



VANESSA MENDIETA REIS

**ESTÁGIO SUPERVISIONADO REALIZADO NO
LABORATÓRIO DE VIROLOGIA ANIMAL DA
UNIVERSIDAD DE CHILE**

LAVRAS-MG

2021

VANESSA MENDIETA REIS

**ESTÁGIO SUPERVISIONADO REALIZADO NO LABORATÓRIO DE VIROLOGIA
ANIMAL DA UNIVERSIDAD DE CHILE**

Relatório de estágio supervisionado
apresentado à Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do Curso de
Medicina Veterinária, para a obtenção do título
de Bacharel.

Prof. Dr. Christian Hirsch
Orientador

LAVRAS-MG

2021

VANESSA MENDIETA REIS

**ESTÁGIO SUPERVISIONADO REALIZADO NO LABORATÓRIO DE VIROLOGIA
ANIMAL DA UNIVERSIDAD DE CHILE**

**SUPERVISED INTERNSHIP PERFORMED IN THE ANIMAL VIROLOGY
LABORATORY OF UNIVERSIDAD DE CHILE**

Relatório de estágio supervisionado apresentado à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Medicina Veterinária, para a obtenção do título de Bacharel.

APROVADO EM 29/11/2021

Prof. Dr. Christian Hirsch, UFLA

M.V. Priscilla Rochele Barrios Chalfun

Me. Marcos Túlio Barcelos Lima

Prof. Dr. Christian Hirsch
Orientador

LAVRAS-MG

2021

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Josiane Maria Reis Ciacci e Héctor Mendieta Rubillo, por sempre estarem ao meu lado, por acreditarem em mim e não medirem esforços para que meus sonhos pudessem ser realizados.

À minha irmã Bettina, por sempre me dar conselhos e me fazer sorrir até mesmo nos momentos mais difíceis.

Aos meus bichinhos, Beto, Tímido e Bandido, por tornarem meus dias mais alegres e por despertarem em mim o amor pelos animais.

À minha família, por todo o amor incondicional e por sempre me motivarem a seguir em frente. Amo muito vocês!

Aos meus professores, por todo o conhecimento transmitido durante a graduação, em especial ao meu orientador, Christian Hirsch, que me inspirou a seguir a área da virologia. Muito obrigada por todas as oportunidades concedidas e por sempre ser tão atencioso!

Ao pessoal do Laboratório de Virologia Animal que me recebeu de portas abertas na instituição. Obrigada por serem tão queridos comigo e por sempre estarem à disposição quando eu precisava tirar minhas dúvidas.

A todos os integrantes dos grupos de estudo do NEMIV, GEMA, NEEM, NEIMBIO e NESUI, que me ensinaram tanto e me ajudaram a definir meu caminho. Obrigada especialmente às professoras e coordenadoras de grupo, Gláucia Mian e Priscila Chalfun que sempre me ajudaram tanto. Vocês são muito especiais para mim!

Agradeço também aos meus amigos de Varginha, Norma, Tainá e Rafael Chagas pelas risadas e conversas ao longo de tantos anos de amizade. Aos meus amigos de Lavras, Heloísa Ester, Ana Beatriz, Marcos Túlio, Ítalo, Savio, Bianca, Thamiris, Ana Clara, Bárbara Sarrapio, Bárbara Rebouças, Jéssica, Nara e Victória Veiga que se tornaram minha segunda família durante o período de graduação. Apesar da distância, vocês sempre estarão no meu coração!

Ao meu namorado Leonardo, que sempre me deu conselhos e me compreendeu. Você apareceu na minha vida e conseguiu tornar meus dias mais felizes.

Saibam que todos que citei aqui foram muito importantes para minha vida e sou eternamente grata por tudo que vocês proporcionaram!

RESUMO

O presente trabalho de conclusão de curso (TCC) tem como objetivo descrever as atividades desenvolvidas durante o estágio supervisionado obrigatório (exigência da disciplina PRG107 para conclusão de curso). O estágio foi realizado no Laboratorio de Virología Animal da Universidad de Chile, localizado na cidade de Santiago, Chile, durante o período de 01 de junho a 31 de agosto de 2021 sob orientação do professor Dr. Christian Hirsch e supervisão do professor Dr. Víctor Manuel Neira Ramírez. O estágio teve duração de 550 horas e ao longo do período foram realizadas diversas tarefas voltadas à vigilância e investigação de doenças infecciosas em animais. Essas tarefas envolveram extrações de DNA e RNA, técnicas de PCR para identificação de microrganismos, realização de isolamento e cultivo viral em ovos livres de patógenos específicos e linhagens celulares, ensaios de ELISA para detecção de anticorpos, testes de hemaglutinação e também coleta de amostras. Portanto, a realização do estágio em tal local foi fundamental para a conclusão do curso de graduação em Medicina Veterinária, uma vez que proporcionou à estudante o desenvolvimento do pensamento crítico e crescimento acadêmico, profissional e pessoal.

Palavras-chave: Microbiologia. Vírus. Diagnóstico laboratorial. Doenças. Infectologia. Animais.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Planta representativa do Laboratorio de Virología Animal.....	9
Figura 2 - Área de lavagem e esterilização do Laboratorio de Virología Animal.....	10
Figura 3 – Área limpa do Laboratorio de Virología Animal.....	10
Figura 4 – Área central do Laboratorio de Virología Animal	11
Figura 5 – Área suja do Laboratorio de Virología Animal	11
Figura 6 – Solução de Chomczynski com fenol para extração de RNA	17
Figura 7 – Termocicladora para realização de PCR em tempo real	18
Figura 8 – Etapas para realização da extração de DNA de PCV2.....	22
Figura 9 – Eletroforese para identificação de PCV2 em amostras	24
Figura 10 – Ovos SPF para cultivo de Avian orthoavulavirus	26
Figura 11 – Células MDCK para cultivo de IAV	30
Figura 12 – Placa de microtitulação com resultados de teste de hemaglutinação	31
Figura 13 – Placa com 96 cavidades para detecção de anticorpos contra SARS-CoV-2 em ensaio de ELISA indireto	36
Figura 14 – Leitor de densidade óptica para análise de teste de ELISA.....	37

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2. DESCRIÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO.....	8
3. DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES	12
3.1 Diagnóstico de Patógenos em Suínos.....	13
3.1.1 PRRS	13
3.1.2. Circovirose suína	19
3.2. Investigação de patógenos em aves marinhas da região Antártica	24
3.2.1 Orthoavulavirus.....	25
3.2.2 Influenza A.....	27
3.3. SARS-CoV-2 em animais domésticos.....	32
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	37
5. REFERÊNCIAS	37

1. INTRODUÇÃO

Os vírus acompanharam toda a trajetória da evolução dos animais e geraram diversos impactos na área da saúde ao longo da história. Como esses agentes são muito simples, eles não possuem a maquinaria necessária para a produção de energia metabólica e síntese de proteínas de forma independente, necessitando das funções e do metabolismo celular do hospedeiro para se multiplicar. Por consequência alguns destes microrganismos podem produzir uma relação desarmônica de parasitismo, gerando uma enfermidade e danos à saúde animal. Portanto, o conhecimento da epidemiologia das doenças virais e de técnicas de diagnóstico laboratorial são fundamentais para proporcionar a prevenção, o tratamento e controle de doenças infecciosas.

O Laboratorio de Virología Animal (LVA) foi o local de escolha para a realização de estágio supervisionado por ser um laboratório de excelência no diagnóstico de doenças infecciosas virais em animais na cidade de Santiago, Chile. Tal entidade realiza diversas pesquisas no âmbito da virologia e biologia molecular, efetuando atividades como diagnósticos de enfermidades infecciosas em suínos, investigação científica de patógenos de aves provenientes da Antártica e detecção de anticorpos contra SARS-CoV-2 (*Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*) em animais domésticos, oferecendo uma oportunidade excepcional de aprendizado.

Sendo assim, a realização de tal estágio auxilia nos conhecimentos teórico-práticos adquiridos durante a graduação em Medicina Veterinária e aprimora técnicas de diagnóstico molecular, proporcionando aptidão para um desenvolvimento crítico, acadêmico e profissional na área científica.

2. DESCRIÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO

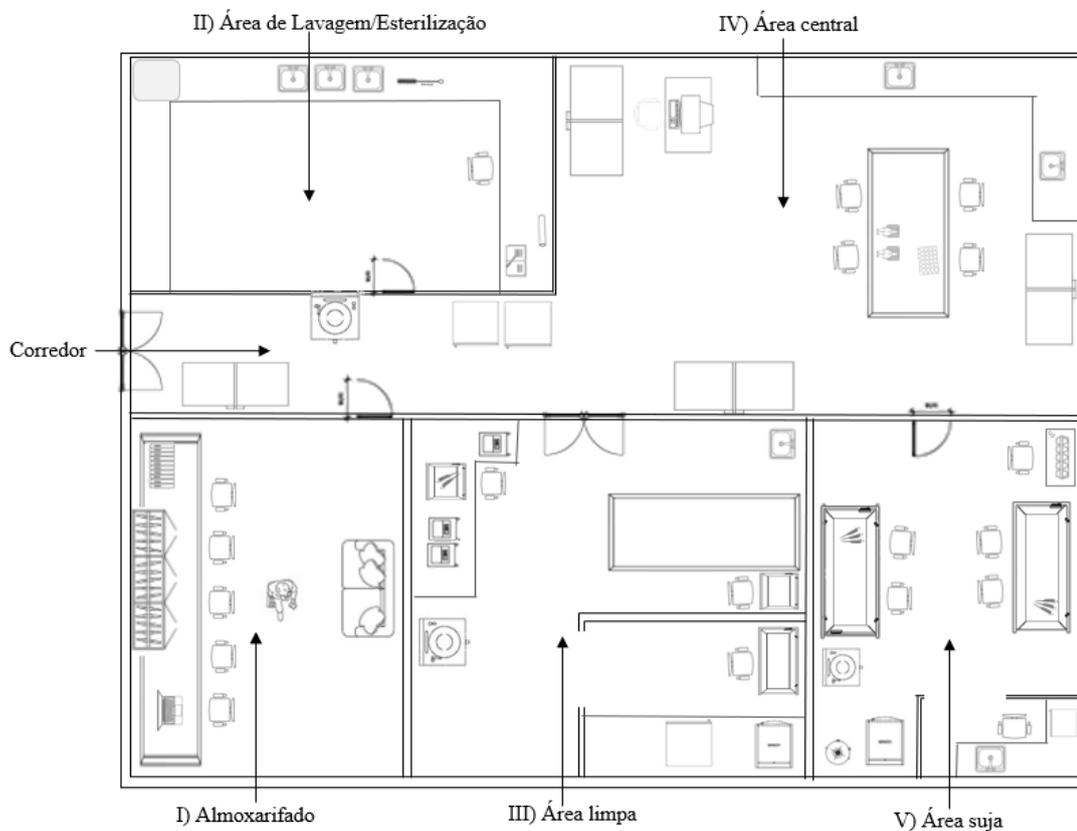
A Universidad de Chile é uma instituição pública que foi fundada no ano de 1842 e atualmente é considerada uma das melhores universidades da América Latina pelo *ranking Quacquarelli (QS)*. Tal instituição possui diversos cursos de graduação e pós-graduação, sendo um deles o Curso de Ciências Veterinárias e Pecuárias, localizado no Campus Antumapu, na avenida Santa Rosa, número 11735, comuna de La Pintana, Santiago, Chile. O curso é composto pelo Departamento de Ciências Biológicas Animais, Ciências Clínicas, Patologia Animal, Produção Animal e de Medicina Veterinária Preventiva, onde, neste último, está inserido o LVA, local onde foi realizado o estágio supervisionado.

O LVA é coordenado pelo professor Dr. Victor Manuel Neira Ramírez e no momento

conta com o auxílio de cinco alunos de graduação e pós-graduação em Medicina Veterinária. As atividades desenvolvidas durante o estágio foram realizadas entre o período de 01 de junho a 31 de agosto de 2021, com um horário de funcionamento de 9:30 às 18:00, de segunda à sexta-feira, com intervalo de 30 minutos para almoço.

A estrutura do LVA é organizada de forma sistemática, afim de dividir as áreas de acordo com o risco biológico e de buscar maior eficiência para a realização das atividades. Logo, a infraestrutura conta com 5 áreas principais, sendo elas: I) almoxarifado, II) área de lavagem/ esterilização, III) área limpa, IV) área central, V) área suja.

Figura 1 – Planta representativa do Laboratório de Virologia Animal



Fonte: Do autor (2021)

Figura 2 - Área de lavagem e esterilização do Laboratório de Virologia Animal



Fonte: Do autor (2021)

A área de lavagem/ esterilização de materiais conta com uma autoclave (AHS-50-DRY, RAYPA, Chile) que é utilizada para descarte de elementos de potencial risco biológico e para esterilização de vidrarias, além disso possui um micro-ondas, ponteiras para pipetas e outros objetos que são utilizados para lavagem e esterilização de materiais.

Figura 3 – Área limpa do Laboratório de Virologia Animal



Legenda: (A) Espaço I. (B) Espaço II.

Fonte: Do autor (2021)

A área limpa é subdivida em dois espaços, sendo o primeiro deles o local de realização de cultivo celular e preparação de reagentes e soluções. Esse espaço conta com diversos equipamentos, entre eles uma capela de fluxo laminar (Heraeus™ Herasafe® KS Safety Cabinet Class II, Thermo Fisher, EUA), uma incubadora (CO2 Incubator Mark I No. 415, Lab-Line Instruments, EUA) e geladeira. Já o segundo espaço é o local para realização de amplificação de material genético, centrifugação de amostras, pesagem de materiais e realização de eletroforeses. Este conta com uma Termocicladora para PCR (reação em cadeia da polimerase) em tempo real (CFX96™ Touch Real-Time PCR Detection System, Bio-Rad, EUA), duas termocicladoras para PCR convencional (My Cycler™ Thermal Cycler, Bio-Rad, EUA), uma centrífuga (Heraeus Primo R, Thermo Scientific, EUA), duas capelas de fluxo laminar portáteis (BBS-V500, Biobase, China), um banho maria (180 Series Water Bath,

Precision Scientific, EUA) e equipamento para eletroforese (PowerPac 3000, Bio-Rad, EUA).

Figura 4 – Área central do Laboratório de Virologia Animal



Fonte: Do autor (2021)

Na área central são realizadas as atividades administrativas, como reuniões de membros do laboratório, registro de dados em Excel e orçamento de materiais, e atividades laboratoriais, como observação de células *in vitro*, realização de testes de ELISA e armazenamento de amostras. Essa área conta com três geladeiras (uma delas para descarte de materiais e outras duas para armazenamento de reagentes), quatro freezers para armazenamento de amostras, um microscópio (Eclipse TS100, Nikon, EUA), uma balança analítica (TE 412, Sartorius, Alemanha) e um computador.

Figura 5 – Área suja do Laboratório de Virologia Animal



Fonte: Do autor (2021)

A área suja é o local onde trabalha-se com materiais de potencial risco biológico. Essa área é utilizada para realizar manipulação e processamento de amostras e inoculação de vírus em ovos SPF (*Specific Pathogen Free* – Livre de Patógenos Específicos) e linhagens celulares. O local contém um banho maria, um vortéx (MX-S, Dlab Scientific Co. Ltd., China), uma incubadora (Heracell™ 150i CO₂ Incubator, Thermo Scientific™, EUA), duas capelas de fluxo laminar (Heraeus™ Herasafe® KS Safety Cabinet Class II, Thermo Fisher, EUA), uma centrífuga, três geladeiras e um freezer.

3. DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES

O LVA realiza diversas atividades voltadas à vigilância e pesquisas de doenças infecciosas em animais. Essas tarefas envolvem extrações de DNA e RNA, técnicas de PCR (convencional, *nested*, e PCR em tempo real) para detectar patógenos como Influenza A virus, Avian Orthoavulavirus, Circovirus, Betaarterivirus suid, Rotavirus, Myxoma virus, *Mycoplasma hyopneumoniae*, Carnivore protoparvovirus 2, Canine morbillivirus, SARS-CoV-2, Respirovirus, *Lactobacillus* spp., Pestivirus, Senecavirus e *Lawsonia intracellularis*. Além disso, realiza-se isolamento e cultivo viral em ovos SPF e linhagens celulares, ensaios de ELISA para detectar anticorpos contra patógenos, como SARS-CoV-2, *Mycoplasma* e Influenza, testes de hemaglutinação como método alternativo para detectar vírus como Influenza A e também, a coleta amostras de animais para posterior diagnóstico laboratorial.

Tabela 1 – Atividades acompanhadas e realizadas durante o estágio no LVA.

Atividades	Número	%
Extração de RNA	17	18%
Extração de DNA	14	15%
RT-PCR em tempo real	14	15%
PCR em tempo real	10	11%
Cultivo de células MDCK	8	9%
Eletroforese	5	5%
ELISA	5	5%
PCR convencional	5	5%
Coleta de amostras	4	4%
Nested PCR	3	3%
Processamento de ovos SPF	3	3%
Teste de hemaglutinação	3	3%
Espectrofotometria	2	2%
Desparafinação de tecidos	1	1%
Total	94	100%

Fonte: Do autor (2021).

A seguir serão abordados os principais microrganismos trabalhados dentro do laboratório e suas respectivas técnicas para diagnóstico e investigação.

3.1 Diagnóstico de Patógenos em Suínos

A produção de suínos no Chile é altamente intensiva e está distribuída principalmente na região central (região Metropolitana de Santiago e região O'Higgins). O país conta atualmente com aproximadamente 2,5 milhões de cabeças de suínos e apesar deste número não ser muito grande comparado à China, Estados Unidos e Brasil, o país tem grande relevância na exportação de carne suína, ficando em sexto lugar no ranking mundial de exportações do produto (USDA, 2020). Desta forma, os plantéis de suínos devem contar com programas de sanidade animal eficientes para controle e erradicação de doenças infecciosas de importância econômica (REYES; ALVAREZ, 2019).

Em 2014, os diagnósticos mais realizados pelo país para identificação de doenças infecciosas virais em suínos foram para circovirose, PRRS (síndrome reprodutiva e respiratória suína) e PSA (Peste Suína Africana). A PSA é uma doença exótica no país e nunca houve registros da enfermidade no território, porém realiza-se diagnósticos para fins de vigilância epidemiológica. Já em relação às outras duas doenças, elas estão presentes no país (SAG, 2014), portanto o LVA realiza diagnósticos para identificação dos seus respectivos agentes etiológicos.

3.1.1 PRRS

No final da década de 80 e início da década de 90, nos Estados Unidos e Europa, foram registradas de forma quase simultânea, epidemias em suínos geradas por um novo patógeno denominado PRRSV (vírus da síndrome reprodutiva e respiratória suína) (LUNNEY et al., 2016). Este, foi apontado por produzir problemas respiratórios, reprodutivos e de perda de peso em suínos de diversas idades, afetando várias etapas da produção e gerando grandes impactos econômicos para a suinocultura mundial (BUTLER et al., 2014; DOKLAND, 2010).

Depois do primeiro caso de PRRS nos Estados Unidos, a doença se espalhou rapidamente e no ano de 1999 o vírus foi detectado pela primeira vez no Chile. O país iniciou uma campanha de vigilância epidemiológica ativa implementada pelo SAG (Servicio Agrícola y Ganadero), órgão oficial do Estado responsável pelo desenvolvimento de programas de controle e erradicação de doenças infecciosas em animais, e no ano de 2012 a OIE (Organização Mundial da Saúde Animal) reconheceu o país como livre de PRRS (NEIRA et al., 2017a; SAG, 2016).

Desafortunadamente em 2013 um novo surto de PRRS, de origem distinta à de 2012, foi detectado no país e o SAG teve que lançar um novo programa de controle e erradicação da doença, que está em vigência até os dias atuais. O número de casos diminuiu consideravelmente no país desde o ano de 2013, porém do primeiro ao terceiro trimestre de 2021 houveram registros da doença em duas granjas comerciais. Sendo assim, o monitoramento e diagnóstico

constante da doença são essenciais para a erradicação do vírus no país (NEIRA et al., 2017a; SAG, 2021).

3.1.1.1 Agente etiológico

O PRRSV é um vírus envelopado que pertence à ordem *Nidovirales*, família *Arteriviridae* e gênero *Betaarterivirus*. Seu genoma é composto por um RNA de fita simples, de polaridade positiva, com um tamanho de aproximadamente 15 kb que possui 11 ORFs (Open Reading Frames) (LUNNEY et al., 2016; NEIRA et al., 2017a). As ORF1a e ORF1ab são as mais próximas à extremidade 5' e ocupam aproximadamente 75% do genoma viral. Estas são traduzidas em duas poliproteínas, que quando clivadas, formam 14 proteínas não estruturais (nsp) que exercem papel fundamental no momento de replicação viral (LUNNEY et al., 2016). Já as proteínas estruturais são codificadas pelas ORFs mais próximas à extremidade 3'. As ORFs 2 a 5 codificam quatro glicoproteínas (GPs) de membrana (a GP2a, GP3, GP4 e GP5), a ORF6 codifica uma proteína de membrana não glicosilada (M) e a ORF 7 uma nucleoproteína (N) (DOKLAND, 2010).

Todas as proteínas de membrana são essenciais para a entrada do vírion na célula. A GP5 e a M são as maiores proteínas de envelope e juntas formam um heterodímero que se liga ao receptor de sialoadesina (CD169) presente em macrófagos teciduais, permitindo a endocitose viral. Já as demais glicoproteínas formam um heterotrímero que se liga ao receptor CD163, presente em macrófagos e monócitos maduros. A ligação dessas GPs ao C163 é fundamental para o processo de desmontagem e internalização do genoma viral no citoplasma celular (LUNNEY et al., 2016; NOVAKOVIC et al., 2016; SU; ROWLAND; YOO, 2021).

Por último, a proteína N é uma das proteínas mais abundantes em células infectadas e apresenta alta afinidade pelo RNA viral, formando a nucleocápside. Essa estrutura tem formato de homodímeros que são ligados por pontes de dissulfeto e protegem o RNA (DOKLAND, 2010).

3.1.1.2 Variabilidade genética

Existem dois genótipos de PRRSV: o tipo 1 ou europeu que foi isolado pela primeira vez na Holanda e o tipo 2 ou norte-americano que foi identificado na América do Norte. Apesar de ambos terem sido descobertos no ano de 1991 (BUTLER et al., 2014), os genótipos apresentam grande variabilidade genética (cerca de 60% de semelhanças na sequência de aminoácidos), indicando que a divergência evolutiva desses vírus ocorreu há muitos anos atrás (LUNNEY et al., 2016; SHI et al., 2010).

A diferenciação entre esses dois genótipos, no momento de diagnóstico laboratorial,

pode ser dado através da amplificação da região ORF7, que apesar de ser uma zona altamente conservada, apresenta divergências na sequência de aminoácidos, permitindo a diferenciação entre os dois (LURCHACHAIWONG et al., 2008).

Dentre os genótipos também há outro tipo de classificação. O PRRSV-1 pode ser agrupado em 4 subtipos e o PRRSV-2 em 9 linhagens. Essa diferenciação pode se dar por meio da comparação da região ORF5, que é uma zona mais variável. No Chile todas as sequências já identificadas pertencem ao genótipo 2 e há uma maior prevalência das linhagens 1, 5, 8 e 9 no território (DOKLAND, 2010; NEIRA et al., 2017a).

3.1.1.3 Transmissão

A transmissão de PRRSV pode ocorrer tanto pela via vertical quanto horizontal (contato direto e indireto) (BUTLER et al., 2014). Pela via vertical, a infecção dos fetos se dá principalmente no último trimestre de gestação. A mortalidade destes varia de 10 a 50%, e aqueles que sobrevivem podem transmitir a doença por até 112 dias após o nascimento (BALASURIYA; CAROSSINO, 2017). Já pela via horizontal existem distintas rotas de transmissão. O suíno infectado pode liberar o vírus por meio de fluidos oral e nasal, fezes, urina, leite e sêmen e além disso, existem animais que podem alojar o vírus em suas tonsilas, tornando-se persistentemente infectados e transmitindo a doença por até 90 dias após a infecção. O contato direto representa uma das formas mais importantes de infecção entre animais da mesma granja. Já a inseminação artificial, vetores mecânicos, fômites e entrada de novos suínos podem representar riscos para a introdução do patógeno em um local livre de PRRS (BUTLER et al., 2014). Um exemplo disso, é que no Chile, uma única granja que era positiva para PRRS no final de 2020, demonstrou constantes resultados negativos para a doença, declarando-se livre de PRRS no mês de março de 2021, porém pouco tempo depois, uma granja vizinha à esta começou a demonstrar resultados positivos. Não se tem certeza de como a doença foi introduzida na segunda granja, porém devido à proximidade das instalações e baixa biossegurança, acredita-se que a doença passou de uma granja à outra (SAG, 2021).

3.1.1.4 Patogenia

Após a transmissão de PRRSV para o novo hospedeiro, os macrófagos locais são atingidos e se disseminam pela circulação sanguínea e linfática, afetando principalmente o pulmão e órgãos linfoides, que irão apresentar alta carga viral. Outros tecidos, como glândulas salivares, testículos e cérebro também são atingidos, porém não de forma tão consistente (LUNNEY et al., 2016; ROWLAND et al., 2003).

Após alguns dias, a replicação viral começa a diminuir e o animal torna-se

persistentemente infectado, eliminando o vírus através de tecidos linfoides secundários. Essa etapa pode durar alguns meses e em situações de estresse pode haver reativação viral, o que torna a eliminação do mesmo mais complicada (LUNNEY et al., 2016; PILERI; MATEU, 2016).

3.1.1.5 Sinais Clínicos

Os sinais clínicos de PRRS variam de acordo com a idade, sexo e genética do animal. Em matrizes gestantes há maior incidência de abortos no último trimestre de gestação ou partos precoces pela doença, aumentando as taxas de fetos mumificados e leitões debilitados no nascimento. Aqueles leitões infectados que sobrevivem ao momento do parto, podem apresentar dificuldades respiratórias, sinais neurológicos, apatia e cianose, aumentando o índice de mortalidade na granja. Já os cachaços podem apresentar febre, letargia e alterações na qualidade do sêmen (KREUTZ, 1998).

3.1.1.6 Diagnóstico

No LVA a técnica de extração de RNA com a solução de Chomczynski-fenol (BM-1755, Winkler, Chile) seguida da amplificação de DNA com a RT-qPCR (reação da transcriptase reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase em tempo real) eram utilizadas para diagnóstico de PRRSV em suínos. A seguir ambos processos serão descritos detalhadamente.

3.1.1.6.1 Extração de RNA com solução de Chomczynski-fenol

Para obtenção de resultados significativos na RT-qPCR, é necessário realizar antes uma técnica de purificação das amostras, para isso, no LVA é executada a extração de RNA de PRRSV com a solução de Chomczynski-fenol.

Para a extração, podem ser utilizadas diferentes tipos de amostras, entre elas, fluido oral, nasal, testicular e de cauda de leitões, pulmões macerados ou soro sanguíneo. Uma vez que as amostras são processadas, realiza-se o primeiro passo que é o de lise celular. Para isso 250 µL da amostra e 750 µL de Chomczynski-fenol são adicionados e mesclados em um microtubo de 1,5ml. Após cinco minutos, 150 µL de clorofórmio são acrescentados. Após a homogeneização, o material é centrifugado à 12.000 x g por 15 minutos a 4 C°, desse modo formam-se duas fases distintas, uma aquosa (contendo o RNA), e outra opaca (contendo DNA e proteínas). A fase aquosa (superior) é coletada cuidadosamente e é transferida para um novo microtubo de 1,5 mL, onde é adicionado 375 µL de isopropanol. A seguir o material é homogeneizado em vórtex, incubado em temperatura ambiente por dez minutos e centrifugado a 12.000 x g por 15 minutos a 4°C. O conteúdo do tubo é descartado, uma vez que o material genético foi precipitado, e

adiciona-se 750 μ L de etanol a 75%. Homogeneiza-se novamente o microtubo no aparelho tipo vórtex e realiza-se uma centrifugação de 7.500 x g por 5 minutos a 4°C. Novamente, a solução é descartada e os tubos são invertidos por 10 minutos para secagem completa de etanol. A seguir o RNA é eluído em 50 μ l de água livre de nuclease e o tubo é estocado a -20°C.

Figura 6 – Solução de Chomczynski com fenol para extração de RNA



Fonte: Do autor (2021)

3.1.1.6.2 RT-qPCR

A RT-qPCR é uma técnica de amplificação de material genético rápida, sensível e eficiente para detecção e quantificação de RNA, por isso, é ideal para a identificação de PRRSV (DOKLAND, 2010). Essa tecnologia permite que as moléculas de RNA sejam transformadas em fitas de DNA complementar (cDNA) através da ação de uma enzima chamada transcriptase reversa e assim posteriormente, essas fitas são amplificadas permitindo uma análise quantitativa do material (LURCHACHAIWONG et al., 2008).

Para a realização dessa técnica é necessário efetuar alguns passos. O primeiro deles é o desenho de *primers* e da sonda. Após a análise do genoma, deve-se escolher uma sequência alvo a ser amplificada. No LVA a região escolhida para a amplificação localiza-se no ORF7, uma vez que nessa região pode-se realizar a diferenciação entre os genótipos PRRSV-1 e PRRSV-2 (LURCHACHAIWONG et al., 2008). Os *primers* usados no ensaio incluem o *forward* (*primer* de início) 5' - CCT CTR GCG ACT GAA GAT GAY G -3' e *reverse* (*primer* de final) 5' - GCG TVG GCA AAC TAA ACT CCA C -3', que amplificam um fragmento de 160 bp.

Para a realização da RT-qPCR deve-se utilizar uma sonda que permite a quantificação do material genético através da emissão de fluorescência (DOKLAND, 2010). Existem dois

tipos de sonda que podem ser utilizados, a SYBR Green e TaqMan. A sonda SYBR é mais inespecífica, uma vez que se liga a qualquer dupla fita de DNA, emitindo uma fluorescência verde. Já a TaqMan, emite fluorescência conforme o aumento da quantidade de cDNA de interesse (LUNNEY et al., 2016). No LVA utiliza-se uma sonda TaqMan marcada com o corante fluorescente Cy5[®] para detecção de PRRSV.

O segundo passo para a realização da RT-qPCR é a produção do MasterMix, uma solução que contém uma mistura de reagentes necessários para a síntese de cDNA (DOKLAND, 2010). Para a preparação da solução adicionam-se 10 µL de iTaq DNA polimerase (Bio-Rad), 0,5 µL de IScript™ (Bio-Rad), 1,67 µL de água livre de nucleasse, 1 µL do *forward*, 1 µL de *reverse* e 1 µL da sonda. A mistura é agitada em aparelho tipo vórtex e posteriormente, 5 µL da amostra extraída são adicionados. Depois de homogeneizar a amostra com o MasterMix, o microtubo é colocado em uma termocicladora (CFX96™ Touch Real-Time PCR Detection System, Bio-Rad, EUA).

O ponto de partida da termocicladora inicia-se a 50°C. Nessa fase as moléculas de RNA são convertidas em cDNA por meio da ação da transcriptase reversa. Logo após, a temperatura do equipamento aumenta para 95°C e nessa etapa ocorre a desnaturação da fita molde de DNA, esse processo dura 10 minutos também. A terceira etapa é a de pareamento dos *primers* ou anelamento, que ocorre a 95°C por quinze segundos, seguido da etapa de amplificação do cDNA à 60°C por quarenta e cinco segundos. As duas últimas etapas ocorrem em 40 ciclos.

Figura 7 – Termocicladora para realização de PCR em tempo real



Legenda: Termocicladora para realização da PCR em tempo real (CFX96, Real Time System, C 1000 Touch, BioRad)

Fonte: Do autor (2021)

Durante o processo de amplificação, caso tenha alguma amostra positiva para PRRSV,

o sinal de fluorescência aumenta conforme os ciclos avançam, criando uma curva sigmoide. Sempre é interessante utilizar um controle negativo e positivo para poder validar o teste e assegurar que não houve nenhum tipo de contaminação durante o ensaio (DOKLAND, 2010).

3.1.2. Circovirose suína

A primeira identificação do circovirus suíno (PCV) ocorreu no ano de 1974, em uma linhagem celular de rim suíno, denominada PK-15. O microrganismo foi descrito como um pequeno vírus de genoma circular e não estava associado a patogenicidade em suínos (MENG, 2013; ZANELLA; MORÉS, 2003). Porém em 1998, um outro vírus com aproximadamente 68% de semelhança na sequência de nucleotídeos, foi identificado e denominado como PCV2 (MENG, 2013). Este último foi relacionado à uma variedade de síndromes em suínos, como a síndrome multissistêmica do definhamento dos suínos (SMDS) e síndrome de dermatite e nefropatia suína (SDNS), representando sérios prejuízos econômicos para a suinocultura mundial (NEIRA et al., 2017c; SEGALÉS, 2012).

Apesar do patógeno ter sido descrito somente em 1998, estudos sorológicos realizados em amostras arquivadas, demonstraram que o vírus já estava presente em diversas populações de suínos ao redor do mundo antes da identificação (WEI et al., 2019). Um exemplo disso é que amostras arquivadas de 1962 na Alemanha e do 1988 no Brasil resultaram positivas para técnicas de PCR (LAROCHELLE et al., 2000; ZANELLA et al., 2006).

Atualmente, a grande maioria dos países onde há produção de suínos, apresentam o patógeno (BRUNBORG; MOLDAL; JONASSEN, 2004). No Chile, país onde realizou-se o estágio supervisionado, demonstrou-se que mais de 90% das produções intensivas de suínos são positivas para PCV2 (NEIRA et al., 2017c). Dessa forma a análise do vírus circulante no país é de extrema importância para o entendimento da enfermidade no local.

3.1.2.1. Agente etiológico

O PCV2 é um vírus muito pequeno não envelopado, que possui apenas 17 nm de diâmetro (WEI et al., 2019) e contém um genoma composto por DNA de fita simples, circular de 1,76 kb (MISINZO et al., 2006). Como seu genoma também é pequeno, o vírus é muito dependente da maquinaria celular para realizar o processo de replicação (WEI et al., 2019).

Apesar do PCV2 apresentar 11 ORFs ao longo do seu genoma, apenas seis delas são consideradas relevantes para a replicação viral. A ORF1 codifica as proteínas não estruturais relacionadas à replicação de DNA, a Rep e Rep' (CORREA-FIZ et al., 2020). A ORF2 é responsável por codificar as proteínas do capsídeo, que são altamente imunogênicas, antigênicas e que também tem o papel de proteger e carrear o genoma viral (MISINZO et al.,

2006). E as ORFs 3 a 6 codificam proteínas não estruturais relacionadas à evasão do sistema imunológico, apoptose celular, entre outras funções, que apesar de não serem fundamentais, facilitam e otimizam o processo de replicação viral (CORREA-FIZ et al., 2020).

3.1.2.2 Variabilidade genética

O PCV2 é um dos vírus com maiores taxas de mutação entre os vírus com genoma DNA e isso gera uma alta heterogeneidade viral, podendo afetar programas de vacinação contra a doença (GAVA et al., 2018). Atualmente existem quatro genótipos distintos de PCV2 que são classificados como PCV2a, PCV2b, PCV2c e PCVd (NEIRA et al., 2017c).

No Chile, um estudo realizado no ano de 2017, demonstrou que os genótipos mais prevalentes eram o PCV2b, seguido de um vírus recombinante entre o PCV2a e PCV2d e em terceiro lugar o genótipo PCV2a, sem recombinação. Nesse estudo não havia sido encontrado o PCV2d não recombinante no território nacional (NEIRA et al., 2017c).

As cepas PCV2a e PCV2b não apresentam diferenças evidentes na patogenicidade e virulência (MENG, 2013; PARK et al., 2014), porém o PCV2d, pode causar a doença mais grave. Além disso, em algumas granjas ao redor do mundo, houve a notificação da presença de SMDS por PCV2d mesmo havendo um plano vacinal (GAVA et al., 2018; OH et al., 2021). Sendo assim, realizar uma análise filogenética contínua para monitoramento dos genótipos é essencial para entendimento da doença no país.

3.1.2.3 Transmissão e Patogenia

O PCV2 é eliminado através de fluidos orais, nasais, fezes, sêmen e urina, portanto a principal forma de transmissão é através do contato direto entre animais. Além disso, o vírus também pode ser transmitido via vertical, ou seja, os leitões podem ser infectados durante a gestação (GILLESPIE et al., 2009).

Ao entrar no hospedeiro, o PCV2 interage com receptores de sulfato de heparina (LI et al., 2020), afetando, de primeiro momento os linfonodos regionais e espalhando-se pelo sistema linfático. Posteriormente, o vírus replica-se em células T e aumenta a replicação de tais células, levando a um desgaste na resposta imunológica e conseqüentemente gerando uma depleção linfóide (GILLESPIE et al., 2009; MENG, 2013).

3.1.2.4 Sinais Clínicos

O PCV2 age como um amplificador de problemas pré-existentes na granja, uma vez que gera imunodepressão no animal (CORREA-FIZ et al., 2020). Existem vários quadros clínicos associados ao circovírus suíno, porém o mais importante é a SMDS. Essa síndrome também está relacionada a outros patógenos, como o PRRSV, *Mycoplasma hyopneumoniae* e Influenza

(MENG, 2013), e acomete principalmente leitões em fase de creche. Estes podem apresentar quadros de emagrecimento, diarreia, prostração, anorexia, hipertrofia de linfonodos regionais e problemas respiratórios (ZANELLA; MORÉS, 2003).

Outros problemas que o PCV2 também está associado são o tremor congênito em filhotes de marrãs soronegativas que entraram em contato com o vírus durante a gestação; a SDNS, em que os animais afetados podem apresentar lesões de pele e edemas subcutâneos; falhas reprodutivas; enterites; entre outros (ZANELLA; MORÉS, 2003).

3.1.2.5 Diagnóstico

Para realização do diagnóstico de SMDS, é necessário efetuar três passos. O primeiro deles é identificar se houve aumento significativo da mortalidade associada à presença de sinais clínicos, o segundo é encontrar lesões macroscópicas em pelo menos um de 5 suínos doentes necropsiados e o terceiro é detectar a presença do agente etiológico ou DNA viral nos tecidos lesionados (MENG, 2013).

A PCR não tem valor de diagnóstico para a doença, porém no LVA realiza-se extrações de DNA de PCV2 seguidos da PCR convencional para a detecção e diferenciação dos genótipos de PCV2 circulantes em território nacional.

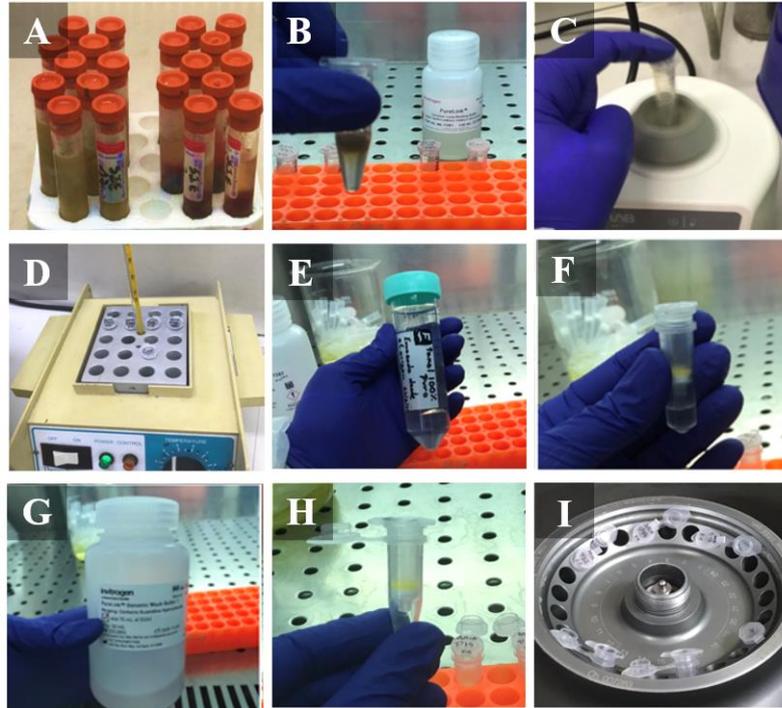
3.1.2.5.1 Extração de DNA

Para a obtenção de bons resultados na PCR de PCV2, primeiramente deve-se realizar a extração de DNA. No LVA a técnica utilizada para esse ensaio é através do kit Invitrogen™ PureLink™ da Thermo Fisher.

Para a extração podem ser utilizados fluido oral, soro sanguíneo ou músculo estriado cardíaco de fetos mumificados. Após o processamento das amostras, 200 µL do material são aliquotados e colocados em microtubos de 1,5 mL. A seguir são adicionados 20 µL de Proteinase K e 20 µL de RNase, que são agitados vigorosamente em aparelho tipo vórtex e incubados a temperatura ambiente por dois minutos. Posteriormente 200 µL de Purelink Genomic Lysis Buffer são adicionados e após homogeneizar bem a solução, a amostra é incubada a 55°C por uma hora em banho maria. Adiciona-se 200 µL de etanol a 100% ao microtubo e após, homogeneiza-se a amostra em vórtex. O volume total é transferido à resina e realiza-se centrifugação a 10.000 x g por 1 minuto à temperatura ambiente. O tubo coletor é descartado e é colocado outro novo no lugar. Adiciona-se 480 µL de solução tampão de lavagem -1 à resina, centrifuga-se o microtubo a 10.000 x g por 1 minuto à temperatura ambiente e descarta-se o material do tubo coletor. Uma nova solução de lavagem é adicionada (solução tampão de lavagem -2) e a amostra é novamente centrifugada a 12.000 x g por 1 minuto à

temperatura ambiente. O coletor é descartado e a resina é colocada em um microtubo. Adiciona-se 50 μ L de Genomic Elution Buffer, posteriormente a amostra é incubada a 1 minuto em temperatura ambiente e realiza-se uma nova centrifuga (12.000 x g por 1 minuto). A resina é descartada e o microtubo é guardado à -20°C.

Figura 8 – Etapas para realização da extração de DNA de PCV2



Legenda: (A) Amostras de fluido oral e sangue. (B) Amostra aliquoteada após a adição de proteinase K, RNase e Purelink Genomic Lysis Buffer. (C) Homogeneização da amostra através de aparelho tipo vórtex. (D) Incubação da amostra em banho maria. (E) Adição de etanol a 100%. (F) Transferência do volume total à resina. (G) Adição de tampão de lavagem 1 e 2. (H) Resina em microtubo de 1,5 mL. (I) Centrifugação após adição de Genomic Elution Buffer.

Fonte: Do autor (2021)

3.1.2.5.2 Reação da Cadeia da Polimerase

A PCR convencional não permite a quantificação imediata do produto de PCR, portanto, após a finalização da técnica, é necessário produzir um gel de agarose para a visualização de bandas de DNA genômico.

Para a escolha dos *primers* dos três genótipos foram selecionadas sequências de aminoácidos localizados no ORF2, uma vez que essa região é geneticamente mais variável. Sendo assim, os *primers* utilizados para identificação de PCV2a incluem o *forward* 5' - GGT TGG AAG TAA TCA ATA GTG GA -3' e *reverse* 5' - GGG GGA CCA ACA AAA TCT C -3', que amplificam um fragmento de 278 bp. Para PCV2b foi utilizado o mesmo *forward* de PCV2a, porém o *reverse* é distinto, 5' - GGG GCT CAA ACC CCC GCT C -3', amplificando um segmento de 277 bp e para PCV2d o *forward* utilizado foi 5' - GGT TGG AAG TAA TCG ATT GTC CT -3' e *reverse* 5' - TCA GAA CGC CCT CCT GGA AT -3', que gera um fragmento

de 343 bp.

Como as amostras são testadas para três genótipos de PCV2, deve-se realizar, por amostra, três MasterMix com *primers* distintos. Cada MasterMix tem um volume total de 15 μL , sendo 10 μL de SsoAdvanced Universal Supermix (Bio-Rad), 1 μL de *forward*, 1 μL de *reverse* e 3 μL de água livre de nuclease. Na sequência, 5 μL da amostra são adicionados em cada microtubo contendo os distintos partidores.

Os microtubos são colocados em uma termocicladora (My Cycler™ Thermal Cycler, Bio-Rad, EUA) e a PCR inicia-se com a desnaturação a 95°C por 10 minutos, seguido de 45 ciclos de 95°C de 15 segundos para amplificação e extensão a 60°C por 45 segundos.

3.1.2.5.3 Eletroforese

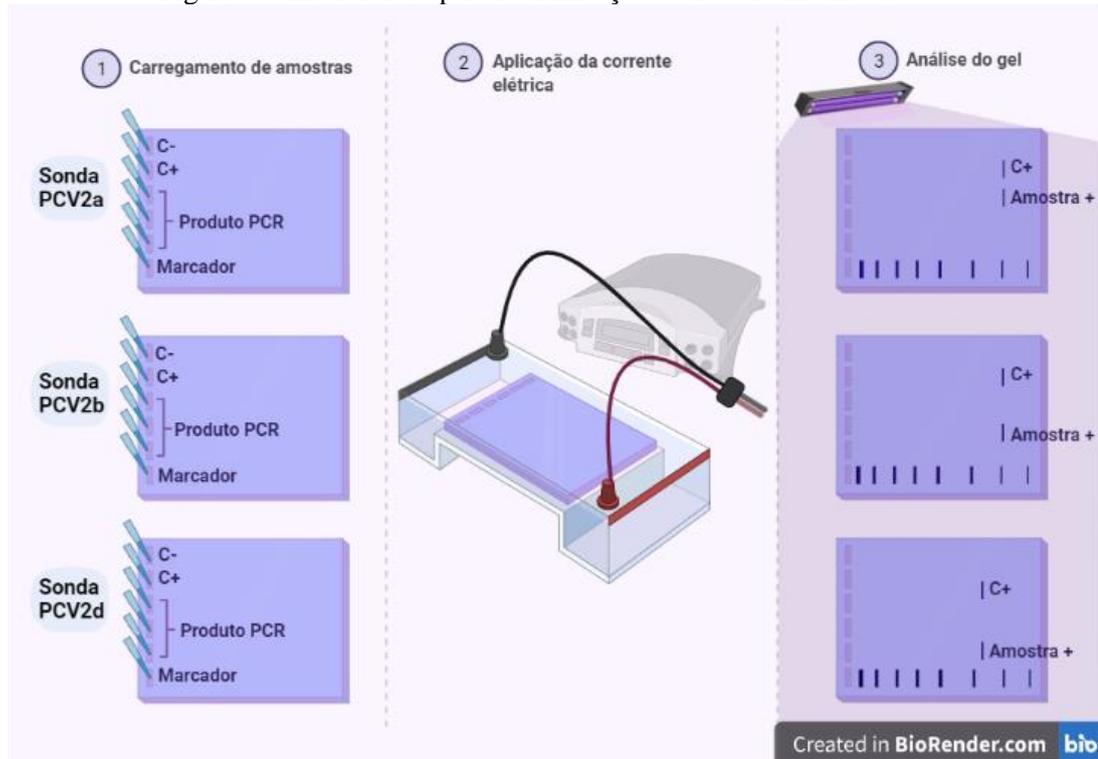
Para visualização da presença de bandas de DNA genômico, o produto de PCR é submetido à eletroforese. Essa técnica consiste basicamente em separar as moléculas de DNA de acordo com sua massa molecular por meio de um campo magnético (MOREIRA; GARCIA, 2002).

A eletroforese é preparada a 1,5% em solução tampão TAE 1X (tris-acetato-EDTA) e corada com 5 μL de SYBR™ Safe DNA gel Stain (Invitrogen, EUA). A corrida de eletroforese é realizada em uma cuba horizontal de eletroforese (Mini-Sub Cell GT Systems, Bio-Rad, EUA) com o gel imerso em tampão TAE 1X.

São coletados 5 μL de produto de PCR e misturados a 1 μL de Gel Loading Dye, Purple (6X) (BioLabs, EUA) em papel Parafilm M® (Bemis Company, EUA). Além disso, 1 μL de marcador molecular, 100 bp DNA Ladder (BioLabs, EUA), é também homogeneizado a 0,2 μL do corante. Na primeira canaleta do gel é colocado o marcador molecular, seguido das amostras e controle positivo e negativo.

O gel é submetido à eletroforese com carga de 110V por 40 minutos utilizando a fonte de energia do equipamento PowerPac 3000 (Bio-Rad, EUA). Posteriormente, o gel é analisado em um transiluminador sob luz ultravioleta e obtém-se os resultados.

Figura 9 – Eletroforese para identificação de PCV2 em amostras



Legenda: Procedimento para a realização e leitura do gel de eletroforese.

Fonte: Adaptado de BioRender (2021). Gel Electrophoresis (Horizontal).

3.2. Investigação de patógenos em aves marinhas da região Antártica

A Antártica é conhecida por ser uma região com condições de temperatura extremamente baixas e por apresentar uma fauna e flora pouco diversificada. Apesar disso, existem 46 espécies de aves que se reproduzem na região, incluindo aves marinhas e voadoras (COSTA; ALVES, 2007), que podem ser hospedeiras de diversos tipos de patógenos.

O entendimento de microrganismos na região Antártica ainda é muito limitado e a vigilância epidemiológica local ainda precisa ser otimizada. Desta forma, no ano de 2016, 2017, 2018 e 2019, docentes e discentes do LVA participaram de expedições à Antártica com o intuito entender a diversidade viral e os fatores delimitantes para distribuição e manutenção dos mesmos (ALVARADO, 2018; ARIYAMA et al., 2021).

Durante as expedições foram coletadas diversas amostras de diferentes espécies aviárias e posteriormente as amostras foram levadas ao LVA, onde realizaram-se vários estudos de identificação e de caracterização viral (ARIYAMA et al., 2021; NEIRA et al., 2017b; OLIVARES et al., 2019).

Ao longo do período de estágio supervisionado, em 2021, pesquisas com os patógenos coletados durante as expedições estavam sendo realizadas para melhor entendimento das características dos microrganismos. A seguir serão descritos os patógenos trabalhados e técnicas realizadas para pesquisa.

3.2.1 *Orthoavulavirus*

O gênero *Orthoavulavirus* pertence à família *Paramyxoviridae* e à subfamília *Avulavirinae*. Uma das espécies mais conhecidas do gênero é a Avian orthoavulavirus 1 ou vírus de Newcastle, que causa uma enfermidade altamente contagiosa e que gera grandes impactos econômicos na avicultura mundial (OIE, 2021; SUBBIAH et al., 2010). Porém, apesar da grande importância da doença, pouco se sabe sobre a ecologia e patogenia de outras espécies deste gênero.

Atualmente, existem nove espécies do gênero *Orthoavulavirus* registrados pelo ICTV. Dentre estas, três delas foram identificadas pelo LVA durante a expedição à Antártica em 2017 e foram nomeadas posteriormente como Avian orthoavulavirus 17, 18 e 19. Estas espécies foram encontradas primeiramente em pinguins gentoo, e após a realização de mais estudos, identificaram os patógenos em outras duas espécies, o pinguim-de-barbicha e pinguim-de-adélia (NEIRA et al., 2017b; OLIVARES et al., 2019).

3.2.1.1 Agente Etiológico

Os Avian orthoavulavirus são vírus envelopados, que possuem um tamanho entre 150 a 250 nm de diâmetro e contêm um genoma composto por RNA de fita simples, polaridade negativa e não segmentado (SUBBIAH et al., 2010).

Seu genoma apresenta aproximadamente 15 kb e possui 6 genes que codificam o mesmo número de proteínas. Entre essas proteínas estão: a nucleoproteína (N), a fosfoproteína (P) e a proteína de polimerase grande (L), que estão associadas ao RNA viral; a proteína matriz (M), que é fundamental para o momento de brotamento viral; e a proteína neuraminidase-hemaglutinina (NH) e de fusão (F), que são ligantes virais. A porção H da NH tem afinidade ao receptor de ácido siálico, permitindo a entrada do vírion na célula, a porção N é importante para a liberação do vírion no ambiente extracelular e a proteína F é responsável pela fusão de membranas lipídicas celulares, permitindo a penetração da nucleocapside no citosol celular por meio da formação de sincícios (GOGOI; GANAR; KUMAR, 2017).

3.2.1.2 Propriedades dos Avian orthoavulavirus 17, 18 e 19

No ano de 2019 foram realizados estudos sobre a patogenicidade dos novos Avian orthoavulavirus 17, 18 e 19. Os patógenos foram inoculados em galinhas, porém nenhuma delas apresentou qualquer sinal clínico pelos agentes, levantando a possibilidade de que tais vírus apresentam baixa patogenicidade (WILLE et al., 2019).

Apesar de tal estudo, ainda devem-se realizar mais investigações sobre os patógenos para melhor compreensão e entendimento de outras propriedades virais. Para isso, no LVA, os

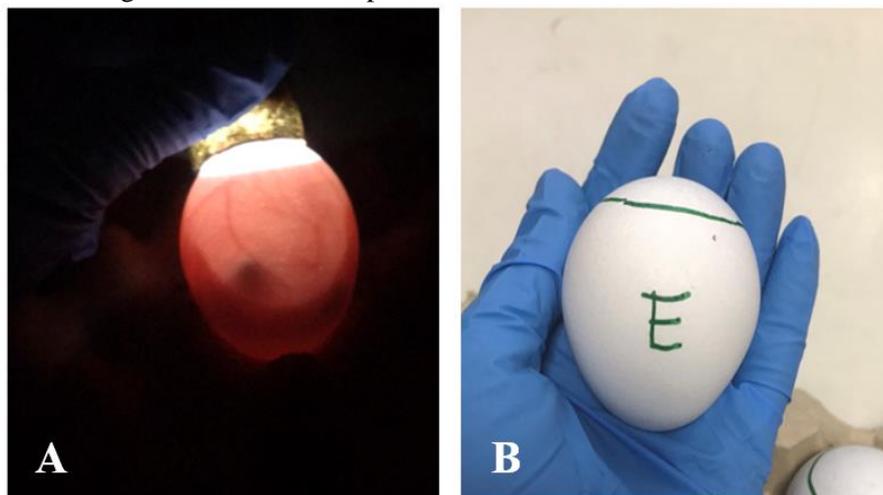
vírus foram inoculados em ovos embrionados de galinha SPF com intuito de aumentar a carga viral e facilitar futuros estudos na área.

3.2.1.3 Inoculação de Orthoavulavirus em ovos SPF

Para que ocorra crescimento viral é necessário que os vírus sejam cultivados em organismos vivos, uma vez que o agente necessita da maquinaria celular para a replicação. No caso de cultivo de *Orthoavulavirus*, os ovos SPF são escolhidos como forma de cultivo viral uma vez que apresentam taxas mais significativas para isolamento quando comparados às células de linhagem MDCK (Madin Darby canine kidney) ou células Vero (originadas de macaco verde africano) (MORESCO; STALLKNECHT; SWAYNE, 2012; OIE, 2021).

Os ovos SPF utilizados no LVA são fornecidos pelo Instituto de Salud Pública (ISP) do Chile e apresentam 9 dias de idade. Após a recepção dos mesmos é verificada a presença de embriões mortos ou moribundos. Esses ovos são considerados inviáveis para o cultivo viral e devem ser submetidos a uma temperatura de 4°C durante a noite. Após esse período de tempo, estes ovos são descartados. Já para os ovos viáveis, deve-se identificar onde o embrião está localizado no ovo e delimitar a câmara de ar com uma caneta permanente. Deve-se tomar cuidado para não deixar os ovos a uma temperatura menor que 37°C por muito tempo, pois caso contrário, os embriões podem ser afetados de forma negativa.

Figura 10 – Ovos SPF para cultivo de *Avian orthoavulavirus*



Legenda: (A) Avaliação de viabilidade de embriões através de ovoscopia. (B) Delimitação do local do embrião e da câmara de ar.

Fonte: Do autor (2021)

A inoculação viral deve ocorrer na cavidade alantoide, realizando-se uma pequena perfuração na região periférica da câmara de ar. Por isso é muito importante realizar a identificação das estruturas no ovo, pois caso contrário, o risco de inocular o vírus diretamente

no embrião ou em outras estruturas é maior. Após a inoculação do vírus coloca-se 100 µl de antimicrobianos (penicilina e anfotericina b), para evitar possíveis contaminações. O local de perfuração é fechado com cola branca escolar e os ovos são colocados em uma incubadora à temperatura de 37°C. Depois de 72 horas, deve-se observar a viabilidade dos embriões para fazer uma avaliação da patogenicidade viral. Após, colocam-se os ovos a 4°C durante a noite e no dia seguinte, o líquido alantoide do ovo é coletado e congelado a -20°C.

O líquido pode ser submetido a um processo de extração de RNA com a solução de Chomczynski-fenol para posterior processo de amplificação, identificação de material genético e realização de uma segunda passagem viral. Para realização de RT-PCR são selecionados *primers* que amplificariam um fragmento de 332 bp localizado no gene L, uma vez que essa região é altamente conservada entre os Avian orthoavulavirus 17, 18 e 19 (JIN et al., 2021). O *forward* utilizado contém a sequência 5' - AAG TAC TGT CTT AAY TGG AGR TA -3' e o *reverse*, a sequência 5' - CAT AGT CCA CAT YTT YTG RCA TA -3'.

Para a realização de MasterMix adiciona-se 12,5 µL de buffer, 1 µL de enzima, 1 µL de *forward* e 1 µL de *reverse*. Coloca-se 5 µL do produto de extração de RNA à mistura e após, adiciona-se o produto em uma termocicladora para RT-PCR convencional. A RT-PCR inicia-se a 50°C por 30 minutos para ação da transcriptase reversa. Depois a temperatura aumenta para 95°C por 2 minutos para a desnaturação da fita molde. A etapa de anelamento ocorre também a 95°C por 30 segundos, seguido da etapa de amplificação do material genético a 72°C por 30 segundos. As duas últimas duas etapas se repetem por 35 ciclos. Após a realização da amplificação, os produtos de PCR são submetidos à eletroforese para identificação de bandas. No LVA as amostras positivas para o vírus são novamente inoculadas em ovos SPF para realização de uma segunda passagem viral. Dessa forma a quantidade de partículas virais aumenta e pode-se realizar análises mais precisas sobre as propriedades virais do agente.

3.2.2 Influenza A

O vírus da Influenza A (IAV) ou popularmente conhecido como vírus da gripe, é responsável por gerar enormes impactos na área da saúde e economia (GITTINS et al., 2020). O patógeno circula em diversos tipos de hospedeiros, como aves, suínos, equinos, cães, mamíferos marinhos e humanos (MEDINA; GARCÍA-SASTRE, 2011), porém as aves aquáticas da ordem Anseriformes (ganso, pato, cisne) e Charadriiformes (mandrião, andorinha, gaivota) são consideradas os reservatórios naturais e originais do vírus (BARNARD et al., 2020). A questão é que algumas dessas aves são migratórias e seus movimentos podem permitir

a transmissão intercontinental de linhagens de IAV, podendo gerar a introdução do patógeno em locais distantes, como a Antártica (BARNARD et al., 2020; GITTINS et al., 2020). Desta forma, o LVA realizou a coleta de materiais na região do sul patagônia, no Chile, e na Antártica para fazer o monitoramento e análise epidemiológica do IAV. A seguir serão descritas as propriedades do patógeno e as técnicas realizadas no laboratório.

3.2.2.1 Agente etiológico

O Influenza é um vírus envelopado que pertence à ordem *Mononegavirales* e à família *Orthomyxoviridae*. Seu genoma é composto por um RNA de fita simples, de polaridade negativa e segmentado (LYCETT; DUCHATEL; DIGARD, 2019). Existem quatro tipos de vírus Influenza, o A, B, C e D e dentre estes o mais bem estudado é o tipo A, devido ao potencial pandêmico que apresenta (SIDORENKO; REICHL, 2004). Este vírus contém 8 segmentos em seu genoma, que codificam pelo menos uma proteína cada. O primeiro segmento codifica a proteína básica de polimerase 2 (PB2), o segundo codifica a proteína básica de polimerase 1 (PB1), o terceiro a proteína ácida de polimerase (PA), o quarto a hemaglutinina (HA), o quinto a nucleoproteína (NP), o sexto a neuraminidase (NA), o sétimo as proteínas de matriz (M1 e M2) e o oitavo as proteínas não estruturais e de exportação nuclear (NS1, NS2 e NEP) (MEDINA; GARCÍA-SASTRE, 2011).

O IAV pode ser subtipado de acordo com as diferentes glicoproteínas presentes na sua superfície (LYCETT; DUCHATEL; DIGARD, 2019). Existem 18 tipos de HA e 11 tipos de NA. Todas elas foram isoladas inicialmente em aves, exceto a H17, H18, N10 e N11, que foram isolados em morcegos (MEDINA; GARCÍA-SASTRE, 2011). A função da HA é conectar-se ao receptor celular do hospedeiro, permitindo a entrada do vírion ao citoplasma. Essa proteína tem tropismo por receptores de ácido siálico α -2,3, presentes na região de intestino delgado de aves e trato respiratório inferior de humanos, e também pelo receptor de ácido siálico α -2,6, presente em trato respiratório superior em humanos (MOSTAFA et al., 2018). A NA tem função de quebrar a ligação entre o ligante viral e receptor celular, permitindo a liberação do vírion no ambiente extra celular (MEDINA; GARCÍA-SASTRE, 2011).

Em relação às outras proteínas, a PB2, PB1 e PA são essenciais para a síntese de material genético, a NP liga-se ao RNA viral, formando a nucleocápside, a M1 participa do processo de montagem viral e ancoramento de glicoproteínas, a M2 atua como canal de transporte iônico, que permite a entrada de hidrogênio e cálcio no vírion e as proteínas não estruturais estão envolvidas no processo de replicação viral (SZEWCZYK; BIENKOWSKA-SZEWCZYK; KRÓL, 2014).

3.2.2.2 Epidemiologia

Como dito anteriormente, as aves aquáticas são as hospedeiras naturais do IAV e sua migração é um fator de risco para a introdução da doença na Antártica. Existem estudos que comprovam que mais de 100 milhões de aves, migram para a região Antártica e Subantártica todos os anos, o que é alarmante, visto que a fauna local pode não ter capacidade imunológica suficiente para combater o vírus (GITTINS et al., 2020).

Em 2014 e 2016 foram registradas a presença de H11N2 e H5N5 em pinguins na região Antártica (BARRIGA et al., 2016; HURT et al., 2014), porém ainda são necessários mais estudos na região para compreender a dinâmica da infecção. No LVA foram realizadas diversas análises de IAV de pinguins-reis e gansos de Magalhães presentes na região da Península Antártica e Sul da Patagônia respectivamente.

3.2.2.3 Isolamento de IAV em células MDCK

O isolamento de vírus em linhagens celulares permite uma caracterização mais detalhada do patógeno, uma vez que este pode replicar-se nas células atingindo uma grande carga viral (FIELDS, 2013). Essa técnica é essencial para a caracterização de vírus circulantes e também para a identificação de novos microrganismos, portanto optou-se por escolher esse procedimento para efetuar as análises de IAV (TAKADA et al., 2019).

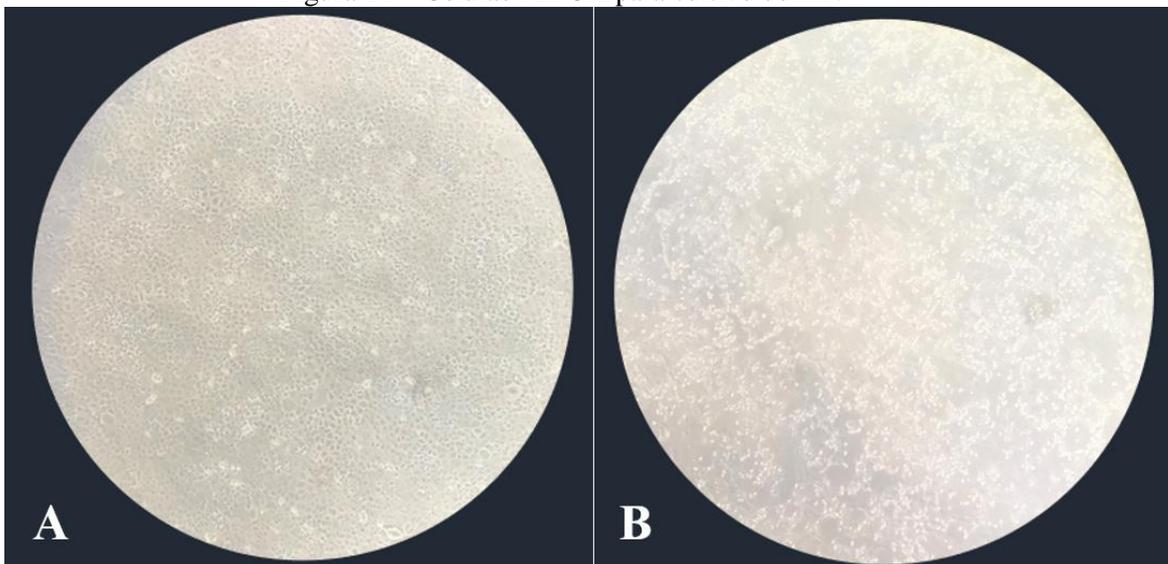
As células MDCK são originadas do rim de um Cocker Spaniel e foram depositadas na organização *American Type Culture Collection* no ano de 1964 (GREGERSEN et al., 2011). Apesar destas células serem originadas de tecido canino, elas são ideais para o crescimento de IAV, uma vez que apresentam receptores de ácido siálico α -2,3 e α -2,6 (BARNARD et al., 2020).

No LVA as células MDCK são rotineiramente colocadas em novos meios de cultivo para manutenção e viabilidade celular. As células são cultivadas em garrafas estéreis de poliestireno de 25 ou 75 cm³ (T25 ou T75) e quando a monocamada atinge uma confluência muito alta ou está envelhecida, deve-se trocar o meio, caso contrário, as células podem apresentar alterações morfológicas ou podem morrer. O processo de troca de meio é chamado de passagem. No LVA realizam-se até 20 passagens por células, para evitar anormalidades na proliferação celular.

Para realizar o processo de passagem celular deve-se descartar o meio antigo e lavar a garrafa T75 duas vezes com 7 mL de PBS (tampão fosfato salino) estéril. Posteriormente adiciona-se 3 mL de tripsina à monocamada e incuba-se a garrafa a 37C° por 10 minutos em uma estufa. Após deve-se dar leves batidas no recipiente para destacar as células presas no fundo do frasco. Adiciona-se 7mL de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) contendo

4% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico (gentamicina + anfotericina b). Posteriormente alíquota-se 2 mL desta solução de cultivo com as células e coloca-se em um novo frasco com 15 mL de DMEM. O frasco é colocado em uma incubadora e após atingir 80-90% de confluência, pode-se realizar o processo de inoculação viral. Para a realização deste processo, deve-se lavar o T75 três vezes com 15mL de PBS x1 e após deve-se adicionar 3mL de amostra. A garrafa é levada a uma incubadora a temperatura de 37°C por uma hora (deve-se agitar o frasco a cada 20 minutos). O inóculo é removido e a monocamada é lavada com PBS. Após adiciona-se 15mL de meio de inoculação para crescimento viral e 150µL de antimicrobiano. O frasco deve ser mantido a 37°C e deve ser observado diariamente para identificação de possível efeito citopático.

Figura 11 – Células MDCK para cultivo de IAV



Legenda: (A) Cultivo de células MDCK sem inoculação de IAV. (B) Células MDCK após 24 horas de inoculação de IAV.

Fonte: Do autor (2021)

3.2.2.4 Teste de hemaglutinação

O teste de hemaglutinação é uma técnica simples e barata para identificação de microrganismos com a capacidade de hemaglutinação, como o IAV, portanto tal ensaio é realizado para selecionar amostras positivas para posterior amplificação e sequenciamento do material genético.

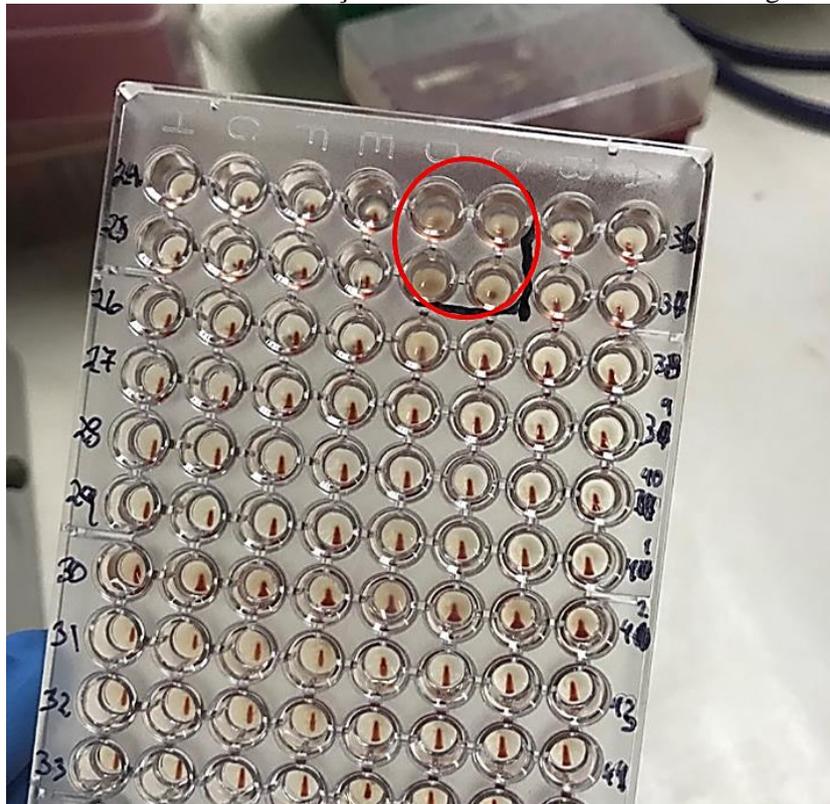
Após apenas uma única passagem do vírus em células MDCK, pode-se fazer o processo para a detecção do patógeno no teste de hemaglutinação (SPACKMAN, 2014). Para a realização da técnica no LVA, são coletados, em um tubo com anticoagulante, 10mL de sangue de galinhas SPF por via intracoronária no setor de avicultura da *Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias*. O sangue é centrifugado a 2.500 x g, por 5 minutos a 4°C e o

sobrenadante é descartado. Após adiciona-se 8 mL de PBS x1 para cada 2 mL de eritrócitos e repete-se o processo de centrifugação e adição de PBS até que o sobrenadante fique transparente. Essa solução pode ser refrigerada por até uma semana, caso necessário. Posteriormente o sangue deve ser preparado a 0,5% em solução PBS.

Em uma placa de microtitulação com 96 cavidades de fundo cônico, colocam-se 50µL de PBS em cada cavidade. Adiciona-se 50µL de fluidos de cultivo celular na primeira fileira da placa e realiza-se diluições seriadas com PBS. Após, coloca-se 50µL de sangue a 0,5% nas cavidades e a placa é incubada à temperatura ambiente por 30 minutos.

Quando formar-se um “botão” no fundo da cavidade, a placa deve ser inclinada ligeiramente. As amostras negativas adquirem um formato de lágrima no momento de inclinação, já as amostras positivas formam um círculo vermelho com margens difusas.

Figura 12 – Placa de microtitulação com resultados de teste de hemaglutinação



Legenda: A região delimitada em vermelho sinaliza as amostras positivas no teste de hemaglutinação

Fonte: Do autor (2021)

As amostras positivas são selecionadas e posteriormente passam pelo processo de extração de RNA com a solução de Chomczynski-fenol. Após, as mesmas são amplificadas em uma termocicladora convencional com *primers* específicos dos segmentos genéticos de HA e NA e os produtos de PCR são visualizados através de eletroforese. Caso haja o aparecimento de bandas no gel, o produto de PCR deve ser enviado à *Unidad de Secuenciación y Tecnologías*

Ómicas da Pontifícia Universidad Católica de Chile para realização do método de sequenciamento Sanger e análise das amostras.

3.3. SARS-CoV-2 em animais domésticos

Em dezembro de 2019, um novo Betacoronavirus, denominado SARS-CoV-2, foi apontado por causar uma doença de caráter respiratório em humanos na cidade de Wuhan, na China (ZHU et al., 2020). Os indivíduos afetados pelo patógeno possuíam sintomas semelhantes aos da gripe, como tosse seca, dores no corpo e febre, porém, além disso, alguns pacientes apresentaram pneumonia atípica seguida de falência múltipla dos órgãos e morte, o que chamou a atenção das autoridades locais (PENG et al., 2020).

O surto foi relacionado ao mercado de frutos do mar em Wuhan, que vendia não somente pescados e crustáceos, mas também uma infinidade de animais selvagens, uma vez que aproximadamente 66% dos primeiros indivíduos infectados e diagnosticados trabalhavam ou haviam visitado o mercado recentemente (NEIRA et al., 2021). Após análises filogenéticas do vírus, revelou-se que o patógeno era extremamente parecido com outros betacoronavírus encontrados em morcegos e pangolins, sugerindo que provavelmente o vírus era de origem animal (KADAM et al., 2021).

Como a COVID-19 (*Coronavirus Disease 2019*), doença causada pelo SARS-CoV-2, era altamente transmissível, o vírus se espalhou rapidamente por várias comunidades na China e posteriormente para outros países. Dessa forma a OMS, em março de 2020, caracterizou a doença como uma pandemia (HU et al., 2020).

No início da pandemia acreditava-se que a doença não era capaz de infectar animais domésticos, porém em março de 2020, um gato da Bélgica começou a apresentar sintomas respiratórios e gastrointestinais, após seu proprietário ter se infectado com o vírus (SALAJEGHEH-TAZERJI et al., 2020). Depois de tal identificação, outros estudos relataram a capacidade de infecção de animais de companhia (GAUDREAULT et al., 2020; SIT et al., 2020) e portanto, no LVA realizaram-se estudos sorológicos em cães e gatos para melhor compreensão da infecção viral.

3.3.1 Agente etiológico

O SARS-CoV-2 é um vírus envelopado pertencente à ordem *Nidovirales*, família *Coronaviridae* e gênero *Betacoronavirus* (SALAJEGHEH-TAZERJI et al., 2020). Seu genoma é composto por um RNA de fita simples, polaridade positiva, com um tamanho de aproximadamente 30 kb, que possui 14 ORFs (SONG, et al., 2019). A ORF1a e ORF1b estão localizadas próximas à extremidade 5' e correspondem a 2/3 do genoma. Estas, codificam duas

poliproteínas, a PP1ab e PP1a, que quando clivadas formam 15 proteínas não estruturais (nsp1 a nsp10 e nsp12 a nsp16) (WU et al., 2020). Já próximo à extremidade 3' estão localizadas outras ORFs que codificam proteínas acessórias e estruturais (CUI; LI; SHI, 2019).

Entre as proteínas estruturais estão a proteína *spike* (S), a de membrana (M), de envelope (E) e a nucleoproteína (N) (HU et al., 2020). A primeira delas, a proteína S, é uma glicoproteína holotrimérica que tem grande importância antigênica, uma vez que é responsável pela entrada do vírion na célula e pela neutralização de anticorpos (WALLS et al., 2020). A segunda, a proteína M, é uma glicoproteína homodimérica que é fundamental para a montagem e brotamento viral. A proteína E é codificada por um gene altamente conservado e é importante para a montagem viral e patogênese. E a proteína N apresenta alta imunogenicidade e tem a função de proteger o genoma viral, formando a nucleocápside (GRAAF; FOUCHIER, 2014).

3.3.2. Patogenia

Após a entrada do SARS-CoV-2 pelo trato respiratório superior em humanos, o domínio de ligação ao receptor (RBD), localizado na região C-terminal da glicoproteína S, conecta-se ao receptor celular da enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2), podendo afetar as células epiteliais alveolares e células endoteliais vasculares e macrófagos (HARRISON; LIN; WANG, 2020; ZHANG et al., 2020).

Como os receptores de ACE2 estão distribuídos em diversos tecidos, o vírus pode causar lesões em diferentes partes do organismo, como pulmão, coração, fígado, rim, pele, entre outros, por isso, os sintomas podem ser muito variados de acordo com o paciente (CEVIK et al., 2020).

3.3.3 Presença de SARS-CoV-2 em mamíferos

Há vários estudos que demonstraram que o SARS-CoV-2 pode infectar outras espécies de mamíferos, que não humanos (GAUDREAU et al., 2020; NEIRA et al., 2021; SALAJEGHEH-TAZERJI et al., 2020). Um exemplo disso, é que em maio de 2020 um estudo realizou inoculações, por via intranasal, de SARS-CoV-2 em 3 furões, 7 gatos e 5 cães da raça Beagle. Alguns dos furões e gatos apresentaram alterações patológicas e transmitiram a doença para outros da mesma espécie, porém os cães evidenciaram menor susceptibilidade à enfermidade (SHI et al., 2020). Provavelmente, isso pode ser explicado devido ao fato de cães apresentarem menores quantidades de receptores de ACE2 no trato respiratório comparado a furões e gatos (NOVA, 2021).

Outros estudos também detectaram a capacidade de infecção do vírus em espécies como saguis, hamsters, morcegos e musaranhos, portanto o entendimento da transmissão, da patogenia e imunologia de animais frente à infecção é extremamente importante para a tomada

de decisões no âmbito de controle e prevenção da doença (NOVA, 2021).

No período de realização do estágio, membros do LVA realizaram estudos sorológicos de infecção por COVID-19 em animais domésticos (cães e gatos) em que os tutores haviam sido infectados pelo vírus, portanto, a seguir, técnicas realizadas para tal estudo serão descritas.

3.3.4 Coleta de amostras

Para a realização da pesquisa deveriam ser coletadas amostras sanguíneas dos animais à domicílio. Dessa forma, os tutores forneciam o consentimento por escrito para autorizar a coleta das amostras. No total, a estagiária realizou e auxiliou na coleta de 21 amostras de cães e gatos. No momento de chegada ao laboratório, as amostras são centrifugadas a 3.000 x g por 5 minutos a 4°C e assim o sobrenadante (soro) é coletado e colocado em um tubo *ependorf* de 1,5 mL para posterior análise em ELISA.

3.3.5 Teste de ELISA

O teste de ELISA é um ensaio imunológico que tem a função de detectar a presença de determinado anticorpo, antígeno, proteína ou glicoproteína em uma amostra (THERMO SCIENTIFIC, 2010). Nessa técnica, a molécula alvo é imobilizada em uma superfície e sofre uma interação altamente específica com uma proteína conjugada com uma enzima ou fluoróforo permissível à detecção. Como a técnica é muito específica é improvável que a ligação entre antígeno-anticorpo seja equivocada, por consequência os riscos de interferência do ensaio são muito baixos (AYDIN, 2015).

Existem vários modelos para a realização do ensaio de ELISA, que dependem basicamente do mesmo conceito, porém cada um deles tem suas vantagens e desvantagens (ABCAM, 2018):

- ELISA direto: nessa técnica, o antígeno é diretamente detectado com um anticorpo conjugado a uma molécula de detecção. A vantagem deste modelo é que a detecção é rápida, porém é menos específica comparada a outros testes de ELISA.

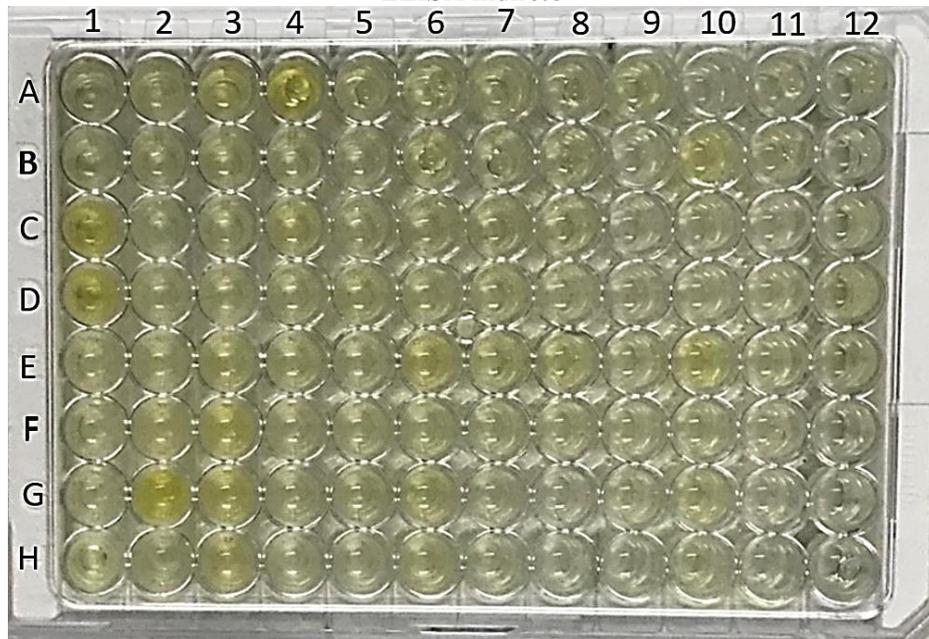
- ELISA indireto: a técnica é muito parecida à direta, porém o indireto requer dois anticorpos, um primário, que se liga ao antígeno específico, e outro secundário que se liga ao primeiro anticorpo e que contém a molécula de detecção. Essa técnica é mais sensível que o ELISA direto, porém, demanda mais tempo para sua realização.

- ELISA sanduíche: nessa técnica são utilizados dois anticorpos que se ligam a diferentes epítomos do antígeno. Esse modelo é denominado como “sanduíche”, pois o antígeno fica acoplado entre dois anticorpos de captura e detecção. O ELISA sanduíche é o mais sensível, porém geralmente seus custos são mais elevados e demanda mais tempo para a realização.

- ELISA competitivo: nessa técnica dois tipos de anticorpo, o da amostra e outro de referência poderão se ligar ao antígeno do teste. Quando não há a presença de anticorpos na amostra, o anticorpo de referência se liga ao antígeno, deixando a região com uma coloração mais intensa. Esse teste é o mais inespecífico, porém pode detectar antígenos pequenos (ABCAM, 2018; AYDIN, 2015; THERMO SCIENTIFIC, 2010).

Para a detecção de anticorpos contra o antígeno de SARS-CoV-2 em cães e gatos, foi utilizado um ensaio de ELISA indireto (ID-Screen[®] ELISA, SARS-CoV-2 Double Antigen Multi-species, IDvet, Chile) que detecta anticorpos contra a proteína N do SARS-CoV-2. Para isso, em uma placa de 96 poços de poliestireno revestidas com o antígeno, 25µL de tampão de diluição são aliqotados em todas as cavidades. Posteriormente, são adicionados 25µL de controle negativo nos poços A1 e B1, 25µL de controle positivo em C1 e D1, e nas outras cavidades coloca-se 25µL do soro de cada animal. A placa é incubada a 37°C por 45 minutos, afim de promover a interação antígeno-anticorpo. Após esse tempo, deve-se esvaziar as cavidades e rapidamente lavar com 300µL de solução de lavagem por 3 vezes consecutivas. Deve-se tomar cuidado para que as cavidades não se sequem, pois caso contrário, o resultado final pode apresentar alterações. Após, é adicionado 100 µL de tampão de conjugado (composto por um recombinante da proteína N purificada com peroxidase) e a placa é incubada a temperatura ambiente por 30 minutos. As placas são novamente esvaziadas e lavadas com 300 µL de tampão de lavagem por três vezes consecutivas. Posteriormente, a solução de substrato é adicionada após a última lavagem, fazendo com que os poços com anticorpos apresentem uma coloração azulada, por causa da oxidação de 2. A placa é incubada a temperatura ambiente por 20 minutos e adiciona-se 100µL de solução de parada às cavidades, fazendo os poços mudarem de cor para a coloração amarelada.

Figura 13 – Placa com 96 cavidades para detecção de anticorpos contra SARS-CoV-2 em ensaio de ELISA indireto



Legenda: Poços com coloração amarelada após adição de solução de parada.

Fonte: Do autor (2021)

Após a finalização do ensaio, a placa é levada para a realização de leitura de densidade óptica a 450nm no *Laboratorio de Inocuidad de los Alimentos* da Universidad de Chile. O leitor de microplaca utilizado é o ELx800™ (BioTek, USA) e os dados são lidos através do software Gen5 (BioTek). Para validação dos dados a média dos controles positivos deve apresentar uma densidade óptica maior ou igual a 0,35 e a média da relação entre controle positivo e negativo deve ser maior que 3,0. Para avaliar se as amostras são positivas ou negativas deve-se realizar uma razão percentual entre a amostra e controle positivo (S/P%). As amostras com o S/P% maiores ou iguais a 60% são consideradas positivas, as entre 50% e 60% são consideradas duvidosas e as menores de 50% são negativas.

Figura 14 – Leitor de densidade óptica para análise de teste de ELISA



Legenda: Leitor de microplaca utilizado foi o ELx800™ (BioTek, USA)

Fonte: Do autor (2021)

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A realização do estágio obrigatório supervisionado no LVA foi fundamental para a conclusão do curso de graduação em Medicina Veterinária, uma vez que proporcionou à estudante o desenvolvimento do pensamento crítico e crescimento acadêmico, profissional e pessoal. Durante esse período várias técnicas de diagnóstico de doenças infecciosas, de biologia celular e molecular foram aprimoradas e aprendidas. Dessa forma, foi possível aliar o conhecimento adquirido na graduação com as atividades realizadas no laboratório. Além disso, o estágio supervisionado possibilitou o contato com grandes profissionais da ciência e com diversas áreas de investigação, permitindo a obtenção de vastas oportunidades no campo científico.

5. REFERÊNCIAS

ABCAM. **ELISA guide: Everything you need to perform your ELISA experiments.** Cambridge: Abcam, 2018.

ALVARADO, R. **Estudiantes y académicos de FAVET en la Expedición Chilena Antártica 54.** Disponível em: <<http://www.veterinaria.uchile.cl/noticias/140796/estudiantes-y-academicos-de-favet-en-expedicion-chilena-antartica-54>>. Acesso em: 21 out. 2021.

ARIYAMA, N. et al. Avian orthoavulavirus 1 (Newcastle Disease virus) antibodies in five penguin species, Antarctic peninsula and Southern Patagonia. **Transboundary and Emerging**

Diseases, v. 1, p. 1–7, 15 fev. 2021.

AYDIN, S. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. **Peptides**, v. 72, p. 4–15, 13 mar. 2015.

BALASURIYA, U. B.; CAROSSINO, M. Reproductive effects of arteriviruses: equine arteritis virus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus infections. **Current Opinion in Virology**, v. 27, p. 57-70, 1 dez. 2017.

BARNARD, K. N. et al. Influenza A viruses serially passaged in different MDCK cell lines exhibit limited sequence variation across their genomes, with the exception of the hemagglutinin gene. **bioRxiv**, v. 1, p. 153, 23 fev. 2020.

BARRIGA, G. P. et al. Avian Influenza Virus H5 Strain with North American and Eurasian Lineage Genes in an Antarctic Penguin. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, n. 12, p. 2221–2223, 21 fev. 2016.

BRUNBORG, I. M.; MOLDAL, T.; JONASSEN, C. M. Quantitation of porcine circovirus type 2 isolated from serum/plasma and tissue samples of healthy pigs and pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome using a TaqMan-based real-time PCR. **Journal of Virological Methods**, v. 122, n. 2, p. 171–178, 15 dez. 2004.

BUTLER, J. E. et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS): An immune dysregulatory pandemic. **Immunologic Research**, v. 59, n. 1-3, p. 81-108, ago. 2014.

CEVIK, M. et al. Virology, transmission, and pathogenesis of SARS-CoV-2. **The BMJ**, v. 371, n. 3862, p. 1–6, 23 out. 2020.

CORREA-FIZ, F. et al. Porcine circovirus 2 (PCV2) population study in experimentally infected pigs developing PCV2-systemic disease or a subclinical infection. **Scientific Reports**, v. 10, n. 17747, p. 1–12, 1 dez. 2020.

COSTA, E. S.; ALVES, M. A. S. BIOLOGIA REPRODUTIVA E ECOLOGIA COMPORTAMENTAL DE SKUAS ANTÁRTICAS *Catharacta maccormicki* E C. lonnbergi*. **Oecologia brasiliensis**, v. 11, n. 1, p. 78–94, 2007.

CUI, J.; LI, F.; SHI, Z. L. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 3, p. 181–192, mar. 2019.

DOKLAND, T. The structural biology of PRRSV. **Virus Research**, v. 154, n. 1, p. 86–97, dez. 2010.

FIELDS, B. N. **Fields Virology**. 6. ed. Philadelphia: Wolters Kluwer, 2013. v. 1, p. 2583.

GAUDREAU, N. N. et al. SARS-CoV-2 infection, disease and transmission in domestic cats. **Emerging Microbes and Infections**, v. 9, n. 1, p. 2322–2332, 1 jan. 2020.

GAVA, D. et al. Structure analysis of capsid protein of Porcine circovirus type 2 from pigs with systemic disease. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, n. 2, p. 351–357, 1 abr. 2018.

GILLESPIE, J. et al. Porcine circovirus type 2 and porcine circovirus-associated disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 23, n. 6, p. 1151-1163, nov. 2009.

- GITTINS, O. et al. Serological and molecular surveys of influenza A viruses in Antarctic and sub-Antarctic wild birds. **Antarctic Science**, v. 32, n. 1, p. 1–6, 1 fev. 2020.
- GOGOI, P.; GANAR, K.; KUMAR, S. Avian Paramyxovirus: A Brief Review. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 64, n. 1, p. 53–67, 1 fev. 2017.
- GRAAF, M.; FOUCHIER, R. A. M. Role of receptor binding specificity in influenza A virus transmission and pathogenesis. **The EMBO Journal**, v. 33, n. 8, 16 abr. 2014.
- GREGERSEN, J. P. et al. Safety of MDCK cell culture-based influenza vaccines. **Future Microbiology**, v. 6, n. 2, p. 143–152, 2 mar. 2011.
- HARRISON, A. G.; LIN, T.; WANG, P. Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis. **Trends in Immunology**, v. 41, n. 12, p. 1100-1115, 14 out. 2020.
- HU, B. et al. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 3, p. 141-154, 6 out. 2020.
- HURT, A. C. et al. Detection of evolutionarily distinct avian influenza A viruses in Antarctica. **mBio**, v. 5, n. 3, p. 1–9, 6 maio 2014.
- JIN, J. H. et al. A set of RT-PCR assays for detection of all known avian paramyxoviruses and application in surveillance of avian paramyxoviruses in China. **PeerJ**, v. 9, n. 10748, p. 1–13, 4 mar. 2021.
- KADAM, S. B. et al. SARS-CoV-2, the pandemic coronavirus: Molecular and structural insights. **Journal of Basic Microbiology**, v. 61, n. 3, p. 180-202, 1 mar. 2021.
- KREUTZ, L. C. Síndrome reprodutiva e respiratória dos suínos: uma breve revisão. **Reprodução Animal**, v. 28, n. 1, p. 179-186, 1 mar. 1998.
- LAROCHELLE, R. E. et al. PCR Detection and Evidence of Shedding of Porcine Circovirus Type 2 in Boar Semen. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 12, p. 4629–4632, dez. 2000.
- LI, J. et al. Conformational Dynamics of Nonenveloped Circovirus Capsid to the Host Cell Receptor. **iScience**, v. 23, n. 10, p. 1–31, 23 out. 2020.
- LUNNEY, J. K. et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): Pathogenesis and interaction with the immune system. **Annual Review of Animal Biosciences**, v. 4, n. 1, p. 129-154, 15 fev. 2016.
- LURCHACHAIWONG, W. et al. Rapid detection and strain identification of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) by real-time RT-PCR. **Letters in Applied Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 55–60, jan. 2008.
- LYCETT, S. J.; DUCHATEL, F.; DIGARD, P. A brief history of bird flu. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 374, n. 1775, p. 1–15, 2019.
- MEDINA, R. A.; GARCÍA-SASTRE, A. Influenza A viruses: New research developments. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 590–603, ago. 2011.

- MENG, X. J. Porcine circovirus type 2 (PCV2): Pathogenesis and interaction with the immune system. **Annual Review of Animal Biosciences**, v. 1, n. 43, p. 43–64, 2013.
- MISINZO, G. et al. Porcine Circovirus 2 Uses Heparan Sulfate and Chondroitin Sulfate B Glycosaminoglycans as Receptors for Its Attachment to Host Cells. **Journal of Virology**, v. 80, n. 7, p. 3487–3494, abr. 2006.
- MOREIRA, J.; GARCIA, R. G. **ELETROFORESE**. Dissertação (Pós-Graduação em Zootecnia – Nutrição e Produção Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2002.
- MORESCO, K. A.; STALLKNECHT, D. E.; SWAYNE, D. E. Evaluation of different embryonating bird eggs and cell cultures for isolation efficiency of avian Influenza A Virus and Avian paramyxovirus serotype 1 from real-time reverse transcription polymerase chain reaction-positive wild bird surveillance samples. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 24, n. 3, p. 563–567, maio 2012.
- MOSTAFA, A. et al. Zoonotic potential of influenza A viruses: A comprehensive overview. **Viruses**, v. 10, n. 497, p. 2–38, 13 set. 2018.
- NEIRA, V. et al. Epidemiological investigations of the introduction of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Chile, 2013-2015. **PLoS ONE**, v. 12, n. 7, p. 1–15, 1 jul. 2017a.
- NEIRA, V. et al. Novel Avulaviruses in Penguins, Antarctica. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, n. 7, p. 1212–1215, 2 out. 2017b.
- NEIRA, V. et al. Genetic analysis of porcine circovirus type 2 from pigs affected with PMWS in Chile reveals intergenotypic recombination. **Virology Journal**, v. 14, n. 191, p. 1–7, 4 out. 2017c.
- NEIRA, V. et al. A household case evidences shorter shedding of SARS-CoV-2 in naturally infected cats compared to their human owners. **Emerging Microbes and Infections**, v. 10, n. 1, p. 376–383, 2021.
- NOVA, N. Cross-Species Transmission of Coronaviruses in Humans and Domestic Mammals, What Are the Ecological Mechanisms Driving Transmission, Spillover, and Disease Emergence? **Frontiers in Public Health**, v. 9, n. 1, p. 1–11, 30 set. 2021.
- NOVAKOVIC, P. et al. Relationships of CD163 and CD169 positive cell numbers in the endometrium and fetal placenta with type 2 PRRSV RNA concentration in fetal thymus. **Veterinary Research**, v. 47, n. 76, p. 1–10, 5 ago. 2016.
- OH, T. et al. A comparison of pathogenicity and virulence of three porcine circovirus type 2 (PCV2) genotypes (a, b, and d) in pigs singularly inoculated with PCV2 and dually inoculated with mycoplasma hyopneumoniae and pcv2. **Pathogens**, v. 10, n. 8, p. 1–12, 1 ago. 2021.
- OIE. Newcastle disease (Infection with Newcastle disease virus). *In*: OIE. **Terrestrial Manual 2021**. Paris, 2021. Disponível em: <<https://www.oie.int/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/terrestrial-manual-online-access/>>. Acesso em: 21 out. 2021.
- OLIVARES, F. et al. Novel penguin Avian avulaviruses 17, 18 and 19 are widely distributed in the Antarctic Peninsula. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 66, n. 6, p. 1–6, 1 nov.

2019.

PARK, C. et al. Comparison of porcine circovirus type 2 (PCV2)-associated lesions produced by co-infection between two genotypes of PCV2 and two genotypes of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. **Journal of General Virology**, v. 95, p. 2486–2494, 1 nov. 2014.

PENG, L. et al. Epidemic analysis of COVID-19 in China by dynamical modeling. **medRxiv**, v. 1, p. 1–18, 16 fev. 2020.

PILERI, E.; MATEU, E. Review on the transmission porcine reproductive and respiratory syndrome virus between pigs and farms and impact on vaccination. **Veterinary Research**, v. 47, n. 108, p. 1-13 , 28 out. 2016.

REYES, D. A.; ALVAREZ, M. J. P. **La industria porcina en Chile: oportunidades y desafíos para su sustentabilidad**. Producción sustentable, sustentabilidad, porcinos, producción porcina, desarrollo sustentable. Santiago, p. 1-14, 1 abr. 2019

ROWLAND, R. R. R. et al. Lymphoid tissue tropism of porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication during persistent infection of pigs originally exposed to virus in utero. **Veterinary Microbiology**, v. 96, n. 3, p. 219–235, 30 out. 2003.

SAG. **Informe PRRS**. Santiago, 2016. Disponível em: < [http://www.sag.cl/ambitos-de-accion/sanidad-animal/107/publicaciones?field_tema_otros_documentos_tid=2575&field_tipo_de_publicacion_tid=All&title=&field_fecha_otros_value\[value\]\[year\]=&items_per_page=All](http://www.sag.cl/ambitos-de-accion/sanidad-animal/107/publicaciones?field_tema_otros_documentos_tid=2575&field_tipo_de_publicacion_tid=All&title=&field_fecha_otros_value[value][year]=&items_per_page=All) >. Acesso em: 20 out. 2021.

SAG. **Informe sanidad animal Chile, año 2014**. Santiago, 2014. Disponível em: <https://www.sag.gob.cl/sites/default/files/situacion_sanitaria_animal_2014.pdf> Acesso em: 21 out. 2021.

SAG. **Informe segundo trimestre 2021: Vigilancia Sanitaria Porcina y Plan de Control y Erradicación del Síndrome Reproductivo Respiratorio Porcino**. Santiago, 2021. Disponível em: <https://www.sag.gob.cl/ambitos-de-accion/sindrome-reproductivo-y-respiratorio-porcino-prrs/2590/publicaciones?field_tema_otros_documentos_tid=All&field_tipo_de_publicacion_tid=All&field_fecha_otros_value%5Bvalue%5D%5Byear%5D=&title=Informe+S%C3%ADndrome+respiratorio+y+reproductivo+porcino+Trimestre&items_per_page=15> Acesso em: 21 out. 2021.

SALAJEGHEH-TAZERJI, S. et al. Transmission of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) to animals: An updated review. **Journal of Translational Medicine**, v. 18, n. 358, p. 1-11 , 21 set. 2020.

SEGALÉS, J. Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: Clinical signs, pathology and laboratory diagnosis. **Virus Research**, v. 164, n. 1-2, p. 10-19, mar. 2012.

SHI, J. et al. Susceptibility of ferrets, cats, dogs, and other domesticated animals to SARS-coronavirus 2. **Science**, v. 368, n. 6494, p. 1016–1020, 29 maio 2020.

SHI, M. et al. Molecular epidemiology of PRRSV: A phylogenetic perspective. **Virus**

Research, v. 154, n. 1-2, p. 7-17, 15 set. 2010.

SIDORENKO, Y.; REICHL, U. Structured model of influenza virus replication in MDCK cells. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 88, n. 1, p. 1–14, 5 out. 2004.

SIT, T. H. C. et al. Canine SARS-CoV-2 infection. **Nature**, v. 586, n. 7831, p. 776–778, 29 out. 2020.

SONG, Z. et al. From SARS to MERS, thrusting coronaviruses into the spotlight. **Viruses**, v. 11, n. 1, p. 59, 2019.

SPACKMAN, E. **Animal Influenza Virus**. 2. ed. Nova York: Humana, v. 1161, p. 439, 2014.

SU, C. M.; ROWLAND, R. R. R.; YOO, D. Recent Advances in PRRS Virus Receptors and the Targeting of Receptor-Ligand for Control. **Vaccines**, v. 9, n. 4, p. 354–369, 1 abr. 2021.

SUBBIAH, M. et al. Pathogenesis of two strains of Avian Paramyxovirus serotype 2, Yucaipa and Bangor, in chickens and turkeys. **Avian Diseases**, v. 54, n. 3, p. 1050–1057, 27 ago. 2010.

SZEWCZYK, B.; BIENKOWSKA-SZEWCZYK, K.; KRÓL, E. Introduction to molecular biology of influenza A viruses. **Acta Biochimica Polonica**, v. 61, n. 3, p. 397–401, 3 set. 2014.

TAKADA, K. et al. A humanized MDCK cell line for the efficient isolation and propagation of human influenza viruses. **Nature Microbiology**, v. 4, n. 8, p. 1268–1273, 29 abr. 2019.

THERMO SCIENTIFIC. **ELISA technical guide and protocols**. Rockford: Thermo Scientific. Disponível em: < <http://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/TR0065-ELISA-guide.pdf> >.

USDA. **Foreign Agricultural Service**. Disponível em: <<https://apps.fas.usda.gov/psdonline/app/index.html#/app/advQuery>>. Acesso em: 23 out. 2021.

WALLS, A. C. et al. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. **Cell**, v. 181, n. 2, p. 281–292, 16 abr. 2020.

WEI, R. et al. Changes on the viral capsid surface during the evolution of porcine circovirus type 2 (PCV2) from 2009 till 2018 may lead to a better receptor binding. **Virus Evolution**, v. 5, n. 2, p. 1–12, 1 jul. 2019.

WILLE, M. et al. Antarctic Penguins as Reservoirs of Diversity for Avian Avulaviruses. **Journal of Virology**, v. 93, n. 11, jun. 2019.

WU, F. et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. **Nature**, v. 579, n. 7798, p. 265–269, 12 mar. 2020.

ZANELLA, J. R. C. et al. Identificação do circovírus suíno tipo 2 por reação em cadeia da polimerase e por imunohistoquímica em tecidos suínos arquivados desde 1988 no Brasil. **Ciência Rural**, v. 36, n. 5, p. 1480–1485, 2006.

ZANELLA, R. C. Z.; MORÉS, N. **Circovirose Suína**. Concórdia: Embrapa, 2003.

ZHANG, Y. et al. Protective humoral immunity in SARS-CoV-2 infected pediatric patients. **Cellular and Molecular Immunology**. Cellular & Molecular Immunology, v. 17, n. 7, p. 768-770, 1 jul. 2020.

ZHU, N. et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 8, p. 727–733, 20 fev. 2020.