR TCA CG-3.

Os PCRs foram realizados usando Taq DNA polymerase (PeqLab, Germany) e buffer Y (PeqLab) em uma reação 25 µl no Thermal Cycler PTC-200 (MJ Research, USA). O protocolo para a PCR incluiu, 5 min a 95°C, seguido de 45 ciclos, cada um consistindo de 94°C por 30 s, 46 °C durante 1 min e 72°C durante 1 min, e uma incubação final a 72°C para 5 min. O protocolo do ciclo Nested-PCR foi idêntico, exceto a temperatura de 56°C em vez de 46°C. Os produtos de PCR foram separados em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio. Em seguida os produtos de PCR foram clonados usando o kit de clonagem TOPO TA (Invitrogen, Alemanha) e sequenciados pelo método “primer walking”, utilizando oligonucleotídeos iniciais universais. As sequencias de nucleotídeos gerados foram avaliadas e comparadas a outras sequencias já depositadas no GenBank, usando o programa BLAST(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) através do Nucleotide BLAST.

5. RESULTADOS

6.1. Registro da ocorrência e caracterização do local dos atropelamentos.

Os animais encontrados mortos na extensão da rodovia ES 060 e que foram recolhidos no período de 2012 á 2015, estão apresentados na figura 23. Os 29 animais avaliados estão registrados quanto ao local (Km) da ocorrência do atropelamento e pela cor dos pontos. Os pontos em vermelhos caracterizam os indivíduos que apresentaram pelo menos um dos vírus da pesquisa em suas amostras e os identificados pela cor amarela não apresentaram os vírus.



Figura 23: Identificação dos quilômetros em que foi feito recolhimento dos *Cerdocyon thous* pela Rodosol, representados quanto à presença de vírus (cor vermelha) ou não (cor amarela) nas amostras. Fonte: Google earth.

A ES-060 além de cortar três grandes reservas ambientais, também apresenta em toda a extensão uma grande área rural que inclui várias fazendas,

haras, hotéis fazenda e sítios, além de pequenas propriedades que podem ter criações. Na figura 24 é possível identificar 19 destas propriedades e observar a proximidade que existe entre animais selvagens com o ambiente antropizado.

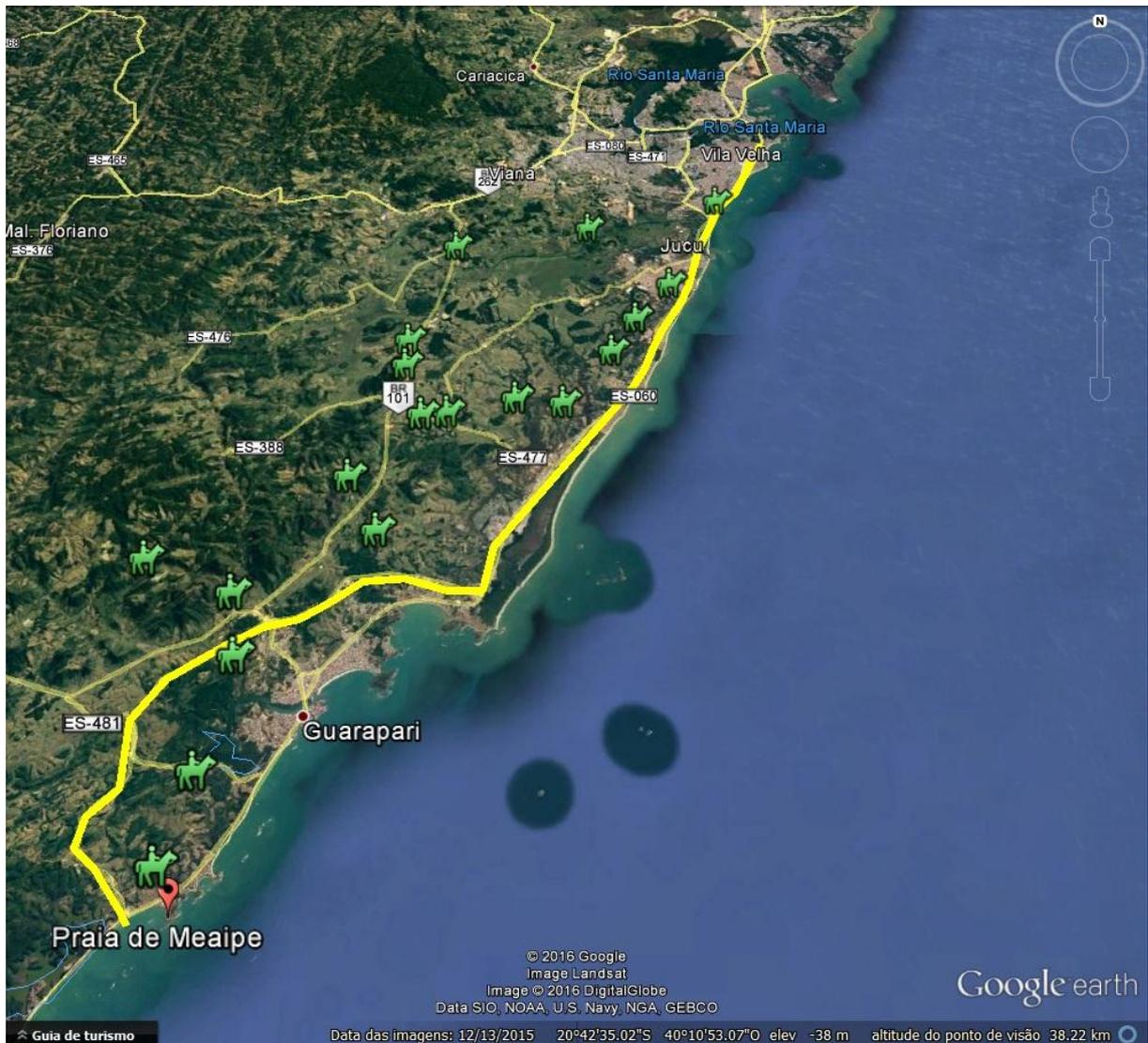


Figura 24: Identificação de propriedades rurais próximas à extensão da ES-060. Fonte: Google earth.

6.2 Dados Biométricos

No período de setembro de 2014 a outubro de 2015, 29 animais mortos por acidentes com veículos automotores e encaminhados para a Universidade de Vila Velha, foram submetidos a avaliações biométricas e em seguida feita necropsia para coleta das amostras (Tabela 4).

Tabela 4: Resultados das avaliações biométricas e identificação das amostras de *Cerdocyon thous* necropsiados no período de 2014 a 2015.

Identidade dos <i>C. thous</i>	Data de recolhimento	Identificação das amostras	Classe etária	Peso(kg)	Sexo
00x2M12	19/07/2012	VS 35	Sub-adulto	3.772	M
1329M12	08/10/2012	VS 36	Adulto	6.865	F
1395M12	18/01/2012	VS 37	Adulto	6.290	M
1420M12	03/12/2012	VS 38	Sub-adulto	4.834	F
2374M14	22/07/2014	VS 39	Adulto	6.070	F
1876M13	04/09/2013	VS 40	Sub-adulto	5.196	F
2355M14	02/07/2014	VS 41	Adulto	7.0	M
24571M14	09/10/2014	VS 42	Adulto	6.070	M
24572M14	23/09/2014	VS 43	Sub-adulto	5.296	F
1745M13	28/05/2013	VS 44	Adulto	6.090	M
522M13	15/02/2013	VS 45	Sub-adulto	4.792	F
2397M14	15/08/2014	VS 46	Adulto	6.615	F
2289M13	13/05/2014	VS 47	Sub-adulto	5.120	F
1626M13	04/05/2013	VS 48	Adulto	6.785	M
1619M13	18/02/2013	VS 49	Sub-adulto	4.978	F
15000M13	04/01/2013	VS 50	Jovem	2.987	M
1631M13	26/02/2013	VS 51	Jovem	2.860	M
2555M14	15/11/2014	VS 52	Adulto	5.800	M
2764M15	15/01/2015	VS 53	Adulto	5.920	M
2738M15	25/03/2015	VS 54	Adulto	6.008	M
2748M15	13/03/2015	VS 55	Adulto	6.340	M
2747M15	18/03/2015	VS 56	Sub-adulto	5.100	M
2734M15	04/03/2015	VS 57	Adulto	5.960	M
2755M15	26/03/2015	VS 58	Adulto	6.982	F
2771M15	25/04/2015	VS 59	Adulto	5780	F
2150M14	14/04/2014	VS 60	Sub-adulto	5.460	M
00x3M13	06/02/2013	VS 61	Adulto	5.526	F
00x1M14	24/06/2014	VS 62	Sub-adulto	5.400	F
2754M15	25/03/2015	VS 63	Sub-adulto	5.200	F

(VS): Virologia em selvagens; (M): Macho; (F): Fêmea; (Kg).Kilograma.

6.3. Avaliação do vírus da raiva

No período de setembro de 2014 a outubro de 2015 foram coletadas amostras de tecido nervoso encefálico de 16 exemplares de *C. thous*. Devido utilizar animais mortos por colisão com veículos automotores, alguns exemplares devido à colisão não apresentavam material para coleta.

Todas as amostras tiveram seus resultados negativos para o vírus rábico (Tabela 5).

Tabela 5: Resultados das análises das amostras de tecido nervoso de *Cerdocyon thous* de vida livre, utilizando as técnicas de Imunofluorescência direta e Prova Biológica por inoculação intracerebral em camundongos suíços.

	Nº de animais	Resultado IFD	Resultado PB
Fêmea	10	-	-
Macho	6	-	-
Total	16	0	0

(IFD): Imunofluorescência direta, (PB): Prova biológica -inoculação intracerebral em camundongos suíços, (-): negativo, (+): positivo.

6.4. Detecção de Rotavirus e Picobirnavirus

Todas as amostras analisadas pela técnica de EGPA apresentaram resultados negativos (Tabela 6), não sendo observado nenhum perfil eletroforético característicos com RV e PBV.

Tabela 6: Resultados das análises de RNAds de rotavírus e picobirnavírus, utilizando a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) em amostras fecais de *Cerdocyon thous* de vida livre.

	N° de animais	Resultado EGPA	
		<i>Rotavirus</i>	<i>Picobirnavirus</i>
Fêmea	14	-	-
Macho	15	-	-
Total	29	0	0

(-) negativo, (+) positivo.

6.5. Detecção de Adenovírus

Nos testes de PCR, seguido por Nested-PCR de cada amostra de fezes e tecidos, foram observadas 11 amostras com bandas possivelmente específicas, com peso esperado de 550 pb e 300 pb e também bandas inespecíficas. As bandas potencialmente específicas, consideramos como positivo e encaminhamos para confirmação e para o sequenciamento. Isso devido estarmos buscando a primeira descrição de adenovírus em *C. thous*, levando a avaliar todas as possibilidades.

Com exceção do animal VS40 que apresentou bandas em ambos os testes, 9 amostra apresentaram bandas em apenas um dos teste. Dentre as amostras de fezes, no teste de PCR, 5 amostras apresentaram bandas, seguindo de 3 amostras no Nested-PCR. Nas amostras de tecidos, 3 apresentaram bandas condizente para o vírus em questão na PCR, e no teste Nested-PCR, todas as amostras analisadas deram negativas (Tabela 7).

Tabela 7: Resultado dos testes de PCR e Nested-PCR na detecção de sugestivas bandas com 550 pb e 300 pb em amostras de fezes e tecido de *Cedocyon thous* de vida livre.

Amostras	PCR	PCR-Nested	PCR	PCR-Nested
	Fezes		Tecido	
VS 35	-	+	-	-
VS 36	+	-	-	-
VS 37	-	-	-	-
VS 38	-	-	+	-
VS 39	-	-	-	-
VS 40	+	-	+	-
VS 41	+	-	-	-
VS 42	-	-	+	-
VS 43	-	-	-	-
VS 44	-	-	-	-
VS 45	-	-	-	-
VS 46	-	-	-	-
VS 47	-	-	-	-
VS 48	-	-	-	-
VS 49	-	+	-	-
VS 50	-	+	-	-
VS 51	+	-	-	-
VS 52	-	-	-	-
VS 53	-	-	-	-
VS 54	-	-	-	-
VS 55	-	-	-	-
VS 56	-	-	-	-

VS 57	-	-	-	-
VS 58	-	-	-	-
VS 59	-	-	-	-
VS 60	+	-	-	-
VS 61	-	-	-	-
VS 62	-	-	-	-
VS 63	-	-	-	-
Total	5	3	3	0

(-) negativo, (+) positivo

As 11 amostras que obtiveram bandas foram encaminhadas ao Instituto de Pesquisa Médica Veterinária, da Academia de Ciências da Hungria para o sequenciamento. A amostra fecal VS 41 apresentou resultado positivo na PCR (Tabela 8) (Figura 25). E a partir do sequenciamento do gene DNA-polimerase, as sequencias de nucleotídeos gerados tiveram fragmento de 291 pb. Em seguida foram avaliadas e comparadas usando o programa BLAST que confirmou-se com 99% de identidade adenovírus aviário da espécie E-8b (FAdVE-8b) em um exemplar de *C. thous* a partir de amostra de fezes.

Tabela 8: Detecção de DNAfd de adenovírus, por PCR em *Cerdocyon thous* de vida livre.

Amostras	Fezes		Tecido	
	PCR	PCR-Nested	PCR	PCR-Nested
VS 35	-	-	0	0
VS 36	-	-	0	0
VS 38	-	-	0	0
VS 40	-	-	-	-
VS 41	+	+	0	0
VS 42	-	-	0	0
VS 49	-	-	0	0
VS 50	-	-	0	0
VS 51	-	-	0	0
VS 60	-	-	0	0
Total		1		0

(-) negativo, (+) positivo, (0) Amostra não testada.

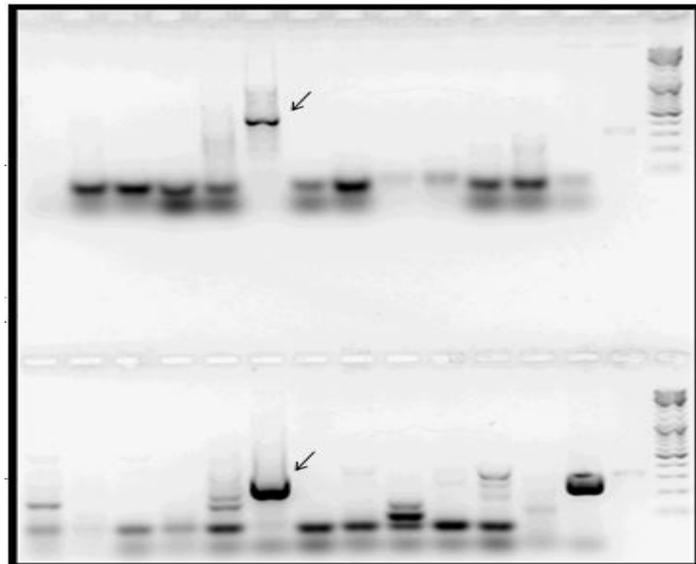


Figura 25: Eletroforese em gel de agarose com resultado positivo para amostra VS40 realizada com produtos de PCR de 550 pb e 300 pb respectivamente, a partir das amostras de fezes e tecido de *Cerdocyon thous* com ladder de 100kb. Fonte: Arquivo pessoal.

6.6. Detecção de *Circovirus* e *Cyclovirus*

As extrações das 11 amostras encaminhadas ao Instituto de Pesquisa Médica Veterinária, da Academia de Ciências da Hungria para o sequenciamento, também foram submetidas à detecção de *Circovirus* e *Cyclovirus*, a partir do gene que codifica a proteína REP.

Das amostras analisadas, a amostra fecal VS40, teve seu produto avaliado e comparado com sequências do GenBank, usando o programa BLAST e obteve 97% de identidade de ácido nucleico para circovírus suíno tipo 2 (*Porcine circovirus type 2* – PCV-2) e a amostra fecal VS41 obteve 95% de identidade de ácido nucleico para Cyclovírus Equ1. Os produtos gerados foram de 356 pb e 314 pb, respectivamente. As amostras de tecido destes animais também foram testadas, mas somente nas amostras de fezes foi possível detectar o genoma dos vírus.

6. DISCUSSÃO

Atualmente as restingas configuram entre os ecossistemas de Mata Atlântica mais alterados devido à sua localização em uma das planícies litorâneas mais urbanizadas e povoadas do país (Rocha et al., 2008). Assim como a área utilizada pela espécie deste estudo, que compreende uma área de restinga representada por 3 grandes reservas ambientais, mas que foram recortadas por uma rodovia bastante movimentada. Além disso, várias propriedades rurais como grandes haras, fazendas e sítios estão próximo a essas reservas, o que aumenta o contato de espécies selvagens com animais domésticos e o homem.

O *C. thous* é uma espécie de hábitos alimentares generalistas, se alimenta de animais hospedeiros dos vírus estudados, sendo relatado o consumo de lixo (Facure; Monteiro-Filho, 1996). Por ser comumente encontrado em áreas rurais e suburbanas, próximos às cercas das casas e cultivos, alimentando-se de itens relacionados a atividades humanas, como frutas cultiváveis, itens de lixo doméstico e galinhas (Facure et al., 2003), o que constitui um marcador importante e que aponta para a contaminação dos animais avaliados já que o ambiente em que vivem os animais sofre pela atividade antrópica invasiva.

6.1. Vírus da raiva

Os animais deste estudo, devido ser oriundos de acidentes com veículos automotores ficavam expostos à variação de temperatura até o momento da sua coleta. Entretanto, estudos demonstram que essa variação, pouco interfere nos resultados dos testes, apresentando exames positivos ao vírus da raiva, em carcaças de animais submetidos a altas temperaturas, assim como baixas temperaturas e em estágio de putrefação (Burkel et al., 1970; Albas et al. 1999). A técnica de IFD, utilizada pelo IBEEs/IDAF para as amostras deste estudo, é considerada pela OMS e pela Organização Mundial de Saúde Animal – OIE como padrão ouro no diagnóstico da raiva (Who, 2013), sendo os diagnósticos *post-mortem* principalmente utilizados a IFD e o isolamento viral por meio de inoculação intracerebral em camundongos ou em cultivo celular, por meio de exemplares de sistema nervoso central dos acometidos pela doença (Who, 2013).

O Brasil é um país que possui uma mastofauna bastante complexa, e os principais animais de interesse para o ciclo silvestre da raiva podem variar em caráter específico e regional (Silva et al.,2012). Segundo dados da Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS/MS 2012), no Brasil, os canídeos silvestres foram responsáveis por 7,9% dos 165 óbitos de humanos com raiva, no período de 1986-2006, no entanto, não foi identificada nenhuma amostra positiva neste estudo.

Casos de raiva humana, apesar da diminuição do número nas últimas décadas ainda, podem ser observados principalmente na região Nordeste do país, enquanto na região Sul não existe registros de casos há mais de 20 anos. Na região Sudeste, a raiva humana foi controlada, principalmente após o ano de 2006. Entretanto, em 2012, um caso foi relatado no estado de Minas Gerais (Brasil, 2014).

O presente estudo utilizou animais mortos por acidentes com veículos automotores e obteve resultados negativos para o vírus da raiva. Uma vez que o tempo entre o recolhimento, necropsia e processamento pode ter sido um fator relevante nesta amostragem é necessário frisar duas hipóteses: 1) baixa expressão viral. A técnica da IFD faz diagnóstico de qualquer partícula viral, mas quando uma amostra tem quantidade de vírus muito pequena, nem sempre é possível utilizar exatamente o lugar onde a proteína do vírus se localiza para preparar a lâmina, pois o vírus não se espalha igualmente no encéfalo. Por esse motivo utilizamos a técnica de inoculação intracerebral em camundongos para confirmar o diagnóstico da IFD, pois quando existe uma quantidade de vírus pequena que não pode ser detectado no imprint da lâmina, esse vírus vai se replicar no cérebro do camundongo e ao final do teste é possível confirmar a presença vírus na lâmina. Também existe a possibilidade do animal ter o vírus da raiva no sistema nervoso central, mas morreu atropelado antes de ter uma replicação viral suficiente para ser diagnosticável. 2) perda da capacidade de replicação. Em casos em que há uma amostra decomposta com pequena quantidade de vírus e que não seja possível visualizar o vírus na IFD, quando inocular o material para prova biológica, o vírus pode não estar mais em condições de replicação no cérebro do camundongo.

Entretanto é preciso ressaltar que esta é a primeira investigação do vírus da raiva em *C. thous* de uma região que compreende reservas com área superior a 300 hectares no sudeste do Brasil no período de 2012 a 2015, e sugere-se que a causa dos acidentes não foi devido a alterações neurológicas decorrentes de infecção pelo vírus da raiva. E não pode deixar de mencionar que o número de amostras analisadas provenientes de animais selvagens terrestres, em 20 anos, tem

um quantitativo pequeno quando comparado às outras espécies de animais domésticos, com um total de 136 amostras no Espírito Santo até o ano de 2013. Esse pequeno número de amostras pode não ser suficiente para demonstrar a circulação do vírus em tais espécies, necessitando de melhorias nas campanhas de controle e vigilância da raiva em animais selvagens, com o aumento do número de exemplares para diagnóstico laboratorial da raiva (Marinho, 2015), assim como apresentado neste trabalho.

6.2. *Rotavirus e Picobirnavirus*

As técnicas rotineiramente utilizadas para a detecção de PBV e RV são a EGPA e a RT-PCR. Para vírus com genomas segmentados, tais como o rotavírus (11 segmentos) e o PBV (dois segmentos), a EGPA seguida pela coloração por nitrato de prata é sensível e aplicada para a detecção dos segmentos genômicos bem como para a caracterização do eletroferogrupos destes vírus (Pereira et al., 1988a).

A primeira descrição do PBV, por exemplo, foi realizada por Pereira et al., 1988b, no Brasil, através de análises por EGPA do conteúdo intestinal de ratos de vida livre (*Oryzomys nigripes*) sendo este uma das presas de *C. thous*, e conseqüentemente uma fonte de contaminação.

Estudos envolvendo *Rotavirus* assim como os *Picobirnavirus* em animais selvagens, em maioria são realizados com animais de cativeiro, sendo poucas as pesquisas envolvendo selvagens de vida livre (Bodewes et al. 2013, Pereira et al., 1988a e Malik et al., 2014).

Considerando que os vírus estudados são de transmissão fecal-oral (Fregolente 2010; Flores, 2012) e as amostras apresentaram resultados negativos para os RNAs viral estudados, a ausência de casos nas amostras dos *C. thous* analisados sugere pouco ou nenhum contato nas últimas semanas de vida, com material fecal contaminado de animais domésticos e humanos, principalmente.

Entretanto várias pesquisas com resultados positivos já foram descritas para *C. thous* e espécies com proximidades filogenéticas. Como descrito por Monteiro (2015), que detectou genomas de RVs em amostras fecais de *Cerdocyon thous* e também de *Lycalopex gymnocercus* (Fischer, 1814). O vírus também foi encontrado em estudo que analisou fezes de vários animais do zoológico em Toronto no Canadá e que apresentaram resultados positivos, inclusive para canídeos como *Nyctereutes procyonoides viverrinus* (Gray, 1834), *Canis lupus*

occidentalis (Richardson, 1829) e *Canis latrans thamnus* (Jackson, 1949), (Petric et al., 1981). Detecção de RVs em fezes de cães domésticos também foi relatada por Gabbay et al., (2003) e Catroxo et al., (2005).

Os PVBs já foram descritos em vários mamíferos incluindo coelhos (Gallimore et al., 1993 e Ludert et al., 1995), gado (Buzinaro et al., 2003; Malik et al., 2014) potros, suínos (Bányai et al., 2008; Ganesh et al., 2011; Martínez et al., 2010), cobaias (Oliveira et al., 1989), ratos (Pereira et al., 1988b e Fregolente et al., 2009), macacos (Wang et al., 2012), tamanduá-bandeira (Haga et al., 1999), orangotangos, tatus (Masachessi et al., 2007), cavalos (Browning et al., 1991). Também encontrados em carnívoros como cães (Costa et al., 2004 e Fregolente et al., 2009), leão, onça-pintada e onça-parda. E recente o estudo realizado por Bodewes et al., (2013), PVB é descrito a partir de amostras de fezes de raposas (*Vulpes vulpes*).

C. thous são animais que cobrem vastas áreas para obter suas necessidades alimentares, utilizando principalmente bordas de matas, áreas alteradas pelo homem, como o ambiente antropizado em que a espécie estudada vive e dessa forma mantém um contato com possíveis fontes de contaminações (Reilly et al., 1970), pela proximidades das reservas com inúmeras propriedades rurais com criação de animais domésticos.

Apesar dos resultados serem negativos, os animais avaliados a partir de exames necroscópicos apresentaram conteúdo estomacal condizente a exposição a outros hospedeiros, já que em um estudo paralelo ainda em andamento foi identificado material biológico de roedor no exemplar VS58, serpente nos exemplares VS43 e VS48 e ainda gambá (*Didelphis aurita*) no exemplar VS39, caracterizando uma maior probabilidade de infecção por *Rotavirus* e principalmente por *Picobirnavirus* (Malik et al., 2014; Fregolente 2009, Anna et al., 1989). Isso mostra que 14% (4/29) dos animais avaliados se alimentaram nos últimos dias de animais hospedeiros dos vírus estudados.

Logo, não foi possível caracterizar os *C. thous* como hospedeiro para os vírus RV e PB. Entretanto, a não detecção viral, também não permite caracterizar a espécie como naturalmente resistente. Pode-se afirmar exclusivamente a condição de não infectado no momento da coleta. O que nos leva à necessidade de uma avaliação amostral maior para qualquer inferência sobre a susceptibilidade ou não aos vírus de RNAs que foram estudados e a relevância dos *C. thous* para a cadeia epidemiológica.

Apesar de não haver descrição prévia a infecção por esses vírus em *C. thous*, há a necessidade de estudos mais amplos para concluir sobre a resistência natural desses animais.

6.3. Adenovírus

Oportunidade de transmissão de doenças entre canídeos selvagens e domésticos pode ser consideravelmente alta na região estudada, visto que a área de estudo é um ambiente antropizado e que existe um grande número de propriedades rurais próximas às limitações das reservas.

Em mamíferos terrestres os adenovírus acometem vários hospedeiros e na maioria dos casos são considerados espécie-específicos, com algumas exceções como é o caso do CAV-1, conhecido por infectar um grande número de espécies de carnívoros silvestres tais como raposas, lobos, guaxinins, gambás e ursos (Woods, 2001).

A partir dos resultados preliminares, sugestivos de casos positivos que foram enviados para confirmação no laboratório da Dra. Maria Benko da Academia de Ciências da Hungria, confirmou a presença de adenovírus nas fezes do animal VS 41. A amplificação do gene DNA-polimerase, foi possível identificar a presença de adenovírus do gênero *Aviadenovirus*. O vírus detectado, a partir do sequenciamento com sequência de 292 pb foi classificado como adenovírus aviário da espécie E tipo 8b (FAdV E 8b).

Embora o papel patogênico da maioria dos FAdV ainda seja questionável, a infecção é associada a uma ampla variedade de apresentações clínicas em galinhas afetando vários tecidos e órgãos. Esses vírus estão envolvidos em condições economicamente importantes, pois estão associados com a pneumonia e traqueíte (Dhillon e Kibeng, 1987), pancreatite (Nakamura et al., 2002), erosão de moela, hepatite por corpos de inclusão, síndrome do hidropericardio, erosões da moela, ventriculite, proventriculite (Guy et al., 2005), glomerulonefrite (Wilson et al., 2010), enterites, síndrome do nanismo e diminuição do ganho de peso (Adair e Fitzgerald, 2008; Wilson et al., 2010), tornando um desafio para a produção avícola.

Com base em dados da literatura, FAdV-E 8b é um dos agentes causadores mais comuns envolvidas em hepatite por corpúsculo de inclusão, uma infecção que pode ocasionar a morte da ave devido alterações degenerativas do fígado (Christensen e Saifuddin, 1989, Ojkic et al. 2008a, Ojkic et al. 2008b). A

hepatite por corpúsculo de inclusão nas galinhas é reconhecida desde 1963, afetando frangos de corte de 3 a 5 semanas de idade.

Na pesquisa feita por Okuda et al., (2004), investigaram a patogenicidade dos adenovírus aviário do sorotipo 8, isoladas de frangos com corpos de inclusão intranucleares vistos em células epiteliais da moela, concluindo que estes vírus são responsáveis por erosões de moela.

Uma vez que os resultados das análises em tecido apresentaram-se negativas, é possível afirmar que o animal avaliado não apresenta infecção pela presença deste vírus, já que adenovírus de animais são normalmente patogênicos dentro da própria espécie (Horwitz, 2001). Mas a presença do vírus nas fezes pode refletir o consumo de aves infectadas ou concebivelmente contaminação de alimentos com excrementos de pássaros, sendo a presença dos vírus nas fezes resultado da alimentação e posteriormente a eliminação do vírus nas fezes desse animal.

Entretanto, apesar da maior probabilidade do genoma encontrado ser de origem alimentar, reforçado pelo hábito alimentar de *C. thous*, não se pode afirmar sobre a susceptibilidade ou não ao vírus para a espécie estudada.

Por se tratar de uma espécie que cobre grandes áreas, principalmente em ambientes alterados (Michalski, 2000; Juarez e Marinho-Filho, 2002), somado a resistência dos adenovírus, que apresentam estabilidade à ação de agentes químicos, como o cloro e físicos como a radiação UV, bem como condições diversas de pH, possibilitam sua permanência no meio ambiente por longos períodos (Gordon et al. 1993, Mattner et al. 2008). Logo, essa espécie de canídeo possivelmente pode atuar como um agente disseminador do vírus, uma vez que o vírus tem sido eliminado nas fezes e que possivelmente contaminam o ambiente.

A disseminação dos FAdVs no ambiente, pode trazer grandes prejuízos a conservação de aves selvagens principalmente, em falcões, que já foi relatado surto dessa espécie criada em cativeiro, onde as aves foram diagnosticadas com infecção por adenovírus (Latimer, 2005).

Ressalta-se também, que a avicultura brasileira é reconhecida como uma das mais desenvolvidas do mundo, com altos índices de produtividade. Atinge esse patamar pelo fato de existir programas de qualidade implantados em todos os elos da cadeia, com destaque para genética, nutrição, manejo, biossegurança, boas práticas de produção, rastreabilidade e programas de bem-estar animal e de preservação do meio ambiente.

No Espírito Santo a avicultura desempenha um importante papel socioeconômico, gerando em torno de 18 mil empregos diretos e indiretos. Vários municípios são responsáveis por destacar a postura comercial do estado no cenário nacional. No município de Guarapari, que compreende a área desta pesquisa, é responsável por 0,09% na produção de postura comercial e 0,18% na produção de frando (AVES, 2015).

Dessa forma é preciso constantes investigações para avanços relacionados aos aspectos ambientais e sanitários, para evitar problemas relacionados à saúde pública e animal ou ainda problemas relacionados à economia da região.

6.4. *Circovirus*

Em mamíferos, dois circovírus demonstraram ser capazes de se replicar, são eles os PCV-1 e PCV-2. O PCV-1 é considerado não-patogênico e o PCV-2 onde a infecção pode ser tanto assintomática, quanto causar uma variedade de sinais clínicos com um significativo impacto econômico para animais de produção (Opriessnig et al., 2007; Grau-Roma et al., 2011).

Sinais de infecção de circovírus em outros mamíferos que não os porcos é pouco investigado, estudos têm sido restrito a circovírus suínos. Entretanto DNA de PCV2 em vacas com sintomas respiratórios e em fetos bovinos abortados foi relatado uma única vez (Nayar, 1999).

Dos resultados apresentados nesta pesquisa, a amostra VS40 de fezes submetidas ao sequenciamento a partir do produto de amplificação com 325 pb do gene que codifica a proteína REP, foram avaliadas e comparadas por meio do programa BLASTX com outras sequencias do GenBank e obteve-se 97% de identidade de ácido nucleico para circovírus suíno tipo 2 (*Porcine circovirus type 2 – PCV-2*).

PCV-2 é reconhecido como um dos os principais patógenos de porcos domésticos em todo o mundo, tendo um efeito extremamente negativo sobre a saúde animal e produção relacionada economia (Segalés et al., 2013, Ticó et al., 2013). Podem causar imunossupressão generalizada em porcos infectados, permitindo assim o desenvolvimento de infecções bacterianas secundárias (Segalés et al., 2004, Wellenberg et al., 2010).

A julgar pelo que se conhece sobre o PCV-2, uma vez que a patogenia desses vírus em canídeos selvagens ainda é escassa, sabe-se que em suínos o

circovírus é transmitido principalmente pela via oronasal. Isso pressupõe que de todos os animais avaliados, um deles foi exposto ao vírus. Evidenciando o contato de um animal selvagem com fômites contaminada pelo vírus, de origem suína principalmente, pois os fragmentos apresentaram alto grau de similaridade para PCV-2.

Neste estudo, amostra de tecido do mesmo animal que apresentou o vírus PCV-2 nas fezes, obteve resultado negativo. A sequência encontrada nas amostras de fezes aponta vírus com homologia para vírus de espécie que é tipicamente presa ou carcaças utilizadas nos hábitos alimentares do *C. thous*. Logo, é provável, que os vírus não tenham sido replicados no *C. thous* e sim no organismo das presas ou carcaças, assim temos uma disseminação mecânica do genoma do vírus detectado.

A ampla distribuição de PCV-2, o dano econômico associado e à necessidade de estratégias de prevenção eficientes, levou à introdução de vacinas contra o PCV-2 na Áustria, em 2008, e eles têm sido uma parte integrante das recomendações do Serviço de Saúde Animal austríaca desde então (Anonymous 2012). No Brasil, não há vacina disponível no mercado, o que leva o controle basear-se na correção de fatores de risco. O Programa Nacional de Sanidade Suídea (PNSS) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento não prevê o controle da circovirose.

Em relação ao perfil da suinocultura capixaba, os municípios que abrange a área do estudo como Guarapari e Vila Velha também fazem parte da produção do estado (ASES, 2015). Diante do exposto, á necessidade de constantes atualizações em técnicas de manejo, tratamento dos dejetos e estudo aprofundado dos agentes e suas interações.

6.5. *Cyclovirus*

A detecção de Cycv em tecido seja ele muscular, fígado ou baço em morcegos e cavalos (Li et al., 2011 e Chandriani et al., 2013) e em várias espécies de animais de criação (cabras, ovelhas, vacas, camelos, e galinhas) (Li et al., 2011; Rodriguez et al., 2013, Tan Le et al., 2013 e Dayaram, 2013) suporta a probabilidade de replicação viral nesses mamíferos. Além disso, Cycvs foram identificados numa variedade de tipos de amostras e organismos, incluindo fezes (morcegos, chimpanzês e seres humanos), músculo (morcegos), produtos de carne

(vacas, galinhas, camelos, ovelhas e cabras) e insetos (libélula e barata) (Li et al., 2011).

A partir das sequências de nucleotídeos do GenBank e da sequência de nucleotídeo com 321 pb do gene que codifica a proteína REP encontrada e analisada pelo BLASTX, identificou-se na amostras de fezes VS41, 95% de identidade de ácido nucleico para o *Cyclovirus* Equ1.

Cycv Equ1 já foi identificado em secreções nasais de cavalos de animais com problemas respiratórios e também detectada em tecidos do fígado e de baço de cavalo com hepatopatia grave, icterícia e encefalopatia hepática (Chandriani et al., 2013). Diante do exposto e sabendo que a transmissão do vírus ocorre principalmente por via oronasal, logo o *C. thous* que apresentou a ocorrência do vírus, certamente esteve em contato com alimento contaminado ou ainda excrementos de cavalo. Essa observação permite apontar uma contaminação por ingestão, sendo outro tipo de contaminação menos provável.

Apesar do vírus não ser identificado na amostra de fígado e rins dos *C. thous* avaliados, a elevada diversidade genética dos Cycvs, pode levar a possível transmissão interespecíficas (Li et al., 2010, 2011). Logo há a necessidade de estudos mais amplos para concluir qualquer inferência sobre a susceptibilidade do vírus nesta espécie estudada.

A detecção de vírus típicos de outra espécie de animal nas fezes de *C. thous* neste estudo sugere que estejam disseminando mecanicamente o vírus, o que possivelmente a torna uma espécie sentinela para esse vírus, resultando em grandes perdas econômicas para a agropecuária da região, já que existem grandes haras com quantidades que variam de 30 a 200 cavalos por propriedade e além de problemas ligados a saúde pública.

7. CONCLUSÕES

No presente estudo é possível verificar o estreito contato que populações selvagens têm com o ambiente urbano, principalmente da espécie em questão, devido seus hábitos e uma vez que a área de amostragem ser caracteriza como antropizada.

E devido a área apresentar uma movimentada rodovia e várias propriedades rurais no entorno das reservas, a avaliação de vírus em amostras biológicas de *C. thous*, apesar de apresentar resultados negativos quanto ao vírus da raiva, rotavírus e picobirnavírus, foi possível identificar outros vírus de animais domésticos como a presença de FAdV E 8b, PCV-2, Cycv Equ1 em amostras fecais da espécie estudada. Podendo assim, estes animais atuarem como disseminadores desses vírus e que possuem grande relevância para a saúde animal, por estarem relacionados a grandes perdas econômicas.

Estes resultados apresentados evidenciam a exposição dos *C. thous* da região com material contaminado de animais domésticos. E apesar das amostras de tecidos apresentarem-se negativas aos vírus testados, não se pode descartar a possibilidade destes animais selvagens estarem vulneráveis as estes vírus.

Considerando que não há descrição prévia destes vírus em *C. thous* e que os fragmentos sequenciados de 292 pb para adenovírus e de 325 e 321 para circovírus e cyclovírus, respectivamente, somado à possibilidade de rearranjo gênico, há possibilidade de estar diante da primeira descrição em *C. thous*, mostrando a similaridade dos vírus de outros hospedeiros mamíferos ou até aves.

Sabe-se que investigações de doenças infecciosas são poucas, especialmente para a espécie *C. thous*. Assim observa-se a necessidade de melhorias nas investigações e controle de vírus em animais selvagens com implementação de estudos como este, devido à carência de dados, a fim de conhecer e entender as circulações virais que acomete as espécies selvagens.

A utilização de animais mortos à margens de rodovias, além de facilitar o acesso dos pesquisadores ao material, é possível utilizar-se dessa perda ambiental para o ganho científico como para a investigação e vigilância epidemiológica, contribuindo para monitoramento e controle de infecções virais em espécies selvagens.

8. REFERÊNCIAS

- Adair, B. M. e Fitzgerald, S. D., 2008: Group I adenovirus infections. *Diseases of poultry*, v. 12, p. 251-266.
- Aguiar, T., Costa, E. C., Rolim, B. N., Romijn, P. C., de Moraes, N. B., & da Silva Teixeira, M. F., 2011: Risco de transmissão do vírus da raiva oriundo de sagui (*Callithrix jacchus*), domiciliado e semidomiciliado, para o homem na região metropolitana de Fortaleza, Estado do Ceará. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 44, 356-363.
- Aguire, A.A., 2009: Wild canids as sentinels of ecological health: a conservation medicine perspective. *Parasites & Vectors.* 2, 7.
- Alam, M. M., Kobayashi, N., Ishino, M., Ahmed, M. S., Ahmed, M. U., Paul, S. K., ... & Naik, T. N., 2007 Genetic analysis of an ADRV-N-like novel rotavirus strain B219 detected in a sporadic case of adult diarrhea in Bangladesh. *Arch Virol.* 152, 199-208.
- Albas, A., Ferrari, C.I., Silva, L.H., Bernardi, F., Ito, F.H., 1999: Influence of canine brain decomposition on laboratory diagnosis of rabies. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 32, p.19–22.
- Albas, A., Souza, E. A. N. D., Picolo, M. R., Favoretto, S. R., Gama, A. R. D., & Sodré, M. M., 2011 Os morcegos e a raiva na região oeste do Estado de São Paulo. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop., Brasília.* 44, 201-205.
- Alexander, K. A., Mcnutt, JW., Briggs, MB., Standers, PE., Funston, P., Hemson, G., Keet, D. e Van Vuuren, M., 2010: Multi-host pathogens and carnivore management in southern Africa. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 33, 249-265.
- Allan, G. M.; Phenix, K. V.; Todd, D. e Mcnulty, M. S., 1994: Some biological and physico-chemical properties of porcine circovirus. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 41, 17-26.
- Allard, A.; Albinsson, B.; Wadell, G., 1992: Detection of adenoviruses in stools from healthy persons and patients with diarrhea by two-step polymerase chain reaction. *J Med Virol*, 37, 149-57.
- Anna, B.; Hambraeus, L.E.J.; Hambraeus, M.; Wandell, G., 1989: Animal model of rotavirus infection in rabbits - protection obtained without shedding of viral antigen. *Archives of Virology.* 107, 237-251.
- Angel, J.; Franco, M. A.; Greenberg, H. B., 2007: Rotavirus vaccines: recent developments and future considerations. *Nat Rev Microbiol.* 5, 529-39.
- Anonymous. 2012: Kundmachung des Österreichischen Bundesministeriums für Gesundheit betreffend "ÖTGD-Programm Circovirus Impfung beim Ferkel". *Animal Health Service Regulation.*

Araujo, D. S. D., Maciel, N. C. , 1998: Restingas fluminenses: biodiversidade e preservação. Boletim FBCN. 25, 27-51.

Araújo F. A. A., 2002: Raiva humana no Brasil: 1992-2001. Belo Horizonte, MG. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais.

ASES-Associação de Suinocultores do Estado do Espírito Santo, 2015. Acesso em: <http://www.associacoes.org.br>.

ASSIS, A. S. et al. Rotavirus epidemiology before and after vaccine introduction. J Pediatr (Rio J), v. 89, n. 5, p. 470-6, 2013.

AVES-Associação dos Avicultores do Estado do Espírito Santo, 2015. Acesso em: <http://www.associacoes.org.br> (acesso em 22 maio 2016).

Barbosa, A. D.; Martins, N. R. S.; Magalhães, D. F., 2011: Zoonoses e saúde pública: riscos da proximidade humana com a fauna silvestre. Ciênc. vet. trop., Recife-PE. 14, 1-9.

Bányai, K., Martella, V., Bogdan, A., Forgach, P., Jakab, F. Meleg, E., Bíró,H., Melegh, B., Szucs, G., 2008: Genogroup I picobirnaviruses in pigs: evidence for genetic diversity and relatedness to human strains. Journal of General Virology. 89, 534–539.

Batista, H. B. C. R.; Franco, A. C.; Roehle, P. M., 2007: Raiva: uma breve revisão. Acta Scientiae Veterinariae. 35,125-144.

Benko, M.; Harrach, B., 2003: Molecular evolution of adenoviruses. Current Topics in Microbiology and Immunology. 272, 3-35.

Beisiegel, B.M., 1999: Contribuição ao estudo da história natural do cachorro do mato, *Cercopithecus thous*, e do cachorro vinagre, *Speothos venaticus*. Tese (Doutorado em Etologia), Instituto de Psicologia, USP.

Beisiegel, B. M.; Lemos, F. G.; Azevedo, F. C.; Queirolo, D.; Jorge, R. S. P., 2013: Avaliação do risco de extinção do Cachorro-do-mato *Cercopithecus thous* (Linnaeus, 1766) no Brasil. Biodiversidade Brasileira. 3, 138-145.

Bengis, R. G.; Kock, R. A.; Fischer, J., 2002: Infectious animal diseases: the wildlife/livestock interface. Revue Scientifique et Technique-Office international des épizooties. 21, 53-66.

Bernardi F., Nadin-Davis S. A., Wandeler A. I., Armstrong J., Gomes, A. A. B., Lima F.S., Nogueira F.R.B. e Ito F.H., 2005: Antigenic and genetic characterization of rabies viruses isolated from domestic and wild animals of Brazil identifies the hoary fox as a rabies reservoir. Journal of General Virology. 86, 3153-3162.

Bhattacharya R., Sahoo G. C., Nayak M. K Sahadr, S. U. R. D., Naik T. N., Bhattacharya S. K., Krishnan T., 2007: Detection of genogroup I and II human picobirnaviruses showing small genomic RNA profile causing acute watery diarrhoea

among children in Kolkata, India. *Journal Of Molecular Epidemiology And Evolutionary Genetics Of Infectious Diseases*. 7, 229–238.

Bleck, T. P. Rabies, in: Guerrant, R. L.; Walker, D. H.; Weller, P. F., 2006: *Tropical infectious diseases: principles, pathogens & practice.*, Churchill Livingstone Elsevier, 2 ed, Philadelphia.

Blinkova, O., Rosario, K., Li, L., Kapoor, A., Slikas, B., Bernardin, F., ... e Delwart, E., 2009: Frequent detection of highly diverse variants of cardiovirus, cosavirus, bocavirus, and circovirus in sewage samples collected in the United States. *Journal of Clinical Microbiology*. 47, 3507–3513.

Bodewes, R., Giessen, J. V. D., Haagmans, B. L., Osterhaus, A. D. M. E., Smits, S. L., 2013: Identification of multiple novel viruses, including a parvovirus and a hepevirus, in feces of red foxes. *Journal of virology*. 87, 7758–7764.

Boom, R.; Sol, C. J. A.; Salimans, M. M. M.; Jansen, C. L.; Dillen, P. M. E. W. V.; Noordaa, J. V. D., 1990: Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids. *Journal of Clinical Microbiology*. 28, 495–503.

Brasil. Ministério da Saúde, 2007a: Situação da Raiva Silvestre no Brasil. Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília: MS.

_____ Ministério da Saúde, 2007b: Casos confirmados de raiva humana (óbitos) no Brasil, grandes regiões e unidades federadas de 1990 a 200.

_____ Ministério da Saúde, 2009: Vigilância em saúde – Zoonoses. p. 224

_____ Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2009a: Controle da raiva dos herbívoros: manual técnico 2009. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: MAPA.

_____ Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, 2009b: Departamento de vigilância epidemiológica. Guia de Vigilância epidemiológica, 7 ed. Brasília: Ministério da Saúde, Caderno 13: Raiva, 31.

_____ Ministério da Saúde, 2014: Portal de Saúde. Situação Epidemiológica – Dados. Casos confirmados de Raiva Humana, segundo UF de residência. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2014.

Browning, G. F., Chalmers, R. M., Snodgras, D. R., Batt, R. M., Hart, C. A., Ormarod, S E; Leadon, D., Stoneham, S. J., Rosdale, P. D., 1991: The prevalence of the enteric pathogens in diarrhoeic thoroughbred foals in Britain and Ireland. *Equine Veterinary Journal*, n.23,p.405–409.

Buckwalter S.P., Teo R., Espy M.J., Sloan L. M., Smith T.F., Pritt B. S., 2012: Real-time qualitative PCR for 57 human adenovirus types from multiple specimen sources. *Journal of clinical microbiology*, v. 50, n. 3, p. 766-771.

Buonavoglia, C., Martella, V., 2007: Canine respiratory viruses. *Veterinary research*, v. 38, n. 2, p. 355-373, 2007.38:355-373.

- Burkel, M. D., Andrews, M. F., Meslow, E. C., 1970: Rabies detection in road-killed skunks (*Mephitis mephitis*). *J Wildl Dis* v. 4, p. 496–499.
- Buzinaro, M G, Freitas, P. P. S, Kisiellius, J. J., Ueda, M., Jerez, J. A., 2003: Identification of a bisegmented double-stranded RNA virus (picobirnavirus) in calf faeces. *The Veterinary Journal*. 166 , 185-187.
- Carnieli JR. P., Brandão, P. E., Carrieri, M. L., Castilho, J. G., Macedo, C. I. M., Machado, L. M., Kotait, I., 2006: Molecular epidemiology of rabies vírus strains isolated from wild canids in northeastern Brazil. *Virus Research*. 120, 113-120.
- Carnieli JR. P., Fahl, W. O., Castilho, J. G., Oliveira, R. N. O., Macedo, C. I. M., Durymanova, E., Jorge, R. S. P., Morato, R. G., Spindola, R. O., Machado, L. M., As, J. E. U., Carrieri, M. L., Kotait, I., 2008: Characterization of Rabies vírus isolated from canids and identification of the main wild canid host in Northeastern Brazil. *Virus Research*. 131, 33-46.
- Catroxo, M. H. B., Pongilupi, T., Gregori, F., Bersano, J. G., Ruiz, V. L. A., Petrella, S., 2005: Detecção de rotavírus pelas técnicas de microscopia eletrônica de transmissão em fezes de cão com diarreia. *Arquivos do Instituto Biológico*. 72, 1-64.
- CDC., 2011: Center for Disease Control and Prevention. *Global Diarrhea Burden Diarrhea: Common Illness, Global Killer. Stopping diarrhea.*
- Christensen. H., Saifuddin M. D., 1989: A primary epidemic of inclusion body hepatitis in broilers, *Avian Dis*. 33, 622-30.
- CITES. Apendices I, II e III, 2012: *Convencão sobre o Comércio Internacional de Espécies Ameaçadas de Fauna e Flora Silvestres.*
- Clark, B.; McKendrick, M., 2004: A review of viral gastroenteritis. *Curr Opin Infect Dis*, v. 17, n. 5, p. 461-9.
- Cleaveland S., Laurenson M. K. e Taylor L. H., 2001: Diseases of humans and their domestic mammals: pathogen characteristics, host range and the risk of emergence. *Philos T Roy Soc B*. 356, 991–999.
- Clevenger, A. P.; Chusc, B. e Gunsonn, K. E., 2003: Spatial patterns and factors influencing small vertebrate fauna road-kill aggregations. *Biological conservation*, v. 109, n. 1, p. 15-26.
- Candriani, S., Skewes-Cox, P., Zhong, W., Ganem, D. E., Divers, T. J., Van Blaricum, A. J., Tennant, B. C. e Kistler, A. L., 2013: Identification of a previously undescribed divergent virus from the Flaviviridae family in an outbreak of equine serum hepatitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 1407–1415.
- Cheida, C. C., Oliveira, E. N., Costa, R. F., Mendes, F. R., Quadros, J., 2006: Ordem Carnívora. In: REIS, N. R.; PERACCHI, A. L.; PEDRO, W. A.; LIMA, I. *Mamíferos do Brasil*. Londrina. 231-275.

Cherem, J.J., Kammers, M.; Ghizoni-Jr, I.R. e Martins, A., 2007: Mamíferos de médio e grande porte atropelados em rodovias do Estado de Santa Catarina, sul do Brasil. *Revista Biotemas*. 20, 81-96.

CONAMA., 2002: Conselho Nacional Do Meio Ambiente. Dispõe dos parâmetros, definições e limites de Área de Preservação Permanente. Resolução nº 303, de 13 de maio de 2002. *Diário Oficial da União*. 90, 68-70.

Mariana Faria Corrêa, 2004: Ecologia de Graxains (CARNÍVORA: CANIDAE; *Cerdocyon thous* e *Pseudalopex gymnocercus*) em um remanescente de Mata Atlântica na região metropolitana de Porto Alegre – Parque Estadual de Itapuã-Rio Grande do Sul, Brasil. Rio grande do Sul, 2004. Dissertação (Mestrado em Ecologia) Programa de pós graduação em ecologia do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Costa, A. P., Cubel Garcia, R. C. N., Labarthe, N V., Leite, J. P. G., 2004: Detection of doublestranded RNA viruses in fecal samples of dogs with gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 56, 554-557.

Courtenay, O., Quinnell, R. J. e Chalmers, W. S. K., 2001: Contact rates between wild and domestic canids: no evidence of parvovirus or canine distemper virus in crab-eating foxes. *Veterinary Microbiology*. 8, 9-19.

Courtenay, O. e Maffei, L., 2004: Crab-eating fox *Cerdocyon thous* (Linnaeus, 1766). pp. 32-38. In: Sillero-Zubiri, C.; Hoffmann, M. & Macdonald, D.W. (eds.). *Canids: foxes, wolves, jackals and dogs. Status survey and conservation action plan*. IUCN.

Curi, N. H. A., Araújo, A. S., Campos, F. S., Lobato, Z. I. P., Gennari, S. M., Marvulo, M. F. V., Silva, J. C. R. e Talamoni, S. A., 2010: Wild canids, domestic dogs and their pathogens in Southeast Brazil: disease threats for canid conservation. *Biodiversity and Conservation*, v. 19, no. 12, p. 3513-3524.

Darwich, L., Segalès, J., Mateu, E., 2004: Pathogenesis of postweaning multisystemic wasting syndrome caused by Porcine circovirus 2: an immune riddle. *Arch. Virol*. 149, 857–874.

Daszak, P., Cunningham, A. A., Hyatt, A. D., 2000: Emerging infectious diseases of wildlife--threats to biodiversity and human health. *Science*. 21, 287, 443-9.

Daszak, P., Cunningham, A. A., Hyatt, A. D., 2001: Anthropogenic environmental change and the emergence of infectious diseases in wildlife. *Acta Tropica*, v. 78, no. 2, p. 103-116.

Davison, A. J. et al., 2000: DNA sequence of frog adenovirus. *Journal of General Virology*. 81, 2431–2439.

Dayaram, A. et al., 2013: High global diversity of cycloviruses amongst dragonflies. *J. Gen. Virol*. 94, 1827–1840.

Deem, S. L. e Emmons, L.H., 2005: Exposure of free-ranging maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*) to infectious and parasitic disease agents in the Noél

Kempff Mercado National Park, Bolivia. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine: Official Publication of the American Association of Zoo Veterinarians*. 36, 192-197.

De Jong J. C., Wermenbol A. G., Verweij-Uijterwaal M. W., Slaterus K. W., Wertheim-Van Dillen P., Van Doornum GJ, Khoo SH, Hierholzer JC., 1999: Adenoviruses from human immunodeficiency virus-infected individuals, including two strains that represent new candidate serotypes Ad50 and Ad51 of species B1 and D, respectively. *J Clin Microbiol*. 37, 3940-3945.

Desselberger, U., 1999: Rotavirus infections: guidelines for treatment and prevention. *Drugs*, 58, 447-52.

Desselberger, U., et al., 2009: Rotaviruses and rotavirus vaccines. *Br Med Bull*. 90, 37-51.

Delwart, E.; Li, L., 2011: Rapidly expanding genetic diversity and host range of the Circoviridae viral family and other Rep encoding small circular ssDNA genomes. *Virus Research*. 164, 114–121.

Dhillon, A. S., Kibeg, F. S. B., 1987.: Adenovirus infection associated with respiratory disease in commercial chickens. *Avian Dis.*, v. 31, n. 7, p. 654-657.

Di Bitetti, M.S.; Di Blanco, Y.E.; Pereira, J.A.; Paviolo, A. & Pérez, I.J., 2009: DI Time partitioning favors the coexistence of sympatric crab-eating foxes (*Cerdocyon thous*) and pampas foxes (*Lycalopex gymnocercus*). *Journal of Mammalogy*. 90, 479-490.

Ellis, J., Hassard, L., Clark, E., Harding, J., Allan, G., Willson, P., Strokappe, J., Martin, K., McNeilly, F. e outros, 1998: Isolation of circovirus from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *The Canadian veterinary journal*. 3, 44.

Ellis, J., Clark, E., Haines, D., West, K., Krakowka, S., Kennedy, S., Allan, G.M.. 2004: Porcine circovirus-2 and concurrent infections in the field. *Vet. Microbiol*. v. 98, p. 159–163.

Estes, M. K., Cohen, J. E. A. N., 1989: Rotavirus gene structure and function. *Microbiological reviews*. 53, 410-449.

Estes, M. K., 1996: Rotavirus and their replication. *Fundamental Virology*. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 731-754.

Estes M., 2001: In Knipe DM et al., eds. *Fields Virology*, ed. 4. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins CD-room.

Estes M. K. E Kapikian A., 2007: Rotaviruses, In: *Fields Virology*. D Knipe, D Griffin, R Lamb, M Martins, B Roizman, S Straus (eds.). Wolters Kluwer Health; Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia, Pennsylvania, USA, 1917 – 1975.

Estes, M. K. E., Greenberg, H. B., 2013: Rotaviruses. In: Knipe, D. M.; Howley, P. M., et al (Ed.). *Fields Virology*. 6th edition. Philadelphia, PA, USA: Wolters Kluwer Health/Lippincott, Williams and Wilkins.

- Facure, K.G. e Monteiro-Filho E. L. A., 1996: Feeding habits of the crab-eating fox *Cerdocyon thous* (Carnivora, Canidae) in a suburban area of southeastern Brazil. *Mammalia*. 60, 147-149.
- Facure, K.G.; Giaretta, A.A. e Monteiro-Filho, E.L.A., 2003: Food habits of the crab-eating fox, *Cerdocyon thous*, in an altitudinal forest of the Mantiqueira Range, Southeastern Brazil. *Mammalia*. 67, 503-511.
- Falkenberg D. B., 1999: Aspectos da flora e da vegetação secundária da restinga de Santa Catarina, sul do Brasil. *INSULA Revista de Botânica*. 28, 01.
- Fenner, R.; Bachmann, P. A.; Gibbs, E. P.; Murphy, F. A.; Studdert, M. J.; White, D. O., 1992: *Virologia veterinária*. Zaragoza: Acribia. 551-556.
- Fiorello, C. V., Noss, A. J., Deem, S.L., Maffei, L. e Dubovi, E.J., 2007: Serosurvey of small carnivores in the Bolivian Chaco. *Journal of Wildlife Diseases*. 43, 551-557.
- Firth, C., Charleston, M.A., Duffy, S., Shapiro, B., Holmes, E.C., 2009: Insights into the evolutionary history of an emerging livestock pathogen: porcine circovirus 2. *J. Virol.* 83, 12813–12821.
- Flores, E. F., 2012: *Virologia Veterinária*. Editora UFSM.
- Funk, S. M. et al., 2001: The role of disease in carnivore ecology and conservation. *Conservation Biology Series-Cambridge*. 443-466.
- Forman, T. T. R., 1998: Alexander, L. E. Roads and their major ecological effects. *Annual Review of Ecology and Systematics*, Palo Alto, 29, 207-231.
- Frencki, R. I. B. et al., 1991: Classification and nomenclature of viruses. *Arch. Virol.* New York, Suppl. 2.
- Fregolente, M.C D., Gatti, M. S. V., 2009: Molecular characterization of picobirnaviruses from new hosts. *Virus Research*. 143, 134–136.
- Fregolente, M.C D., 2010: Caracterização genética de picobirnavírus detectados em amostras fecais de diferentes hospedeiros. 2010. 80f. Tese (Doutor em Genética e Biologia Molecular) Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- Gabbay, Y. B., Homen, V. S. F., Munford, V.; Alves, A. S., Mascarenhas, J. D. P., Linhares, A. C., Rácz M. L., 2003. Detecção de rotavírus em cachorros com diarreia. *Brazilian Journal of Microbiology*. 34, 77-80.
- Gallimore, C, Lewis, D Brown, D., 1993: Detection and characterization of a novel bisegmented double-stranded RNA virus (picobirnavirus) from rabbit faeces. *Arch Virol*, 133, 63–73.
- Ganesh, B; Nataraju, S. M., Rajendran, K, Ramamurthy, T, Kanungo, S., Manna, B, Nagashima, S, Sur, D., Kobayashi, N.; Krishnan, T., 2010: Detection of closely related Picobirnaviruses among diarrhoeic children in Kolkata: Evidence of zoonoses? *Journal Of Molecular Epidemiology And Evolutionary Genetics Of Infectious Diseases*. 10, 511-516.

- Ganesh, Balaji B. et al., 2011: Role of cytokines in the pathogenesis and suppression of thyroid autoimmunity. *Journal of Interferon & Cytokine Research*. 31, 721-731.
- Ganesh B., Masachessi G., Mladenova Z., 2014: Animal Picobirnavirus. *VirusDisease*. 25, 223-238.
- Gascoyne, S. C., Laurenson, M. K., Lelo, S., Borner, M., 1993: Rabies in African wild dogs (*Lycaon pictus*) in the Serengeti region, Tanzania. *Journal of wildlife Diseases*. 29, 396-402.
- Gatti, M. S., Castro P. A. F., FERRAZ, M. M. G., FIALHO, A. M., Pereira, H. G., 1989: Viruses with bisegmented double-stranded RNA in pig faeces. *Research in Veterinary Science*. 47, 397–398.
- Gati, A., Bianchi, R., Rosa, C. R. X., Mendes, S. L., 2006: Diet of two sympatric carnivores, *Cerdocyon thous* and *Procyon cancrivorus*, in a restinga area of Espírito Santo State, Brazil. *Journal of Tropical Ecology*. 22, 227-230.
- Ge, X. et al., 2011: Genetic diversity of novel circular ssDNA viruses in bats in China. *Journal of General Virology*. 92, 2646–2653.
- Ghebremedhin B., 2014: Human adenovirus: Viral pathogen with increasing importance. *Eur J Microbiol Immunol (Bp)* 4, 26-33.
- Giannitti, F., Diab, SS., Uzal, FA., Fresneda, K., Rossi, D., Talmi-Frank, D. and Baneth, G., 2012: Infection with a Hepatozoon sp. closely related to *Hepatozoon felis* in a wild Pampas gray fox (*Lycalopex -Pseudalopex -gymnocercus*) co-infected with canine distemper virus. *Veterinary Parasitology*, vol. 186, 497-502.
- Gillman, L., Sánchez, A.M., Arbiza, J., 2013: Picobirnavirus in captive animals from Uruguay: identification of new hosts. *Intervirology*. 56, 46–49.
- Giordano, M. O., Martinez, L. C., Rinaldi, D., Gúinard, S., Naretto, E., Casero, R., Yacci, M.R., Depetris, A. R., Medeot, S. I., Naes, S. V., 1999: Diarrhea and enteric emerging viruses in HIV-infected patients. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 15, 1427–1432.
- Giordano, M. O., Masachessi, G.; Martinez, L. C., Barril, P. A., Ferreyra, L. J., ISA, M. B., Nates, S. V., 2008: Two instances of large genome profile picobirnavirus occurrence in Argentinian infants with diarrhea over a 26-year period (1977 – 2002). *Journal of Infection*. 56, 371-375.
- Gombold, J. L., Ramig, R. F., 1994: Genetics of the rotaviruses. In: Ramig, R. F. (eds). *Rotaviruses*, Berlin: Springer-Verlag. 130-137.
- Gomes A. A. B., 2004: Epidemiologia da raiva: caracterização de vírus isolados de animais domésticos e silvestres do semi-árido paraibano da região de Patos, Nordeste do Brasil. 107f. São Paulo, SP. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Programa de Pós-graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses, Universidade de São Paulo.

Gordon Y. J., Gordon R. Y., Romanowski E., Araullo-Cruz T. P., 1993: Prolonged recovery of desiccated adenoviral serotypes 5, 8, and 19 from plastic and metal surfaces in vitro. *Ophthalmology*. 100, 1835-1840.

Grau-Roma L., Fraile L., Segales J., 2011: Recent advances in the epidemiology, diagnosis and control of diseases caused by porcine circovirus type 2. *Vet J*. 187, 23-32.

Grohmann, G.S., Glass, R. I., Pereira, H. G., Monroe, S. S., Hightower, A. W., Weber, R., Bryan, R. T., 1993: Enteric viruses and diarrhea in HIV-infected patients. Enteric Opportunistic Infections Working Group. *The New England Journal of Medicine*. 329, 14–20.

Guedes D., Barbosa L.M., Martins S. E., 2006: Composição florística e estrutura fitossociológica de dois fragmentos de floresta de restinga no Município de Bertiooga, SP, Brasil. *Acta Botanica Brasilica*. 20, 299-311.

Guy, J. S., Barnes, H. J., Smith, L. et al., 2005: Partial characterization of an adenovirus-like virus isolated from broiler chickens with transmissible viral proventriculitis. *Avian Dis*. 49, 344-351.

Haga, I. R., Martins, S. S., Hosomi, S.T., 1999: Identification of a bisegmented double-stranded RNA virus (Picobirnavirus) in faeces of giant anteaters (*Myrmecophaga tridactyla*). *The Veterinary Journal*. 158, 234–236.

Halami, M. Y. et al, 2008: Detection of a novel circovirus in mute swans (*Cygnus olor*) by using nested broad-spectrum PCR. *Virus Research*. 132, 208–212.

Hattermann, K., Schmitt, C., Soike, D., Mankertz A., 2003: Cloning and sequencing of Duck circovirus (DuCV). *Arch. Virol*. 148, 2471–2480.

Harrach B., 2014: Adenoviruses: General Features. Reference Module in Biomedical Sciences. Elsevier. 1-9.

Horwitz, M. S., 2001: Adenovirus immunoregulatory genes and their cellular targets. *Virology*. 279, 1-8.

Hubner, S. O., Pappen, F. G., Ruas, J. L., Vargas, G.D. Á., Fischer, G. e Vidor, T., 2010: Exposure of pampas fox (*Pseudalopex gymnocercus*) and crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) from the Southern region of Brazil to Canine distemper virus (CDV), Canine parvovirus (CPV) and Canine coronavirus (CCoV). *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 53, 593-597.

Hunter L.. *Carnivores of the World*. Princeton University Press, Princeton. 240p, 2011.

IBAMA. Listas das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção, 2004. Disponível em: <http://www.icmbio.gov.br/portal/faunabrasileira/lista-de-especies?start=600>. Acesso em 25/10/2015

ICTV. International committee on taxonomy of virus, 2013: Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. In: King, A.M.Q.; Adams, M.J.;

Carstens, E.B.; Lefkowitz, E.J. (Eds.). Ninth Report of the International 35 Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Elsevier Academic Press.

ICTV. International committee on taxonomy of virus, 2015: Virus Taxonomy: the classification and nomenclature of viruses.

INCAPER (Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural), 2015.

Instituto Florestal, Plano de manejo: parque estadual do morro do Diabo. Santa Cruz do Rio Pardo: Viena. 311, 2006.

IUCN - Red lista of threatened species, 2006.

Johne, R. et al., 2006: Genome of a novel circovirus of starlings, amplified by multiply primed rolling-circle amplification. *Journal of General Virology*. 87, 1189–1195.

Jones MS 2nd, Harrach B, Ganac RD, Gozum MM, Dela Cruz WP, Riedel B, Pan C, Delwart EL, Schnurr DP., 2007: New adenovirus species found in a patient presenting with gastroenteritis. *J Virol*. 81, 5978-5984.

Jorge, R. S. P., Rocha, F. L., May Junior, J. A., Morato, R. G., 2010: Ocorrência de patógenos em carnívoros selvagens brasileiros e suas implicações para a conservação e saúde pública. *Oecol. Aust.* 14, 686-710.

Juarez, K.M. E Marinho-Filho, J., 2002: Diet, habitat use, and home ranges of sympatric canids in Central Brazil. *Journal of Mammalogy*, 83: 925-933. Berta, A., 1982. *Cerdocyon thous*. *Mammalian Species*. 186, 1-4.

Karina Miranda Marinho, 2015: Epidemiologia e distribuição espaço-temporal da raiva no Espírito Santo, entre os anos de 1994 e 2013. Dissertação de mestrado em Saúde Coletiva do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória- ES.

Kapikian, A. Z.; Hoshino, Y.; Chanock, R. M. Rotaviruses. In: Knipe, D. M.; Howley, P. M., et al (Ed.), 2001: *Fields Virology*. 4th edition. Philadelphia, PA, USA: Lippincott, Williams and Wilkins, p.1787–1833.

Kasper C.B., Trinca C.S., Sanfelice D., Mazim F.D. & Trigo T.C., 2014: Os carnívoros, p.161-190. In: Gonçalves G.L., Quintela F.M. & Freitas T.R.O. (Eds), *Mamíferos do Rio Grande do Sul*. Pacartes, Porto Alegre.

Kim, K.H., Chang, H.W., Nam, Y.D., Roh, S.W., Kim, M.S., Sung, Y., Jeon, C.O., Oh, H.M., Bae, J.W., 2008: Amplification of uncultured single-stranded DNA viruses from rice paddy soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 5975–5985.

Latimer, K. S., e Redig, P. T., 2005: "Adenovirus Infection in Taita Falcons." *Journal of Avian Medicine and Surgery* v.19.4, p. 280-285.

Lemos, F.G.; Facure, K.G. & Azevedo, F.C. A first approach to the comparative ecology of the hoary fox and the crab-eating fox in a fragmented human altered landscape in the Cerrado biome at Central Brazil. p. 143-160, 2011a.

Lemos, F.G.; Azevedo, F.C.; Costa, H.C.M. e May Junior, J.A., 2011b: Human threats to hoary and crab-eating foxes in Central Brazil. *Canid News*, 14.2 (online).

Li, L., Kapoor, A., Slikas, B., Bamidele, O. S., Wang, C., Shaukat, S., Masroor, M. A., Wilson, M. L., Ndjanga, J.-B. N. e outros, 2010: Multiple diverse circoviruses infect farm animals and are commonly found in human and chimpanzee feces. *J Virol*, v. 84, p. 1674– 1682.

Li, L., Shan, T., Soji, O. B., Alam, M. M., Kunz, T. H., Zaidi, S. Z. e Delwart, E., 2011: Possible cross-species transmission of circoviruses and cycloviruses among farm animals. *J. Gen. Virol.* 92, 768–772

Li L., Giannitti F., Low J., Keyes C., Ullmann L. S., Deng X., Aleman M., Pesavento P. A., Pusterla N. e Delwart E., 2015: Exploring the virome of diseased horses. *Journal of General Virology*, p. 1–13.

Lima, F. E. S., Cibulski, S. P., Santos, H. F.; Teixeira T. F., Varela, A. P. M., Roehe, P. M., Delwart, E., Franco, A. C., 2015: Genomic characterization of novel circular ssDNA viruses from insectivorous bats in Southern Brazil. *PLoS one*, v. 10, n. 2, p. e0118070.

Linhares, A. C.; Pinheiro, F. P.; Schmetz, C.; Muller, G.; Petters, D., 1977: Duovírus (rotavírus) em Belém do Pará. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 19, 278-279.

Linhares, A. C.; Pinheiro, F. P.; Freitas, R. B.; Gabbay, Y. B.; Shirley, J. A.; Beards G. M., 1981: Na outbreak of rotavirus diarrhea among a nonimmune, isolated South America Indian community. *Am. J. Epidemiol.* 113, 703-710.

López-Bueno, A. et al., 2009: High diversity of the viral community from an Antarctic lake. *Science*. 326, 858–861.

Ludert J. E., Hidalgo M., Gil F, Liprandi F., 1991: Identification in porcine faeces of a novel virus with a bisegmented double-stranded RNA genome. *Archives of Virology*. 117, 97–107.

Ludert J. E., Abdul-latif L., Liprandi A, Liprandi F., 1995: Identification of picobirnavirus, viruses with bisegmented double stranded RNA, in rabbit faeces. *Research in Veterinary Science*. 59, 222–225.

Lukashok S. e Horwitz M. S., 2006 Adenovirus persistence. In: Ahmed R, Chen I. *Persistent Viral Infections*. John Wiley & Sons. Chichester.

Luksic I., Kearns P. K., Scott f., Rudan I., Campbell H., Nair H., 2013: Viral etiology of hospitalized acute lower respiratory infections in children under 5 years of age -- a systematic review and meta-analysis. *Croat Med J.* 54, 122-134.

Majláthová, V., Hurníková, Z., Majláth, I. e Petko, B., 2007: Hepatozoon canis infection in Slovakia: imported or autochthonous? *Vector Borne and Zoonotic Diseases* (Larchmont, N.Y.). 7, 199-202.

Madec F., Rose N., Grasland B., Cariolet R. e Jestin A., 2008: Pós-desmame síndrome multissistêmica e outros problemas relacionados com o PCV2 em suínos: uma experiência de 12 anos. *Transfronteiriça e Doenças Emergentes*. 55, 273 -28.

Madsen, L. B. et al. Estimating the costs of implementing the rotavirus vaccine in the national immunisation programme: the case of Malawi. *Trop Med Int Health*. 19, 177-85, 2014.

Malik, Y.S., Sharma, A. K., Kumar, N., Sharma, K., Ganesh, B., Kobayashi, N., 2014: Identification and characterisation of a novel genogroup II picobirnavirus in a calf in India. *Veterinary Record*. 174, 11.

Mankertz, A. et al., 2000: Cloning and sequencing of columbid circovirus (coCV), a new circovirus from pigeons. *Archives of Virology*. 145, 2469–2479.

Martínez, L .C, Masachessi, G., Carruyo, G., Ferreyra, L. J., Barril, P. A, Isa, M. B., Giordano, M. O., Ludert, J. E., Nates, S.V., 2010: Picobirnavirus causes persistent infection in pigs. *Journal Of Molecular Epidemiology And Evolutionary Genetics Of Infectious Diseases*. 10, 984–988.

Mascarenhas J. D. P., Leite, J. P. G., Lima J. C. Heinemann, M. B. Oliveira, D. S., Araújo, I. T., Soares, L. S., Gusmão, R. H. P., Gabbay, Y. B., Linhares, A. C., 2007: Detection of a neonatal human rotavirus strain with VP4 end NSP4 genes of porcine origin. *Journal of Medical Virology*. 56, 524-532.

Masachessi, G., Martínez, L. C., Giordano, M. O., Barril, P. A, Isa, B. M, Ferreyra, L., Villareal, D., Carello, M., Asis, C., Nates, S. V., 2007: Picobirnavirus (PBV) natural hosts in captivity and virus excretion pattern in infected animals. *Archives of Virology*. 152, 989–998.

Matthijnssens, J. et al., 2011: Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). *Arch Virol*, v. 156. 8, 1397-413.

Matthijnssens, J., 2012: Genotype constellation of epidemiologically important human rotaviruses. 10th International Rotavirus Symposium, Bangkok, Thailand. 19-21.

Mattion, N. M. et al., 1991 Expression of rotavirus proteins encoded by alternative open reading frames of genome segment 11. *Virology*. 181, 295-304.

Mattner F, Sykora KW, Meissner B, Heim A., 2008: An adenovirus type F41 outbreak in a pediatric bone marrow transplant unit: analysis of clinical impact and preventive strategies. *Pediatr Infect Dis J*. 27, 419-424.

Mattos, B. C., Patrício, L. L., Plugge, N. F., Lange, R. R., Richartz, R. R. E Dittrich, R. L., 2008: Seroprevalence of antibodies anti-Neospora caninum and anti-Toxoplasma gondii in captive wild canids. *Revista Brasileira de Parasitologia veterinária = Brazilian Journal of Veterinary*. 17, 267-272.

Mayo A. E Guerreiro M. G., 1972: Vírus da raiva. In: *Virologia Veterinária*, 2. ed. Porto Alegre: Sulina. 437.

Mayo, M. A. e Pringle, C. R., 1997: Virus taxonomy. *Journal of Genetic Virology*. 79, 649-657.

Mccoll, K. A., Tordo. N., Setién, A. A., 2000: Bat lyssavirus infections. *Revue Scientifique et Technique International Office of Epizootcs*.19, 177-179.

Megid, J., 2007: Raiva. Pp. 785-798. In: Z.S. Cubas, J.C.R. Silva & J.L. Catão-Dias(orgs). *Tratado de animais selvagens – medicina veterinária*. Editora Roca Ltda., São Paulo, SP. 1354.

Meier O. e Greber U. R. S. F., 2004: Expressão errônea: operador inesperado Adenovirus endocytosis. *J Gene Med*. 6, 152–163.

Mena K. D., Gerba C. P., 2009: Waterborne adenovirus. *Rev Environ Contam Toxicol*. 198, 133-167.

Michalski F., 2000, *Ecologia de carnívoros em área alterada no Sudoeste do Brasil*. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

Mondal, A.; Majee, S., 2014: Novel bisegmentedvirus (picobirnavirus) of animals, birds and humans. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*.4, 154-158.

Monteiro, G. S, Fleck, J. D., Kluge, M., Rech, N. K., Soliman, M. C., Staggemeier, R., Rodrigues, M. T., Barros, M. P., Heinzelmann, L. S. e Spilki, F. R., 2015 Adenoviruses of canine and human origins in stool samples from free-living pampas foxes (*Lycalopex gymnocercus*) and crab-eating foxes (*Cerdocyon thous*) in São Francisco de Paula, Rio dos Sinos basin Braz. *J. Biol*. 75,11-16.

Moraes, M.P. e Costa, P. R. S., 2007: Adenoviridae. In: Flores, E.F. (org.). *Virologia Veterinária*. Santa Maria: editora UFSM. 413-431.

Motta-Júnior, J. C., Lombardi J. A. e Talamoni, S. A., 1994: Notes on crab-eating fox (*Dusicyon thous*) seed dispersal and food habits in southeastern Brazil. *Mammalia, Paris*. 58, 156-159.

Murray, D. L., Kapke, C. A., Evermann, J. F. e Fuller, T. K., 1999: Infectious disease and the conservation of free-ranging large carnivores. *Animal Conservation*. 2, 241-254.

Nakamura, K., Tanaka, H., Mase, M., 2002: Pancreatic necrosis and ventricular erosion in adenovirus-associated hydropericardium syndrome of broilers. *Vet Pathol*. 39, 403-406.

Nakano-Oliveira, E., 2006: *Ecologia de mamíferos carnívoros e a conservação da Mata Atlântica na região do Complexo Estuarino Lagunar de Cananéia, Estado de São Paulo*. Tese (Doutorado em Ecologia) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

Natchu U. C. X. M. E., Bhatnagar S., 2013: Diarrhoea in children: Identifying the cause and burden. *The Lancet*, 382,184-6.

Nates S. V, Gatti M. S, Ludert J. E., 2011: The picobirnavirus: an integrated view on its biology, epidemiology and pathogenic potential. *Future Virology*. 6, 223-235.

Navarro J. O., 2015: Detecção e caracterização moleculares de Picobirnavirus bovino na região centro-sul do Brasil. Pirassununga, SP. Dissertação de mestrado – Faculdade de Zootenia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo.

Nayar, G. P., Hamel, A. L., Lin, L., Sachvie, C., Grudeski, E. e Spearman, G., 1999 Evidence for circovirus in cattle with respiratory disease and from aborted bovine fetuses. *Can Vet J*. 40, 277–278.

Niagro, F. D. et al., 1998: Beak and feather disease virus and porcine circovirus genomes: intermediates between the geminiviruses and plant circoviruses. *Archives of Virology*. 143, 1723–1744.

Ojkic D, Krell PK, Tuboly T, Nagy E., 2008a: Characterization of fowl adenoviruses isolated in Ontario and Quebec, Canada, *Can J Vet Res*. 72, 236-41.

Ojkic D, Martin E, Swinton J, Vaillancourt JP, Boulianne M, Gomis S., 2008b: Genotyping of Canadian isolates of fowl adenoviruses, *Avian Pathol*. 37, 95-100.

Okuda Y., Ono M., Shibata I. E Sato S., 2004: Pathogenicity of Serotype 8 Fowl Adenovirus Isolated from Gizzard Erosions of Slaughtered Broiler Chickens. *Zen-noh Institute of Animal Health. J. Vet. Med. Sci*. 66, 1561–1566.

Oliveira, T. C. G, Meneguim, J. M., Pereira, E. A., 1989: Comportamento da *Trypanosoma evansi* (T. equinum) em Animais de Laboratório. *Arq. Bras. Med. Veto Zoot*. 41, 271-277.

Opriessnig, T., X. J. Meng, and P. G. Halbur., 2007: Porcine circovirus type 2 associated disease: update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. *J. Vet. Diagn. Investig*. 19, 591-615.

Parashar, U. D. et al., 1998: Rotavirus. *Emerg Infect Dis*. 4, 561-70.

Parashar, U. D, Hummelman E. G., Bresee J. S., Miller A. M., Glass R.I., 2003: Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerging Infectious Diseases*. 9, 565-571.

Pereira, H. G., Azeredo, R. S., Leite, J. P., Barth, O. M., Sutmoller, F., Farias, V., Vidal, M. N. P., 1983: Comparison of PAGE, immuno-electron microscopy and enzyme immunoassay for the rapid diagnosis of rotavirus infection in children. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 78, 483-490.

Pereira, H. G., Flewett, T. H., Candeias, J. A., Barth, O. M., 1988a: A virus with a bisegmented double-stranded RNA genome in rat (*Oryzomys nigripes*) intestines. *Journal Of General Virology*. 69, 2749–2754.

Pereira, H. G., Fialho, A. M., Flewett, T. H., Teixeira, J. M .S., Andrade, Z. P., 1988b: Novel viruses in human faeces. *The Lancet*. 2, 103–104.

Pessôa, L. M., Tavares, W. C. e Gonçalves, R. P., 2010: "Mamíferos das restingas do macrocompartimento litorâneo da Baía de Campos, Rio de Janeiro." Mamíferos de restingas e manguezais da Brasil (organizado por Pessôa LM; Tavares WC e Siciliano S.). Sociedade Brasileira de Mastozoologia/Museu Nacional, Rio de Janeiro.

Petric, M. et al., 1981: A survey of zoo mammals for antibody to rotavirus. *Canadian Journal of Comparative Medicine*. 45, 327.

Phan T. G., Vo N. B. Á., Pankovics P., Reuter G., Olive T. W., Wang L. C., Deng X., Poon L. L. M., Eric D., 2013: The viruses of wild pigeon droppings. *PloS one*. 8, 72787.

Phan, T. G., Luchsinger, V., Avendano, L. F., Deng, X. e Delwart, E., 2014: Cyclovirus in nasopharyngeal aspirates of Chilean children with respiratory infections. *J. Gen. Virol.* 95, 922–927.

Prada, C.S., 2004: Atropelamento de vertebrados silvestres em uma região fragmentada do nordeste do Estado de São Paulo: quantificação do impacto e análise dos fatores envolvidos. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais), Universidade Federal de São Carlos. 147.

Rahman, M. et al., 2003: Genetic characterization of a Novel, Naturally Occurring Recombinant Human G6P[6] Rotavirus. *J. Clin. Microbiol.* 41 2088-2095.

Ramani, S. e Kang, G., 2009: Viruses causing childhood diarrhoea in the developing world. *Curr Opin Infect Dis.* 22, 477-82.

Reilly J. R., Hanson L. E., Ferris D. H., 1970 Experimental induced predator-food chain transmission of *Leptospira grippityphosa* from rodents to wild Marsupialia and Carnivora. *Am J Vet Res.* 31, 1443-1448.

Rezini, J.A., 2010: Atropelamento de mamíferos em rodovias do leste dos Estados do Paraná e Santa Catarina, Sul do Brasil. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Conservação). Universidade Federal do Paraná. 50.

Rizzini C. T. 1997: Tratado de fitogeografia do Brasil. 2 ed. Rio de Janeiro, Âmbito Cultural Edições.

Reis R. N., Peracchi A. L., Pedro W.A., Lima I. P., 2006: Mamíferos do Brasil. Londrina, p. 244-245.

Ribeiro, M. C., Metzger, J. P, Martensen A. C., Ponzoni, F. J., Hirota, M. M., 2009: Therazilian atlantic Forest: how much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. *Biological Conservaton.* 142, 1141-1153.

Richardson, S. et al., 1998: Extended excretion of rotavirus after severe diarrhoea in young children. *Lancet.* 351, 1844.

- Rocha, V. J., REIS N. R. e Sekiama M. L., 2004: Dieta e Dispersão de Sementes POR *Cerdocyon thous* (Linnaeus) (Carnivora, Canidae) em um fragmento florestal no Paraná, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*. 21, 871-876.
- Rocha, Vladimir J., et al., 2008: "Feeding habits of the crab-eating fox, *Cerdocyon thous* (Carnivora: Canidae), in a mosaic area with native and exotic vegetation in Southern Brazil." *Revista Brasileira de Zoologia*. 25, 594-600.
- Ramamoorthy, S., e Meng, X. J., 2009: Porcine circoviruses: a minuscule yet mammoth paradox. *Animal Health Research Reviews*. 10, 1-20.
- Rodriguez, L. L. et al., 2007: Rhabdoviridae. In: Flores, Eduardo Furtado. *Virologia veterinária*. Santa Maria: Ed. da UFSM. 689-719.
- Rodriguez, P. M., Rosario, K. e Breitbart, M., 2013: Novel cyclovirus discovered in the Florida woods cockroach *Eurycotis floridana* (Walker). *Arch. Virol.* v.158, p.1389–1392,.
- Rosa, A.O. e Mauhs, J., 2004: Atropelamento de animais silvestres na rodovia RS-040. *Caderno de Pesquisa Série Biologia*.16, 35-42.
- Rosario, K., Duffy, S., Breitbart, M., 2009: Diverse circovirus-like genome architectures revealed by environmental metagenomics. *J. Gen. Virol.* 90, 2418–2424.
- Runde V, Ross S, Trensche R, Lagemann E, Basu O, Renzing-Köhler K, Schaefer UW, Roggendorf M, Holler E., 2001: Adenoviral infection after allogeneic stem cell transplantation (SCT): report on 130 patients from a single SCT unit involved in a prospective multi center surveillance study. *Bone Marrow Transplant*. 28, 51-57.
- Rupprecht, C. E., Storh, K. e Meredith, C., 2001: Rabies. Pp. 3-36. In: E.S. Williams, I.K. Barker (eds). *Infectious diseases of wild mammals*. (3ª edição). Iowa State University Press, Ames. 302.
- Rupprecht, C. E., Hanlon, C. A., Hemachudha, T., 2002: Rabies re-examined. *Lancet infect. dis.* 2.
- Russel W. C., 2009: Adenoviruses: update on structure and function. *J Gen Virol*.90, 1-20.
- Schmoll F., Lang C., Steinrigl A S., Schulze K. e Kuffold J., 2008: Prevalência de PCV2 em javalis e sêmen austríacos e alemães destinados à inseminação artificial. *Theriogenology*. 69, 814-821.
- Schrenzel, M. et al., 2005. Characterization of a new species of adenovirus in falcons. *Journal of Clinical Microbiology*. 43, 3402–3413
- Segalés, J., Domingo, M., Chianini, F., Majó, N., Domí, J., Darwich, L., & Mateu, E., 2004: Immunosuppression in postweaning multisystemic wasting syndrome affected pigs. *Veterinary Microbiology*. 98, 151–158.

Segalés J., Allan G. M e Domingo M. doenças circovírus suíno . Pesquisa da Saúde Animal Comentários, v. 6, p.119-142, 2005.

Segalés J., Kekarainen T. e Cortey M., 2013: A história natural do circovírus suíno tipo 2: A partir de um vírus inofensivo para uma doença suína devastador. *Veterinary Microbiology*. 165, 13-20.

Seto D, Chodosh J., Brister J. R., Jones M. S., 2011: Members of the Adenovirus Research Community. Using the whole-genome sequence to characterize and name human adenoviruses. *J Virol*, v. 85, p.5701-5702.

Silva L. A., Thalita Oliveira E. S., Junior M. C., 2012: Raiva em animais silvestres. *Anais IV SIMPAC - Volume 4 - n. 1 - Viçosa-MG*. 265-270.

Scarano F. R., 2002: Structure, function and floristic relationships of plant communities in stressful habitats marginal to the Brazilian Atlantic Rainforest. *Annals of Botany*. 90, 517-524.

Staden, R., Beal, K. e Bonfield, J., 2000: The Staden package, 1998. *Methods Mol. Biol.* 132, 115–130

Steyer, A. et al., 2008: Human, porcine and bovine rotaviruses in Slovenia: evidence of interspecies transmission and genome reassortment. *Journal of General Virology*. 89, 1690-1698.

Stewart, M., Perry, R. e Raidal S. R., 2006: Identification of a novel circovirus in Australian raven(*Corvus coronoides*) with feather disease. *Avian Pathology*. 35, 86-92.

Souza M. T. R..2004: O litoral Brasileiro. *Revista de Cultura do IMAE*. 5, 63-67.

Atlântica, SOS Mata, 2004: Fundação SOS Mata Atlântica e Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais. São Paulo.

SVS - Ministério da Saúde, 2012: Fundação Nacional de Saúde. Mapas da Raiva no Brasil. Brasília: Organização Pan-Americana da Saúde; Organização Mundial da Saúde.

Tabarelli, M., Pinto, L. P., Silva, J. M. C., Hirota, M. M.; Bedê, L. C., 2005a: Desafios e oportunidades para a conservação da biodiversidade na Mata Atlântica brasileira. *Megadiversidade*. Belo Horizonte. 1, 132-138.

Tamehiro, C. Y.; Alfieri, A. F.; Médici, K. C.; Alfieri, A. A., 2003: Segmented double-stranded genomic RNA viruses in fecal samples from broiler chicken. *Brazilian Journal Microbiology*. 34, 348-353.

Tan Le, V. et al., 2013: Identification of a new cyclovirus in cerebrospinal fluid of patients with acute central nervous system infections. *MBio*. 4, 213-231.

Tate, J. E. et al., 2012: estimate of worldwide rotavirus-associated mortality in children younger than 5 years before the introduction of universal rotavirus

vaccination programmes: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 12, 136.

Tebruegge M, Curtis N., 2012: Adenovirus: an overview for pediatric infectious diseases specialists. *Pediatr Infect Dis J.* 31, 626-627.

Than, V. T.; Kim, W., 2013: Prevalence of rotavirus genotypes in South Korea in 1989-2009: implications for a nationwide rotavirus vaccine program. *Korean J Pediatr.* 56, 465-73.

Ticó, G., Segalés, J. e Matinez, J., 2013: The blurred border between porcine circovirus type 2-systemic disease and porcine respiratory disease complex. *Veterinary Microbiology.* 163, 242–247.

Tdd. D., 2000: Circoviruses: immunosuppressive threats to avian species: a review. *Avian Pathology.* 29, 373-394.

Todd, D., Weston, J. H., Soike, D. e Smyth, J. A., 2001: Genome sequence determinations and analyses of novel circoviruses from goose and pigeon. *Virology.* 286, 354–362.

Todd, D. Circoviridae. In: Fauquet, C. M., Mayo, M. A., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, L.A. (Eds.), 2005: *Virus Taxonomy: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* San Diego: Elsevier Academic Press. 327–334.

Todd, D. et al., 2007: Molecular characterization of novel circoviruses from finch and gull. *Avian Pathology.* 36, 75–81.

Trask, S. D.; McDonald, S. M.; Patton, J. T., 2012: Structural insights into the coupling of virion assembly and rotavirus replication. *Nat Rev Microbiol,* 10, 165-77.

Vieira, E.M., 1996: Highway mortality of mammals in central Brazil. *Ciência e Cultura.* 48, 270-272.

Vieira, E.M. e Port, D., 2007: Niche overlap and resource partitioning between two sympatric fox species in southern Brazil. *Journal of Zoology.* 272, 57-63.

Vogels, R., Zuijdggeest, D., Van Rijnsoever, R., Hartkoorn, E., Damen, I., De Bethune, M. O., Koudstaal, W., Cecchini, M., Wetterwald, A., Sprangers, M., Lemckert, A., Ophorst, O., Koel, B., Van Meerendonk, M., Quax, P., Panitti, L., Grimbergen, J., Bout, A., Goudsmit, J., Havenga, M., 2003: Replication-deficient human adenovirus type 35 vectors for gene transfer and vaccination: efficient human cell infection and bypass of preexisting adenovirus immunity. *J. Virol.* 77, 8263-8271.

Zanella, J.C.; Morés, N., 2003: *Circovirose suína.* Concórdia: Embrapa Suínos e Aves. 12

Zubiri, C. S.; Holfmann, M.; Macdonald, D. W., 1990: Canids: Foxes, Wolves, Jackals and Dogs. In: Courtenay, O.; Maffei L(Org). *Crab-eating fox Cerdocyon thous (Linnaeus, 1766).* 1. ed. Switzerland and Cambridge, UK. *Canid Action Plan.* 32-38.

Yang, H.; Chen, S.; Ji, S., 1998: A novel rotavirus causing large scale of adult diarrhea in Shi Jiazhuang]. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi*. 19, 336-8.

Yang, H. et al., 2004: Cloning and sequence analysis of dsRNA segments 5, 6 and 7 of a novel non-group A, B, C adult rotavirus that caused an outbreak of gastroenteritis in China. *Virus Res*. 106, 15-26.

Wang, Y.; Bányai, K., Tu, X., Jiang, B., 2012: Simian Genogroup I Picobirnaviruses: Prevalence, Genetic Diversity and Zoonotic Potential. *Journal of Clinical Microbiology*. 50, 2779-2782.

Wada, M. Y.; Rocha, S. M.; Maia-Elkhoury, A. N. S., 2011: Situação da Raiva no Brasil, 2000 a 2009. *Epidemiol. serv. saúde, Brasília*. 20, 509-518.

Walker E, Ison M. G., 2014: Respiratory viral infections among hospitalized adults: experience of a single tertiary healthcare hospital. *Influenza Other Respir Viruses*. 8, 282-292.

Wakuda, M. et al., 2011: Porcine rotavirus closely related to novel group of human rotaviruses. *Emerg Infect Dis*. 17, 1491-3.

Ward, R. L., Nakagomi, D. R., Knowlton, D. R., Mcneal, M. M., Nakagomi, T., Clemens, J. D., Sack, D. A., Schiff, G. M., 1990: Evidence for natural reassortments of human rotaviruses belonging to different genogroups. *Journal Virology*, v.64, 3219–3225.

Wellehan, J. F. et al., 2004: Detection and analysis of six lizard adenoviruses by consensus primer PCR provides further evidence of a reptilian origin for the atadenoviruses. *Journal of Virology*. 78, 13366–13369.

Wellenberg, G. J., Bouwkamp, F. T., Wolf, P. J. V. D., Swart, W. A. J. M., Mombarg, M. J. e De Gee, A. L. W., 2010: A study on the severity and relevance of porcine circovirus type 2 infections in Dutch fattening pigs with respiratory diseases. *Veterinary*. 142, 217–224.

Wiktor, T. J.; Koprowski, H., 1980: Antigenic variants of rabies virus, *Journal of Experimental Medicine*. 152, 99 – 112.

Wilson, D. E., Cole, F. R., Nichols, J. D., Rudran, R., Foster E. M. (eds.), 1996: *Measuring and monitoring biological diversity: standard methods for mammals*. Smithsonian Institution Press, Washington, D.C.

Wilson, F.D.; Wills,R.W.;Senties-cue,C.G.; Maslin, W.R.; Stayer, P.A.; Magee, D.L. High incidence of glomerulonephritis associated with inclusion body hepatitis in broiler chickens: routine histopathology and histomorphometric studies. *Avian Diseases*, v. 54, p. 975-980, 2010.

Wilhelmi I., Roman E., Sánchez-Fauquier A. Viruses causing gastroenteritis. *Clin Microbiol Infect*, v.9, p. 247-262, 2003.

Wold W. S. M, Ison M. G. Adenoviruses. In: Knipe DM, Howley PM. *Fields Virology*, 6th Edition. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, 2013.

Woo, P.C., Lau, S.K., Bai, R., Teng, J.L., Lee, P., Martelli, P., Hui, S.W., Yuen, K.Y. , 2012: Complete genome sequence of a novel picobirnavirus, otarinepicobirnavirus, discovered in California sea lions. *Journal of Virology*. 86, 6377– 6378.

Woods, L. M. Adenoviral diseases. In: WILLIAMS, E. S.; BARKER, I. (eds) *Infectious diseases of wild mammals*, 3. Ed. Ames: Iowa State University Press, p. 202–213, 2001.

World Health Organization (WHO), 2013: Rabies - Bulletin – Europe. 37, 2.

Esta dissertação teve as normas de referências baseadas nas exigências do *Journal Transboundary and Emerging Diseases*, ISSN: 1865-1682. Os artigos elaborados futuramente serão submetidos a este.

9. ANEXOS

1- Tampão tris-cálcio

Tris base 0,01 M	1,21 g
Cloreto de cálcio 0,0015 M	0,22 g
Água destilada q.s.p.....	1000 ml

2- Soluções para a extração

2.1 Tampão L6

Triton X-100.....	2,6 ml
Isotiocianato de guanidina	120g
EDTA 0,2 M pH 8,0.....	22 ml
Tris- HCl 0,1 M, ph 6,4.....	100ml

2.2 Tampão L2

Isotiocianato de guanidina	120g
Tris- HCl 0,1 M, ph 6,4.....	100ml

3 - Soluções para o preparo do gel de poliacrilamida

3.1 Gel concentrador 3,5%

Acrilamida/Bis-acrilamida	0,14 ml
UpperTRIS	0,5 ml
Água destilada	1,5 ml
Persulfato de amônio	50 µL
TEMED	10 µL

3.1.1 Acrilamida/Bis-acrilamida

Bis-acrilamida	1,3 g
Acrilamida	50 g
Água destilada q.s.p	100 ml

3.1.2 Upper TRIS

TRIS (Base)	6,06 g
HCl concentrado	q.s.p pH 6,8
Água destilada	q.s.p 100 ml

3.1.3 Persulfato de amônio (20 mg/mL)

Persulfato de amônio	20 mg
----------------------------	-------

Água destilada q.s.p. 1,0 ml

3.2 Gel separador 7%

Acrilamida/Bis-acrilamida 1,02 ml

LowerTRIS 1,75 ml

Água destilada 4,02 ml

Persulfato de amônio 200 µL

TEMED 10 µL

3.2.1 Lower TRIS

TRIS (Base) 18,17 g

HCl concentrado q.s.p. pH 8,8

Água destilada q.s.p. 100 ml

3.3 Etanol 10% - ácido acético 0,5%

Etanol 10 ml

Ácido acético 0,5 ml

Água destilada q.s.p. 100 ml

3.4 Nitrato de prata

Nitrato de prata 0,185 g

Água destilada q.s.p. 100 ml

3.5 Solução reveladora

NaOH 3,75 g

Formaldeído (40%) 0,95 ml

Água destilada q.s.p. 125 ml

3.6 Ácido acético 5%

Ácido acético 5,0 ml

Água destilada q.s.p. 100 ml

4- Anexo da instrução normativa do idaf do IFD e PB

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO

SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA

INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº8, DE 12 DE ABRIL DE 2012

O SECRETÁRIO SUBSTITUTO DE DEFESA AGROPECUÁRIA DO MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, no uso da atribuição que lhe

conferem os arts.10 e 42 do Anexo I do Decreto nº 7.127, de 4 de março de 2010, tendo em vista o disposto no Decreto nº 5.741, de 30 de março de 2006, na Instrução Normativa MAPA nº 1, de 16 de janeiro de 2007, na Instrução Normativa MAPA nº 5, de 1º de março de 2002, na Portaria SDA nº 168, de 27 de setembro de 2005, e o que consta do Processo nº 21000.003435/2008-41, resolve:

Art. 1º Definir os requisitos e critérios para a realização do diagnóstico de raiva, por meio dos métodos denominados Teste de Imunofluorescência Direta (TIFD) e Prova Biológica em camundongos (PB), a serem adotados pelos laboratórios pertencentes à Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários do Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária, em atendimento ao Programa Nacional de Controle da Raiva dos Herbívoros (PNCRH).

Art. 2º Aprovar os métodos previstos nos Anexos I e II desta Instrução Normativa.

Art. 3º O laboratório de que trata o art. 1º desta Instrução Normativa deverá designar um responsável técnico e um responsável técnico substituto, com experiência comprovada de, no mínimo, dois anos na realização dos métodos de que trata esta Instrução Normativa. Parágrafo único. O responsável técnico e o responsável técnico substituto não poderão responder por mais de um laboratório.

Art. 4º O laboratório de que trata o art. 1º desta Instrução Normativa deverá dispor das seguintes instalações:

- I - área específica para recebimento das amostras;
- II - área destinada à manipulação das amostras, preparo das lâminas e da suspensão de Sistema Nervoso Central - SNC;
- III - sala escura destinada à leitura e interpretação de lâminas por microscopia de fluorescência;
- IV - infectório ou biotério de experimentação destinado à manutenção de camundongos durante a Prova Biológica;
- V - área de desinfecção e lavagem, destinada à esterilização de materiais e amostras biológicas potencialmente infectadas, assim como à lavagem e secagem dos materiais previamente esterilizados; e
- VI - área de esterilização destinada à embalagem e esterilização de vidraria e de outros materiais não descartáveis.

Art. 5º São consideradas amostras para o diagnóstico de raiva: I - o Sistema Nervoso Central; e II - o animal inteiro, no caso de animais silvestres pequenos, menores ou iguais a 20 cm (vinte centímetros) de comprimento.

Art. 6º As amostras para o diagnóstico de raiva deverão ser encaminhadas resfriadas ou congeladas, dependendo do período de tempo transcorrido entre a coleta e a sua chegada ao laboratório, nos seguintes termos:

I - a amostra será encaminhada refrigerada quando o período entre a coleta e o recebimento no laboratório não ultrapassar 24 (vinte e quatro) horas, devendo estar acondicionada em frasco, preferencialmente inquebrável, com tampa e tamanho adequado, ou saco plástico duplo devidamente lacrado, identificada individualmente e mantida à temperatura de 2 a 4 °C (dois a quatro graus Celsius), por meio de gelo reciclável, em caixa isotérmica perfeitamente vedada, provida do símbolo de risco biológico e afixados os dizeres: "URGENTE, MATERIAL BIOLÓGICO PERECÍVEL";

II - a amostra será encaminhada congelada quando o período entre a coleta e o recebimento no laboratório ultrapassar 24 (vinte e quatro) horas, devendo estar acondicionada em frasco, preferencialmente inquebrável, com tampa e tamanho adequado, ou saco plástico duplo devidamente lacrado, identificada individualmente e contida em caixa isotérmica perfeitamente vedada, de forma a manter o congelamento, provida do símbolo de risco biológico e afixados os dizeres: "URGENTE, MATERIAL BIOLÓGICO PERECÍVEL".

§ 1º O gelo reciclável utilizado para encaminhamento das amostras para o diagnóstico de raiva ao laboratório não deverá ser reutilizado.

§ 2º Excepcionalmente, as amostras poderão ser encaminhadas ao laboratório conservadas em glicerol, caso não seja possível a sua refrigeração ou congelamento.

§ 3º A amostra conservada em glicerol, nos termos do § 2º, deverá ser acondicionada em frasco, preferencialmente inquebrável, com tampa e tamanho adequado, contendo solução de glicerina 50% (cinquenta por cento) em tampão fosfato pH 7,4, identificada individualmente e contida em embalagem secundária impermeável perfeitamente vedada, provida do símbolo de risco biológico e afixados os dizeres: "URGENTE, MATERIAL BIOLÓGICO PERECÍVEL".

Art. 7º O Formulário Único de Requisição de Exames para Síndromes Neurológicas deverá acompanhar toda amostra suspeita de raiva enviada ao laboratório, conforme definido no Manual Técnico - 2009 - Controle da Raiva dos Herbívoros, do PNCRH, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA, aprovado pela Portaria SDA nº 168, de 27 de setembro de 2005.

Art. 8º As amostras deverão ser registradas em livro próprio contendo, no mínimo, as informações referentes ao número do protocolo, responsável pelo recebimento, espécie, sexo, idade, raça, data da coleta, data do encaminhamento, data do

recebimento, data de emissão do relatório de ensaio, número de partida e título do conjugado.

Art. 9º O laboratório deverá manter uma alíquota da amostra congelada e devidamente identificada, à temperatura de - 20 °C (vinte graus Celsius negativos) ou inferior, por um período mínimo de 6 (seis) meses. Parágrafo único. As amostras deverão ser conservadas em congeladores exclusivos a esta finalidade, de capacidade suficiente ao volume de análises realizadas, estocadas de forma ordenada e em local de acesso restrito.

Art. 10. Toda amostra oriunda do sistema de vigilância do PNCRH deverá ser submetida ao TIFD e à PB. § 1º O relatório de ensaio do TIFD deverá ser liberado no prazo máximo de 48 (quarenta e oito) horas úteis, contadas a partir da entrada do material suspeito no laboratório. § 2º A PB deverá ser iniciada no prazo máximo de 48 (quarenta e oito) horas úteis, contadas a partir da entrada do material suspeito no laboratório. § 3º No caso de utilização de camundongos desmamados, o relatório de ensaio da PB deverá ser liberado no prazo máximo de 28 (vinte e oito) dias, contados a partir do dia da inoculação ou eventual reinoculação.

§ 4º No caso de utilização de camundongos lactentes, o relatório de ensaio da PB deverá ser liberado no prazo máximo de 21 (vinte e um) dias, contados a partir do dia da inoculação ou eventual reinoculação.

Art. 11. O resultado deverá vir destacado no relatório de ensaio pelas expressões POSITIVO ou NEGATIVO. § 1º O relatório de ensaio com resultado NEGATIVO deverá ser emitido, no mínimo, em 3 (três) vias, das quais uma será encaminhada à Superintendência Federal de Agricultura na Unidade Federativa de origem da amostra, outra ao requisitante e a outra deverá ser mantida no laboratório. § 2º O relatório de ensaio com resultado POSITIVO, no TIFD ou na PB, deverá ser imediatamente informado à Superintendência Federal de Agricultura na Unidade Federativa de origem da amostra, ao órgão estadual de defesa sanitária animal da Unidade Federativa, às autoridades de Saúde, ao requisitante e à Coordenação-Geral de Apoio Laboratorial - CGAL/SDA, aos quais será obrigatório o envio de uma via do relatório de ensaio, enquanto outra via deverá ser mantida no laboratório.

Art. 12. Esta Instrução Normativa entra em vigor na data de sua publicação.

RICARDO DA CUNHA CAVALCANTI JÚNIOR

ANEXO I

TESTE DE IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA (TIFD)

1. Objetivo

O Teste de Imunofluorescência Direta (TIFD) tem o objetivo de pesquisar a presença de antígenos do vírus da raiva, por imunofluorescência direta, em impressões de amostras de Sistema Nervoso Central (SNC) de animais suspeitos ou de tecido cerebral de camundongos inoculados com amostras suspeitas para diagnóstico de raiva.

2. Material a ser pesquisado As regiões anatômicas do SNC de predileção a serem pesquisadas para o diagnóstico da raiva são o hipocampo (corno de Ammon), o cerebelo, o córtex e a medula espinhal. Para as amostras de equídeos, deverá ser incluída, sempre que possível, a medula espinhal. É recomendado pesquisar no mínimo 3 (três) regiões anatômicas do SNC antes de se concluir por um resultado negativo.

3. Método

3.1. Preparação dos controles do teste

3.1.1. Todo ensaio ou série de ensaios deverá incluir lâminas para controle positivo e controle negativo. 3.1.2. O controle positivo deverá ser preparado antecipadamente, a partir de duas impressões em lâmina, do cérebro de camundongo albino suíço, inoculado por via intracerebral com amostra positiva para raiva, submetido à eutanásia na fase parálitica da doença.

3.1.3. O controle negativo deverá ser preparado a partir de duas impressões, em lâmina, de cérebro de camundongo albino suíço sadio.

3.1.4. As lâminas poderão, a critério do laboratório, ser fixadas por imersão em acetona PA a -20°C, por, no mínimo, 15 (quinze) minutos. Após este período, retirar as lâminas da acetona, escorrer e deixar secar em temperatura ambiente.

3.1.5. As lâminas para controle deverão estar identificadas e datadas, podendo ser mantidas em temperatura de -20°C e utilizadas por até 10 (dez) dias.

3.2. Diluição do conjugado em Cérebro de Camundongo Normal (CCN) e Cérebro de Camundongo Infectado (CCI) - diluições de trabalho

3.2.1. A diluição do conjugado em suspensão de Cérebro de Camundongo Infectado (CCI) e em suspensão de Cérebro de Camundongo Normal (CCN) - diluição de trabalho - deverá ser determinada encontrando-se o melhor título a ser empregado no exame das amostras suspeitas. Este título é representado pela diluição que

proporciona a melhor fluorescência específica com o mínimo de fluorescência inespecífica pela TIFD, utilizando diluições seriadas das suspensões de CCN + conjugado e CCI + conjugado, perante lâminas positivas.

3.2.2. A avaliação do conjugado deverá ser realizada a cada novo lote ou sempre que necessário, pois repetidos congelamentos, descongelamentos e filtrações podem alterar o título do conjugado. O laboratório deverá manter registro desta avaliação.

3.2.3. Para o preparo do CCN e CCI, o seguinte protocolo deverá ser adotado:

- a) preparar duas suspensões a 20% de cérebro de camundongo em salina tamponada fosfatada (PBS), pH 7,4, suplementada com 2% de soro de equino livre de anticorpos antivírus da raiva ou com uma suspensão a 10% de gema de ovos de galinha embrionados de 6 a 7 dias: a.1) uma suspensão a partir de cérebro de camundongo normal - CCN; a.2) uma suspensão a partir de cérebro de camundongo infectado- CCI, coletado de animais na fase parálitica da doença, após inoculação de 0,03 mL de suspensão de vírus da raiva fixo (CVS - Challenge Virus Standard, com título mínimo de 105 DL50/0,03mL em camundongos), diluído na proporção de 1/100 ou 1/1000;
- b) homogeneizar adequadamente as suspensões de cérebro;
- c) centrifugar por 10 (dez) minutos a 1000 x g (força centrífuga relativa);
- d) coletar o sobrenadante e distribuir em alíquotas devidamente identificadas;
- e) conservar em temperatura de -20°C ou inferior;
- f) utilizar as alíquotas dos sobrenadantes para diluir o conjugado na proporção indicada pela titulação previamente encontrada.

3.3 Preparação do material para ensaio em lâminas de microscopia - impressão ou decalque

3.3.1 Para a preparação do material suspeito para o ensaio em lâminas de microscopia por impressão ou decalque, deverá ser adotado o seguinte protocolo:

- a) identificar as lâminas, de acordo com a amostra a ser examinada;
- b) cortar fragmentos de hipocampo, cerebelo, córtex e medula espinhal;
- c) colocar cada fragmento em espátula, papel filtro ou pinça cirúrgica, com o corte voltado para cima;
- d) secar o fragmento com papel de filtro, passando-o levemente sobre o material;
- e) fazer a impressão ou decalque do material em lâmina. Devem ser feitas pelo menos duas impressões de cada fragmento de SNC. Se necessário, retirar o excesso de tecido com papel de filtro e deixar secar;
- f) as lâminas poderão, a critério do laboratório, ser fixadas por imersão em acetona

PA a -20°C , por, no mínimo, 15 (quinze) minutos. Após este período, retirar as lâminas da acetona, escorrer e deixar secar em temperatura ambiente.

3.4. Coloração e montagem das lâminas

3.4.1. Para a coloração e montagem das lâminas, deverá ser adotado o seguinte protocolo:

- a) o conjugado deverá ser adicionado a volume apropriado de CCN ou CCI, de forma a constituir a diluição trabalho;
- b) demarcar, com lápis demográfico, esmalte ou semelhante, as impressões de tecido nervoso do material sob exame e dos controles de prova, ou utilizar lâminas de vidro extrafina, com dois círculos e extremidade fosca;
- c) recobrir a área delimitada com algumas gotas do conjugado de diluição de trabalho. A disposição de utilização da solução de conjugado + CCN e solução de conjugado + CCI deve estar prevista na documentação do laboratório e ser sempre a mesma. Sugere-se a seguinte forma: c.1) lâminas de controle positivo e controle negativo: recobrir a impressão de tecido nervoso localizada próximo à descrição de identificação da lâmina com a solução de conjugado + CCN. Recobrir a impressão de tecido nervoso mais distante da descrição de identificação da lâmina com a solução de conjugado + CCI; c.2) lâminas de material suspeito: recobrir a impressão de tecido nervoso localizada próximo à descrição de identificação da lâmina com a solução de conjugado + CCN. Recobrir a impressão de tecido nervoso mais distante da descrição de identificação da lâmina com a solução de conjugado + CCI;
- d) colocar as lâminas em câmara úmida (bandeja forrada com papel de filtro ou similar umidificado e provida de tampa) e levar à estufa a 37°C por 30 (trinta) minutos;
- e) lavar as lâminas com PBS, pH 7,4 a 7,8, mantendo-as levemente inclinadas horizontalmente e evitando a mistura entre as duas soluções (conjugado+CCI e conjugado+CCN);
- f) submergir as lâminas em PBS, pH 7,4, por dez minutos. Repetir este procedimento por, no mínimo, três vezes;
- g) secar as lâminas ao ar em posição vertical. Colocar uma gota de solução de glicerol a 50% em PBS (pH 7,6) sobre cada impressão e sobrepor com lamínula. Esta etapa poderá ser suprimida, desde que as lâminas sejam mantidas em PBS (pH 7,4 a 7,8); h) proceder imediatamente à leitura em microscópio de fluorescência.

3.5. Leitura

3.5.1. A leitura deverá ser realizada em microscópio de fluorescência, em magnitude

de 10 x 40, abrangendo todas as áreas demarcadas, inicialmente nas lâminas-controle e, em seguida, no material suspeito.

3.6. Interpretação dos resultados

3.6.1 Validação do ensaio: para que o ensaio tenha validade, as lâminas-controle deverão apresentar o seguinte padrão de visualização:

3.6.1.a) Controle positivo: apresentar fluorescências características na impressão onde foi acrescentado o conjugado + CCN, e não apresentar tais fluorescências na impressão onde foi acrescentado o conjugado + CCI;

3.6.1.b) Controle negativo: não apresentar quaisquer fluorescências características nas 2 (duas) impressões.

3.6.2. Resultado do material suspeito

3.6.2.1. Resultado positivo: quando qualquer uma das impressões das lâminas contendo conjugado + CCN apresentar fluorescência característica.

3.6.2.2. Resultado negativo: quando não houver qualquer fluorescência característica em todas as impressões das lâminas da amostra suspeita.

3.6.3. Fluorescências características são reações antígeno-anticorpo, de fluorescência brilhante, em cor de maçã verde ou verde amarelada, de tamanho variável. Algumas são minúsculas (chamadas comumente de poeiras ou areia) e as maiores têm as dimensões e formas comparáveis aos corpúsculos de Negri. As inclusões são geralmente circulares ou ovais e possuem a margem mais brilhante que a área central.

ANEXO II

PROVA BIOLÓGICA (PB) - ISOLAMENTO DO VÍRUS DA RAIVA EM CAMUNDONGOS

1. Objetivo

A Prova Biológica (PB) é o teste complementar ao Teste de Imunofluorescência Direta (TIFD), utilizada para detectar infectividade de uma suspensão de material suspeito de raiva, em animais de laboratório.

2. Material a ser pesquisado As regiões anatômicas de predileção a serem utilizadas no preparo do inóculo para diagnóstico de raiva são o hipocampo (corno de Ammon), o cerebelo, o córtex e a medula espinhal. É recomendada a inclusão de fragmentos de pelo menos três regiões anatômicas distintas. Para as amostras de

equídeos, deverá ser incluída, sempre que possível, a medula espinhal.

3. Método

3.1. Seleção dos animais Para a PB, deverá ser selecionado um grupo de no mínimo oito camundongos da linhagem albino suíço, sadios, adultos jovens desmamados, de 21 (vinte e um) a 28 (vinte e oito) dias de idade (12 a 14 g), do mesmo sexo, ou uma ninhada de no mínimo dez camundongos albinos suíços, sadios, lactentes, de 1 (um) a 2 (dois) dias de idade.

3.2. Preparo do inóculo

- a) retirar pequenos fragmentos do tecido nervoso suspeito, elegendo áreas que melhor representem as regiões anatômicas a serem pesquisadas;
- b) pesar os fragmentos de tecido nervoso, macerar, homogeneizar e acrescentar volume de PBS (pH 7,4 a 7,8), de forma a obter uma suspensão de 10 a 20% (p.v.);
- c) centrifugar em centrífuga refrigerada a 200 x g durante cinco minutos ou deixar em repouso por, no mínimo, 01 (uma) hora à temperatura de 4°C;
- d) retirar o sobrenadante e adicionar 1.000 UI de penicilina e 2 mg de estreptomicina por mL. Esta etapa poderá ser suprimida, desde que estes antibióticos sejam adicionados em etapa anterior;
- e) o inóculo deverá ser mantido à temperatura de 4°C até ser utilizado. A inoculação deverá ser realizada no mesmo dia e o inóculo mantido em banho de gelo durante o procedimento de inoculação.

3.3. Inoculação

- a) aspirar o inóculo utilizando seringa de 0,25 mL a 1,0 mL (tuberculina) com agulha de calibre 0,40-0,45 mm por 1-1,5 cm de comprimento;
- b) com uma das mãos, conter o animal pela pele da região dorso-cervical, mantendo-o aprisionado com o dedo polegar e o indicador, pressionando-o levemente sobre uma superfície plana. Com a outra mão, posicionar o conjunto agulha-seringa perpendicularmente à cabeça e distante 1-2 mm do arco frontal, na direção de um dos hemisférios cerebrais;
- c) introduzir 1 a 2 mm da agulha, através da caixa craniana, no tecido cerebral e inocular a dose de 0,03 mL por camundongo desmamado ou a dose de 0,02 mL por camundongo lactente;
- d) substituir os animais que porventura morrerem durante ou imediatamente após o procedimento de inoculação.

3.4. Observação dos animais

- a) manter o grupo de animais em gaiola adequada e devidamente identificada, com

livre acesso à água e ração, e em ambiente com luz, temperatura e umidade controladas (infectório) de acordo com normas técnicas;

b) observar os animais diariamente e registrar na ficha de observação, que deverá conter todos os dados do material suspeito, as alterações ocorridas com os camundongos, assim como aqueles que se mantêm saudáveis;

c) o registro será feito por meio de símbolos, que deverão estar indicados em legenda, para as categorias abaixo listadas, para as quais são sugeridos: S = para animal sadio; D = para animal doente; P = para animal paralítico; M = para animal morto; E = para animal submetido à eutanásia; NC = para animal não considerado (exemplo, sem condições de análise);

d) observar os camundongos desmamados até o 28^o dia pós-inoculação e os camundongos lactentes até o 21^o dia pós-inoculação;

e) examinar pelo TIFD o cérebro dos camundongos desmamados que, entre o 5^o e o 28^o dia pós-inoculação, morreram ou foram submetidos à eutanásia por estarem doentes ou paralíticos. Seguir o mesmo procedimento para os camundongos lactentes que, entre o 4^o e o 21^o dia pós-inoculação, morreram ou foram submetidos à eutanásia por estarem doentes ou paralíticos;

f) para apressar o resultado da inoculação em camundongos neonatos, poderá ser realizada eutanásia de um camundongo por vez, aos 5, 7, 9 e 11 dias pós-inoculação, seguidos da realização da IFD.

3.4.1. Quando uma amostra, depois de inoculada, causar a morte, durante o período de observação dos animais, de um quantitativo superior a 3 (três) animais em 8 (oito) inoculados, e os mortos, após examinados, resultarem negativos para raiva no TIFD ou, ainda, caso seu exame seja impossível, dever-se-á proceder a uma nova inoculação da amostra em um lote com o dobro de animais inicialmente inoculados.

3.4.2. O diagnóstico será concluído como "Negativo" se ao menos 5 (cinco) dos animais inoculados sobreviverem saudáveis aos 28 (vinte e oito) dias de observação, no caso de desmamados, e 21 (vinte e um) dias, no caso de lactentes, e os mortos apresentarem-se negativos para raiva ao TIFD. Caso contrário, e não se tratando de material Positivo, o diagnóstico pela PB é considerado "Impossível".

3.5. Interpretação dos resultados

3.5.1. Resultado positivo: quando a impressão em lâmina do cérebro de um ou mais camundongos que morreram ou foram submetidos à eutanásia durante o período de observação apresentar fluorescência característica do vírus da raiva, pelo TIFD.

3.5.2. Resultado negativo: quando, durante o período de observação, não ocorrer

morte ou sintomatologia característica para a raiva, no grupo de camundongos inoculados com o material suspeito ou quando a impressão em lâmina do cérebro de um ou mais camundongos, que morreram ou foram submetidos à eutanásia durante o período de observação, não apresentar fluorescência característica do vírus da raiva pelo TIFD.

D.O.U., 13/04/2012 - Seção 1

5- Anexo da ficha geral de biometria

Ficha Geral de Biometria

Data da necropsia:

Nº de registro:

Data do recolhimento

Foto nº:

Idade: () Jovem () Sub-adulto () Adulto

Sexo:

Peso:

Tamanho do corpo:

Tamanho da cauda:

Patras traseiras:

Patras dianteiras:

Pelagem:

Observações

VS:

Exame de Raiva: () Sim () Não