

Escola Superior de Ensino do Instituto Butantan
Programa de Pós-graduação *Lato Sensu*
Biotecnologia para Saúde - Vacinas e Biofármacos

Giovanni Andreu Leite

**Utilização de ensaios moleculares na detecção de vírus em serpentes dos
plantéis do Instituto Butantan**

São Paulo
2023

Giovanni Andreu Leite

**Utilização de ensaios moleculares na detecção de vírus em serpentes dos
plantéis do Instituto Butantan**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Especialização em Biotecnologia para Saúde - Vacinas e Biofármacos do Programa de Pós-graduação *Lato Sensu* da Escola Superior do Instituto Butantan como requisito básico para a obtenção do título de Especialista em Biotecnologia.

Orientador (a): Josana Kapronezai

São Paulo

2023

**Catálogo na Publicação
Instituto Butantan
Dados inseridos pelo(a) aluno(a)**

Leite, Giovanni Andreu

Utilização de ensaios moleculares na detecção de vírus em serpentes dos plantéis do Instituto Butantan / Giovanni Andreu Leite ; orientador(a) Josana Kapronezai - São Paulo, 2023.

42 p. : il.

Monografia (Especialização) - Escola Superior do Instituto Butantan, Especialização na Área da Saúde - Biotecnologia Para a Saúde - Vacinas e Biofármacos.

1. Virologia 2. Detecção. 3. Saúde animal. 4. Biologia molecular I. Kapronezai, Josana . II. Escola Superior do Instituto Butantan. III. Especialização na Área da Saúde - Biotecnologia Para a Saúde - Vacinas e Biofármacos. IV. Título.

AUTORIZAÇÃO PARA ACESSO E REPRODUÇÃO DE TRABALHO

Eu, Giovanni Andreu Leite, aluno do Curso de Especialização em Biotecnologia para Saúde - Vacinas e Biofármacos, autorizo a divulgação do meu trabalho de conclusão de curso por mídia impressa, eletrônica ou qualquer outra, assim como a reprodução total deste trabalho de conclusão de curso após publicação, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

Prazo de liberação da divulgação do trabalho de conclusão de curso após a data da avaliação:

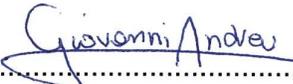
Imediato

06 meses

12 meses

Outro prazo _____ Justifique:

São Paulo, 09 de fevereiro de 2023


.....
aluno(a)

De acordo:.....
Orientador(a): 

Dedico este trabalho aos meus pais, pilares da minha formação como ser humano, sem eles, nenhuma das conquistas que celebrei até hoje seriam possíveis.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Ma. Josana Kapronezai pela paciência, gentileza, comprometimento e companhia durante o período em que trabalhamos juntos.

À Dra. Viviane Fongaro Botosso pelos ensinamentos e pelas oportunidades de crescimento.

Aos amigos que fiz durante o período do curso pelo apoio e agradável convivência.

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

Este trabalho teve apoio financeiro da FAPESP, número do processo 2019/12303-4.

Certificado pela CEUA do Instituto Butantan sob nº 2032060420.

RESUMO

LEITE, Giovanni Andreu. **Utilização de ensaios moleculares na detecção de vírus em serpentes dos plantéis do Instituto Butantan**. 2023. 42 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Biotecnologia) – Escola Superior do Instituto Butantan, São Paulo, 2023.

Vírus podem infectar e causar doenças em serpentes, ocasionando surtos em biotérios e conseqüente comprometimento na produção de veneno. Reptarenavírus foram identificados em casos de Doença do Corpúsculo de Inclusão, sendo apresentadas evidências substanciais sugerindo a relação causal do vírus com a doença, inclusive com a coinfeção de diferentes espécies de vírus em um mesmo animal. Chuviridae é uma família recentemente descoberta de vírus RNA de fita simples, de sentido negativo e de estrutura genômica variável, que infecta várias espécies de artrópodes, incluindo mosquitos. Este trabalho foi realizado como parte da implantação de metodologias de detecção e identificação de vírus em serpentes mantidas em cativeiro nos plantéis do Instituto Butantan, que visam a otimização e o aperfeiçoamento dos protocolos de manejo e conservação dos animais, além da possibilidade de identificação de novas espécies de vírus. As coletas de amostras foram realizadas in vivo e/ou post-mortem, considerando a situação clínica de cada animal e a critério do médico veterinário responsável pelo biotério. Após a extração dos ácidos nucleicos, a pesquisa de vírus foi realizada utilizando a amplificação de fragmentos do genoma viral por reação em cadeia da polimerase e sequenciamento de nucleotídeos pelo método de Sanger. As metodologias desenvolvidas neste trabalho foram eficazes na detecção de reptarenavírus e chuvírus em serpentes mantidas em cativeiro em plantéis do Instituto Butantan, o que demonstra a importância da implementação do diagnóstico de doenças virais na quarentena e no monitoramento sanitário dessas coleções.

Palavras-chave: Virologia. Detecção. Saúde animal. Serpentes. Cativeiro. Biologia molecular.

ABSTRACT

LEITE, Giovanni Andreu. **Use of molecular assays in detection of virus in captive snakes of Butantan Institute**. 2023. 42 p. Monograph (Specialist in Biotechnology) – Escola Superior do Instituto Butantan, São Paulo, 2023.

Viruses can infect and cause diseases in snakes, causing outbreaks in herds and hindering the production of venom. Reptarenavirus were identified in cases of Inclusion Body Disease, and substantial evidence was presented suggesting the causal relationship of the virus with the disease, including co-infection of different virus species in the same animal. Chuviridae is a recently discovered family of negative-sense, single-stranded RNA viruses of variable genomic structure that infect several species of arthropods, including mosquitoes. This work was carried out as part of the implementation of methodologies for detection and identification of viruses in snakes kept in captivity in the herds of Instituto Butantan, which aim to optimize and improve protocols for handling and conservation of animals, in addition to the possibility of identifying new virus species. Sample collections were performed in vivo and/or post-mortem, considering the clinical situation of each animal and at the discretion of the veterinarian responsible for the vivarium. After extracting the nucleic acids, virus research was performed using the amplification of viral genome fragments by polymerase chain reaction and nucleotide sequencing by the Sanger method. The methodologies developed in this work were effective in detecting reptarenavirus and chuvirus in snakes kept in captivity at Instituto Butantan, which demonstrates the importance of implementing the diagnosis of viral diseases in the quarantine and sanitary surveillance of these collections.

Keywords: Virology. Detection. Animal health. Snakes. Captive. Molecular biology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Animal apresentando sintomatologia neurológica sugestiva de DCI.....	14
Figura 2 - Gel de agarose da eletroforese dos produtos da PCR para reptarenavírus	27
Figura 3 - Gel de agarose da eletroforese dos produtos da PCR para chuvírus	34
Figura 4 - Página do Blast mostrando a porcentagem de identificação com outras sequências do banco. Resultado para o sequenciamento do reptarenavírus.....	36
Figura 5 - Dendograma mostrando a distância entre as sequências encontradas e as depositadas no Blast.....	37
Figura 6 - Página do Blast mostrando a porcentagem de identificação com outras sequências do banco. Resultado para o sequenciamento do chuvírus.....	38
Figura 7 - Dendograma comparando a distância entre as sequências enviadas e as sequências do banco de dados.....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Primers utilizados para detecção de reptarenavírus	21
Tabela 2 - Primers utilizados para detecção de chuvírus.....	22
Tabela 3 - Primers utilizados na amplificação do gene de referência	23
Tabela 4 - Resultados dos testes para detecção de reptarenavírus nas amostras coletadas in vivo.....	27
Tabela 5 - Resultados dos testes para detecção de reptarenavírus em amostras coletadas em necropsias.....	33
Tabela 6 - Resultados dos testes para detecção de chuvírus das amostras coletadas em necropsias	35

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	18
2.1 Geral	18
2.2 Específicos	18
3 METODOLOGIA	19
3.1 População analisada	19
3.2 Coleta de amostras	19
3.3 Processamento das amostras	19
3.3.1 Swabs	20
3.3.2 Lavado traqueal.....	20
3.3.3 Fezes	20
3.3.4 Fragmentos de tecidos e órgãos	20
3.4 Extração de ácidos nucleicos	20
3.5 Síntese de cDNA	21
3.6 Reação em cadeia pela polimerase (PCR)	21
3.6.1 Amplificação de fragmento do Segmento L de reptarenavírus.....	21
3.6.2 Amplificação de fragmento da região da RNAPol de chuvírus	22
3.6.3 Amplificação de fragmento constitutivo do genoma hospedeiro.....	23
3.6.4 Eletroforese horizontal em gel de agarose	23
3.7 Sequenciamento genético	24
3.7.1 Purificação dos produtos da PCR.....	24
3.7.2 Reação de Sequenciamento	24
3.7.3 Purificação da Reação de Sequenciamento.....	24
3.7.4 Corrida eletroforética e análise das sequências obtidas	24
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4.1 Detecção de reptarenavírus pela reação em cadeia da polimerase	27
4.2 Detecção de chuvírus pela reação em cadeia da polimerase	34
4.3 Sequenciamento genético dos <i>amplicons</i> de <i>Reptarenavirus</i>	36
4.4 Sequenciamento genético dos <i>amplicons</i> de <i>Chuvirus</i>	37
5 CONCLUSÃO	39
REFERÊNCIAS	40

1 INTRODUÇÃO

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que ocorrem cerca de 5 milhões de picadas de serpentes anualmente, resultando em até 2,7 milhões de envenenamentos, com 81.000 a 138.000 mortes por ano, além de cerca de 400.000 amputações ou outro tipo de dano físico permanente, revelando alta morbidade e profundo impacto econômico. Devido à grande importância para a saúde pública, em março de 2007, as imunoglobulinas antivenenos de serpentes foram incluídas na Lista de Medicamentos Essenciais da OMS, que lançou, no ano subsequente a primeira edição do guia para sua produção, controle e regulamentação, incluindo instruções para o manejo e manutenção dos animais (WHO, 2013).

A manutenção de serpentes em cativeiro é necessária para a obtenção de veneno, que é imprescindível para a produção de antivenenos e estudos de bioprospecção e toxinologia (COSTA et al., 2005). Considerando as boas práticas de fabricação de produtos farmacêuticos, a qualidade do veneno, insumo inicial do processo de produção, deve ser assegurada e para isso, o controle sanitário das serpentes é mandatório.

O Instituto Butantan, como uma das principais instituições responsáveis pela produção de soros antiveneno no país, mantém em seus biotérios serpentes dos gêneros que mais comumente causam acidentes ofídicos e que são utilizadas rotineiramente para a extração de veneno. Atualmente o biotério de serpentes conta com cerca de 1000 serpentes dos gêneros *Bothrops* (jararaca, jararacuçu, urutu etc.), *Crotalus* (cascavel), *Micrurus* (corais-verdadeiras) e *Lachesis* (surucucu-pico-de-jaca). O veneno destas serpentes torna possível a produção de mais de 270.000 ampolas antiveneno ofídico ao ano, sendo a instituição, o único produtor nacional de antivenenos contra acidentes de *Lachesis* e *Micrurus*.

No biotério responsável pelo fornecimento de venenos para o centro de produção, as serpentes são mantidas em caixas plásticas individuais e o manejo, desde a entrada dos animais, prevê uma série de medidas profiláticas internas visando evitar a entrada e disseminação de patógenos no plantel. As serpentes passam por duas quarentenas, sendo realizados testes parasitológicos e microbiológicos a fim de detectar a presença de possíveis parasitas ou patógenos.

O Laboratório de Ecologia e Evolução do Instituto Butantan atua nas áreas de história natural, biodiversidade, conservação, ecologia e evolução sendo responsável

pela manutenção do serpentário de exposição do Instituto e de biotérios que fazem parte de programas de conservação, como da serpente Jararaca-Ilhoa (*Bothrops insularis*) cuja população vem declinando vertiginosamente nos últimos anos e é considerada criticamente ameaçada (CR) segundo as listas do Estado de São Paulo (Decreto Estadual nº 53.494/2008) e nacional (MACHADO; MARTINS; DRUMMOND, 2005; ICMBIO, 2018).

Além da pesquisa e produção de soros, a instituição contribui para a difusão do conhecimento através de diversas atividades disponíveis à população como visitação ao serpentário e exposição zoológica viva do Museu Biológico. A manutenção adequada das serpentes pertencentes aos biotérios da instituição é imprescindível, não apenas para a produção de produtos biofarmacêuticos, mas também para a pesquisa básica e para a preservação das espécies.

A aquisição de répteis, tanto originários de reprodução em cativeiro quanto da natureza, representa um alto risco de introdução de doenças em uma coleção, sendo que a testagem de rotina e o tratamento realizado por um veterinário hábil podem contribuir grandemente para a taxa de sobrevivência desses animais (PASMANS et al., 2008). A pesquisa em doenças infecciosas, não infecciosas e parasitárias que afetam serpentes mantidas em cativeiro representa um assunto de importância, uma vez que serve de ponto de partida para melhorar as condições de saúde das serpentes e otimizar a produção de veneno (IB, 2011).

A virologia em répteis foi impulsionada por estudos que sugeriram que esses animais podem ser reservatórios naturais de arbovírus, como flavivírus e togavírus, que acometem humanos, outros mamíferos e aves e que podem ter importante papel na epidemiologia destes vírus. Além desses, foram descritos na literatura outros vírus que podem infectar e causar doenças em serpentes, ocasionando surtos em biotérios e conseqüente comprometimento na produção de veneno. Dentre os principais destacam-se paramixovírus, herpesvírus, adenovírus, nidovírus, retrovírus, reovírus, picornavírus e iridovírus (LATNEY; WELLEHAN, 2020; MARSCHANG, 2011; SOLIS et al., 2017).

A doença do corpúsculo de inclusão (DCI) foi identificada primeiramente em pítons, há mais de 40 anos, contudo, apenas nos anos 1990 tornou-se uma doença de importância em serpentes em cativeiro pelo mundo. É uma doença infecciosa que pode causar tanto uma doença de caráter crônico quanto agudo em serpentes pertencendo à família *Boidae* e *Pythonidae* (ABBA et al., 2016). É caracterizada pela

formação de inclusões intracitoplasmáticas proteicas em neurônios e em células epiteliais de vários órgãos. Geralmente afeta boídeos, mas já foi descrita em *Bothriechis marchi* e *Lampropeltis getuls* (MARSCHANG, 2011). Ocorre esporadicamente em colubrídeos e viperídeos, mas não está claro se a DCI em não boídeos possui a mesma etiologia (FLEMING et al., 2003; RAYMOND et al., 2001). Os sinais são muito variáveis, incluindo desde regurgitação seguida de anorexia a sintomas neurológicos como incoordenação, desorientação, tremores de cabeça, letargia e morte. Foram descritos também sarcomas cutâneos indiferenciados, desordens linfoproliferativas, leucemia e em alguns casos pneumonia e estomatite, muitas vezes associadas a infecções bacterianas secundárias (STENGLEIN et al., 2017). Animais apresentando corpúsculos de inclusão em vários tecidos, mas sem sinais clínicos de doença aparente têm sido descritos, particularmente em boídeos. A sintomatologia em pítons e jibóias, portanto, pode variar bastante, sendo geralmente mais severa em pítons, com sintomas neurológicos mais proeminentes (STENGLEIN et al., 2017). A doença é fatal e pode causar grandes danos em biotérios (PASMANS et al., 2008).

Figura 1 - Animal apresentando sintomatologia neurológica sugestiva de DCI



Fonte: KAPRONEZAI, 2018.

Inicialmente os retrovírus foram associados como possíveis causadores da doença do corpúsculo de inclusão; contudo, retrovírus endógenos foram detectados em *Boa constrictor* dificultando a conexão definitiva entre os retrovírus encontrados em serpentes com DCI positivo e a doença (MARSCHANG, 2011). Além disso, em um estudo sobre a transmissão da doença duas serpentes foram inoculadas com um retrovírus isolado de uma serpente DCI positiva e desenvolveram os sinais clínicos da doença em oito dias, mas sem haver o reisolamento do vírus destas. Em outro estudo,

quatro jibóias não infectadas receberam inoculações de homogenatos de fígado de uma serpente com DCI e dez semanas após a inoculação apareceram corpúsculos de inclusão, sem haver o desenvolvimento da doença (MARSCHANG, 2011).

O envolvimento de outra espécie viral à doença DCI foi descrita por Abba (2016), que isolou e identificou o vírus pertencente ao gênero *Reptarenavirus* em tecidos de boídeos. A partir deste relato, novas pesquisas foram geradas comprovando a evidência da relação causal do vírus com a doença DCI (STENGLEIN et al., 2012, 2017) e de possível coinfeção de diferentes espécies virais no mesmo animal, por sequenciamento de nova geração (HEPOJOKI et al., 2015). Os dados gerados permitiram a classificação de 5 espécies do gênero *Reptarenavirus* (ICTV, 2021).

A infecção experimental de camundongos com reptarenavírus mostrou evidências de propagação viral, mas sem manifestação de sinais clínicos nos roedores, sugerindo que eles podem servir como reservatório para o vírus (ABBA et al., 2017; UCCELLINI et al., 2014).

Chuviridae é uma família recentemente descoberta de vírus RNA de fita simples e de sentido negativo. A informação disponível sobre esta família limita-se à sua distribuição (provavelmente infecta várias espécies de artrópodes incluindo mosquitos) e à sua estrutura genômica variável, não segmentada, bissegmentada e circular (SHI et al., 2018). A maioria dos chuvírus foi descoberta no curso médio e inferior do rio Yangzi região, que era chamada de Chu na China antiga (GONG et al., 2015; HAN et al., 2020).

No Brasil, Argenta et al. (2020) descreveram o vírus em três animais originários da região amazônica.

A detecção e o estudo de vírus em répteis contam com uma ampla gama de ferramentas, incluindo desde métodos clássicos em virologia tais como cultura de células, bem como métodos moleculares, incluindo PCR e sequenciamento (MARSCHANG, 2011).

Algumas dessas ferramentas foram utilizadas no presente trabalho com a finalidade de identificar os agentes etiológicos das doenças apresentadas pelos animais dos serpentários do Instituto Butantan.

A implantação de metodologias de detecção e identificação de vírus em serpentes mantidas em cativeiro nos plantéis do Instituto Butantan, visa a otimização

e o aperfeiçoamento dos protocolos de manejo e conservação dos animais, além da possibilidade de identificação de novas espécies de vírus.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Este estudo objetivou a continuidade dos trabalhos de pesquisa de vírus em serpentes mantidas em cativeiro nos biotérios do Instituto Butantan, realizados no Laboratório de Virologia, baseando-se na implantação de diferentes metodologias para a detecção, identificação e caracterização dos vírus que podem acometer esses animais.

2.2 Específicos

a) Estabelecer a metodologia necessária para a eficiente detecção dos principais grupos de vírus que podem acometer as serpentes;

b) Otimizar a metodologia de detecção para os principais grupos de vírus encontrados, definindo os tipos de amostras a serem coletadas;

c) Caracterizar geneticamente, através do sequenciamento de nucleotídeos pelo método de Sanger, os vírus detectados nos testes de PCR;

d) Contribuir para a elaboração e implementação de protocolos de manejo sanitário e epidemiológico nos biotérios.

3 METODOLOGIA

3.1 População analisada

Os animais estudados pertencem ao plantel dos biotérios do Laboratório de Ecologia e Evolução (LEEV) e Museu Biológico.

3.2 Coleta de amostras

As coletas de amostras foram realizadas *in vivo* e/ou *post-mortem*, considerando a situação clínica de cada animal e a critério do médico veterinário responsável pelo biotério, antes e depois do período de início deste trabalho.

Na coleta de amostras realizada após o óbito decorrente da evolução do quadro ou da eutanásia do animal, foram coletados fragmentos de órgãos e tecidos utilizando materiais cirúrgicos (pinças, tesouras e ou bisturis) estéreis e exclusivos para cada amostra coletada.

Nos animais vivos, foram coletados *swabs* das mucosas oral e cloacal, lavado traqueal e sangue. Para a coleta dos *swabs* e do lavado traqueal foi utilizada solução salina estéril. A quantidade de solução a ser infundida na traquéia foi calculada de acordo com o peso do animal e o volume recuperado acondicionado em tubos do tipo Falcon, estéreis e livres de nucleases. O sangue foi coletado através da punção direta da veia caudal, sendo imediatamente transferido para microtubos de coleta com gel separador e ativador de coágulo (Vacuplast).

As fezes eliminadas pelos animais e encontradas pelos bioteristas nas caixas de contenção também foram coletadas para análise em tubos do tipo Falcon de 50 mL, estéreis e livres de nucleases.

A coleta dos *swabs* foi realizada sob a supervisão de um médico veterinário, sendo o mesmo responsável pela realização das coletas de sangue e dos lavados traqueais.

As amostras armazenadas a -80°C, foram acondicionadas em criotubos contendo 0,5 mL de meio de transporte viral (Viral Transport Media - VTM) ou TRIzol® (Invitrogen); para amostras processadas imediatamente após a coleta, foram utilizados tubos do tipo Eppendorf de 1,5 mL contendo 1 mL de PBS (Phosphate Saline Buffer) pH 7,4, ambos estéreis e livres de nucleases.

3.3 Processamento das amostras

As amostras foram preparadas de acordo com suas características e particularidades.

3.3.1 Swabs

Os tubos contendo o *swab* imerso em 1 mL de VTM (descongelados em banho de gelo) ou PBS pH 7,4 (mantidos em gelo e processados imediatamente após a coleta) foram homogeneizados em agitador de tubos do tipo vórtex por 3 minutos. Após a homogeneização, a extração foi realizada partindo de 200 µL do sobrenadante.

3.3.2 Lavado traqueal

O lavado traqueal foi homogeneizado em agitador de tubos do tipo vórtex e posteriormente centrifugado a 5.000 rpm por 10 minutos, sendo utilizados 200 µL do sobrenadante para o prosseguimento do protocolo de extração de ácidos nucleicos.

3.3.3 Fezes

Uma alíquota de 0,2 a 0,3 g de fezes foi transferida para um tubo tipo Eppendorf de 1,5 mL; foi adicionado 1 mL de PBS pH 7,4 e o tubo foi vigorosamente homogeneizado por 3 minutos. Foi realizada a centrifugação a 15.000 x g por 1 minuto e 200 µL do sobrenadante foi utilizado para a extração.

3.3.4 Fragmentos de tecidos e órgãos

Para a disrupção dos órgãos e tecidos, os criotubos contendo as amostras foram descongelados em banho de gelo; uma alíquota de aproximadamente 25 mg foi colocada em um tubo contendo uma *bead* de aço inoxidável de 5 mm de diâmetro (Qiagen) e 1 mL de PBS pH 7,4. A disrupção das amostras foi realizada utilizando o equipamento TissueLyser II (Qiagen) por 4 minutos a 30 Hz. Após a disrupção, as amostras foram centrifugadas a 1000 x g por 1 minuto, a 8°C. O protocolo seguiu com a utilização de 100 µL do sobrenadante.

3.4 Extração de ácidos nucleicos

Para a extração dos ácidos nucleicos foi utilizado o kit MagMAX™ CORE Nucleic Acid Purification Kit (Applied Biosystems™, A32700).

De acordo com o tipo de amostra, a extração foi realizada seguindo-se o protocolo de extração indicado: as amostras de *swabs*, soro, sangue total, tecidos e

órgãos foram extraídas usando-se o protocolo simples e as amostras de fezes, o protocolo complexo, conforme as instruções do fabricante do *kit*. Os ácidos nucleicos extraídos renderam 90 µL de material de cada amostra e foram acondicionados em microtubos livres de nucleases e armazenados a -20°C.

3.5 Síntese de cDNA

Após a obtenção do RNA viral, a transcrição reversa para DNA complementar foi realizada utilizando o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems™), que contém: solução de dNTP 25X (100mM), solução de random primers 10X, tampão de reação 10X e enzima transcriptase reversa MultiScribe, de acordo com as instruções do fabricante.

Para uma reação com volume final de 40 µL, foram utilizados 1,6 µL de solução de dNTP 25x (100mM), 4 µL de tampão de reação 10x, 4 µL da solução Random Primers 10x, 2 µL da enzima transcriptase reversa MultiScribe, 8,4 µL de água livre de nucleases, e 20 µL de RNA extraído. As amostras foram levadas ao termociclador Veriti™ (Applied Biosystems™), sob as seguintes condições: 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos e 85°C por 5 minutos, mantendo 4°C ao final das etapas.

3.6 Reação em cadeia pela polimerase (PCR)

Considerando o histórico e os sinais apresentados pelo animal, a pesquisa de vírus foi realizada utilizando a amplificação de fragmentos do genoma viral por reação em cadeia da polimerase (PCR).

3.6.1 Amplificação de fragmento do Segmento L de reptarenavírus

Para a detecção de reptarenavírus foi utilizada uma PCR com *primers* direcionados para uma região de 821 pb do segmento L do vírus (Tabela 1).

Tabela 1 - *Primers* utilizados para detecção de reptarenavírus

<i>Primer</i>	Sequência do <i>primer</i> (5' → 3')	Tamanho do produto (pb)	Referência
CON-F1 (senso)	"TTGAATCCAGCCCACAGTAATA"	821	ABBA et al. (2016)
CON-R1 (anti-senso)	"GAGCCGATACTAGCAGACTTTC"		

Fonte: próprio autor, 2022.

Legenda: Tabela contendo informações sobre os primers utilizados para detecção de reptarenavírus,

Para a amplificação, 2,5 µL do cDNA foi adicionado à solução mix de PCR, composta por 1X PCR Buffer (Invitrogen™), 0,2 mM de cada dNTP (Invitrogen™), 10 mM de cada primer (senso e anti-senso), 1,5 mM de MgCl₂, 1,25 U de Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen™) e água livre de nucleases q.s.p. 25 µL. Em um termociclador, modelo Veriti™ (Applied Biosystems™), a solução preparada foi submetida a 95°C por 4 minutos para a desnaturação inicial da fita dupla de cDNA, seguida de 40 ciclos de 95°C por 30 segundos, 53,5 °C por 30 segundos e 72°C por 50 segundos, finalizando a 72°C por 5 minutos para a extensão final e sendo mantida a 4°C até a retirada do equipamento.

3.6.2 Amplificação de fragmento da região da RNAPol de chuvírus

Para detecção de chuvírus foi utilizada uma PCR com *primers* direcionados para uma região de 330 pb da RNAPol do vírus, desenhados a partir de sequências obtidas pelo sequenciamento de nova geração de algumas amostras, realizado em parceria com a equipe de bioinformática do Hospital Israelita Albert Einstein (Tabela 2).

Tabela 2 - *Primers* utilizados para detecção de chuvírus

<i>Primer</i>	Sequência do <i>primer</i> (5'→ 3')	Tamanho do produto (pb)	Referência
CHUV-Fwd1 (senso)	“AGGACAAGGTTTCATGGCATCAT”	330	NA
CHUV-Rev1 (anti-senso)	“ACAGCTGATACCGTTGTTACGT”		

Fonte: próprio autor, 2022.

Legenda: Tabela contendo informações sobre os primers utilizados para detecção de chuvírus,

Para a amplificação, 2,5 µL do cDNA foi adicionado à solução “mix” de PCR, composta por 1X PCR Buffer (Invitrogen™), 0,2 mM de cada dNTP (Invitrogen™), 10mM de cada primer (senso e anti-senso), 1,5 mM de MgCl₂, 1,25 U de Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen™) e água livre de nucleases q.s.p. 25 µL. Em um termociclador, modelo Veriti™ (Applied Biosystems™), a solução preparada foi submetida a 95°C por 4 minutos para a desnaturação inicial da fita dupla de cDNA, seguida de 40 ciclos de 95°C por 1 minuto, 58 °C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, finalizando a 72°C por 5 minutos para a extensão final e ao completar as etapas, a 4°C até a retirada do equipamento.

3.6.3 Amplificação de fragmento constitutivo do genoma hospedeiro

As amostras foram submetidas à PCR para amplificação do gene da beta-actina (ACTB) com a finalidade de validar a eficiência do método de extração de ácidos nucleicos, uma vez que é um gene constitutivo que está presente em todas as células animais, além de avaliar a presença de possíveis inibidores da PCR (CAMARGOS et al., 2008). Foram utilizados *primers* específicos para o gene da beta-actina, como gene de referência para as serpentes (Tabela 3).

Tabela 3 - *Primers* utilizados na amplificação do gene de referência

<i>Primer</i>	Sequência dos <i>primers</i>
ACTB-F (senso)	“CAGCACTGGCTCCCAGCACA”
ACTB-R (anti-senso)	“CAGAGTATTTGCGCTCAGGAGGAGC”

Fonte: BASTOS, 2012.

Legenda: Tabela contendo informações sobre os *primers* utilizados na amplificação do fragmento constitutivo como método de validação.

Para a amplificação, 2,5 µL do cDNA foi adicionado à 22,5 µL de solução de PCR pronta para uso, PCR SuperMix (Invitrogen™). A extensão foi realizada em termociclador, modelo Veriti™ (Applied Biosystems™), a solução preparada foi submetida a 95°C por 4 minutos para a desnaturação inicial da fita dupla de DNA, seguida de 40 ciclos de 95°C por 1 minuto, 60 °C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, finalizando a 72°C por 5 minutos para a extensão final e ao completar as etapas, a 4°C até a retirada do equipamento.

3.6.4 Eletroforese horizontal em gel de agarose

A visualização dos produtos amplificados pela PCR foi realizada utilizando a eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,2% em tampão TBE (45 mM Tris-Borato e 1 mM EDTA, pH 8), adicionando o intercalante GelRed® Nucleic Acid Gel Stain (Biotium) a uma concentração final de 1x diretamente na agarose fundida. Após a polimerização, o gel foi colocado na cuba de eletroforese horizontal e coberto com o tampão de corrida TBE (Tris-Borato EDTA). Cinco microlitros de cada produto da PCR foram adicionados a 2 µL de BlueJuice™ Gel Loading Buffer 10X (Invitrogen™), sendo então aplicados no gel e submetidos à eletroforese a 100 V durante aproximadamente

60 minutos. A visualização e documentação do gel foi realizada sob luz ultravioleta utilizando o fotodocumentador BioDoc-it (UVP).

3.7 Sequenciamento genético

As amostras que apresentaram bandas do tamanho esperado formadas no gel de agarose, foram submetidas ao sequenciamento de nucleotídeos pelo método de Sanger.

3.7.1 Purificação dos produtos da PCR

Os fragmentos amplificados na reação em cadeia da polimerase foram purificados utilizando o reagente ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent (Applied Biosystems™) para a eliminação dos reagentes excedentes das etapas anteriores.

Cinco microlitros dos produtos da PCR foram adicionados a microtubos contendo 2 µL do reagente enzimático ExoSAP-IT™, sendo submetidos a 37°C por 15 minutos, 80°C por 15 minutos e 4°C até a retirada do termociclador. Posteriormente, o volume obtido foi diluído com 43 µL de água livre de nucleases para cada tubo de reação.

3.7.2 Reação de Sequenciamento

Para a reação de sequenciamento foi utilizado o *kit* BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems™), segundo instruções do fabricante: para cada 5µL de amostra proveniente da reação de purificação foram utilizados 2µL do tampão de reação 5x e 2µL do reagente BigDye™ Terminator v3.1. Ao *mix* da reação foram acrescentados, em tubos separados, 1 µL de *primer* senso ou anti-senso a 10 pmol/µL. A extensão enzimática foi realizada em um termociclador, modelo Veriti™ e iniciou a 96°C por 1 minuto, para a desnaturação inicial da dupla fita de DNA, seguida de 30 ciclos de 96°C por 15 segundos, para a desnaturação, 50°C por 15 segundos, para o anelamento dos *primers* e 60°C por 15 segundos, para a extensão do fragmento. Após a finalização dos ciclos, o equipamento foi programado para permanecer a 4°C até a retirada dos tubos.

3.7.3 Purificação da Reação de Sequenciamento

Para a retirada de impurezas e excesso de dideoxynucleotídeos terminadores não incorporados aos fragmentos formados na reação de sequenciamento, foi realizada a purificação utilizando o *kit* BigDye XTerminator™ Purification Kit (Applied Biosystems™), seguindo as recomendações do fabricante.

Foram adicionados 45 µL do tampão de reação SAM Solution e 10 µL do reagente X-Terminator™ em cada tubo contendo os 10 µL resultantes da reação de sequenciamento, mantendo-os sob agitação à temperatura ambiente, protegidos da luz, no agitador MixMate® (Eppendorf) a 2500 rpm por 30 minutos. Os microtubos foram centrifugados a 1000 rpm por 2 minutos e 20 µL do sobrenadante foram transferidos para uma placa MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystems™), armazenada sob refrigeração de 2 a 8°C e protegida da luz até o momento da corrida no analisador genético.

3.7.4 Corrida eletroforética e análise das sequências obtidas

A corrida eletroforética das amostras purificadas foi realizada utilizando o analisador genético automático ABI PRISM modelo 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems™), em polímero POP-7™ (Applied Biosystems™) e utilizando os parâmetros de tempo e voltagem pré-programados, adequados para o tamanho de cada fragmento.

Os dados gerados foram analisados com a utilização do programa SeqManPro™, - DNASTar® versão 15.3.0(66).422, EUA, para obter a sequência consenso de cada amostra a partir do alinhamento das sequências senso e anti-senso de cada fragmento. As sequências resultantes foram submetidas ao Blast® (ZHANG et al., 2000) para a confirmação das identidades dos fragmentos amplificados através da comparação de bases entre as sequências consenso obtidas e os genomas depositados nos bancos de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No período de 19/05/2022 a 21/12/2022 foram coletadas 145 amostras *in vivo*, como parte do programa de monitoramento da presença de vírus em plantéis do Instituto Butantan. Considerando as características individuais dos animais e de acordo com a possibilidade, foram coletados swabs orais, swabs cloacais, fezes, lavados traqueais e sangue. Os animais incluídos na amostragem pertencem aos biotérios do Laboratório de Ecologia e Evolução e do Museu Biológico, sendo 30 *Boa constrictor constrictor*, 1 *Boa constrictor amarali*, 2 *Python bivittatus*, 3 *Epicrates cenchria* e 3 colubrídeos da espécie *Pantherophis guttatus*, totalizando 39 animais.

As coletas de amostras *in vivo* foram realizadas a fim de atender ao programa de monitoramento da presença de reptarenavírus e chuvírus, estabelecido em virtude da detecção anterior de animais contaminados com esses vírus nesses biotérios. Todos os procedimentos relacionados à manipulação dos animais e à coleta de amostras foram realizados sob supervisão de um médico veterinário, priorizando o bem-estar dos animais.

Considerando que este trabalho está inserido no contexto de uma das linhas de pesquisa desenvolvidas no Laboratório de Virologia, também foram objeto de estudo amostras coletadas anteriormente, tanto *in vivo* quanto *post-mortem*, a partir de animais de espécies variadas. Além das 145 amostras coletadas de 39 animais testados *in vivo*, foram incluídas nos testes de PCR para reptarenavírus 83 amostras de fragmentos de órgãos e fluidos biológicos, coletadas nas necropsias de 4 *Boa constrictor constrictor* e 1 *Boa constrictor amarali*, totalizando 228 amostras e 44 animais avaliados.

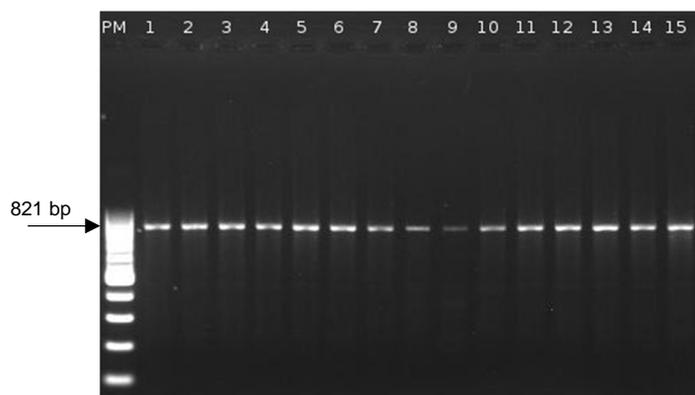
O processamento das amostras foi realizado no Laboratório de Virologia, atendendo às normas de boas práticas de laboratório, dentro do conceito de qualidade ao qual está inserido.

Foi realizada a extração de ácidos nucleicos de 228 amostras, que previamente aos testes de detecção para cada vírus, foram submetidas à PCR para o gene da beta-actina (ACTB) com a finalidade de verificar a eficiência do método de extração e a presença de possíveis inibidores da PCR, em consonância com o preconizado por Camargos et al. (2008). A amplificação do fragmento do gene da beta-actina pôde ser observada em 100% das amostras analisadas, indicando a eficiência do processo de extração.

4.1 Detecção de reptarenavírus pela reação em cadeia da polimerase

Um total de 228 amostras foram submetidas ao teste de PCR para detecção de reptarenavírus. Após a corrida eletroforética, os produtos amplificados pela PCR que revelaram bandas no gel na altura referente ao tamanho de 821 pares de bases (Figura 2) foram sequenciados pelo método de Sanger, para confirmação do diagnóstico.

Figura 2 - Gel de agarose da eletroforese dos produtos da PCR para reptarenavírus



Fonte: KAPRONEZAI, 2021.

Legenda: Eletroforese em gel de agarose 1,2% corado com GelRed, dos produtos resultantes da amplificação do fragmento L de reptarenavírus por PCR, utilizando primers específicos dirigidos para essa região do genoma. Canaleta PM: peso molecular de 100 pares de base (BioTools). Canaleta 1 a 15: amplificação dos fragmentos da região L do genoma de reptarenavírus.

Com a utilização da PCR para a amplificação de um fragmento específico do segmento L do vírus, foi possível detectar o reptarenavírus em 38,6% do total de amostras (88/228), em 6 (13,64%) dos 44 animais testados.

O estudo realizado por Simard et al. (2020), encontrou prevalência de DCI em 19,2% dos animais estudados, com incidência particularmente alta em *Boa constrictor* (34%), o que corrobora com os resultados encontrados neste estudo, com relação à espécie mais acometida pelo reptarenavírus.

Tabela 4 - Resultados dos testes para detecção de reptarenavírus nas amostras coletadas in vivo

Identificador	Espécie	Data da coleta	Amostras positivas para <i>Reptarenavirus</i>	Amostras negativas para <i>Reptarenavirus</i>	Total de amostras

Animal 1	<i>Python Bivitattus</i>	19/05/2022	-	swab oral, swab cloacal	2
Animal 2	<i>Python Bivitattus</i>	19/05/2022	-	swab oral, swab cloacal	2
Animal 3	<i>Boa constrictor constrictor</i>	19/05/2022	-	swab oral, swab cloacal	2
Animal 4	<i>Boa constrictor constrictor</i>	19/05/2022	-	swab oral, swab cloacal	2
Animal 5	<i>Boa constrictor amarali</i>	19/05/2022	-	swab oral, swab cloacal, sangue + linfa, sangue total	5
		24/05/2022		fezes	
Animal 6	<i>Boa constrictor constrictor</i>	08/06/2022	-	swab oral, swab cloacal, fezes	6
		22/07/2022		fezes	
		22/08/2022		fezes	
		10/11/2022		fezes	
Animal 7	<i>Boa constrictor constrictor</i>	09/06/2022	-	swab oral, swab cloacal	7
		11/07/2022		swab oral, swab cloacal	
		25/07/2022		fezes	
		10/10/2022		swab oral, swab cloacal	
Animal 8	<i>Boa constrictor constrictor</i>	09/06/2022	-	swab oral, swab cloacal	5
		11/07/2022		swab oral, swab cloacal	
		12/07/2022		fezes	
Animal 9	<i>Boa constrictor constrictor</i>	09/06/2022	-	swab oral, swab cloacal	8
		22/06/2022		fezes	

		11/07/2022		swab oral, swab cloacal	
		12/07/2022		swab oral, swab cloacal	
		26/07/2022		fezes	
Animal 10	<i>Boa constrictor constrictor</i>	09/06/2022	-	swab oral, swab cloacal, fezes	5
		20/07/2022		fezes	
		03/08/2022			
Animal 11	<i>Boa constrictor constrictor</i>	09/06/2022	-	swab oral, swab cloacal	7
		13/06/2022		fezes	
		11/07/2022		swab oral, swab cloacal	
		10/10/2022		swab oral, swab cloacal	
Animal 12	<i>Boa constrictor constrictor</i>	09/06/2022	-	swab oral, swab cloacal	7
		13/06/2002		fezes	
		08/08/2022		swab oral, swab cloacal	
		10/10/2022		swab oral, swab cloacal	
Animal 13	<i>Boa constrictor constrictor</i>	09/06/2022	-	swab oral, swab cloacal	7
		10/06/2022		fezes	
		08/08/2022		swab oral, swab cloacal	
		10/10/2022		swab oral, swab cloacal	
Animal 14	<i>Boa constrictor constrictor</i>	09/06/2022	-	swab oral, swab cloacal	7

		08/08/2022		swab oral, swab cloacal	
		13/09/2022		fezes	
		10/10/2022		swab oral, swab cloacal	
Animal 15	<i>Boa constrictor constrictor</i>	09/06/2022	-	swab oral, swab cloacal, fezes	8
		08/08/2022		swab oral, swab cloacal	
		10/10/2022		swab oral, swab cloacal	
		31/10/2022		fezes	
Animal 16	<i>Boa constrictor constrictor</i>	09/06/2022	-	swab oral, swab cloacal	8
		13/07/2022		swab oral, swab cloacal	
		08/08/2022		swab oral, swab cloacal	
		10/10/2022		swab oral, swab cloacal	
Animal 17	<i>Boa constrictor constrictor</i>	09/06/2022	-	swab oral, swab cloacal	9
		04/07/2022		fezes	
		11/07/2022		swab oral, swab cloacal	
		08/08/2022		swab oral, swab cloacal	
		10/10/2022		swab oral, swab cloacal	
Animal 18	<i>Epicrates cenchria</i>	09/06/2022	-	swab oral, swab cloacal	3
		23/08/2022		fezes	

Animal 19	<i>Epicrates cenchria</i>	09/06/2022	-	swab oral, swab cloacal	3
		27/07/2022		fezes	
Animal 20	<i>Epicrates cenchria</i>	09/06/2022	-	swab oral, swab cloacal	2
Animal 21	<i>Pantherophis guttatus</i>	09/06/2022	-	swab oral, swab cloacal	2
Animal 22	<i>Pantherophis guttatus</i>	09/06/2022	-	swab oral, swab cloacal	2
Animal 23	<i>Pantherophis guttatus</i>	09/06/2022	-	swab oral, swab cloacal	2
Animal 24	<i>Boa constrictor constrictor</i>	12/07/2022	-	swab oral, swab cloacal	2
Animal 25	<i>Boa constrictor constrictor</i>	12/07/2022	-	swab oral, swab cloacal	2
Animal 26	<i>Boa constrictor constrictor</i>	12/07/2022	-	swab oral, swab cloacal	2
Animal 27	<i>Boa constrictor constrictor</i>	12/07/2022	-	swab oral, swab cloacal	2
Animal 28	<i>Boa constrictor constrictor</i>	12/07/2022	-	swab oral, swab cloacal	2
Animal 29	<i>Boa constrictor constrictor</i>	12/07/2022	-	swab oral, swab cloacal	2
Animal 30	<i>Boa constrictor constrictor</i>	12/07/2022	-	swab oral, swab cloacal	2
Animal 31	<i>Boa constrictor constrictor</i>	12/07/2022	-	swab oral, swab cloacal	2
Animal 32	<i>Boa constrictor constrictor</i>	12/07/2022	-	swab oral, swab cloacal	2
Animal 33	<i>Boa constrictor constrictor</i>	12/07/2022	-	swab oral, swab cloacal, fezes	3
Animal 34	<i>Boa constrictor constrictor</i>	12/07/2022	-	swab oral, swab cloacal	2

Animal 35	<i>Boa constrictor constrictor</i>	12/07/2022	-	swab oral, swab cloacal	2
Animal 36	<i>Boa constrictor constrictor</i>	12/07/2022	-	swab oral, swab cloacal	2
Animal 37	<i>Boa constrictor constrictor</i>	12/07/2022	-	swab oral, swab cloacal	2
Animal 38	<i>Boa constrictor constrictor</i>	12/07/2022	-	swab oral, swab cloacal	2
Animal 39	<i>Boa constrictor constrictor</i>	12/07/2022	-	swab oral, swab cloacal, fezes	3
Total analisado					145

Fonte: próprio autor, 2022.

No presente estudo, 9,23% (6/65) dos swabs orais e 11,94% (8/67) dos swabs cloacais, foram PCR positivos para reptarenavírus, nos animais das espécies *Boa constrictor constrictor* e *Boa constrictor amarali*,

Aqrawi et al. (2015) coletaram amostras de 30 serpentes (45 swabs esofágicos e 28 amostras de sangue); 30% dos animais e 70% das amostras analisadas foram PCR positivas. No estudo publicado por Hyndman et al. (2019), das 8 amostras positivas, 5 eram amostras de sangue e 3 eram swabs.

A detecção do reptarenavírus foi possível em todas as amostras coletadas *in vivo*, ou seja, em swabs orais, cloacais, lavados traqueais, sangue e fezes. Cabe ressaltar a importância estratégica da amostragem de fezes no monitoramento de reptarenavírus em biotérios, tanto pela facilidade com que esse material pode ser obtido, quanto pela preservação do bem-estar animal, pois evita o estresse inerente à manipulação dos animais.

Considerando, segundo Pasmans et al. (2008), o caráter fatal da doença e o risco que representa para os biotérios, a direção dos laboratórios e os profissionais optaram, após a confirmação dos resultados, pela eutanásia humanitária dos animais infectados.

Nas amostras provenientes de necrópsias, o RNA viral foi detectado no coração, traquéia, esôfago, pulmão, fígado, estômago, rins, intestinos, baço, pâncreas, vesícula biliar, bile, oviduto, testículos, líquido celomático, tireóide, glândula

adrenal e no sangue total, sugerindo que a doença é sistêmica, aparentemente sem tropismo ou afinidade por um órgão ou sistema específico (Tabela 5).

Tabela 5 - Resultados dos testes para detecção de reptarenavírus em amostras coletadas em necropsias

Identificador	Espécie	Data da coleta	Amostras positivas para <i>Reptarenavirus</i>	Amostras negativas para <i>Reptarenavirus</i>	Total de amostras
Animal A	<i>Boa constrictor constrictor</i>	25/11/2020	traquéia, esôfago, pulmão, coração, fígado, estômago, bile, rim, intestino, <i>swab</i> oral, <i>swab</i> cloacal, sangue total	-	12
Animal B	<i>Boa constrictor constrictor</i>	03/12/2020	intestino, oviduto, rim, vesícula biliar, pâncreas, baço, estômago, fígado, pulmão, coração, traquéia, esôfago, lavado traqueal, <i>swab</i> oral, <i>swab</i> cloacal, sangue total, soro	-	17
Animal C	<i>Boa constrictor constrictor</i>	14/12/2020	intestino, fígado, testículo, pâncreas, baço, vesícula biliar, estômago, pulmão, esôfago, traquéia, coração, <i>swab</i> oral, <i>swab</i> cloacal, sangue total	-	14
Animal D	<i>Boa constrictor constrictor</i>	03/02/2021	<i>swab</i> oral, <i>swab</i> cloacal, soro, sangue, lavado traqueal	-	19
		11/03/2021	<i>swab</i> cloacal (reamostragem)		
		21/04/2021	testículo, intestino, rim, baço/pâncreas, bile, vesícula biliar, estômago, fígado, pulmão, esôfago, traquéia, coração, sangue total		
Animal E	<i>Boa constrictor amarali</i>	26/01/2021	<i>swab</i> oral, <i>swab</i> cloacal, lavado traqueal	rim	21
		15/03/2021	<i>swab</i> cloacal (reamostragem)		
		04/05/2021	traquéia, tireóide, esôfago, coração, pulmão, fígado, baço, bile, vesícula biliar, pâncreas, estômago, glândula adrenal, folículo, intestino, líquido celomático, soro		

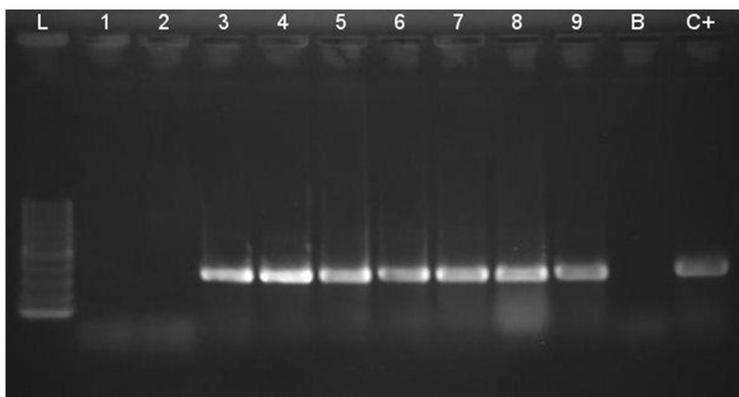
Fonte: próprio autor, 2022.

Apenas um dos animais positivos para reptarenavírus foi mantido vivo, em isolamento, como parte de um estudo em desenvolvimento no laboratório.

4.2 Detecção de chuvírus pela reação em cadeia da polimerase

As amostras que apresentaram resultado positivo para reptarenavírus foram submetidas a uma PCR com primers dirigidos para uma região de 330 pb da RNA polimerase de Chuvírus. Na etapa de eletroforese, os produtos amplificados que revelaram bandas no tamanho esperado de aproximadamente 330 pares de bases (Figura 3) estão sendo sequenciados pelo método de Sanger, para confirmação dos resultados.

Figura 3 - Gel de agarose da eletroforese dos produtos da PCR para chuvírus



Fonte: próprio autor, 2022.

Legenda: Eletroforese em gel de agarose 1,2% corado com GelRed, dos produtos resultantes da amplificação do fragmento L de reptarenavírus por PCR, utilizando primers específicos dirigidos para essa região do genoma. Canaleta L: peso molecular de 100 pares de base (BioTools). Canaleta 1 e 2 - traquéia e coração do animal X; canaleta 3 - traquéia, 4 - tireóide, 5 - esôfago, 6 - coração, 7 - pulmão, 8 - fígado, 9 - baço do animal E, canaleta 10 e 11, controle negativo e positivo, respectivamente.

Um total de 86 amostras, obtidas a partir de 6 *Boa constrictor constrictor* e 1 *Boa constrictor amarali* foram submetidas ao teste de PCR para detecção de chuvírus.

Com a utilização da PCR para a amplificação de um fragmento específico da RNA polimerase do vírus, houve amplificação de fragmento do tamanho esperado em 11,63% (10/86), das amostras testadas, e em 83,33% (5/6) dos animais estudados (4 *Boa constrictor constrictor* e 1 *Boa constrictor amarali*).

Tabela 6 - Resultados dos testes para detecção de chuvírus das amostras coletadas em necropsias

Identificador	Espécie	Data da coleta	Amostras positivas para <i>Chuvirus</i>	Amostras negativas para Chuvirus	Total de amostras
Jibóia A	<i>Boa constrictor constrictor</i>	25/11/2020	traquéia	esôfago, pulmão, coração, fígado, estômago, bile, rim, intestino, swab oral, swab cloacal, sangue total	12
Jibóia B	<i>Boa constrictor constrictor</i>	03/12/2020	pulmão	intestino, oviduto, rim, vesícula biliar, pâncreas, baço, estômago, fígado, coração, traquéia, esôfago, lavado traqueal, swab oral, swab cloacal, sangue total, soro	17
Jibóia C	<i>Boa constrictor constrictor</i>	14/12/2020	sangue total, intestino, testículos, esôfago	fígado, pâncreas, baço, vesícula biliar, estômago, pulmão, traquéia, coração, swab oral, swab cloacal	14
Jibóia D	<i>Boa constrictor constrictor</i>	03/02/2021	-	swab oral, swab cloacal, lavado traqueal, sangue, soro	19
		11/03/2021		swab cloacal (reamostragem)	
		21/04/2021		testículo, intestino, rim, baço/pâncreas, bile, vesícula biliar, estômago, fígado, pulmão, esôfago, traquéia, coração, sangue total	
Jibóia E	<i>Boa constrictor amarali</i>	26/01/2021	swab oral, swab cloacal, lavado traqueal	traquéia, tireóide, esôfago, coração, pulmão, fígado, baço, bile, vesícula biliar, pâncreas, estômago, glândula adrenal, foliculo, intestino, líquido celomático, soro	19
		04/05/2021	-	líquido celomático, soro	
Jibóia 4	<i>Boa constrictor constrictor</i>	02/08/2021	-	swab oral, swab cloacal	5
		24/09/21	swab cloacal (reamostragem)	swab oral (reamostragem)	
		01/09/2021	-	fezes	

Fonte: próprio autor, 2022.

O gene da polimerase de Chuvírus foi detectado na traquéia e lavado traqueal, pulmão, testículos, intestino, esôfago, sangue total e swabs orais e cloacais.

Os resultados obtidos neste estudo, demonstrando a presença de Chuvírus em amostras positivas para reptarenavírus é semelhante ao resultado evidenciado pelo trabalho de Argenta et al. (2020), que foi capaz de detectar o vírus em três *Boa constrictor constrictor* positivas para reptarenavírus.

4.3 Sequenciamento genético dos amplicons de *Reptarenavirus*

Após a análise dos dados obtidos no sequenciamento genético, os *CONTIGs* obtidos apresentaram aproximadamente 800 pares de bases. O alinhamento das sequências consenso obtidas com as sequências depositadas nos bancos de dados NT (Nucleotide Collection, NCBI) por meio do Blast (ZHANG et al., 2000), demonstrou uma homologia de 95%, em média, entre as sequências de diferentes variantes do *Reptarenavirus rotterdam* (UHV) (Figuras 4 e 5). Foi possível observar a identificação com a variante UHV-1 (acesso KR870020.1), variante UHV-4 (acesso KR870027.1), UHV-3 (acesso KR870032.1) e variantes ainda não nomeadas. Esses resultados confirmam a etiologia da doença apresentada pelos animais, reforçando e acreditando os resultados obtidos na PCR.

Figura 4 - Página do Blast mostrando a porcentagem de identificação com outras sequências do banco. Resultado para o sequenciamento do reptarenavírus.

Job Title: CONTIG_780
 RID: V9PCHN5B01N Search expires on 01-05 08:42 am Download All
 Results for: 1:|cl|Query_63030_780.2(797bp)
 Program: BLASTN Citation
 Database: nt See details
 Query ID: |cl|Query_63030
 Description: 780.2
 Molecule type: dna
 Query Length: 797
 Other reports: Distance tree of results MSA viewer

Filter Results
 Organism: only top 20 will appear exclude
 Type common name, binomial, taxid or group name
 + Add organism
 Percent Identity: [] to [] E value: [] to [] Query Coverage: [] to []
 Filter Reset

Descriptions Graphic Summary Alignments Taxonomy

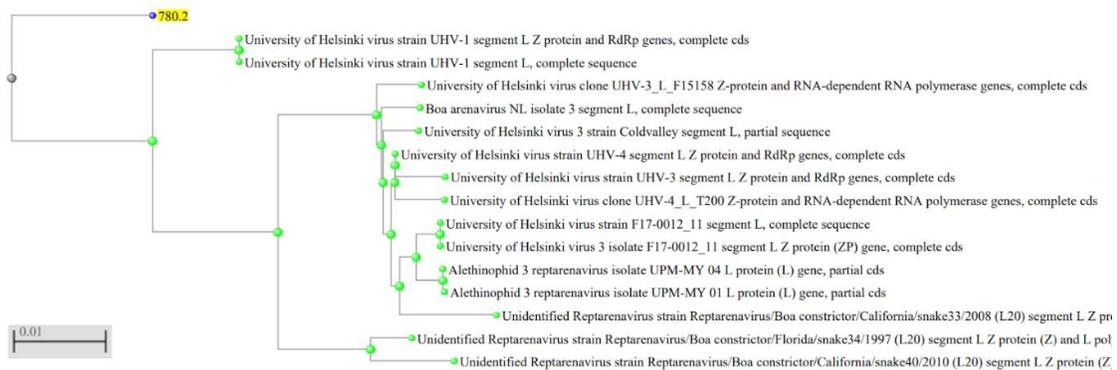
Sequences producing significant alignments Download Select columns Show 100

select all 15 sequences selected GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
University of Helsinki virus strain UHV-1 segment L Z-protein and RdRp genes complete cds	University of Hel...	1240	1240	93%	0.0	95.96%	6834	KR870020.1
University of Helsinki virus strain UHV-1 segment L complete sequence	University of Hel...	1240	1240	93%	0.0	95.96%	6935	KF297881.1
University of Helsinki virus strain UHV-4 segment L Z-protein and RdRp genes complete cds	University of Hel...	1175	1175	93%	0.0	94.35%	6882	KR870027.1
University of Helsinki virus clone UHV-3_L_F15158 Z-protein and RNA-dependent RNA polymerase genes compl...	University of Hel...	1170	1170	93%	0.0	94.21%	6916	KX527586.1

Fonte: gerado através do Blast (ZHANG et al., 2000), 2022.

Figura 5 - Dendograma mostrando a distância entre as sequências encontradas e as depositadas no Blast



Fonte: gerado através do Blast (ZHANG et al., 2000), 2022.

4.4 Sequenciamento genético dos *amplicons* de *Chuvirus*

Os dados obtidos como resultado do sequenciamento de nucleotídeos utilizando os primers de *Chuvirus*, geraram *CONTIGs* com aproximadamente 332 pares de base, que foram alinhados com sequências do banco de dados NT (Nucleotide Collection, NCBI) através do Blast (ZHANG et al., 2000). A sequência submetida retornou um *hit* de aproximadamente 81,19% de homologia com as sequências depositadas referentes ao Herr Frank virus 1 (acesso MN567051.1; Figuras 6 e 7). No entanto, a análise das sequências obtidas de todas as amostras ainda está em andamento. Contudo, a alta taxa de identidade entre as sequências confirma a amplificação dos fragmentos do genoma de chuvírus pela PCR. Através da comparação de bases feita pelo Blast é possível observar diferenças relevantes em relação a sequência depositada nos bancos de dados do NCBI por Argenta e sua equipe (ARGENTA et al., 2020).

Figura 6 - Página do Blast mostrando a porcentagem de identificação com outras seqüências do banco. Resultado para o sequenciamento do chuvírus.

Job Title **Contig_1**

RID [VVZGB44016](#) Search expires on 01-12 01:35 am
[Download All](#)

Program BLASTN [Citation](#)

Database nt [See details](#)

Query ID lc|Query_4735

Description Contig_1

Molecule type dna

Query Length 332

Other reports [Distance tree of results](#) [MSA viewer](#)

Filter Results

Organism only top 20 will appear exclude
Type common name, binomial, taxid or group name
[+ Add organism](#)

Percent Identity to E value to Query Coverage to

[Filter](#) [Reset](#)

Descriptions Graphic Summary Alignments Taxonomy

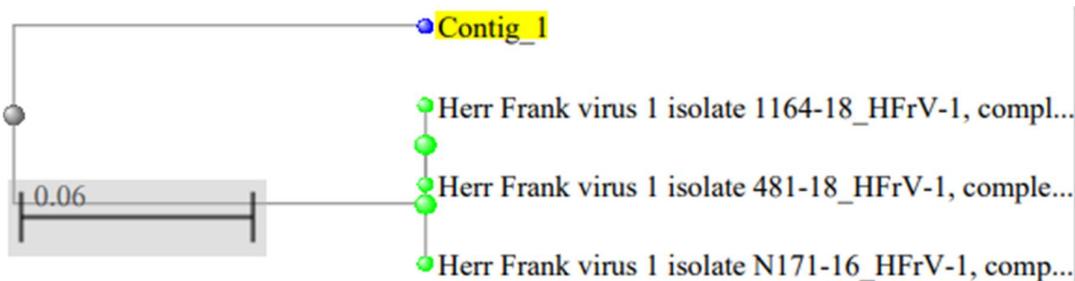
Sequences producing significant alignments Download Select columns Show 100

select all 3 sequences selected [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#) [MSA Viewer](#)

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Herr Frank virus 1 isolate 1164-18_HFrV-1_complete sequence	Herr Frank virus 1	316	316	96%	1e-81	81.19%	10574	MN567063.1
Herr Frank virus 1 isolate 481-18_HFrV-1_complete sequence	Herr Frank virus 1	316	316	96%	1e-81	81.19%	10549	MN567057.1
Herr Frank virus 1 isolate N171-16_HFrV-1_complete sequence	Herr Frank virus 1	316	316	96%	1e-81	81.19%	10718	MN567051.1

Fonte: gerado através do Blast (ZHANG et al., 2000), 2022.

Figura 7 - Dendrograma comparando a distância entre as seqüências enviadas e as seqüências do banco de dados



Fonte: gerado através do Blast (ZHANG et al., 2000), 2022.

5 CONCLUSÃO

As metodologias desenvolvidas neste trabalho foram eficazes na detecção de reptarenavírus e chuvírus em serpentes mantidas em cativeiro em plantéis do Instituto Butantan.

A padronização dos testes tornou possível a realização de uma triagem nos biotérios, minimizando a ocorrência de infecções, eliminando reservatórios dos vírus e prevenindo a contaminação por contato direto ou por fômites.

A partir dessa triagem, foi estabelecido um programa de monitoramento contínuo dos plantéis, com a elaboração de protocolos de avaliação periódica e abrangente, contemplando todos os animais, bem como um programa especial para os que entram na quarentena, com vistas à sua introdução na coleção.

O Instituto Butantan mantém em seus biotérios, serpentes que são rotineiramente utilizadas para extração de veneno e posterior produção de soro antiofídico e um vasto acervo de serpentes utilizadas para pesquisa e ensino em diversas áreas. O presente trabalho mostrou a importância da implementação do diagnóstico de doenças virais na quarentena e no monitoramento sanitário dessas coleções. Com a melhora das condições sanitárias, há um incremento tanto na biossegurança dos antivenenos produzidos pelo Instituto Butantan, quanto na preservação do patrimônio genético e dos programas de conservação de espécies ameaçadas de extinção em curso na instituição.

REFERÊNCIAS

- ABBA, Y. et al. In vitro isolation and molecular identification of reptarenavirus in Malaysia. **Virus Genes**, v. 52, n. 5, p. 640–650, 1 out. 2016.
- ABBA, Y. et al. Pathological vicissitudes and oxidative stress enzyme responses in mice experimentally infected with reptarenavirus (isolate UPM/MY01). **Microbial Pathogenesis**, v. 104, p. 17–27, 1 mar. 2017.
- AQRAWI, T. et al. Identification of snake arenaviruses in live boas and pythons in a zoo in Germany. **Tierärztliche Praxis**. Ausgabe K, Kleintiere/Heimtiere, v. 43, n. 4, p. 239–247, 2015.
- ARGENTA, F. F. et al. Identification of Reptarenaviruses, Hartmanviruses, and a Novel Chuvirus in Captive Native Brazilian Boa Constrictors with Boid Inclusion Body Disease. **Journal of Virology**, v. 94, n. 11, p. e00001-20, 18 maio 2020.
- BASTOS, Carolina Mancini Vall. **Análise da expressão gênica diferencial das glândulas de veneno de Bothrops jararaca (Serpentes: Viperidae)**. 157p. Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva. 2012.
- CAMARGOS, M. F. et al. APLICAÇÃO DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE PARA DETECÇÃO DE Mycoplasma spp NA RÓTINA DE CULTIVOS CELULARES. **Ciência Animal Brasileira / Brazilian Animal Science**, v. 9, n. 3, p. 786–790, 15 out. 2008.
- COSTA, A. et al. Manutenção de serpentes em cativeiro no Instituto Butantan: I-A longevidade dos gêneros Bothrops, Crotalus e Lachesis. **Publ. Avulsas do Instituto Pau Brasil**, v. 8–9, p. 63–68, 1 dez. 2005.
- FLEMING, G. J. et al. Cytoplasmic Inclusions in Corn Snakes, *Elaphe guttata*, Resembling Inclusion Body Disease of Boid Snakes. **Journal of Herpetological Medicine and Surgery**, v. 13, n. 2, p. 18–22, 1 jan. 2003.
- GONG, S. et al. Nairobi sheep disease virus RNA in ixodid ticks, China, 2013. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 4, p. 718–720, abr. 2015.
- HAN, X. et al. Leafhopper *Psammotettix alienus* hosts chuviruses with different genomic structures. **Virus Research**, v. 285, p. 197992, ago. 2020.
- HEPOJOKI, J. et al. Arenavirus coinfections are common in snakes with boid inclusion body disease. **Journal of virology**, v. 89, n. 16, p. 8657–8660, 2015.
- HYNDMAN, T. et al. Reptarenaviruses in apparently healthy snakes in an Australian zoological collection. **Australian Veterinary Journal**, v. 97, n. 4, p. 93–102, 2019.

ICMBIO. Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção. **Volume IV: Répteis. 2018.** Disponível em: ¹https://www.gov.br/icmbio/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/publicacoes-diversas/livro_vermelho_2018_vol4.pdf. Acesso em 11/01/2023.

ICTV – International Committee on Taxonomy of Viruses. **ICTV Master Species List v3.** 2021. Disponível em: <https://ictv.global/msl/current>. Acesso em 11/01/2023.

INSTITUTO BUTANTAN – IB. **Laboratório de herpetologia.** São Paulo: IB; 2011. Disponível em: http://www.butantan.gov.br/home/laboratorio_de_herpetologia.php. Acesso em 11/01/2023.

MACHADO, A. B. M.; MARTINS, C. S.; DRUMMOND, G. **Lista da fauna brasileira ameaçada de extinção: incluindo a Lista das espécies quase ameaçadas e deficientes em dados.** 2005.

MARSCHANG, R. E. Viruses Infecting Reptiles. **Viruses**, v. 3, n. 11, p. 2087–2126, 1 nov. 2011.

PASMANS, F. et al. Introducing reptiles into a captive collection: the role of the veterinarian. **Veterinary Journal** (London, England: 1997), v. 175, n. 1, p. 53–68, jan. 2008.

RAYMOND, J. T. et al. A Disease Resembling Inclusion Body Disease of Boid Snakes in Captive Palm Vipers (*Bothriechis Marchi*). **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 13, n. 1, p. 82–86, jan. 2001.

SHI, M. et al. The evolutionary history of vertebrate RNA viruses. **Nature**, v. 556, n. 7700, p. 197–202, abr. 2018.

SIMARD, J. et al. Prevalence of inclusion body disease and associated comorbidity in captive collections of boid and pythonid snakes in Belgium. **PLOS ONE**, v. 15, n. 3, p. e0229667, 2 mar. 2020.

STENGLEIN, M. D. et al. Identification, characterization, and in vitro culture of highly divergent arenaviruses from boa constrictors and annulated tree boas: candidate etiological agents for snake inclusion body disease. **mBio**, v. 3, n. 4, p. e00180- 00112, 2012.

STENGLEIN, M. D. et al. Differential Disease Susceptibilities in Experimentally Reptarenavirus-Infected Boa Constrictors and Ball Pythons. **Journal of Virology**, v. 91, n. 15, p. e00451-17, 12 jul. 2017.

UCCELLINI, L. et al. Identification of a novel nidovirus in an outbreak of fatal respiratory disease in ball pythons (*Python regius*). **Virology Journal**, v. 11, p. 144, 8 ago. 2014.

WHO (World Health Organization). Guidelines for the Production, Control and Regulation of Snake Antivenom Immunoglobulins. **Annex 5: Replacement of Annex**

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023:** Informação e documentação - referências - elaboração. Rio de Janeiro: ABNT, 2018.

2 of WHO Technical Report Series, no 964. WHO Press. 2013: 192p. Disponível em: <https://www.who.int/publications/m/item/snake-antivenom-immunoglobulins-annex-5-trs-no-1004>. Acesso em 11/01/2023.

ZHANG, Z. et al. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. **Journal of Computational Biology: A Journal of Computational Molecular Cell Biology**, v. 7, n. 1–2, p. 203–214, 2000.