

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Livia Sacchetto Pengo

**PROSPECÇÃO DE CORONAVÍRUS HUMANO E VÍRUS DA RAIVA
EM PEQUENOS MAMÍFEROS SILVESTRES, NO ESTADO DE MINAS
GERAIS, BRASIL.**

Juiz de Fora

2016

LÍVIA SACCHETTO PENGO

**PROSPECÇÃO DE CORONAVÍRUS HUMANO E VÍRUS DA RAIVA
EM PEQUENOS MAMÍFEROS SILVESTRES, NO ESTADO DE MINAS
GERAIS, BRASIL.**

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas na área de Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias.

Orientadora: Profa. Dra. Betânia Paiva Drumond

Co-orientadora: Profa. Dra. Giliane de Souza Trindade

Juiz de Fora

2016

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Pengo, Lívia Sacchetto.

Prospecção de coronavírus humano e vírus da raiva em pequenos mamíferos silvestres, no estado de Minas Gerais, Brasil/ Lívia Sacchetto Pengo. -- 2016.

96 f. : il.

Orientadora: Betânia Paiva Drumond

Coorientadora: Giliane de Souza Trindade

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2016.

1. Coronavírus. 2. Vírus da raiva. 3. Zoonoses. 4. Vírus emergentes. 5. Mamíferos silvestres. I. Drumond, Betânia Paiva, orient. II. Trindade, Giliane de Souza, coorient. III. Título.

LÍVIA SACCHETTO PENGO

**PROSPECÇÃO DE CORONAVÍRUS HUMANO E VÍRUS DA RAIVA EM
PEQUENOS MAMÍFEROS SILVESTRES, NO ESTADO DE MINAS GERAIS,
BRASIL**

Dissertação de Mestrado submetida à banca examinadora do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Ênfase em Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos necessários para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 23/02/2016.

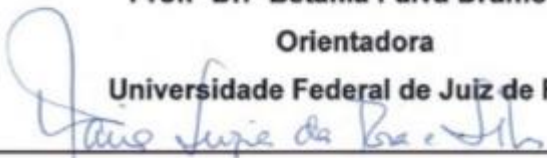
BANCA EXAMINADORA:



Prof.ª Dr.ª Betânia Paiva Drumond

Orientadora

Universidade Federal de Juiz de Fora


Prof.ª Dr.ª Maria Luzia da Rosa e Silva

Universidade Federal de Juiz de Fora


Prof. Dr. Pedro Augusto Alves

FIOCRUZ

À minha família, pelo amor e apoio incondicionais.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos concedida.

À Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) (projeto CBB - APQ-04270-10) e Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Juiz de Fora (PROPESQ/UFJF), pelo apoio financeiro.

Ao programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora, sua coordenação e seu corpo docente, pelo suporte, auxílio e conhecimento adquirido nas disciplinas do curso.

À minha orientadora e professora, Dra. Betânia Paiva Drumond, pela confiança em meu trabalho, paciência e dedicação. Sou grata, sobretudo, pela inspiração e ensinamentos que vão além do desenvolvimento deste trabalho.

À minha co-orientadora, Profa. Dra. Giliane de Souza Trindade, pela oportunidade oferecida e pela confiança em mim depositada.

Aos colaboradores deste trabalho, Profa. Dra. Erna G. Kroon (UFMG), Prof. Dr. Adriano Paglia e seus alunos (UFMG), Prof. Dr. Pedro Henrique Nobre e seus alunos (Colégio de Aplicação João XXIII-UFJF), e a toda equipe de pesquisadores do Grupo ECOVIR (UFJF, UFMG, UFOP, UFSJ, IFET-Sudeste de Minas). Agradeço em especial, ao pesquisador Dr. Pedro Augusto Alves, às colegas Júlia Miranda e Carolina Dourado, e à amiga Samantha Campos, pelas contribuições indispensáveis no desenvolvimento deste trabalho.

A todos que fizeram parte da equipe de coleta de animais no Campus Rio Pomba, pelo esforço empenhado e por fazerem das campanhas divertidas e prazerosas. Em especial, a Lara e Flávia, pelo aprendizado e conselhos.

À Profa. Dra. Maria Luzia da Rosa e Silva, pelos ensinamentos, carinho e receptividade em nossa convivência. Agradeço, ainda, pelas contribuições na qualificação deste trabalho.

À Dra. Ana Paula Vilela, pelas contribuições e preciosas sugestões na qualificação deste trabalho.

À banca examinadora, formada pelas professoras Dra. Maria Luzia da Rosa e Silva (UFJF) e Dra. Érica Azevedo Costa (UFMG), e seus suplentes, Prof. Dr. André Luiz da Silva Domingues (UFJF) e Prof. Dr. Pedro Augusto Alves (FIOCRUZ), pela disponibilidade e pelo futuro aperfeiçoamento deste trabalho.

Aos professores e colegas do Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia, pelo aprendizado e pelo agradável convívio.

Às minhas amigas e colegas do Laboratório de Virologia, Izabela, Andrêssa, Tatiane, Lorenna e Bárbara, pelo companheirismo, troca de conhecimentos, colaboração e por tornar o ambiente de trabalho um convívio prazeroso.

Ao Laboratório de Vírus/UFMG, pela estrutura e receptividade durante a realização de experimentos.

Aos que a faculdade me trouxe de melhor, meus biólogos, Elisa, Paula, Ricardo, Samantha, Ítala, Fernanda, Cíntia e Tamirys. Agradeço pela amizade única, desabafos, apoio, conselhos e pelas melhores risadas. Vocês são os melhores!

Ao meu querido amigo, Nicolás (*in memoriam*), pela força, incentivo e preocupação durante a seleção. Jamais esquecerei do dia em que comemoramos a minha aprovação no mestrado.

A todos os meus amigos, que de alguma forma, sempre se mantiveram presentes.

Agradeço, também, a toda minha família, que são a minha base e sem eles nada seria possível:

Ao meu primo Eduardo, pelo companheirismo e convívio diário. Sou grata, por poder contar com sua presença em momentos difíceis e importantes de minha vida.

À minha prima Patrícia, pelos conselhos sinceros, motivação e irmandade.

Aos meus padrinhos, em especial à minha madrinha, Eloiza, pelo apoio em todas as etapas da minha vida.

Aos meus queridos avós, Graciema e Antônio, pelo exemplo, amor, carinho e confiança.

Ao meu irmão Thiago, pelo amor, cumplicidade e por ser o melhor irmão.

Aos meus pais, Márcia e Kakau, meu infinito agradecimento. Obrigada pelo amor incondicional, educação, apoio, por sempre acreditarem e confiarem em mim. Agradeço, sobretudo, ao meu maior exemplo, minha mãe, por ser a mulher mais forte e amável que conheço.

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

RESUMO

A emergência de viroses é um importante problema de saúde pública mundial. Alguns animais, incluindo mamíferos silvestres, têm um importante papel na manutenção e na transmissão de vírus, podendo agir como hospedeiros e reservatórios naturais. Os coronavírus (CoVs) e o vírus da raiva (RABV) pertencem às famílias *Coronaviridae* e *Rhabdoviridae* respectivamente. Esses vírus, pertencentes a essas duas famílias, têm sido isolados a partir de animais silvestres e domésticos. Os coronavírus são vírus que causam doenças respiratórias, entéricas, hepáticas e neurológicas e estão amplamente distribuídos entre os humanos e outros mamíferos. O vírus da raiva causa encefalite aguda progressiva em diversos mamíferos, incluindo também humanos. Diante desse contexto, este trabalho teve como objetivo a prospecção de coronavírus humano e do vírus da raiva em pequenos mamíferos silvestres no estado de Minas Gerais, Brasil. Os pequenos mamíferos silvestres dos quais foram investigados os vírus de interesse deste estudo, procederam de três diferentes áreas de estudo, onde foram coletados entre os anos de 2012 e 2013. Roedores e marsupiais, foram provenientes do Campus Rio Pomba do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais e os morcegos do Parque Estadual da Serra do Papagaio e do Jardim Botânico da Universidade Federal de Juiz de Fora. Amostras de fígado, pulmão, soro e rins oriundos desses animais foram submetidas a extração de RNA total, seguida da síntese de cDNA. Foi realizado o PCR em tempo real (qPCR) com as 58 amostras de pulmão, 54 amostras de fígado, 120 amostras de soro e 18 amostras de rim, para a investigação de coronavírus humano. Para a investigação do vírus da raiva, foi realizado o qPCR com 58 amostras de pulmão, 120 amostras de soro e 18 amostras de rins. Neste estudo, foram detectadas 17 (6,8%) amostras positivas, de 250 testadas, para o coronavírus humano HKU1, provenientes de doze roedores (9,23%) e três morcegos (16,66%). Nenhuma das 196 amostras testadas para RABV foram positivas no qPCR. Esses resultados apontam, pela primeira vez, a circulação de HCoV-HKU1 em roedores e morcegos, podendo esses animais estarem desenvolvendo um papel na manutenção e emergência desses vírus no estado de Minas Gerais. Além disso, enfatiza a importância de estudos de vigilância de espécies animais, para compreender a circulação, manutenção e transmissão desses vírus, bem como o seu potencial emergente.

Palavras-chaves: Coronavírus. Vírus da raiva. Zoonoses. Vírus emergentes. Mamíferos silvestres. PCR em tempo real (qPCR).

ABSTRACT

The emergence of viruses is an important public health problem worldwide. Some animals, including wild mammals, play an important role in the maintenance and transmission of viruses and can act as hosts and natural reservoirs. Coronaviruses (CoVs) and rabies virus (RABV) belong to *Coronaviridae*, and *Rhabdoviridae* families, respectively. Viruses belonging to these two families have been isolated from wild and domestic animals. Coronaviruses are viruses that cause respiratory, enteric, hepatic and neurological disorders and are widely spread among humans and other mammals. Rabies virus causes progressive acute encephalitis in many mammals, including humans. In this context, the aim of this work was to perform a prospective study of human coronavirus and rabies virus in small wild mammals in the state of Minas Gerais, Brazil. Small wild mammals were collected between the years 2012 and 2013. Rodents and marsupials came from the Campus Rio Pomba of Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais and bats from Parque Estadual da Serra do Papagaio and Jardim Botânico da Universidade Federal de Juiz de Fora. Samples of liver, lung, kidney, and serum from these animals were subjected to RNA extraction and cDNA synthesis. The real-time PCR (qPCR) was performed for human coronavirus investigation using cDNA obtained from 58 lung samples, 54 liver samples, 120 serum samples, and 18 kidney samples. For the investigation of rabies virus, qPCR was performed with cDNA derived from 58 lung samples, 120 serum samples, and 18 kidneys samples. In this study, 17 samples were positive (6,8%), out of 250 tested for human coronavirus HKU1, from twelve rodents (9,23%) and three bats (16,66%). None of the 196 samples tested were positive for RABV in qPCR. These results demonstrate for the first time, the circulation of HCoV-HKU1 in rodents and bats, such animals may be developing a role in the maintenance and emergence of these viruses in the state of Minas Gerais. In addition, it emphasizes the importance of animal species surveillance studies to understand the circulation, maintenance, and transmission of these viruses and their emerging potential.

Keywords: Coronavirus. Rabies virus. Zoonoses. Emerging viruses. Wild mammals. Real-time PCR (qPCR).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Partícula viral do vírus da raiva.....	21
Figura 2 - Genoma do vírus da raiva.....	22
Figura 3 - Ciclo de multiplicação do vírus da raiva.....	23
Figura 4 - A raiva e suas áreas de risco.....	26
Figura 5 - Estrutura da partícula viral dos coronavírus.....	31
Figura 6 - Genoma dos <i>Betacoronavirus</i>	32
Figura 7 - Ciclo de multiplicação dos coronavírus.....	33
Figura 8 - Cobertura vegetal do estado de Minas Gerais.....	41
Figura 9 - Áreas de amostragem para coleta de roedores e marsupiais.....	42
Figura 10 - Gaiolas utilizadas para a captura dos roedores e marsupiais.....	43
Figura 11 - Procedimentos com os roedores e marsupiais capturados.....	44
Figura 12 - Representação esquemática do gBlock RCoV.....	49
Figura 13 - Gráficos da qPCR para RABV, referente às amostras de roedores e marsupiais.....	57
Figura 14 - Gráficos da qPCR para RABV, referente às amostras de morcegos ...	58
Figura 15 - Gráficos dos produtos amplificados (positivos) na qPCR para HCoV HKU1, referente às amostras de roedores e marsupiais.....	60
Figura 16 - Gráficos dos produtos amplificados (suspeitos) na qPCR para HCoV HKU1, referente às amostras de roedores e marsupiais.....	61
Figura 17 - Gráficos dos produtos amplificados (positivos) na qPCR para HCoV HKU1, referente às amostras de morcegos.	62
Figura 18 - Gráficos dos produtos amplificados (suspeitos) na qPCR para HCoV HKU1, referente às amostras de morcegos.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Os quatro gêneros de coronavírus e suas espécies, agrupados por filogenia.....	29
Tabela 2 - Coleção de morcegos utilizados neste trabalho.	46
Tabela 3 - Iniciadores utilizados no controle interno da qPCR.	49
Tabela 4 - Iniciadores utilizados na detecção do RABV por qPCR.....	50
Tabela 5 - Iniciadores utilizados na detecção de coronavírus por qPCR.	50
Tabela 6 - Número de capturas e de indivíduos capturados por campanha, em armadilhas do tipo Sherman ou gaiola, no município de Rio Pomba, MG.	55
Tabela 7 - Número de indivíduos e de espécies de roedores e marsupiais capturados por ambiente, em armadilhas do tipo Sherman ou gaiola, no município de Rio Pomba, MG.....	56
Tabela 8 - Pequenos mamíferos silvestres positivos no qPCR para HCoV HKU1. ...	59
Tabela 9 - Distribuição das amostras de fígado, pulmão e soro na qPCR.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ABLV - *Australian bat lyssavirus* (lissavírus do morcego australiano)
- ARAV - *Aravan virus* (vírus Aravan)
- BCoV - *Bovine coronavirus* (coronavírus bovino)
- Bulbul CoV HKU11 - *Bulbul coronavirus HKU11* (coronavírus Bulbul HKU11)
- CCoV - *Canine coronavirus* (coronavírus canino)
- CDC - *Centers for Disease Control and Prevention* (Centro de Controle e Prevenção de Doenças)
- cDNA - DNA complementar
- CoVs - coronavírus
- Cq - *quantification cycle* (ciclo de quantificação)
- DNA - ácido desoxirribonucleico
- dNTP - deoxinucleotídeo trifosfato
- DTT - ditioneitol
- DUVV - *Duvenhage virus* (vírus Duvenhage)
- EBLV1 - *European bat lyssavirus 1* (lissavírus do morcego europeu 1)
- EBLV2 - *European bat lyssavirus 2* (lissavírus do morcego europeu 2)
- ECOVIR – Núcleo de Pesquisa em Ecologia de Vírus Emergentes
- EPIs - equipamentos de segurança individual
- EqCoV – *Equine coronavirus* (coronavírus equino)
- FAVN - *fluorescent antibody virus neutralization* (neutralização do vírus por anticorpo fluorescente)
- FCoV - *Feline coronavirus* (coronavírus felino)
- FWD - *Forward* (referência a iniciador senso)
- GenBank - *Genetic Sequence Database* (Banco de Dados de Sequências Genéticas)
- HCoVs – coronavírus humanos
- HCoV-229E – *Human coronavirus 229E* (coronavírus humano 229E)
- HCoV-NL63 – *Human coronavirus NL63* (coronavírus humano NL63)
- HCoV-OC43 – *Human coronavirus OC43* (coronavírus humano OC43)
- HCoV-HKU1 - *Human coronavirus HKU1* (coronavírus humano HKU1)
- HE - hemaglutinina esterase

IBV - *infectious bronchitis virus* (vírus da bronquite infecciosa)

ICMBio - Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade

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

IDT - *Integrated DNA Technologies* (Tecnologias de DNA Integrado)

IFA - *indirect immunofluorescence assay* (teste de imunofluorescência indireta)

IFET - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia

IRKV - *Irkut virus* (vírus Irkut)

JB-UFJF - Jardim Botânico da Universidade Federal de Juiz de Fora

Kg - quilograma

KHUV - *Khujand virus* (vírus Khujand)

LBV - *Lagos bat virus* (vírus do morcego de Lagos)

M - molar

MERS-CoV - *Middle East respiratory syndrome coronavirus* (coronavírus da síndrome respiratória do Oriente Médio)

mg - miligrama

MHV – *Murine hepatitis virus* (vírus da hepatite murina)

mM - milimolar

M-MLV - *Moloney Murine Leukemia Virus* (Vírus da Leucemia Murina de Moloney)

MOKV - *Mokola virus* (vírus Mokola)

ng – nanograma

°C – Celsius

OMS – Organização Mundial da Saúde

ORF(s) - *Open reading frame* (janela aberta de leitura)

pb - pares de bases

PBS - tampão salina fosfatada

PCR - reação em cadeia da polimerase

PEDV – *Porcine epidemic diarrhea virus* (vírus da diarreia epidêmica suína)

PESP - Parque Estadual da Serra do Papagaio

pH - potencial Hidrogeniônico

PHEV - *Porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus* (vírus da encefalomielite hemaglutinante suína)

PRONEM - Programa de Apoio a Núcleos Emergentes de Pesquisa

qPCR - *quantitative* PCR (PCR quantitativo – PCR em Tempo Real)

RABV – *Rabies virus* (vírus da raiva)

RCoV – *Rat coronavirus* (coronavírus de rato)

RFFIT – *rapid fluorescent focus inhibition test* (teste rápido de inibição de focos fluorescentes)

RNA - ácido ribonucleico

RpRd – RNA polimerase RNA-dependente

RT – transcrição reversa

RT-PCR - reação de transcrição reversa, seguida de PCR

SARS-CoV - *severe acute respiratory syndrome coronavirus* (coronavírus da síndrome respiratória aguda grave)

SNC - Sistema Nervoso Central

TAE - tampão Tris-Acetato-EDTA

TBE – tampão Tris-Borato-EDTA

TGEV - *Transmissible gastroenteritis coronavirus* (coronavírus da gastroenterite transmissível)

Tm - *melting temperature* (temperatura de dissociação)

TuCoV – *Turkey coronavirus* (coronavírus Turkey)

UFJF - Universidade Federal de Juiz de Fora

UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais

WCBV - *West Caucasian bat virus* (vírus do morcego caucasiano do oeste)

WHO - *World Health Organization* (Organização Mundial da Saúde)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1. VIROSES EMERGENTES/REEMERGENTES E SEUS HOSPEDEIROS SILVESTRES	17
1.2. VÍRUS DA RAIVA.....	19
1.2.1. CLASSIFICAÇÃO E HISTÓRICO.....	19
1.2.2. ESTRUTURA DA PARTÍCULA VIRAL	21
1.2.3. ESTRUTURA DO GENOMA	22
1.2.4. CICLO DE MULTIPLICAÇÃO.....	22
1.2.5. DIAGNÓSTICO	23
1.2.6. PREVENÇÃO E CONTROLE.....	24
1.2.7. EPIDEMIOLOGIA	25
1.2.8. HOSPEDEIROS E RESERVATÓRIOS	27
1.3. CORONAVÍRUS.....	29
1.3.1. CLASSIFICAÇÃO E HISTÓRICO.....	29
1.3.2. ESTRUTURA DA PARTÍCULA VIRAL	30
1.3.3. ESTRUTURA DO GENOMA	31
1.3.4. CICLO DE MULTIPLICAÇÃO.....	32
1.3.5. DIAGNÓSTICO	34
1.3.6. TRATAMENTO E PREVENÇÃO	34
1.3.7. EPIDEMIOLOGIA	35
1.3.8. HOSPEDEIROS E RESERVATÓRIOS	36
2. JUSTIFICATIVA.....	38
3. OBJETIVOS.....	40
3.1. OBJETIVO GERAL.....	40
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
4. MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1. AMOSTRAS DE PEQUENOS MAMÍFEROS SILVESTRES	41
4.1.1. COLETA DE ROEDORES E MARSUPIAIS	41
4.1.2. COLEÇÃO DE VÍSCERAS DE MORCEGOS.....	45

4.2. PROCESSAMENTO DOS ESPÉCIMES E EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL.....	47
4.2.1. ROEDORES E MARSUPIAIS	47
4.2.2. MORCEGOS	47
4.3. TRANSCRIÇÃO REVERSA PARA A PCR EM TEMPO REAL	48
4.4. CONTROLE INTERNO DA PCR EM TEMPO REAL.....	48
4.5. CONTROLE POSITIVO DA PCR EM TEMPO REAL.....	49
4.6. PROSPECÇÃO DO VÍRUS DA RAIVA POR PCR EM TEMPO REAL.....	49
4.7. PROSPECÇÃO DE CORONAVÍRUS HUMANO POR PCR EM TEMPO REAL.....	50
4.8. PADRONIZAÇÃO E CRITÉRIOS PARA ANÁLISE DA PCR EM TEMPO REAL.....	50
4.9. PCR CONVENCIONAL	51
4.10. PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR	53
4.11. SEQUENCIAMENTO	54
5. RESULTADOS.....	55
5.1. COLETA DOS PEQUENOS MAMÍFEROS SILVESTRES	55
5.2. EXTRAÇÃO DE RNA, SÍNTESE DE cDNA E TESTE PARA O CONTROLE INTERNO.....	56
5.3. PROSPECÇÃO DO VÍRUS DA RAIVA POR PCR EM TEMPO REAL.....	57
5.3.1. ROEDORES E MARSUPIAIS	57
5.3.2. MORCEGOS	57
5.4. PROSPECÇÃO DE CORONAVÍRUS	58
5.4.1. PROSPECÇÃO DE CORONAVÍRUS HUMANO POR PCR EM TEMPO REAL.....	58
5.4.1.1. Roedores e Marsupiais.....	58
5.4.1.2. Morcegos.....	61
5.4.2. CORONAVÍRUS POR PCR CONVENCIONAL.....	63
6. DISCUSSÃO	65
7. CONCLUSÕES	74
8. PERSPECTIVAS	75
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76

1. INTRODUÇÃO

1.1. VIROSES EMERGENTES/REEMERGENTES E SEUS HOSPEDEIROS SILVESTRES

5 Ao longo das últimas décadas observou-se a emergência de doenças
infeciosas que representam uma ameaça na saúde humana mundial (LEDERBERG,
SHOPE e OAKS, 1992). A maior parte dessas doenças infecciosas emergentes é de
origem zoonótica (TAYLOR, LATHAM e MARK, 2001). Devido a sua enorme
diversidade, grande capacidade de evolução e intervenção terapêutica limitada, os
10 vírus têm recebido a maior parte da atenção no que diz respeito a doenças
emergentes (MORSE, 1997). Diversos vírus zoonóticos veem emergindo e
reemergindo em todo o mundo, entre esses, podemos citar Middle East respiratory
syndrome coronavirus (MERS-CoV), Ebola virus, Zika virus, Chikungunya virus,
entre outros (BURT et al., 2012; DE GROOT et al., 2013; WHOER, 2014; ZANLUCA
15 et al., 2015). O fator mais importante na emergência de novas doenças zoonóticas
na população humana, sendo elas, virais ou não, é o aumento do contato entre
seres humanos e animais silvestres (DASZAK, CUNNINGHAM e HYATT, 2001).

 O homem está constantemente alterando o meio ambiente em que vive,
interferindo nas relações entre o mesmo e outras espécies. O surgimento de uma
20 zoonose depende de vários fatores, que muitas vezes atuam simultaneamente para
mudar a dinâmica do patógeno (DOBSON e CARPER, 1996). Além das
propriedades do patógeno, outros fatores afetam o surgimento ou a propagação
destes, incluindo: fatores ambientais ou mudanças no uso da terra, o crescimento da
população humana, mudanças no comportamento humano ou da estrutura social,
25 viagens ou comércio internacional, a adaptação do patógeno ao uso de drogas ou à
novas espécies hospedeiras (LEDERBERG, HAMBURG e SMOLINSKI, 2003), e
também podem ser citadas a domesticação de animais, limpeza de terras para a
agricultura e pastagem e a caça de animais silvestres (WOLFE, DUNAVAN e
DIAMOND, 2007).

30 Durante os últimos anos, novas infecções virais emergiram ou reemergiram,
sendo a maioria delas em regiões tropicais ou subtropicais. A maioria destas
infecções são zoonoses e claramente os vírus compartilhados por animais e seres

humanos são, ao contrário dos vírus que infectam apenas humanos, muito mais difíceis de erradicar (KALLIO-KOKKO et al., 2005).

Três quartos das zoonoses são originadas de animais silvestres, portanto o desenvolvimento de uma vigilância nessa fauna e a procura de novos patógenos
5 fazem parte de uma estratégia para prevenir o futuro surgimento de zoonoses (TAYLOR, LATHAM e MARK, 2001), além de fornecer dados epidemiológicos. Dados os recursos limitados para a prevenção de uma pandemia é uma vantagem para a saúde pública focar na descoberta de patógenos em espécies de animais silvestres com maior probabilidade de abrigar zoonoses (WOOLHOUSE e
10 GOWTAGE-SEQUERIA, 2006).

Novos vírus têm sido descritos a partir de animais silvestres, pertencentes a diversas famílias virais tais como *Coronaviridae*, *Bunyaviridae*, *Astroviridae*, *Rhabdoviridae*, *Flaviviridae*, *Filoviridae*, *Paramyxoviridae*, *Adenoviridae* e *Reoviridae* (MACKENZIE e JEGGO, 2013). Com exceção da família *Adenoviridae*, todas essas
15 famílias são vírus de RNA (CONDIT, 2013). Esforços para entender os padrões de surgimento de doenças infecciosas emergentes destacaram os vírus, especialmente os vírus de RNA, como principal ameaça, devido, muitas vezes, às suas elevadas taxas de substituição de nucleotídeos, baixa capacidade de correção de erros de mutação e alta capacidade de se adaptar a novos hospedeiros, incluindo humanos
20 (JONES et al., 2008).

A maioria dos animais reservatórios de doenças infecciosas é pertencente à classe *Mammalia* (MACKENZIE e JEGGO, 2013). Os roedores, marsupiais e morcegos são grupos bem representativos: das 701 espécies de mamíferos que ocorrem no Brasil, há pelo menos 98 espécies de roedores, 22 de marsupiais e 113
25 de morcegos na Mata Atlântica (PAGLIA et al., 2012).

A ordem *Chiroptera*, que inclui os morcegos, representa a ordem mais especiosa entre os mamíferos do Brasil (PAGLIA et al., 2012). Além da abundância, esses animais possuem uma alta diversidade e distribuição, conseqüentemente, isso contribui para uma maior diversidade de patógenos a eles associados (WOO et al.,
30 2012). Diversos vírus já foram isolados ou detectados de morcegos naturalmente infectados, com destaque para vírus das famílias *Rhabdoviridae*, *Paramyxoviridae*, *Coronaviridae* e *Filoviridae* (SCHNEEBERGER e VOIGT, 2016). Os morcegos possuem hábitos sinantrópicos e frequentemente habitam áreas de agricultura, o

que os coloca em constante interação com os seres humanos (WONG et al., 2007). Os roedores correspondem à segunda maior ordem da classe *Mammalia* (Ordem *Rodentia*) (PAGLIA et al., 2012). Alguns fatores tornam os roedores reservatórios apropriados de patógenos zoonóticos. Dentre estes podemos citar a alta
5 diversidade, elevada taxa de fecundidade, reprodução rápida e uma maior facilidade de serem encontrados próximos aos humanos, se comparado a outros animais silvestres (MILLS, 2006). Os roedores estão entre os principais reservatórios de agentes infecciosos, tais como os vírus pertencentes às famílias *Arenaviridae*, *Bunyaviridae*, *Poxviridae* e *Herpesviridae* (ZAPATA e SALVATO, 2013; OLIVEIRA et
10 al., 2014; ABRAHÃO et al., 2009; LACK, VOLK e VAN DEN BUSSCHE, 2012). A ordem *Didelphimorphia* inclui a maioria dos marsupiais americanos vivos, distribuídos do sudeste do Canadá ao sul da Argentina (NOWAK, 1999). Na literatura científica, há relatos da participação desses animais como reservatórios de vírus, dando destaque para os pertencentes às famílias *Rhabdoviridae* e *Flaviviridae*
15 (ARAÚJO, 2012; BACCHIEGA, 2014; DE THOISY et al., 2009). Espécies de mamíferos dessa ordem são frequentemente observadas em ambientes antrópicos rurais e urbanos, sendo um dos mamíferos silvestres de maior contato com humanos (BACCHIEGA, 2014). A interação do homem com espécies dessa ordem é antiga, e além disso, esses animais são resistentes à ação antrópica no meio ambiente sendo
20 os únicos mamíferos que permanecem em áreas muito devastadas (JANSEN, 2006).

1.2. VÍRUS DA RAIVA

1.2.1. CLASSIFICAÇÃO E HISTÓRICO

Os vírus pertencentes ao gênero *Lyssavirus*, família *Rhabdoviridae*, causam
25 encefalite aguda progressiva (raiva) em mamíferos, sendo transmitida para indivíduos susceptíveis diretamente por mordidas, arranhões ou contaminação das mucosas com saliva. Os vírus desse gênero encontram-se distribuídos mundialmente, exceto na Antártica e várias ilhas isoladas (DIETZGEN et al., 2011).

Atualmente o ICTV reconhece onze espécies do gênero *Lyssavirus*: vírus
30 Aravan (*Aravan virus* - ARAV), lissavírus do morcego australiano (*Australian bat lyssavirus* - ABLV), vírus Duvenhage (*Duvenhage virus* – DUVV), lissavírus do

morcego europeu 1 (*European bat lyssavirus 1* - EBLV1), lissavírus do morcego europeu 2 (*European bat lyssavirus 2* - EBLV2), vírus Irkut (*Irkut virus* - IRKV), vírus Khujand (*Khujand virus* - KHUV), vírus do morcego de Lagos (*Lagos bat virus* - LBV), vírus Mokola (*Mokola virus* - MOKV), vírus da raiva (*Rabies virus* - RABV),
5 vírus do morcego caucasiano do oeste (*West Caucasian bat virus* - WCBV). O vírus do morcego Shimoni (*Shimoni bat virus*) está classificado dentro do gênero provisoriamente, porém ainda não foi aprovado como espécie (DIETZGEN et al., 2011).

Com base em relações filogenéticas e propriedades antigênicas, o gênero foi
10 subdividido em dois filogrupos. O filogrupo I inclui as espécies RABV, ABLV, DUVV, EBLV1, EBLV2, ARAV, KHUV e IRKV. O filogrupo II inclui as espécies LBV e MOKV. A espécie mais divergente do gênero, *West Caucasian bat virus* (WCBV), não é membro de nenhum desses filogrupos (DIETZGEN et al., 2011).

A espécie *Rabies virus*, ou vírus da raiva (RABV), é distribuída mundialmente
15 e tem maior importância epidemiológica dada a sua associação com a maioria dos casos de encefalite por lissavírus em humanos em relação às outras espécies virais descritas acima (CHAVES, 2010).

A raiva é uma das mais antigas doenças infecciosas conhecidas (LYLES, KUZMIN e RUPPRECHT, 2013), com relatos desde o século XXIII a.C. (BAER,
20 NEVILLE e TURNER, 1996). Pasteur e suas pesquisas sobre a raiva permitiram a adaptação do tipo selvagem do vírus a animais de laboratório, possibilitando o desenvolvimento de conceitos e abordagens experimentais para a primeira vacinação de proteção contra a raiva. No ano de 1885, um menino sobreviveu após ser mordido em vários locais por um cão infectado e receber a primeira profilaxia
25 pós-exposição com a vacina de Pasteur (KOPROWSKI, 1985). Assim essa vacina tornou-se a conduta profilática aceita em todo o mundo no início do século 20 (LYLES, KUZMIN e RUPPRECHT, 2013).

Na década de 60, foi produzida uma vacina inativada e eficaz (KOPROWSKI, 1985), eliminando muito dos problemas relacionados às vacinas anteriores
30 produzidas em tecido cerebral. Além disso, com o progresso na área de biotecnologia, versões melhoradas de vacinas antirrábicas estão em desenvolvimento (LYLES, KUZMIN e RUPPRECHT, 2013). Atualmente, a combinação da imunoglobulina e vacina é o padrão recomendado para a profilaxia

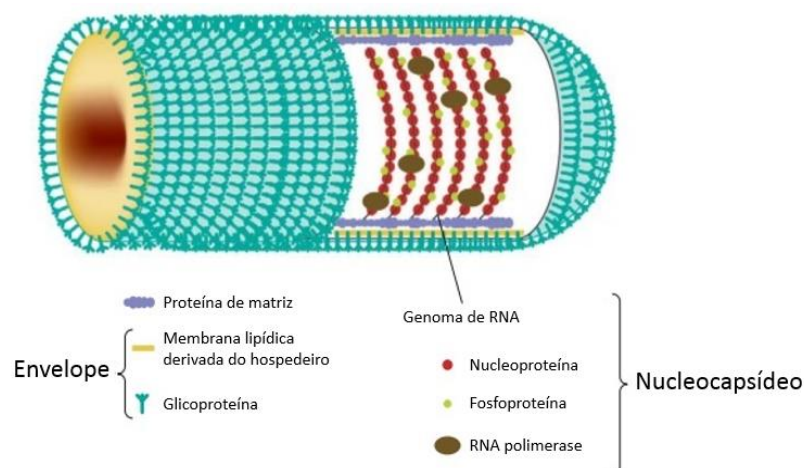
em humanos possivelmente expostos ou expostos à raiva (LYLES, KUZMIN e RUPPRECHT, 2013).

1.2.2. ESTRUTURA DA PARTÍCULA VIRAL

5 A partícula viral dos lissavírus possui forma de bala, com 60 a 110 nanômetros de diâmetro e 130 a 250 nanômetros de comprimento. Esses são compostos por duas unidades estruturais: um nucleocapsídeo helicoidal interno (com cerca de 50 nanômetros de diâmetro) e um envelope lipídico derivado da membrana plasmática da célula hospedeira. O nucleocapsídeo compreende um

10 complexo de ribonucleoproteína que consiste, em um genoma de RNA, uma nucleoproteína (N), uma fosfoproteína (P) e a RNA polimerase RNA-dependente (L). A posição da proteína de matriz (M) é controversa e pode estar contida no canal central da ribonucleoproteína ou formar uma hélice entre a ribonucleoproteína e a membrana da partícula viral. A glicoproteína (G) é composta de quatro domínios

15 distintos: um peptídeo sinal, um ectodomínio, um peptídeo transmembrana e um domínio citoplasmático. Espículas, que consistem em três ectodomínios glicosilados da proteína G, se projetam através da membrana da partícula viral (DIETZGEN et al., 2011) (FIGURA 1).



20

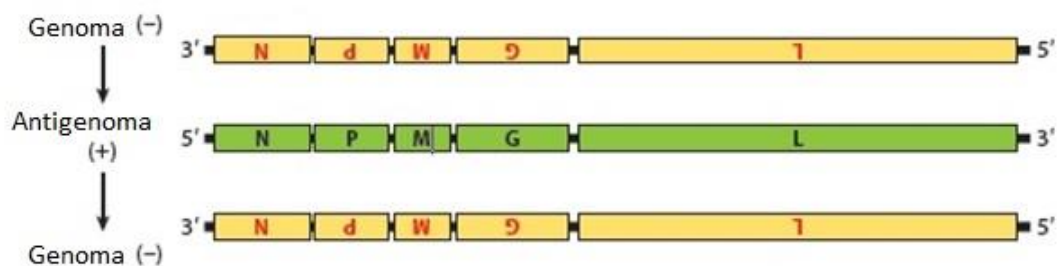
Figura 1 – Partícula viral do vírus da raiva. O nucleocapsídeo consiste em um genoma de RNA, uma nucleoproteína, uma fosfoproteína e a RNA polimerase RNA-dependente. O envelope lipídico é derivado da membrana plasmática da célula hospedeira e possui glicoproteínas inseridas.

Fonte: Adaptado de Warrell e Warrell, 2004.

25

1.2.3. ESTRUTURA DO GENOMA

Os lissavírus apresentam um genoma de RNA de fita simples com polaridade negativa e um tamanho aproximado de 12 kilobases. O genoma consiste de uma sequência líder de cerca de 50 nucleotídeos, seguida de cinco genes de proteínas estruturais na ordem: 3' -N-P-M-G-L- 5'. Esses genes são separados por regiões intergênicas não codificantes seguidas de uma sequência ao final do genoma de 70 nucleotídeos na região 5' (DIETZGEN et al., 2011) (FIGURA 2).



10 **Figura 2 - Genoma do vírus da raiva.** O genoma de RNA de fita simples possui uma região líder (LDR) seguida dos genes N, P, M, G, e L. Durante a replicação, o genoma de senso negativo (amarelo) é transcrito em um RNA intermediário de senso positivo ou antigenoma (verde). O antigenoma é então transcrito de volta a um RNA de senso negativo, completando a replicação.

Fonte: Adaptado de Davis, Rall e Schnell, 2015.

15

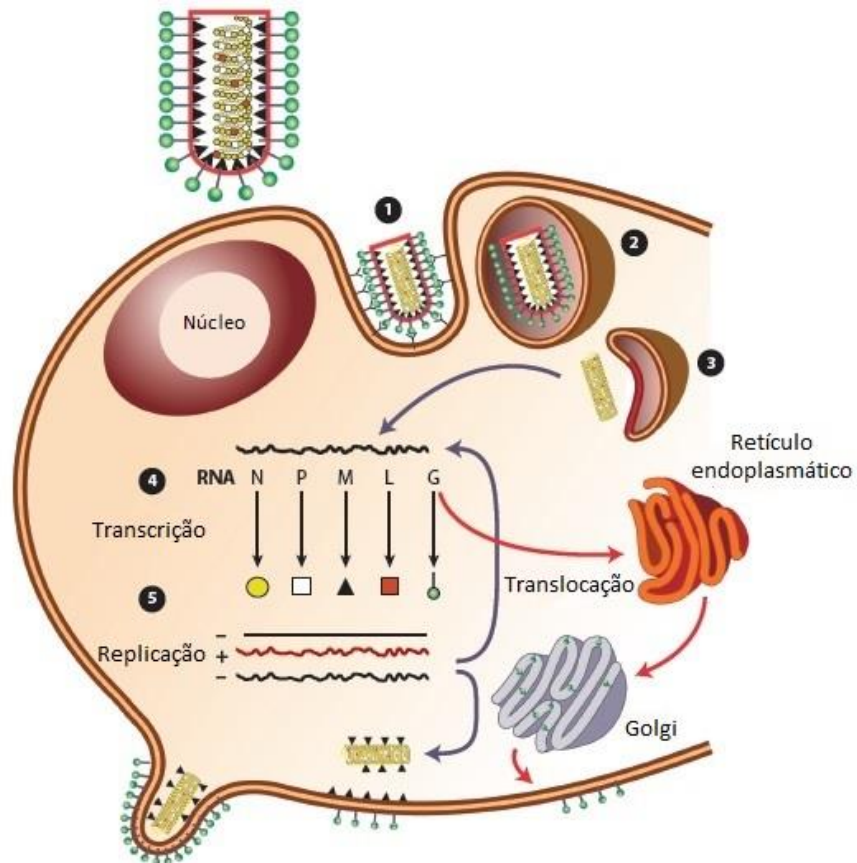
1.2.4. CICLO DE MULTIPLICAÇÃO

O vírus entra na célula pela ligação com receptores de superfície celular, esse evento é mediado pela ligação da glicoproteína viral (G) com a membrana celular. Após a internalização do vírus, a glicoproteína viral G medeia a fusão dependente de baixo pH com a membrana endossomal e o vírus é desnudado, liberando o nucleocapsídeo do núcleo ribonucleoproteico. Os cinco genes estruturais (N, P, M, G e L) do genoma de RNA são transcritos em cinco RNAs mensageiros monocistrônicos de polaridade positiva e em um RNA de polaridade positiva de comprimento completo, o qual serve como molde para replicação da progênie do genoma viral de polaridade negativa. As proteínas (N, P, M e L) são sintetizadas a partir dos seus respectivos RNAs mensageiros em ribossomos livres no citoplasma e a proteína G é sintetizada a partir do seu RNA mensageiro em membranas ligadas a

20

25

ribossomos (retículo endoplasmático rugoso) (WUNNER e CONZELMANN, 2013) (FIGURA 3).



- 5 **Figura 3 - Ciclo de multiplicação do vírus da raiva.** Uma partícula do vírus da raiva se liga a um receptor na célula hospedeira (1) e é internalizada pela membrana celular do hospedeiro (2). Após a fusão, mediada por pH, da membrana da partícula viral com a membrana endossomal (3), o capsídeo é liberado, os genes transcritos (4) e o genoma replicado (5).

Fonte: Adaptado de Davis, Rall e Schnell, 2015.

10

1.2.5. DIAGNÓSTICO

O diagnóstico clínico da raiva não é difícil em casos com um histórico documentado de exposição e subsequentes sinais clínicos ou sintomas compatíveis (LYLES, KUZMIN e RUPPRECHT, 2013). Entretanto, a raiva deve ser considerada suspeita em qualquer doença neurológica aguda inexplicável que rapidamente progride para um estado de coma ou morte (BAER, BELLI e FISHBEIN, 1990). O diagnóstico de rotina é estabelecido por testes laboratoriais padronizados para os isolados, antígenos, ácidos nucleicos ou anticorpos neutralizantes do vírus

15

específico (SMITH, 1999). O diagnóstico *post mortem* deve ser realizado em espécimes do sistema nervoso central (SNC), especialmente no tronco cerebral e cerebelo (TEPSUMETHANON et al., 1997). A reação em cadeia da polimerase precedida de transcrição reversa (RT-PCR) tem sido utilizada para amplificar e posteriormente para sequenciar partes do genoma de lissavírus diretamente do cérebro, saliva e outros tecidos afetados (HEATON et al., 1997, SMITH, 1999). Essa técnica permite a detecção do RNA viral especificamente e também permite percepções na identificação de variantes do vírus através do sequenciamento genético. Vários testes diagnósticos têm sido desenvolvidos para a detecção de anticorpos neutralizantes do vírus, como o teste rápido de inibição de focos fluorescentes (RFFIT) e neutralização do vírus por anticorpo fluorescente (FAVN), que são recomendados por autoridades como a Organização Mundial da Saúde (OMS) (LYLES, KUZMIN e RUPPRECHT, 2013). Outros métodos sorológicos foram desenvolvidos para detectar anticorpos contra outros componentes do RABV, principalmente contra o nucleocapsídeo, que é o mais abundante em células infectadas. Dos testes sorológicos, o mais bem estabelecido é o teste de imunofluorescência indireta (IFA). Os anticorpos detectados por IFA aparecem mais cedo que os anticorpos neutralizantes do vírus e, por vezes, é o único resultado positivo obtido *ante mortem* (CDC, 2010).

20

1.2.6. PREVENÇÃO E CONTROLE

A raiva tem o mais alto índice de fatalidade dentre as doenças infecciosas (LYLES, KUZMIN e RUPPRECHT, 2013). Diante desse fato e da inexistência de um tratamento específico para a doença, a prevenção em humanos é direcionada para o tratamento profilático quando há suspeita de exposição ao vírus. Vacinas antirrábicas produzidas em cultura de células e em ovos embrionados são utilizadas tanto para a profilaxia pré-exposição quanto para a profilaxia pós-exposição, e têm sido administradas a milhões de pessoas em todo o mundo (WHO, 2013).

Nos seres humanos, a profilaxia pré-exposição é altamente preconizada para aqueles que estão em risco de exposição aos lissavírus devido a certos fatores, como trabalho, residência ou viagem (WHO, 2013). Já a profilaxia pós-exposição recomendada é a limpeza imediata da ferida e a administração de imunoglobulina e

30

vacina antirrábica (SMITH, 1996). Os biológicos antirrábicos disponíveis atualmente fornecem proteção confiável contra o filogrupos I dos lissavírus (RABV, DUVV, EBLV-1, EBLV-2, ABLV, ARAV, KHUV, DUVV), porém eles não protegem contra o filogrupos II dos lissavírus (LYLES, KUZMIN e RUPPRECHT, 2013).

5 A eliminação da exposição primária a animais infectados com raiva é um meio fundamental para a prevenção da doença (WHO, 2013). Mortes por raiva em humanos são pouco frequentes em regiões com a raiva em cães controlada, dado que cães domésticos são os reservatórios mais comuns do vírus (WHO, 2013). Entretanto, muitos casos de exposição são tratados na Europa e na América do
10 Norte devido à raiva enzoótica silvestre (HANLON, OLSON e CLARK, 1999).

Atualmente, a raiva não é considerada erradicada devido a seus numerosos e diversos reservatórios silvestres da doença (LYLES, KUZMIN e RUPPRECHT, 2013). A eliminação da raiva de espécies silvestres, que servem como reservatórios do vírus, necessita de alguns avanços no campo da vacinação e principalmente, de
15 uma melhor compreensão de como o vírus é mantido e transmitido entre estes animais silvestres. Dessa forma, a vigilância epidemiológica é de extrema importância para detectar e prever a emergência de novos reservatórios da doença (SMITH, 1996).

20 1.2.7. EPIDEMIOLOGIA

A raiva é uma zoonose - doença transmitida de animais para seres humanos - negligenciada. Com exceção da Antártica, a doença é considerada endêmica em todos os continentes. A raiva está presente em mais de 100 países, com o maior número de óbitos registrados na África e Ásia. Entretanto, o real impacto da doença
25 é considerado subestimado, com mais de três milhões de pessoas consideradas sob risco de infecção em todo o mundo (WHO, 2013) (FIGURA 4). Mesmo sendo considerada uma doença endêmica em muitos continentes, a vigilância não é eficaz, especialmente em animais silvestres (LYLES, KUZMIN e RUPPRECHT, 2013).

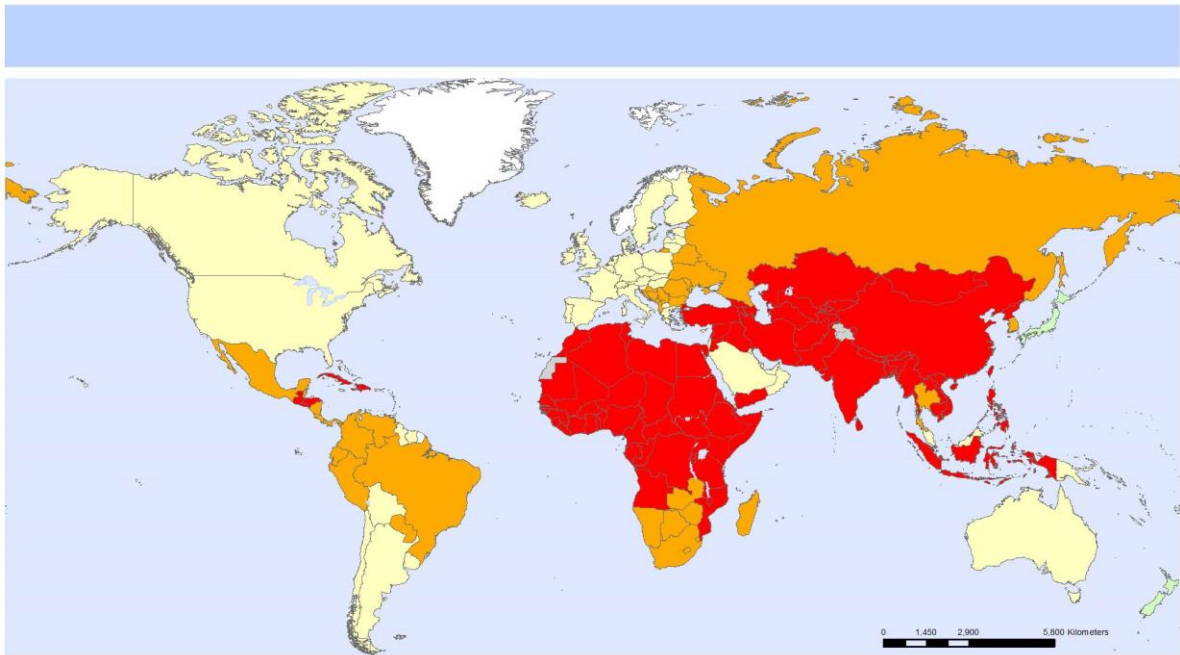


Figura 4 - A raiva e suas áreas de risco. Mapa das áreas de risco de infecção com o vírus da raiva. Legenda: Vermelho - Áreas com alto risco; Laranja - Áreas de risco médio; Amarelo - Áreas com baixo risco; Verde - Áreas sem risco.

5 Fonte: Adaptado de WHO, 2013.

A epidemiologia do gênero *Lyssavirus* é parcialmente influenciada pela distribuição de espécies hospedeiras, abundância, demografia, ecologia comportamental, dispersão e interação com os seres humanos (RUPPRECHT et al., 1995). Nas Américas, todas as amostras de vírus do gênero *Lyssavirus* isoladas são da espécie *Rabies virus* (RABV) (BADRANE e TORDO, 2001; BERNARDI et al., 2005). O cão doméstico é o principal hospedeiro e o maior vetor do RABV em todo o mundo (WANDELER et al., 1993). Entretanto, todos os mamíferos são susceptíveis ao RABV e são considerados potenciais vetores (GAUTRET et al., 2014).

15 Um estudo sobre a história evolutiva do vírus da raiva canina no Brasil, realizado por meio de análise filogenética, indicou que a introdução do vírus ocorreu por volta do final do século XIX e no início do século XX. Esse período corresponde ao de grande movimento imigratório da Europa para o Brasil. Em seguida, durante o século XX, o vírus disseminou-se entre os animais carnívoros autóctones, em
20 consequência do rápido desenvolvimento no país (KOBAYASHI et al., 2011).

1.2.8. HOSPEDEIROS E RESERVATÓRIOS

A classe *Mammalia* possui cerca de 4.650 espécies, sendo todas susceptíveis ao vírus da raiva. Porém, como reservatórios de importância em saúde pública são mencionadas duas ordens: *Carnivora* e *Chiroptera* (KOTAIT et al., 2007). Entre as
5 aproximadamente 1.113 espécies da ordem *Chiroptera* existentes no mundo, são encontradas no Brasil, atualmente, cerca de 165 espécies entre os morcegos insetívoros, frugívoros e hematófagos (PERACCHI et al., 2006). Os morcegos são os principais hospedeiros reservatórios para a maioria dos lissavírus, enquanto os
10 carnívoros terrestres mantêm a circulação do vírus da raiva (DIETZGEN et al., 2011). Na ordem *Carnivora*, destacam-se os cães, raposas, cachorro do mato e guaxinins (BACCHIEGA, 2014).

É sabido que a raiva é uma doença de animais de sangue quente, e enquanto os carnívoros são reconhecidos como os principais vetores devido aos seus atributos físicos e comportamentais, todos os mamíferos, incluindo herbívoros,
15 insetívoros e onívoros (que incluem os roedores), podem ser infectados e são potencialmente capazes de transmitir a doença (WINKLER, 1991).

Pesquisadores utilizam muitas vezes os roedores para o isolamento do vírus da raiva em laboratórios (WINKLER, 1991). Sendo assim, a possibilidade de transmissão do vírus da raiva para os seres humanos ou outros animais a partir
20 destes existe. Assim, a investigação de roedores deve ser considerada (CHILDS et al., 1997). Dada à suscetibilidade comprovada de roedores a infecção pelo vírus da raiva, a ampla distribuição de roedores em áreas com a circulação do vírus e de que os roedores são presas naturais para muitos hospedeiros carnívoros da doença, parece contraditório a não ocorrência de raiva em roedores na natureza (WINKLER,
25 1991).

As vias de infecção podem ser um pouco diferentes em roedores se comparado com outros mamíferos. Tem sido sugerido que os roedores, principalmente os menores, não sobreviveriam ao trauma de uma mordida de um carnívoro infectado pelo vírus e morreriam antes que pudessem sucumbir à doença.
30 Porém, em estudos experimentais, roedores se tornaram infectados após a ingestão de tecidos infectados. Essa forma de infecção pode ocorrer na natureza, visto que muitos roedores se alimentam de animais em putrefação. Os roedores acumulam o

vírus da raiva nas glândulas salivares, como outras espécies suscetíveis, sendo também capazes de transmitir o vírus por mordida (WINKLER, 1972).

Em 1950, foi descrito um caso de raiva em uma menina grega mordida por um rato, porém não foi possível o diagnóstico do animal. Em 1945, foi descrito raiva
5 também em um homem mordido por um rato na Romênia. A raiva em roedores tem sido amplamente estudada nos Estados Unidos. Entre os anos de 1950 a 1961, laboratórios da Florida analisaram mais de 10 mil roedores em busca da raiva, porém somente um esquilo se mostrou positivo para o vírus. Foi pressuposto que esse animal foi infectado após contato com um morcego infectado com o vírus da
10 raiva, devido à estreita associação observada entre esses animais e a relatos prévios de raiva em morcegos na Florida. Na Califórnia e Carolina do Sul, incidentes isolados com roedores infectados foram confirmados em laboratório. Entretanto, como no caso da Flórida, citado acima, não houve evidências de que estes roedores estavam envolvidos na manutenção ou na transmissão da doença (WINKLER,
15 1991).

O papel dos roedores na epidemiologia da raiva tem despertado o interesse de pesquisadores. A distribuição mundial dos roedores, o elevado número de indivíduos da ordem e a diversidade de espécies podem oferecer uma explicação para muitos fenômenos inexplicáveis da epidemiologia desse vírus. Estudos são
20 necessários para a compreensão do papel deste grande grupo na manutenção e propagação do vírus da raiva na natureza (WINKLER, 1991).

Pouco se sabe a respeito do papel dos marsupiais no ciclo silvestre da raiva, de qual forma e via ele se infecta e se pode transmitir o vírus a outros animais, incluindo humanos. O que se tem conhecimento é que esses animais são
25 resistentes à inoculação do vírus rábico por via intramuscular, mas apresentam maior sensibilidade pela inoculação nasal de partículas do vírus (BEAMER, MOHR e BARR, 1960).

Bacchiega confirmou a circulação do vírus da raiva nas espécies *Didelphis albiventris* e *Didelphis aurita* (pertencentes a ordem *Didelphimorphia*), através da
30 identificação de anticorpos neutralizantes do vírus. O índice de prevalência desses anticorpos para o vírus rábico é alto quando comparado com outras espécies silvestres conhecidas como reservatórios do vírus rábico (morcegos e primatas não humanos) (BACCHIEGA, 2014). A raiva silvestre nesses animais assumiu maior

importância também devido aos seus hábitos sinantrópicos, que alcançaram as áreas urbanas e de transição, em consequência da maior oferta de alimentos existente nestas áreas e ao impacto ambiental provocado pela ação humana em seus habitats naturais (KOTAIT et al., 2007).

5

1.3. CORONAVÍRUS

1.3.1. CLASSIFICAÇÃO E HISTÓRICO

Os coronavírus estão atualmente classificados na subfamília *Coronavirinae*, pertencente à família *Coronaviridae*, ordem *Nidovirales*. A subfamília *Coronavirinae* inclui os quatro gêneros: *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Deltacoronavirus* e *Gammacoronavirus* (TABELA 1) (DE GROOT et al., 2013; ICTV, 2014).

10

Tabela 1 – Os quatro gêneros de coronavírus e suas espécies, agrupados por filogenia.

Gêneros	Espécies
<i>Alphacoronavirus</i>	<i>Alphacoronavirus 1</i> (TGEV, FCoV, CCoV); HCoV-229E, HCoV-NL63; Mi-BatCoV 1; Mi-BatCoV HKU8; Rh-BatCoV HKU2; Sc-BatCoV 512; PEDV.
<i>Betacoronavirus</i>	<i>Betacoronavirus 1</i> (BCoV, EqCoV, HCoV-OC43, PHEV) Murine coronavirus (MHV, RCoV); HCoV-HKU1; SARS-CoV; Ty-BatCoV HKU4; Pi-BatCoV HKU5; Ro-BatCoV HKU9; MERS-CoV (a ser estabelecida)
<i>Deltacoronavirus</i>	<i>Bulbul CoV</i> HKU11; <i>Munia CoV</i> HKU13; <i>Thrush CoV</i> HKU12.
<i>Gammacoronavirus</i>	<i>Avian coronavirus</i> (IBV, TuCoV); <i>Beluga whale coronavirus</i> SW1.

Fonte: De Groot et al., 2013; ICTV, 2014.

15

Os coronavírus (CoVs) infectam uma grande variedade de animais, causando doenças respiratórias, entéricas, hepáticas e neurológicas de gravidade variável (WOO et al., 2012; LAU et al., 2014). Esses vírus encontram-se amplamente distribuídos entre os seres humanos, outros mamíferos e aves (MASTERS e PERLMAN, 2013).

20

A partir da década de 30, alguns coronavírus foram isolados como responsáveis por infecções em animais, como porcos, aves e ratos (MASTERS e PERLMAN, 2013). Trinta anos depois, dois coronavírus (229E e OC43) foram reconhecidos por causarem infecções no trato respiratório superior em humanos (LU et al., 2012). No ano de 2002-2003, ocorreu um surto de uma nova doença, a síndrome respiratória aguda grave (do inglês *severe acute respiratory syndrome - SARS*), causada por um novo coronavírus até então desconhecido, o SARS-CoV (DROSTEN et al., 2003; KSIAZEK et al., 2003; PEIRIS et al., 2003). Este surto estimulou pesquisas e grandes avanços no estudo desses vírus (MASTERS e PERLMAN, 2013), resultando, nos anos seguintes, na descoberta dos coronavírus NL63 e HKU1, identificados em 2004 e 2005, respectivamente (VAN DER HOEK et al., 2004; WOO et al., 2005). Em 2012, outro coronavírus foi descoberto (ZAKI et al., 2012; BERMINGHAM et al., 2012; VAN BOHEEMEN et al., 2012), responsável por uma doença respiratória grave denominada síndrome respiratória do Oriente Médio (do inglês *Middle East respiratory syndrome - MERS*) causada pelo coronavírus MERS-CoV (DE GROOT et al., 2013).

Seis coronavírus (229E, NL63, OC43, HKU1, SARS e MERS) estão associados a infecções em humanos e são denominados coronavírus humanos (HCoV) (DOMINGUEZ et al., 2014). Os vírus HCoV-229E, HCoV-NL63, HCoV-OC43 e HCoV HKU1 estão na maioria das vezes associados a infecções do trato respiratório superior, causando resfriados comuns. No entanto, podem ocasionalmente trazer consequências mais graves em jovens, idosos e indivíduos imunocomprometidos (MASTERS e PERLMAN, 2013). Os vírus SARS-CoV e MERS-CoV são vírus associados a infecções graves, ocasionando doença do trato respiratório inferior com altas taxas de fatalidade (CHAN et al., 2012), é provável que esses vírus tenham origem em reservatórios animais e cruzaram barreiras interespecies para infectar humanos (CHAN et al., 2013).

1.3.2. ESTRUTURA DA PARTÍCULA VIRAL

Os coronavírus são partículas esféricas e envelopadas, com tamanho de diâmetro podendo variar de 50 a 200 nanômetros (média de 80 a 120 nanômetros de diâmetro). Na superfície da partícula viral encontram-se presentes projeções em

formato de pétala, denominadas espículas, que são características desses vírus. O nucleocapsídeo dos coronavírus, ribonucleoproteína que contém o genoma viral, possui uma simetria helicoidal e se encontra inserida no interior do envelope viral (MASTERS e PERLMAN, 2013).

- 5 Os coronavírus possuem quatro principais proteínas estruturais, sendo elas: a proteína *spike* ou da espícula (S), a proteína de membrana (M), a proteína do envelope (E), e a proteína do nucleocapsídeo (N). As proteínas S, M e E encontram-se localizadas na membrana do envelope viral, enquanto a proteína N localiza-se no cerne da ribonucleoproteína (MASTERS e PERLMAN, 2013) (FIGURA 5).

10

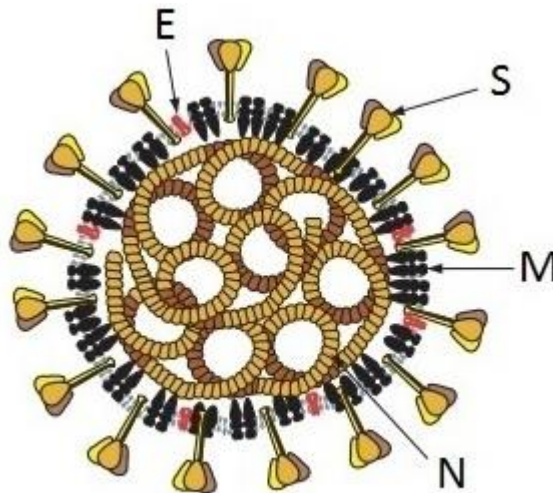


Figura 5 - Estrutura da partícula viral dos coronavírus. Esquema mostrando as principais proteínas estruturais dos coronavírus: S, proteína *spike* ou da espícula; M, proteína de membrana; E, proteína do envelope; e N, proteína do nucleocapsídeo.

- 15 Fonte: Adaptado de Masters e Perlman, 2013.

1.3.3. ESTRUTURA DO GENOMA

- 20 O genoma dos coronavírus é constituído por uma molécula de RNA fita simples com aproximadamente 30 kilobases, com polaridade positiva e presença de estrutura *cap* na extremidade 5' e cauda poliadenilada na extremidade 3', o que permite sua atuação como um RNAm (FEHR e PERLMAN, 2015). Devido ao seu tamanho, o genoma desses vírus é considerado o maior entre todos os vírus de

RNA, incluindo os de genoma segmentado e não segmentado (MASTERS e PERLMAN, 2013).

5 Duas janelas de leitura (do inglês *open reading frame* ou ORFs), denominadas ORF1a e ORF1b, ocupam os dois primeiros terços do genoma a partir da extremidade 5'. Essa porção contém os genes responsáveis pela codificação das proteínas do complexo replicase-transcriptase, ou seja, proteínas não estruturais (UJIKE e TAGUCHI, 2015; FEHR e PERLMAN, 2015). O terço restante do genoma, próximo a extremidade 3', é ocupado pelos genes responsáveis pela codificação de proteínas estruturais e acessórias (GORBALENYA et al., 2006; UJIKE e TAGUCHI, 10 2015; FEHR e PERLMAN, 2015). É também nessa porção do genoma, localizado anteriormente ao gene codificador da proteína estrutural da espícula (S), que se encontra o gene codificador da glicoproteína de envelope hemaglutinina esterase (HE), característica de alguns *Betacoronavirus* (LISSENBERG et al., 2005) (FIGURA 6).

15



Figura 6 - Genoma dos *Betacoronavirus*. Os primeiros dois terços do genoma (ORF1a e ORF1b) codifica as proteínas não estruturais (Verde). O restante do genoma codifica as quatro proteínas estruturais: S, E, M e N (Laranja). Alguns *Betacoronavirus* possuem o gene de hemaglutinina esterase (HE) (Laranja). O genoma de cada gênero ou espécie possui um conjunto de proteínas acessórias únicas (Vermelho).

20

Fonte: Adaptado de Ujike e Taguchi, 2015.

1.3.4. CICLO DE MULTIPLICAÇÃO

25 A partícula viral dos coronavírus se ligam à célula mediante a interação entre a proteína S viral e seu receptor específico na célula hospedeira (existem atualmente diversos receptores conhecidos). Essa interação é determinante para que ocorra a infecção por coronavírus, além de estabelecer o tropismo viral. Após essa interação, o vírus ganha acesso ao citoplasma celular por meio da clivagem proteolítica da proteína S, dependente de pH ácido, culminando na fusão do

30

envelope viral com a membrana endossômica. No citoplasma, ocorre então, a tradução do gene da replicase-transcriptase (ORF1a e ORF1b) a partir do RNA genômico viral, gerando a poliproteína replicase. Essa poliproteína é processada por proteases virais em 16 proteínas não estruturais, que se associam às membranas de vesículas onde ocorrem a síntese de RNA genômico e a transcrição de RNAs mensageiros subgenômicos. Os RNAs subgenômicos são então traduzidos em proteínas virais estruturais e acessórias. Após a síntese do RNA genômico viral, esse, forma um complexo com a proteína estrutural do nucleocapsídeo (N), originando o nucleocapsídeo de estrutura helicoidal. As proteínas estruturais virais de membrana (M), do envelope (E) e da espícula (S) são inseridas no retículo endoplasmático. O nucleocapsídeo e as proteínas do envelope se movem para o compartimento intermediário entre o complexo de Golgi e o retículo endoplasmático onde se associam formando a partícula viral. Após a montagem, os vírions são transportados para a superfície da célula hospedeira por meio de vesículas, e liberadas por exocitose (MASTERS e PERLMAN, 2013; FEHR e PERLMAN, 2015) (FIGURA 7).

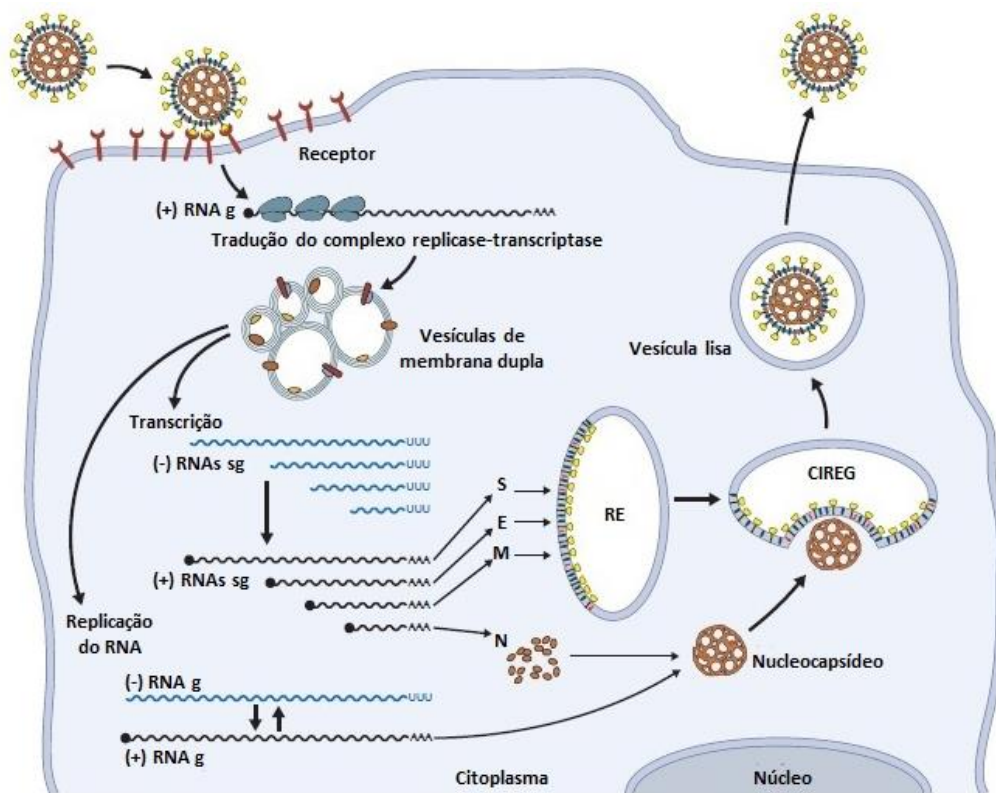


Figura 7 - Ciclo de multiplicação dos coronavírus. (RNA g) RNA genômico. (RNA sg) RNA subgenômico. (S) Proteína *spike*. (E) Proteína do envelope. (M) Proteína de membrana. (N) Proteína

do nucleocapsídeo. (CIREG) Compartimento intermediário entre o retículo endoplasmático e o complexo de Golgi.

Fonte: Adaptado de Masters e Perlman, 2013.

5 1.3.5. DIAGNÓSTICO

A maioria das infecções por coronavírus são auto-limitadas e o diagnóstico não é realizado (FEHR e PERLMAN, 2015). A maioria das infecções por HCoVs, causam doença respiratória superior leve e o diagnóstico clínico não é possível, devido a semelhança dos sintomas causados por esses vírus com sintomas
10 causados por outras infecções do trato respiratório superior (MASTERS e PERLMAN, 2013).

Contudo, existem algumas ocasiões onde o diagnóstico específico do agente etiológico é importante, como estudos epidemiológicos e situações clínicas graves na saúde humana e animal. Além disso, existem ocasiões onde o diagnóstico é
15 fundamental, como em locais onde surtos graves estejam ocorrendo devido a circulação de vírus como o MERS-CoV (FEHR e PERLMAN, 2015).

Atualmente tem se utilizado em grande escala, métodos de diagnóstico de infecções por coronavírus baseados em RT-PCR (NOBRE et al., 2014), *nested*-RT-PCR (LAM et al., 2007; CHU et al., 2011) e RT-PCR em tempo real (CHAN et al.,
20 2015; VIGNOLES et al., 2015). Além de diversos ensaios sorológicos, como ELISA (CHEN et al., 2015; PARK et al., 2015), imunofluorescência (HE et al., 2005) e ensaios de neutralização (NIE et al., 2004).

1.3.6. TRATAMENTO E PREVENÇÃO

25 Até o momento, não há terapias antivirais específicas contra infecções com HCoVs (MASTERS e PERLMAN, 2013; GRAHAM, DONALDSON, BARIC, 2013; FEHR e PERLMAN, 2015). Existem vacinas de uso veterinário contra alguns coronavírus animais, como o vírus da bronquite infecciosa e o coronavírus canino, no entanto, ainda não existem vacinas disponíveis para a prevenção das infecções
30 com HCoVs (MASTERS e PERLMAN, 2013). Várias estratégias estão sendo analisadas para o desenvolvimento de vacinas eficazes e seguras (GRAHAM,

DONALDSON, BARIC, 2013), enquanto isso o controle e a prevenção contra infecções por coronavírus humanos depende de um sistema de vigilância em saúde pública eficaz e de práticas de controle de infecção adequadas (MASTERS e PERLMAN, 2013).

5

1.3.7. EPIDEMIOLOGIA

Os coronavírus HCoV-OC43, HCoV-229E, HCoV-NL63 e HCoV-HKU1 estão distribuídos mundialmente (MASTERS e PERLMAN, 2013) e circulam há muitos anos entre os humanos (CHAN et al., 2015). Com base em estudos de prospecção, os HCoV-OC43, HCoV-229E, HCoV-NL63 e HCoV-HKU1 são responsáveis por 10 - 30% de todas as infecções do trato respiratório superior (PYRC, BERKHOUT e VAN DER HOEK, 2007; MCINTOSH, 1974; MONTO, 1974; LARSON, REED e TYRRELL, 1980; ISAACS et al., 1983). No Brasil, os vírus HCoV-229E, HCoV-OC43 e HCoV-HKU1, já foram demonstrados circulando em crianças e adultos (MACEDO, 2002; BELLEI et al., 2008).

O SARS-CoV, emergiu no ano de 2003 na China e se disseminou por diferentes países, causando surtos que resultaram em 8.422 casos em todo o mundo, com 916 mortes (WHO, 2003). Após medidas de controle e quarentena, a infecção pelo SARS-CoV desapareceu ainda em 2003 (COLEMAN e FRIEMAN, 2014).

O mais recente coronavírus descoberto, MERS-CoV, no ano de 2012, se disseminou da Arábia Saudita para diversos países do Oriente Médio e Europa com relatos elevado de morbidade (AL-TAWFIQ, 2013). Em maio de 2014, dois casos foram confirmados nos Estados Unidos, ambos em pacientes com recente viagem a Arábia Saudita, onde se acredita ter ocorrido a infecção. A monitoração na região é constante, visto a existência de risco de disseminação e o pouco conhecimento sobre o vírus (CDC, 2015).

25

1.3.8. HOSPEDEIROS E RESERVATÓRIOS

Os coronavírus (CoVs) são comumente detectados em morcegos ao redor do mundo, mas podem ser encontrados em muitas outras espécies como aves, gatos, cães, porcos, ratos, cavalos e seres humanos (GUY et al., 2000). Os morcegos e outros pequenos mamíferos são importantes reservatórios de vírus, como os coronavírus, que podem ser transmitidos para os humanos (COLEMAN E FRIEMAN, 2014).

Os gêneros *Alphacoronavirus* e *Betacoronavirus*, abrangem vírus que estão relacionados a infecção em diversos mamíferos (WOO et al., 2009; WOO et al., 2012). O gênero *Betacoronavirus* compreende vírus que infectam humanos (HCoV-HKU1 e HCoV-OC43), bovinos (BCoV), equinos (EqCoV), roedores (MHV e RCoV), morcegos (Ty-BatCoV HKU4 e Pi-BatCoV HKU5), entre outros (MASTERS e PERLMAN, 2013). Além desses, o gênero ainda compreende os vírus zoonóticos SARS-CoV e MERS-CoV, possivelmente com origem em morcegos (ECKERLE et al., 2014), responsáveis por graves epidemias nos anos de 2003 e 2012, respectivamente (DROSTEN et al., 2003; DE GROOT et al., 2013). Esses surtos, evidenciam a gravidade de coronavírus associados a doenças respiratórias em humanos e existência de um potencial para a emergência de coronavírus humanos a partir de reservatórios silvestres (DOMINGUEZ et al., 2014).

O CoV do tipo SARS já foi isolado de animais silvestres como morcegos e guaxinins. Entretanto, as investigações nestes animais são raras e relativamente pouco se sabe sobre a prevalência de coronavírus nessas espécies. A identificação de SARS-CoV em animais silvestres sugere que este patógeno humano emergiu como resultado de uma transmissão interespecies (POON et al., 2005). O surto causado pelo SARS-CoV, gerou um interesse maior em entender os coronavírus, pois antes de ganhar importância para a saúde pública, as doenças associadas aos coronavírus eram principalmente de interesse veterinário (DROSTEN et al., 2003; KSIAZEK et al., 2003). Esses fatos apontam a introdução desses vírus em humanos e em animais silvestres simultaneamente, sugerindo a possibilidade de serem encontrados também em outros hospedeiros ou reservatórios ainda não documentados. Mais importante ainda, esses achados destacam o potencial risco

para a saúde humana decorrente de infecções de animais silvestres com coronavírus (POON et al., 2005).

A maioria dos coronavírus infecta naturalmente apenas uma espécie animal ou um número limitado de espécies intimamente relacionadas. Por outro lado, devido à alta frequência de erros gerados pela RNA polimerase, os coronavírus são reconhecidos pela sua capacidade de mutabilidade e de recombinação do RNA, mecanismos importantes na evolução natural destes vírus (LAI, PERLMAN e ANDERSON, 2007). Essa capacidade de mudança genética permite a adaptação desse gênero a novos hospedeiros e nichos ecológicos, por vezes causando surtos zoonóticos com graves consequências (LE PODER, 2011). Somado a isso, os coronavírus possuem a capacidade de utilizar uma variedade de receptores em seus hospedeiros, sendo capazes de causar um grande espectro de doenças (WOO et al., 2012).

Além da emergência de SARS-CoV e MERS-CoV como vírus patogênicos humanos importantes (COLEMAN e FRIEMAN, 2014), os HCoVs também se destacam como agentes etiológicos emergentes, sejam os tipos já conhecidos como OC43 e 229E, bem como os recentemente descobertos agentes NL63 e o HKU1 (NOBRE et al., 2014).

Estudos de vigilância viral em espécies animais, como morcegos, roedores e gado, são essenciais para o entendimento do potencial patogênico para humano que existe no meio ambiente, antes que eles possam emergir. Portanto, existe a necessidade de pesquisar esses vírus com potencial emergente e também desenvolver uma vacina de amplo espectro ou estratégias terapêuticas para prevenção dos CoVs emergentes atuais e futuros (COLEMAN e FRIEMAN, 2014).

2. JUSTIFICATIVA

O mundo vem sofrendo um aumento na emergência e reemergência de doenças infecciosas humanas, principalmente zoonoses. Diversos fatores contribuem para a emergência de novas doenças, entre eles o aumento da
5 degradação ambiental causada pelo homem, o que leva a aproximação deste com animais silvestres e conseqüentemente com patógenos. Entre os diversos patógenos responsáveis por essas doenças, podemos destacar os agentes virais, que vem emergindo e reemergindo principalmente em regiões tropicais e subtropicais.

10 O Brasil é um país tropical que vem sofrendo grandes avanços antrópicos em seus ambientes naturais. A Mata Atlântica é o ecossistema brasileiro mais devastado e ameaçado, e, além disso, é caracterizado por uma grande diversidade de espécies. Diante desses fatos, observa-se uma ligação entre o avanço antrópico nos ambientes naturais, com conseqüente aumento da proximidade entre animais
15 silvestres e humanos. Essa proximidade não se limita somente ao ser humano e ocorre também com os animais domésticos. Caracteriza-se assim um cenário facilitador da disseminação de patógenos, principalmente zoonóticos, para novos hospedeiros e novos ambientes. Diversos vírus, pertencentes às famílias virais como *Coronaviridae* e *Rhabdoviridae*, têm sido descritos em humanos, animais
20 domésticos e animais silvestres. Os vírus dessas duas famílias caracterizam-se por possuir genoma de RNA, os quais são mais frequentemente associados a emergência e reemergência de doenças que causam um grande impacto na saúde pública mundial, devido às suas altas capacidades de mudanças evolutivas.

25 Os roedores, os marsupiais e os morcegos correspondem a uma grande parte de todas as espécies de mamíferos e possuem características que os favorecem como reservatórios zoonóticos, como alta diversidade, proximidade com os seres humanos, capacidade de adaptação em novos ambientes, entre outros. As áreas onde foram coletados os pequenos mamíferos silvestres para este estudo, estão localizadas em região de bioma de Mata Atlântica, porém com características
30 distintas, incluindo áreas florestais com elevado grau de conservação ambiental, fragmentos de mata nativa com diferentes níveis de antropização, áreas de pastagem e áreas próximas ao peridomicílio rural. Diante dessas circunstâncias,

essas áreas se tornam um interessante foco de estudo de prospecção viral, tendo como objetivo a predição de surtos zoonóticos relacionados a pequenos mamíferos silvestres, especialmente roedores, morcegos e marsupiais.

5 É possível prever a ocorrência de uma doença zoonótica se houver um monitoramento de pesquisa constante. Assim, esse tipo de pesquisa busca diminuir os impactos que determinados agentes virais podem vir a causar no ambiente e nos indivíduos.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

- Investigar a circulação do coronavírus humano HKU1 e do vírus da raiva em pequenos mamíferos silvestres, no estado de Minas Gerais.

5

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Compor uma coleção de vísceras e soro de pequenos mamíferos silvestres (roedores e marsupiais) para prospecção de vírus zoonóticos emergentes, denominada Col-ECOVIR.

10

- Investigar a presença do coronavírus humano HKU1 e do vírus da raiva em roedores e marsupiais capturados em áreas de pasto, mata e peridomicílio, durante o período de outubro de 2012 a agosto de 2013, em uma área de Mata Atlântica, localizada no município de Rio Pomba, Zona da Mata mineira.

15

- Investigar a presença do coronavírus humano HKU1 e do vírus da raiva em morcegos, capturados durante os anos de 2012 e 2013, no Parque Estadual da Serra do Papagaio e no Jardim Botânico da Universidade Federal de Juiz de Fora, localizados em área de Mata Atlântica das mesorregiões Sul e Sudoeste e Zona da Mata de Minas Gerais, respectivamente.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. AMOSTRAS DE PEQUENOS MAMÍFEROS SILVESTRES

4.1.1. COLETA DE ROEDORES E MARSUPIAIS

As coletas dos pequenos mamíferos silvestres foram realizadas em uma propriedade rural localizada no estado de Minas Gerais, mais especificamente na região da Zona da Mata mineira. A propriedade rural é o Campus Rio Pomba do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia (IFET) do Sudeste de Minas Gerais, que se localiza no município de Rio Pomba.

A região da área de estudo apresenta vegetação típica de Floresta Estacional Semi-decidual, uma formação típica da Mata Atlântica de Interior (FIGURA 8). A Mata Atlântica é considerada o bioma brasileiro que mais sofreu com a degradação ambiental, demonstrando fragmentação florestal na região da Zona da Mata, com manchas de vegetação nativas isoladas entre si e entremeadas por uma matriz de pasto, monoculturas e aglomerações humanas. O clima da região é caracterizado como subtropical úmido, com verão chuvoso e com estação seca de abril a setembro (VIEIRA et al., 2013).

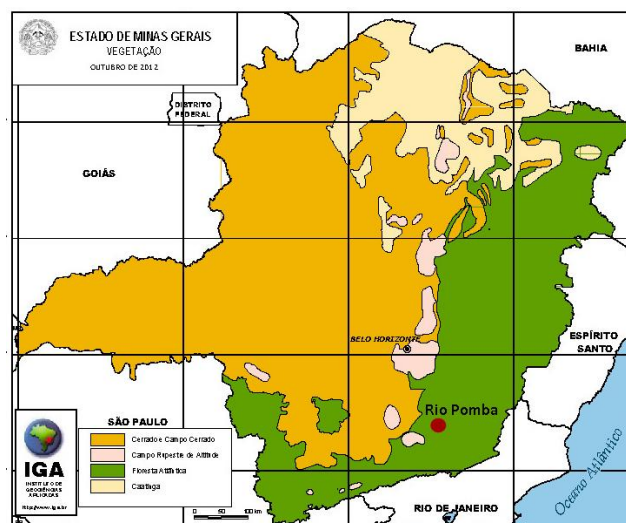


Figura 8 - Cobertura vegetal do estado de Minas Gerais. O mapa mostra a localização do município de Rio Pomba em uma região de vegetação de Mata atlântica. Legenda: Verde - Mata Atlântica; Amarelo – Cerrado.

Fonte: Adaptado de IGA, 2012.

Os pequenos mamíferos silvestres foram coletados durante o período de outubro de 2012 a agosto de 2013, totalizando seis campanhas de coleta com duração de quatro noites cada, realizadas a cada dois meses. No local de estudo, foram estabelecidas três diferentes áreas de amostragem: (1) pasto, áreas de pastagens próximas as áreas de vegetação nativa (FIGURA 9A); (2) mata, áreas de fragmentos de vegetação nativa (FIGURA 9B); e (3) peridomicílio, áreas próximas às construções da propriedade (curral, paiol, barracões para depósito etc.) (FIGURA 9C).

10

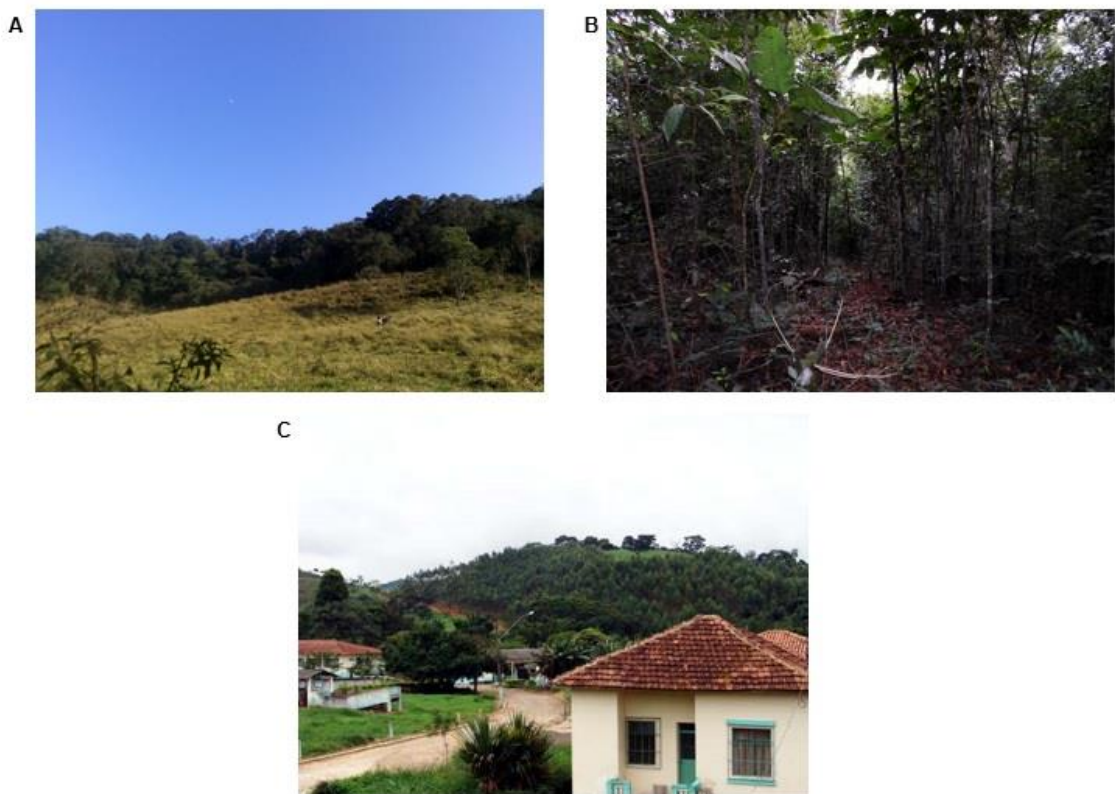


Figura 9 - Áreas de amostragem para coleta de roedores e marsupiais. As áreas de amostragem se encontram no Campus Rio Pombo do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia (IFET) do Sudeste de Minas Gerais, no município de Rio Pombo. **(A)** Pasto. **(B)** Mata. **(C)** Peridomicílio.

15

Foram estabelecidos, nas áreas de amostragem, dez transectos (dois em área de peridomicílio, quatro em área de pasto e quatro em área de mata, e nestes foram distribuídas armadilhas durante as campanhas de coleta. Em cada transecto de amostragem, foram estabelecidas quinze estações de coleta, distantes aproximadamente 20 metros entre si. Em cada estação de coleta foram colocadas

20

duas armadilhas de coleta, sendo uma do tipo Sherman (8 x 8 x 26 cm) (FIGURA 10A), específica para a coleta de roedores e marsupiais pequenos e outra do tipo gaiola (50 x 21,5 x 20 cm) (FIGURA 10B) com isca suspensa, para captura de animais maiores. Nas áreas de peridomicílio e nas áreas de pasto, ambas armadilhas foram colocadas no chão, já nas áreas de mata, em cada estação foi colocada uma armadilha no chão e outra no extrato médio da mata (sobosque).

Em cada campanha de coleta foram utilizadas 300 armadilhas (150 do tipo gaiola e 150 do tipo Sherman) e como iscas foram utilizados algodão embebido em óleo de fígado de bacalhau e abacaxi picado em pedaços. Durante cada campanha, as armadilhas ficaram abertas por quatro noites consecutivas e verificadas pela manhã de cada dia. As iscas eram repostas novamente em caso de captura, e trocadas no terceiro dia de coleta, em caso de não captura.

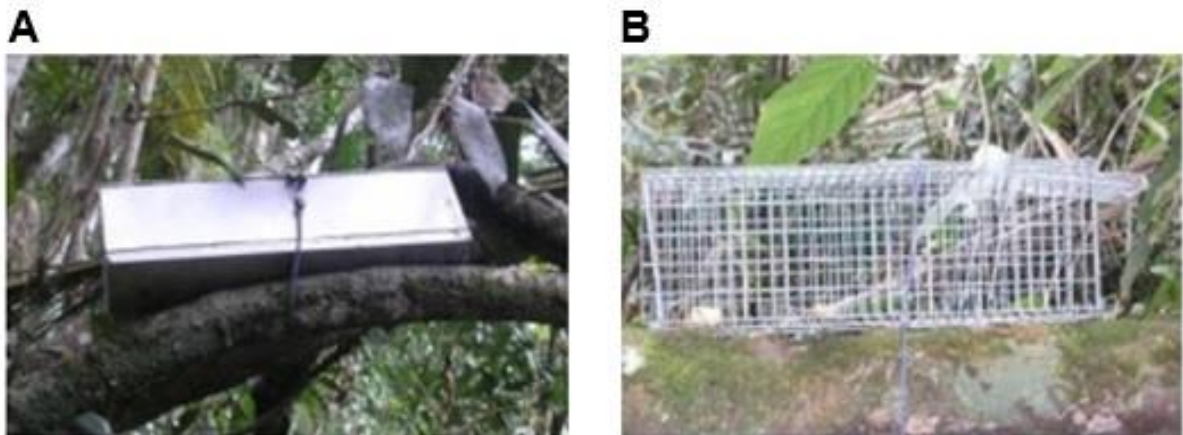


Figura 10 - Gaiolas utilizadas para a captura dos roedores e marsupiais. (A) Armadilha do tipo Sherman, em formato retangular. **(B)** Armadilha do tipo gaiola, em formato retangular.

Os animais capturados foram inicialmente pesados e então anestesiados na região intramuscular do membro inferior com cetamina e cloridrato de xilazina (80mg/Kg de cetamina e 12mg/Kg de xilazina) (RAMIREZ, RETAMAL e VERGARA, 2003). Em seguida, 10% do sangue dos animais capturados foi coletado por punção cardíaca (FIGURA 11A). Após a punção, os animais foram analisados e, em seguida, foram anotadas em uma ficha observações como sexo, idade, peso, condição reprodutiva e medidas morfométricas (FIGURA 11B). Alguns animais foram sacrificados e eviscerados para a prospecção dos vírus de interesse a partir das vísceras e o restante foi solto em seu habitat de coleta. Os animais que foram

sacrificados tiveram suas carcaças posteriormente taxidermizadas e depositados na Coleção de Mamíferos do departamento de Zoologia da UFMG.

O sacrifício foi realizado através da administração de uma dose três vezes superior à dose máxima de cetamina e cloridrato de xilazina (240mg/Kg de cetamina e 45mg/Kg de xilazina), via intraperitoneal. Para a coleta das vísceras, a superfície ventral externa de cada animal foi desinfetada com etanol 70% e a cavidade peritoneal aberta com auxílio de tesoura e pinça cirúrgica estéril. As vísceras foram retiradas, fracionadas em três pedaços e armazenadas em tubos criogênicos devidamente etiquetados, sendo em um destes tubos adicionado conservante (RNAlater, LifeTechnologies). Os tubos foram armazenados imediatamente em nitrogênio líquido (-196°C) e posteriormente no laboratório estas amostras foram transferidas e conservadas em freezer - 80°C.

Os marsupiais e roedores que não foram sacrificados, ficaram em observação por 24 horas após a punção cardíaca, em seguida esses animais foram anilhados e reintroduzidos no seu local de origem de captura. As anilhas eram numeradas e foram presas à orelha do animal, o que permitia que esse fosse identificado em uma posterior recaptura. As capturas de pequenos mamíferos foram realizadas mediante Licença Permanente emitida pelo ICMBio em nome do pesquisador Adriano Pereira Paglia (Licença permanente para coleta de material zoológico Número: 12989-1 Data da Emissão: 21/11/2007).

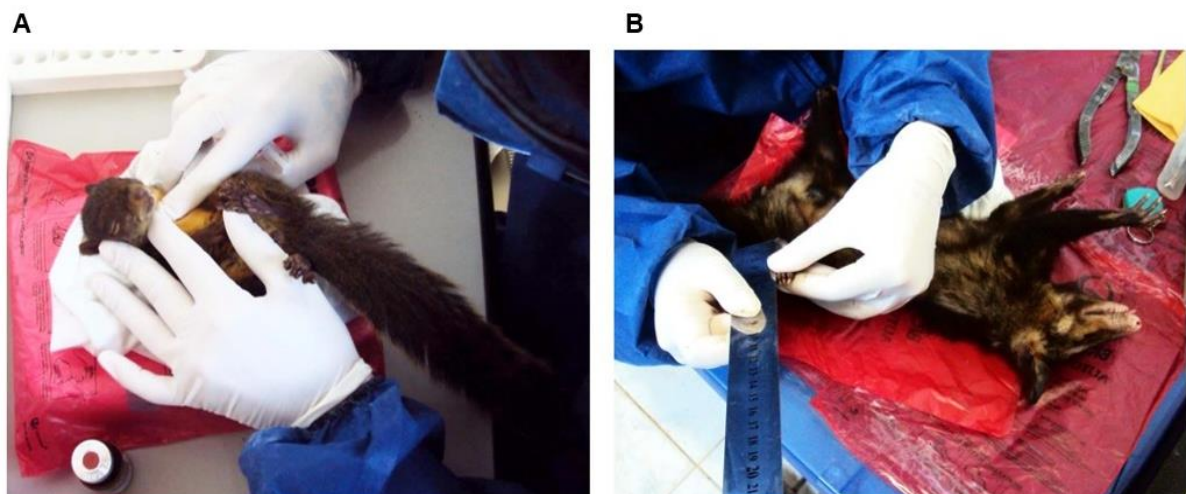


Figura 11 - Procedimentos com os roedores e marsupiais capturados. (A) Punção cardíaca sendo realizada em um animal coletado. **(B)** Medição sendo realizada em um animal coletado.

A coleta de pequenos mamíferos silvestres foi realizada de acordo com os parâmetros de segurança para coleta de roedores, preconizado pelo CDC (MILLS et al., 1995). Foram utilizados equipamentos de segurança individual (EPIs) durante as coletas de campo. Entre esses EPIs, destacam-se o uso de avental descartável,
5 botas e luvas de borracha, luvas cirúrgicas, óculos de proteção, perneiras e máscaras para a filtragem do ar do tipo 95%. Produtos descartáveis foram colocados em sacos de lixo autoclaváveis, lacrados e acondicionados apropriadamente até o retorno à UFMG, onde foram autoclavados e devidamente descartados.

10 4.1.2. COLEÇÃO DE VÍSCERAS DE MORCEGOS

Neste estudo, foi utilizado parte de uma coleção de vísceras de morcegos, cedida pelo Prof. Dr. Pedro Henrique Nobre ao Laboratório de Virologia da Universidade Federal de Juiz de Fora. A coleção compreende órgãos tais como, coração, pulmão, rim, intestino, baço, pâncreas e fígado de morcegos coletados
15 durante os anos de 2012 e 2013, em duas localidades distintas: (1) no Parque Estadual da Serra do Papagaio (PESP), Minas Gerais e (2) no Jardim Botânico da Universidade Federal de Juiz de Fora (JB-UFJF), Minas Gerais (TABELA 2).

20

25

30

Tabela 2 - Coleção de morcegos utilizados neste trabalho.

Ficha	Espécie	Família	Sexo	Local de Coleta	Data de Coleta
Q1807	<i>Sturnira lilium</i> (E. Geoffroy, 1810)	<i>Phyllostomidae</i>	Macho	PESP	18/05/2012
Q1810	<i>Sturnira lilium</i>	<i>Phyllostomidae</i>	Fêmea	PESP	18/05/2012
Q1812	<i>Sturnira lilium</i>	<i>Phyllostomidae</i>	Fêmea	PESP	18/05/2012
Q1813	<i>Carollia perspicillata</i> (Linnaeus, 1758)	<i>Phyllostomidae</i>	Macho	PESP	18/05/2012
Q1814	<i>Carollia perspicillata</i>	<i>Phyllostomidae</i>	Macho	PESP	18/05/2012
Q1815	<i>Carollia perspicillata</i>	<i>Phyllostomidae</i>	Macho	PESP	18/05/2012
Q484	<i>Myotis nigricans</i> (Schinz, 1821)	<i>Vespertilionidae</i>	Fêmea	PESP	23/11/2012
Q485	<i>Myotis nigricans</i>	<i>Vespertilionidae</i>	Fêmea	PESP	23/11/2012
Q486	<i>Myotis nigricans</i>	<i>Vespertilionidae</i>	Macho	PESP	23/11/2012
Q491	<i>Sturnira lilium</i>	<i>Phyllostomidae</i>	Fêmea	JB-UFJF	20/12/2012
Q492	<i>Sturnira lilium</i>	<i>Phyllostomidae</i>	Macho	JB-UFJF	20/12/2012
Q493	<i>Platyrrhinus recifinus</i> (Thomas, 1901)	<i>Phyllostomidae</i>	Fêmea	JB-UFJF	20/12/2012
Q494	<i>Carollia perspicillata</i>	<i>Phyllostomidae</i>	Fêmea	JB-UFJF	20/12/2012
Q495	<i>Sturnira lilium</i>	<i>Phyllostomidae</i>	Macho	JB-UFJF	20/12/2012
Q496	<i>Carollia perspicillata</i>	<i>Phyllostomidae</i>	Macho	JB-UFJF	20/12/2012
Q497	<i>Sturnira lilium</i>	<i>Phyllostomidae</i>	Macho	JB-UFJF	20/12/2012
Q503	<i>Anoura caudifer</i> (E. Geoffroy, 1818)	<i>Phyllostomidae</i>	Macho	JB-UFJF	24/01/2013
Q504	<i>Anoura caudifer</i>	<i>Phyllostomidae</i>	Macho	JB-UFJF	24/01/2013

PESP: Parque Estadual da Serra do Papagaio. JB-UFJF: Jardim Botânico da Universidade Federal de Juiz de Fora.

- 5 O Parque Estadual da Serra do Papagaio fica localizado na mesorregião Sul e Sudoeste de Minas Gerais, abrangendo parte dos municípios de Aiuruoca, Alagoa, Baependi, Itamonte e Pouso Alto. Situado na Serra da Mantiqueira, abriga um importante remanescente de Mata Atlântica com formações mistas de campos e matas (IEF/MG, 2010). As capturas dos quirópteros foram realizadas nas mediações
- 10 do município de Baependi. O Jardim Botânico da Universidade Federal de Juiz de Fora (JB-UFJF) está situado em um fragmento de Mata Atlântica, a Mata do Krambeck, localizada no município de Juiz de Fora. A Mata do Krambeck é considerada a maior reserva ambiental urbana tropical particular do mundo (Fonte: Lei Municipal 8527/94).
- 15 As capturas dos morcegos foram realizadas em períodos noturnos através de redes de neblina e coordenadas pelo Prof. Dr. Pedro Henrique Nobre, mediante licença de coleta no Parque Estadual da Serra do Papagaio (SISBIO 28238-1, CEUA 031/2012) e no Jardim Botânico da Universidade Federal de Juiz de Fora (SISBIO

23813-3, CEUA 055/2009). Alguns espécimes foram sacrificados, para tombamento, e tiveram suas vísceras retiradas. Estas foram adicionadas em conservante (*RNAlater*, LifeTechnologies) e enviadas ao Laboratório de Virologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, onde foram acondicionadas a -70°C.

5

4.2. PROCESSAMENTO DOS ESPÉCIMES E EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL

4.2.1. ROEDORES E MARSUPIAIS

As vísceras e o soro dos roedores e marsupiais coletados foram encaminhados a Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), onde foram armazenadas a -70°C. Essa coleção, denominada Col-ECOVIR, pertence ao grupo de pesquisa ECOVIR, liderado pela Profa. Dra. Giliane de Souza Trindade.

No presente trabalho, foram utilizadas para a extração do RNA total, as amostras de fígado, de pulmão e de soro dos espécimes coletados. Para a extração do RNA total das amostras de soro foi utilizado o QIAamp® Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, USA), de acordo com instruções do fabricante. Para a extração do RNA total das amostras de fígado e pulmão, 30 mg de cada órgão foi previamente macerado em nitrogênio líquido com o auxílio de cadinho e pistilo estéreis. O sobrenadante obtido foi utilizado para a extração de RNA total com o RNeasy® Mini Kit (QIAGEN, USA), de acordo com instruções do fabricante. As amostras extraídas de RNA total foram quantificadas, usando o equipamento NanoDrop (Thermo Scientific) e armazenadas a -70°C.

4.2.2. MORCEGOS

Da coleção de vísceras de morcegos, foram utilizadas neste trabalho, as amostras de rim dos espécimes. Foi retirada metade do volume do órgão (no caso, um rim do animal) do conservante (*RNAlater*, LifeTechnologies) e este foi lavado três vezes com 500 µl de salina fosfatada 1:10 (PBS 1X) (NaCl 137 mM, KCl₂ 7mM, Na₂ HPO₄ 4,3 mM, K₂ HPO₄ 1,4 Mm, pH 7,2). Em seguida os rins foram macerados em nitrogênio líquido, com o auxílio de cadinho e pistilo estéreis. Os macerados obtidos foram armazenados a -70°C. A extração de RNA total foi realizada a partir de 200 µL

do macerado utilizando o High Pure Viral Nucleic Acid Kit (ROCHE, GER), de acordo com as instruções do fabricante. As amostras de RNA total foram armazenadas a -70°C.

5 4.3. TRANSCRIÇÃO REVERSA PARA A PCR EM TEMPO REAL

Para a detecção dos vírus de interesse a partir do RNA extraído do soro, fígado, pulmão e rim dos pequenos mamíferos silvestres, foi realizada a síntese de uma cadeia complementar de DNA (cDNA) com oligonucleotídeos aleatórios. A reação de transcrição reversa foi realizada utilizando-se a enzima SuperScript II (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante, para as amostras de roedores e marsupiais, e a enzima MMLV (Moloney Murine Leukemia Virus, Promega), seguindo as instruções do fabricante, para as amostras de morcegos. Os cDNAs obtidos foram diluídos na proporção 1:5 e utilizados na reação de PCR em tempo real (qPCR).

15

4.4. CONTROLE INTERNO DA PCR EM TEMPO REAL

Foi utilizado para o controle interno da reação de qPCR, iniciadores que amplificam a região do gene codificador para a β -actina de *Mus musculus* (TABELA 3). A reação para amplificação do gene constitutivo permite certificar que todas as etapas anteriores ao qPCR passaram no controle de qualidade e que o material está adequado. Por ser um gene constitutivo dos mamíferos, a reação para β -actina sempre tem que ser positiva, pois espera-se que sempre exista RNA mensageiro deste gene nas amostras. Caso seja negativo, os passos anteriores ao qPCR devem ser analisados e repetidos. A reação para o controle interno era composta de 5,0 μ L de SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 0,2 μ L dos iniciadores senso e anti-senso juntos (2 pmol/ μ L), 1 μ L de cDNA diluído e água (q.s.p. 10 μ L).

25

Tabela 3 - Iniciadores utilizados no controle interno da qPCR.

Iniciadores	Sequência (5' - 3')	Tamanho esperado do produto (pb)	Tm esperado do produto
β -actina FWD	AAA TCG TGC GTG ACA TCA AAG A	64	76°C
β -actina REV	GCC ATC TCC TGC TCG AAG TC		

Os iniciadores possuem como alvo parte do gene codificador da proteína β -actina de *Mus musculus*. pb: pares de bases. FWD: *Forward*. REV: *Reverse*.
Fonte: Santos et al., 2014.

5

4.5. CONTROLE POSITIVO DA PCR EM TEMPO REAL

Como controle positivo para a amplificação do material genético dos vírus investigados, foram utilizados fragmentos de DNA sintético, desenhados pelo pesquisador colaborador Pedro A. Alves (ALVES, 2015). Os fragmentos de genes sintéticos, ou gBlock, foram sintetizados pela empresa IDT (Integrated DNA Technologies) e clonados em plasmídeo pGEMt.

O gBlock utilizado, denominado RCoV, contém regiões do genoma dos vírus investigados e regiões de ligação dos iniciadores específicos (FIGURA 12).

15

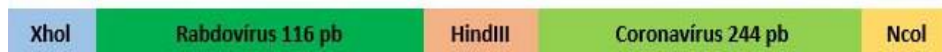


Figura 12 - Representação esquemática do gBlock RCoV. Azul: sítio para enzima de restrição XhoI. Verde: sequência amplificada pelos iniciadores RABV FWD/ RABV REV Laranja: sítio para enzima de restrição HindIII. Verde claro: sequência amplificada pelos iniciadores HCoV FWD/ HCoV REV. Amarelo: sítio para enzima de restrição NcoI.

20

4.6. PROSPECÇÃO DO VÍRUS DA RAIVA POR PCR EM TEMPO REAL

A detecção do vírus da raiva foi realizada utilizando-se um par de iniciadores, RABV FWD /RABV REV, que tem como alvo uma região do gene da proteína N da espécie *Rabies virus* (RABV) (WAKELEY et al., 2005) (TABELA 4). Esses iniciadores foram escolhidos com base em alinhamentos de amostras virais do RABV. A escolha dos iniciadores e as condições das qPCRs foram estabelecidas pelo pesquisador colaborador, Pedro A. Alves (ALVES, 2015).

Tabela 4 - Iniciadores utilizados na detecção do RABV por qPCR.

Iniciadores	Sequência (5' -3')	Vírus alvo	Tamanho esperado do produto (pb)	Tm esperado do produto
RABV FWD	AATGTAACACCTCTACAATGGAT	RABV	112pb	75°C
RABV REV	GCAGGGTACTTGTACTCATA			

Os iniciadores possuem como alvo para amplificação uma região do gene da proteína N do RABV. pb: pares de bases. FWD: *Forward*. REV: *Reverse*.

5 4.7. PROSPECÇÃO DE CORONAVÍRUS HUMANO POR PCR EM TEMPO REAL

A detecção de coronavírus foi realizada utilizando-se o par de iniciadores HCoV (HCoV FWD /HCoV REV) que tem como alvo uma região conservada do gene da RNA polimerase RNA-dependente (RdRp) do coronavírus HCoV-HKU1 (TABELA 5). Os iniciadores foram desenvolvidos a partir do alinhamento com amostras virais de HKU1. Os iniciadores foram desenhados e as condições das qPCRs foram estabelecidas pelo pesquisador colaborador, Pedro A. Alves (ALVES, 2015).

Tabela 5 - Iniciadores utilizados na detecção de coronavírus por qPCR.

Iniciadores	Sequência (5' -3')	Vírus alvo	Tamanho esperado do produto (pb)	Tm esperado do produto
HCoV FWD	CCT GTA ATG GCC ATA AGA TTG AAG	HKU1	78pb	70°C
HCoV REV	CTG TAC GAT AAA CAT TAG AGT ATA AGC G			

Os iniciadores possuem como alvo para amplificação uma região conservada do gene da RNA polimerase RNA-dependente (RdRp) dos coronavírus HCoV-HKU1. pb: pares de bases. FWD: *Forward*. REV: *Reverse*.

4.8. PADRONIZAÇÃO E CRITÉRIOS PARA ANÁLISE DA PCR EM TEMPO REAL

No Laboratório de Virologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, foi realizada a repetição da curva padrão da qPCR para detecção de coronavírus e do vírus da raiva. A eficiência (Eff%) foi considerada satisfatória quando o seu valor encontrava-se no intervalo entre 95% e 105%, considerando-se o coeficiente de

regressão linear (R^2) maior que 0,99 (BUSTIN et al., 2009). A curva padrão foi realizada em duplicata, com sete pontos, diluídos serialmente, na proporção 1:10. A curva partiu do ponto mais concentrado, com 1 ng/ μ L do DNA sintético, até o ponto menos concentrado, com 0,01 pg/ μ L do DNA sintético.

5 A mistura de reação com o par de iniciadores HCoV e RABV era composta por 5,0 μ L de SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 0,8 μ L de cada iniciador (800 nM), 1,0 μ L do DNA sintético diluído (1ng/ μ L) e água ultrapura (q.s.p. 10 μ L). Os testes das amostras foram realizados posteriormente a repetição da curva padrão. Todos os testes das amostras foram realizados em duplicata incluindo
10 o DNA sintético, usado como controle positivo e a água ultrapura, como controle negativo.

Todas as reações de qPCR foram feitas no Step OnePlus (Applied Biosystems) com o seguinte ciclo: desnaturação inicial a 95°C, por 10 minutos, seguida de 40 ciclos com desnaturação a 95°C, por 15 segundos e pareamento e
15 extensão, a 60°C, por 1 minuto. A curva de dissociação foi realizada após os 40 ciclos da PCR. Para isso, a temperatura, que partiu de 60°C, aumentava gradativamente, até que chegasse a 99°C. Todos os dados gerados foram capturados pela máquina e analisados ao término da reação. Em todos os experimentos realizados, foi analisado o gráfico da referência passiva (ROX), que
20 normaliza pequenos erros de pipetagem durante a realização do qPCR. Casos em que o ROX apresentava desvios do padrão esperado eram repetidos.

Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram produto amplificado em ambas as replicatas, com temperatura de dissociação (T_m - *melting temperature*) semelhante ou muito próxima à T_m esperada e ciclo de quantificação
25 (Cq - *quantification cycle*) abaixo de 35. Amostras que apresentaram produto amplificado com T_m similar ao esperado em apenas uma replicata foram consideradas suspeitas.

4.9. PCR CONVENCIONAL

30 As amostras que foram consideradas positivas nas reações de qPCR, usando o par de iniciadores HCoV FWD/ HCoV REV, foram submetidas a um *nested*-PCR (nPCR) para pancoronavirus, descrito por Chu e colaboradores, 2011. Nessa reação foram utilizados dois pares de iniciadores (1ª reação - CoV 1 FWD e CoV 1 REV; 2ª

reação - CoV 2 FWD e CoV 2 REV) que tem como alvo a sequência da RNA polimerase RNA-dependente (RdRp) dos coronavírus.

Primeiramente, a reação nPCR foi realizada utilizando o cDNA sintetizado a partir da RT com iniciadores aleatórios, como descrito no item 4.3. Com base nesses resultados, em um segundo momento, foi realizada a reação nPCR utilizando o cDNA sintetizado a partir da RT com iniciador específico, como descrito a seguir. A reação de transcrição reversa com iniciador específico foi realizada utilizando-se a enzima SuperScript III (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante.

Para a 1ª PCR, 2,0 µL do cDNA não diluído foram adicionados a 2,5 µL de tampão 10X (200 mM Tris-HCl, pH 8,4, 500 mM KCl, Promega), 2,0 µL de MgCl₂ 25mM (Promega), 0,25 µL de dNTPs (25mM de cada dNTP, Ludwig Biotech), 1,25 µL de cada iniciador (CoV 1 FWD e CoV 1 REV) (10pmol/µL), 0,3 µL de Taq polimerase (2 U/µL, Promega) e água ultra pura (q.s.p. 25 µL). O ciclo consistiu de uma desnaturação inicial de 95°C, por 1 minuto, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 94°C, por 20 segundos; pareamento a 48°C, por 30 segundos e extensão a 72°C, por 50 segundos. Após essa incubação por 30 ciclos, em banho de gelo foi adicionado uma mistura à reação, contendo: 0,5 µL de tampão 10X (200 mM Tris-HCl, pH 8,4, 500 mM KCl, Promega), 0,4 µL de MgCl₂ 25mM (Promega), 0,05 µL de dNTPs (25mM de cada dNTP, Ludwig Biotech), 0,25 µL de cada iniciador (CoV 1 FWD e CoV 1 REV) (10pmol/µL), 0,075 µL de Taq polimerase (2 U/µL, Promega) e água ultra pura (q.s.p. 5 µL). Essa mistura, totalizando 30 µL, foi incubada a uma desnaturação inicial de 95°C, por 1 minuto, seguida de 10 ciclos de desnaturação a 94°C, por 20 segundos; pareamento a 48°C, por 30 segundos e extensão a 72°C, por 50 segundos. Ao final, houve uma extensão final a 72°C, por 5 minutos.

Para a 2ª PCR, a 5,0 µL do produto da 1ª reação de PCR foram adicionados 5,0 µL de tampão 10x (200 mM Tris-HCl, pH 8,4, 500 mM KCl, Promega), 4,0 µL de MgCl₂ 25mM (Promega), 0,5 µL de dNTPs (25mM de cada dNTP, Ludwig Biotech), 2,5 µL de cada iniciador (CoV 2 FWD e CoV 2 REV) (10pmol/µL), 0,5 µL de Taq polimerase (2 U/µL, Promega) e de água ultra pura (q.s.p. 50 µL). O ciclo consistiu de uma desnaturação inicial de 95°C, por 1 minuto, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 94°C, por 20 segundos; pareamento a 48°C, por 30 segundos e extensão a 72°C, por 50 segundos. Ao final, houve uma extensão final a 72°C, por 5

minutos.

Os produtos da 2ª reação de PCR foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida 8%, a 100V, por 50 minutos. Foi utilizado o padrão de tamanho molecular de DNA de 100 pb (Ludwig Biotech). Para a coloração, os géis foram
5 fixados em solução fixadora 1 (40% metanol, 10% ácido acético, 50% H₂O), seguido da solução fixadora 2 (10% etanol, 5% ácido acético, 85% H₂O), sob agitação constante de 50 rpm, por 30 minutos, em cada solução. Posteriormente foi adicionada a solução oxidante (bicromato de potássio 0,034 M e ácido nítrico 0,032 M) e o gel foi incubado por 10 minutos, sob agitação constante de 50 rpm. Os géis
10 foram lavados com água destilada e foi adicionada a solução de nitrato de prata (0,2 g de AgNO₃, 100 ml de água), na qual o gel foi incubado em agitação constante de 50 rpm, por 20 minutos. Posteriormente, os géis foram lavados com água destilada para então ser adicionada a solução reveladora (2,93 g de Na₂CO₃, 0,05 g de paraformaldeído, 100 ml de água), até atingir a coloração desejada (adaptado de
15 SAMBROOK e RUSSELL, 2001). A coloração do gel foi interrompida com a mistura das soluções fixadora 1 e 2. O gel foi visualizado em negatoscópio (Tele-panorâmico, Blue equipamentos).

4.10. PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR

Os produtos amplificados foram separados em gel de poliacrilamida 8% e corados com SYBR® Gold Nucleic Acid Gel Stain (Invitrogen), diluído 1:10, e visualizadas sob luz ultravioleta (UV). A partir da excisão do fragmento de interesse do gel de poliacrilamida, foi realizada uma reamplificação com os iniciadores internos do pancoronavirus *nested*-PCR (CoV 2 FWD e CoV 2 REV). Os produtos
25 reamplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, Estados Unidos) a 2% em tampão TBE 1X (89 mM- tris HCl; 89 mM H₃BO₃; 2 mM Na₂ EDTA, pH 8,3 - Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, Estados Unidos). Uma mistura de 13 µL de produto reamplificado e 2 µL de azul de bromofenol (*loading buffer*) foi aplicada no gel de agarose e submetido então à
30 eletroforese em tampão TBE 1X (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, Estados Unidos) durante 40 minutos a 100 volts. A visualização do gel foi realizada sobre transluminador de luz ultravioleta (UV), sendo os resultados comparados ao controle

de peso molecular de DNA de 100 pb (Ludwig Biotech). Os fragmentos de interesse foram excisados do gel de agarose e purificados utilizando o kit MiniElute (QIAGEN), seguindo as instruções do fabricante.

5 4.11. SEQUENCIAMENTO

Os produtos purificados foram enviados para sequenciamento na empresa Myleus Biotecnologia (Brasil) por eletroforese capilar (Método de Sanger) (SANGER, NICKLEN e COULSON, 1977) utilizando a plataforma ABI3130 (Life Technologies), obedecendo as condições de reação indicadas pelo fabricante. Para a leitura das sequencias foi utilizado o programa Chromas Lite versão 2.01 (TECHNELYSIUM PTY LTD, 2005) (http://www.technelysium.com.au/chromas_lite.html). As sequências geradas foram analisadas utilizando o programa BLAST (ALTSCHUL et al., 1997) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

5. RESULTADOS

5.1. COLETA DOS PEQUENOS MAMÍFEROS SILVESTRES

Um total de 163 espécimes de pequenos mamíferos silvestres foram capturados ao longo de 175 capturas no Campus Rio Pomba do IFET do Sudeste de Minas Gerais, durante o período de outubro de 2012 a agosto de 2013 (APÊNDICE A). O maior número de capturas e de indivíduos capturados ocorreu durante as campanhas cinco e seis, realizadas durante os meses de junho e agosto de 2013, respectivamente (TABELA 6). Durante as campanhas de coleta, 10 animais foram recapturados, sendo dois deles recapturados duas vezes, totalizando 12 recapturas.

10

Tabela 6 – Número de capturas e de indivíduos capturados por campanha, em armadilhas do tipo Sherman ou gaiola, no município de Rio Pomba, MG.

Campanha	Mês/Ano	Estação	Número de capturas (captura + recaptura)	Número de indivíduos capturados (captura)
1	Outubro/2012	Chuvosa	24	23
2	Dezembro/2012	Chuvosa	16	14
3	Fevereiro/2013	Chuvosa	10	10
4	Abril/2013	Seca	10	10
5	Junho/2013	Seca	55	52
6	Agosto/2013	Seca	60	54
Total			175	163

Do total de animais capturados, 157 foram submetidos à punção cardíaca para coleta de sangue e 64 foram sacrificados para evisceração. Em alguns animais não foi possível a punção cardíaca devido a alguns fatores excludentes como: prenhez, pequeno tamanho, animais encontrados predados ou mortos na armadilha e fuga. Treze espécies diferentes foram representadas no total de animais capturados, sendo quatro espécies da ordem *Didelphimorphia* (marsupiais) e nove espécies da ordem *Rodentia* (roedores).

20

As áreas de amostragem apresentaram diferentes números de indivíduos capturados. A área de pasto foi o ambiente em qual se capturou o maior número de indivíduos, com 132, seguido da área de mata, com 26, e da área de peridomicílio, com cinco. Entretanto, a área de mata foi o ambiente que apresentou maior

diversidade de espécies, com oito, seguido da área de pasto, com sete, e da área de peridiomicílio, com duas (TABELA 7).

5 Tabela 7 – Número de indivíduos e de espécies de roedores e marsupiais capturados por ambiente, em armadilhas do tipo Sherman ou gaiola, no município de Rio Pomba, MG.

Espécies	Total de indivíduos			Total
	Mata	Pasto	Peridomicílio	
Ordem Didelphimorphia				
<i>Caluromys philander</i> (Linnaeus, 1758)	1	-	-	1
<i>Didelphis aurita</i> (Wied-Neuwied, 1826)	6	-	2	8
<i>Gracilinanus microtarsus</i> (Wagner, 1842)	7	-	-	7
<i>Monodelphis americana</i> (Müller, 1776)	1	-	-	1
Ordem Rodentia				
<i>Akodon cursor</i> (Winge, 1887)	6	14	-	20
<i>Akodon cf. mystax</i> (Hershkovitz, 1998)	-	28	-	28
<i>Calomys tener</i> (Winge, 1887)	-	72	-	72
<i>Guerlinguetus ingrami</i> (Thomas, 1901)	1	-	-	1
<i>Juliomys pictipes</i> (Osgood, 1933)	2	-	-	2
<i>Necomys lasiurus</i> (Lund, 1841)	-	14	-	14
<i>Nectomys squamipes</i> (Brants, 1827)	-	1	-	1
<i>Oligoryzomys nigripes</i> (Olfers, 1818)	2	2	3	7
<i>Oxymycterus cf. dasytricus</i> (Schinz, 1821)	-	1	-	1
Total de indivíduos	26	132	5	163
Total de espécies	8	7	2	

5.2. EXTRAÇÃO DE RNA, SÍNTESE DE cDNA E TESTE PARA O CONTROLE INTERNO

10 A extração de RNA foi realizada em 120 amostras de soro, 54 amostras de fígado, 58 amostras de pulmão (roedores e marsupiais) e 18 amostras de rim (morcegos). Em função de algumas limitações como, escassez, dano, perda ou limite de reagente, não foi realizada a extração de RNA em algumas amostras. As 250 amostras de RNA foram usadas para a síntese de cDNA. Em seguida, foi realizado o teste para o controle interno da qPCR. Na maior parte das amostras 15 (92%), foi detectado o gene da β -actina dos Cq: 13 ao Cq: 35, mostrando a

integridade do cDNA. Algumas amostras (8%) apresentaram Cq mais tardios, de 36 ao Cq 39.

5.3. PROSPECÇÃO DO VÍRUS DA RAIVA POR PCR EM TEMPO REAL

5 5.3.1. ROEDORES E MARSUPIAIS

Um total de 141 animais foi testado para a presença do genoma do RABV, utilizando o par de iniciadores RABV FWD/ RABV REV, incluindo 120 amostras de soro e 58 amostras de pulmão (totalizando 178 amostras). Nenhuma amostra testada para RABV foi positiva no qPCR (FIGURA 13).

10

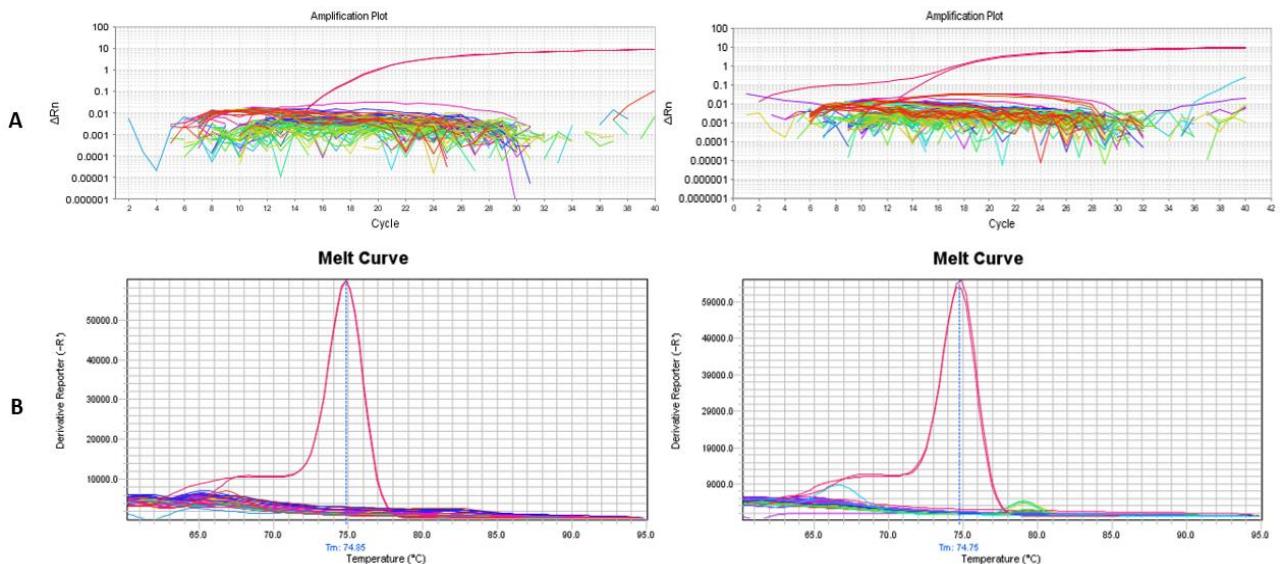


Figura 13 – Gráficos da qPCR para RABV, referente às amostras de roedores e marsupiais. (A) Gráficos de amplificação (fluorescência vs. ciclo) e **(B)** gráficos da curva de *melting*. As curvas em rosa mostram a temperatura de *melting* do controle positivo. Gráficos gerados pelo Termociclador StepOnePlus (LifeTechnologies).

15

5.3.2. MORCEGOS

Um total de 18 animais foi testado para a presença do genoma do vírus da raiva, a partir do rim, utilizando o par de iniciadores RABV FWD/ RABV VER. Nenhuma amostra testada para RABV foi positiva no qPCR (FIGURA 14).

20

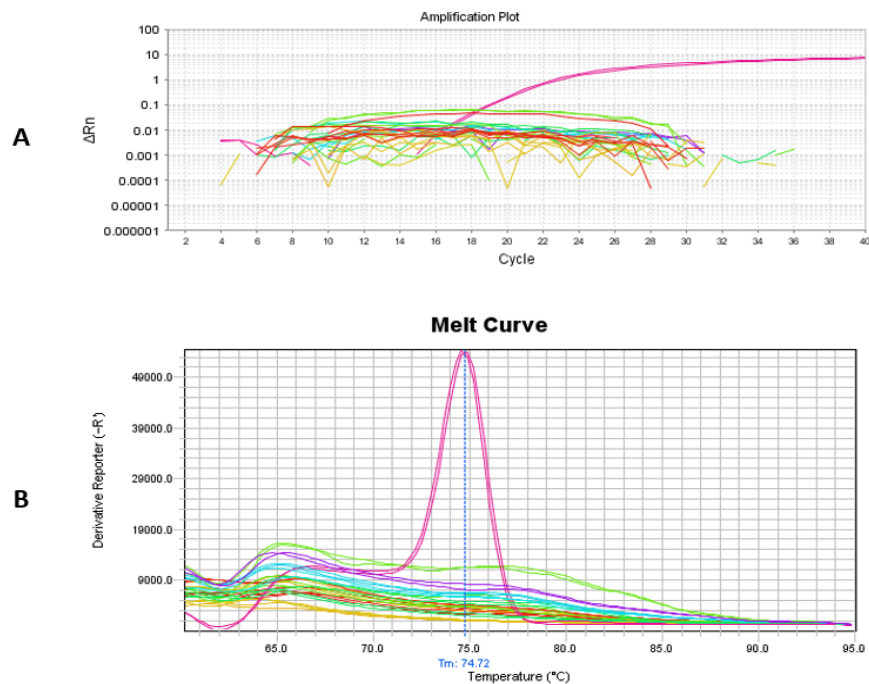


Figura 14 - Gráficos da qPCR para RABV, referente às amostras de morcegos. (A) Gráfico de amplificação (fluorescência vs. ciclo) e **(B)** gráfico da curva de *melting*. As curvas em rosa mostram a temperatura de *melting* do controle positivo. Gráficos gerados pelo Termociclador StepOnePlus (LifeTechnologies).

5

5.4. PROSPECÇÃO DE CORONAVÍRUS

5.4.1. PROSPECÇÃO DE CORONAVÍRUS HUMANO POR PCR EM TEMPO REAL

5.4.1.1. Roedores e marsupiais

10 Um total de 141 animais foi testado para a presença do genoma do coronavírus humano HKU1, usando o par de iniciadores HCoV FWD/ HCoV REV, incluindo 58 amostras de pulmão, 54 amostras de fígado e 120 amostras de soro (totalizando 232 amostras). Dessas 232 amostras testadas, 14 amostras (6%) foram positivas na reação de qPCR, apresentando amplificação nas duas replicatas

15 (exemplos mostrados na FIGURA 15). As amostras positivas são provenientes de 12 animais (8.5%), sendo todos eles roedores. Esses animais foram capturados em diferentes áreas de amostragem no Campus Rio Pomba, três foram capturados na área de mata, oito na área de pasto e um na área de peridomicílio (TABELA 8).

Tabela 8 - Pequenos mamíferos silvestres positivos no qPCR para HCoV HKU1.

FICHA	ESPÉCIE	DATA COLETA	ÁREA	qPCR HCoV		
				S	F	P
PRONEM 0015	<i>Akodon cf. mystax</i>	26/10/2012	Pasto	Negativa	POS Ct: r1 (33.4); r2 (32.9)	Negativa
PRONEM 0020	<i>Calomys tener</i>	27/10/2012	Pasto	Negativa	POS Ct: r1 (32.4); r2 (30.9)	-
PRONEM 0022	<i>Akodon cf. mystax</i>	27/10/2012	Pasto	-	POS Ct: r1 (31.5); r2 (30.5)	Suspeita
PRONEM 0052	<i>Oligoryzomys nigripes</i>	13/12/2012	Mata	POS Ct: r1 (31.6); r2(32.8)	POS Ct: r1 (32.5); r2 (34.2)	Negativa
PRONEM 0061	<i>Oligoryzomys nigripes</i>	05/02/2013	Peridomicílio	-	POS Ct: r1 (29.6); r2 (29.6)	POS Ct: r1 (31.5); r2 (30.4)
PRONEM 0067	<i>Akodon cursor</i>	07/02/2013	Pasto	-	POS Ct: r1 (30.8); r2 (31.4)	Negativa
PRONEM 0080	<i>Calomys tener</i>	09/04/2013	Pasto	POS Ct: r1 (34.4); r2 (35.5)	-	Negativa
PRONEM 0112	<i>Akodon cursor</i>	26/06/2013	Mata	Negativa	POS Ct: r1 (30.5); r2 (33.1)	Negativa
PRONEM 0168	<i>Calomys tener</i>	26/08/2013	Pasto	Negativa	POS Ct: r1 (32.7); r2 (33.4)	Negativa
PRONEM 0191	<i>Calomys tener</i>	27/08/2013	Pasto	-	Negativa	POS Ct: r1 (32.5); r2 (33.5)
PRONEM 0210	<i>Akodon cf. mystax</i>	29/08/2013	Pasto	-	POS Ct: r1 (31.2); r2 (31.0)	Negativa
PRONEM 0212	<i>Juliomys pictipes</i>	29/08/2013	Mata	POS Ct: r1 (30.7); r2 (30.4)	Negativa	Negativa

(S) Soro. (F) Fígado. (P) Pulmão. (-) Teste não realizado. (POS) Amostra positiva. (Ct) *Cycle Threshold*. (r1) Replicata 1. (r2) Replicata 2. Entre parênteses estão indicados os ciclos onde foi observada a amplificação.

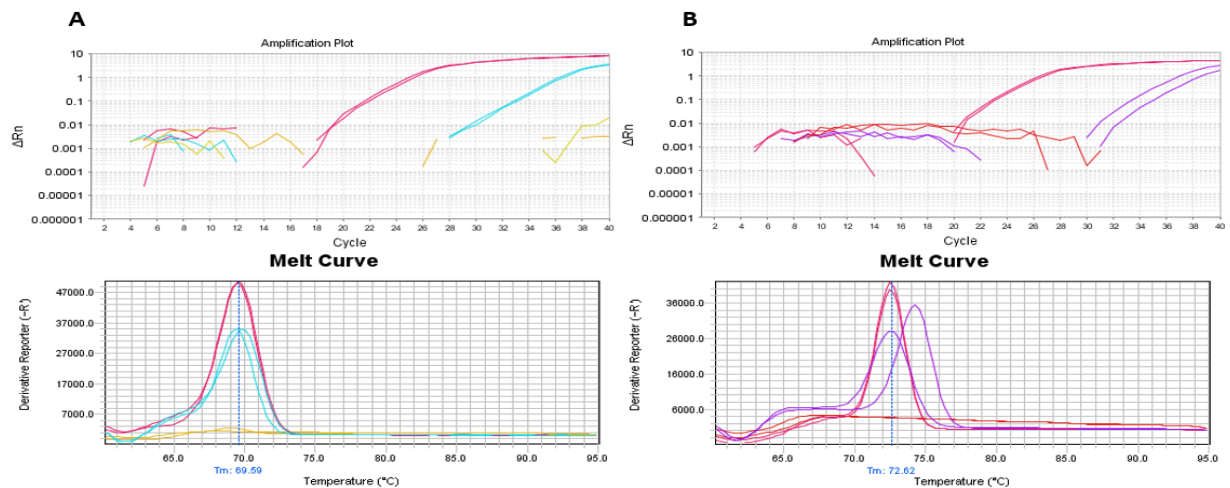


Figura 15 – Gráficos dos produtos amplificados (positivos) na qPCR para HCoV HKU1, referente às amostras de roedores e marsupiais. (A) Gráficos de amplificação (fluorescência vs. ciclo) e da curva de *melting* referente à amostra de soro PRONEM 212. Legenda: Rosa – Controle positivo. Azul – Amostra PRONEM 212. Amarelo – Controle negativo. **(B)** Gráficos de amplificação e da curva de *melting* referente à amostra de fígado PRONEM 20. Legenda: Rosa – Controle positivo. Roxo – Amostra PRONEM 20. Vermelho – Controle negativo. Gráficos gerados pelo Termociclador StepOnePlus (LifeTechnologies).

5 As amostras de soro e de fígado obtidas do animal PRONEM 52, proveniente de um espécime de *Oligoryzomys nigripes*, coletado na área de mata, foram ambas positivas na reação de qPCR. Também foram positivas na reação de qPCR, as amostras de fígado e de pulmão obtidas do animal PRONEM 61, proveniente de um

15 As amostras positivas compreendem duas amostras de pulmão, nove amostras de fígado e três amostras de soro. Além dessas, um total de 11 amostras de fígado, seis amostras de pulmão e 26 amostras de soro foram consideradas suspeitas na reação de qPCR, para a presença de HCoV HKU1, apresentando amplificação em somente uma das replicatas (TABELA 9).

20

Tabela 9 - Distribuição das amostras de fígado, pulmão e soro na qPCR.

Amostra	qPCR HCoV HKU1						
	Positivas		Suspeitas		Negativas		Total
Fígado	9	16.6%	11	20.3%	34	62.9%	54
Pulmão	2	3.4%	6	10.3%	50	86.2%	58
Soro	3	2.5%	26	21.6%	91	75.8%	120
Total	14	6%	43	18.5%	175	75.4%	232

Das amostras suspeitas, a amostra de fígado e de pulmão obtidas do animal PRONEM 60, proveniente de um espécime de *Calomys tener*, coletado na área de pasto em dezembro de 2012, foram ambas suspeitas na reação de qPCR para HCoV HKU1 (FIGURA 16).

5

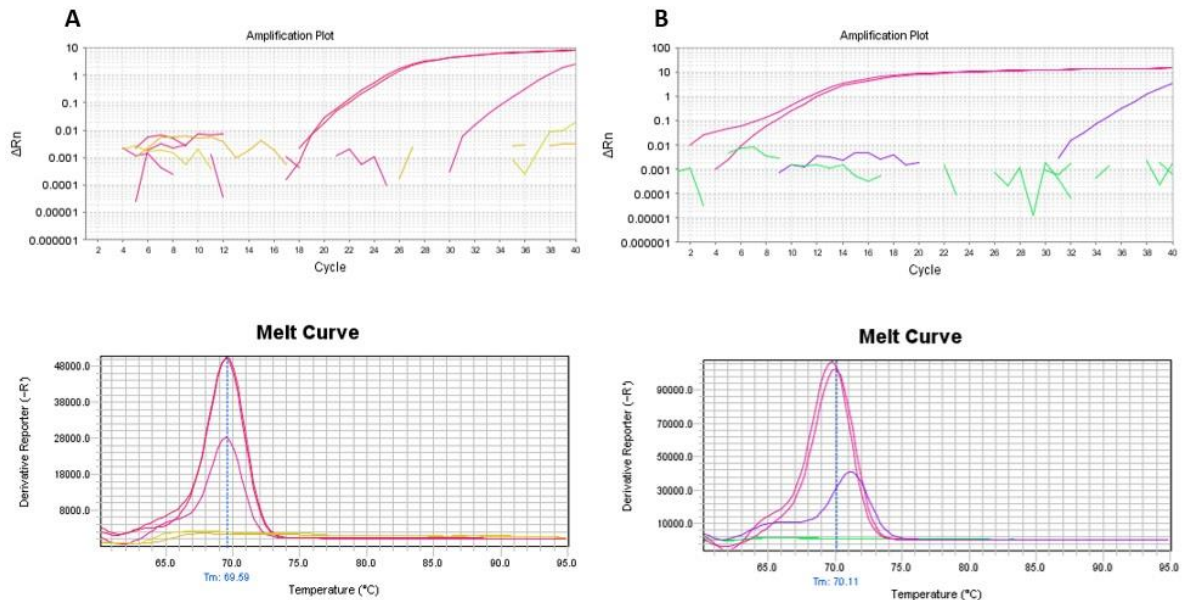


Figura 16 - Gráficos dos produtos amplificados (suspeitos) na qPCR para HCoV HKU1, referente às amostras de roedores e marsupiais. (A) Gráficos de amplificação (fluorescência vs. ciclo) e da curva de *melting* referente à amostra de fígado PRONEM 60. Legenda: Rosa – Controle positivo. Rosa claro – Amostra PRONEM 60. Amarelo – Controle negativo. **(B)** Gráficos de amplificação e da curva de *melting* referente à amostra de pulmão PRONEM 60. Legenda: Rosa – Controle positivo. Roxo – Amostra PRONEM 60. Verde – Controle negativo. Gráficos gerados pelo Termociclador StepOnePlus (LifeTechnologies).

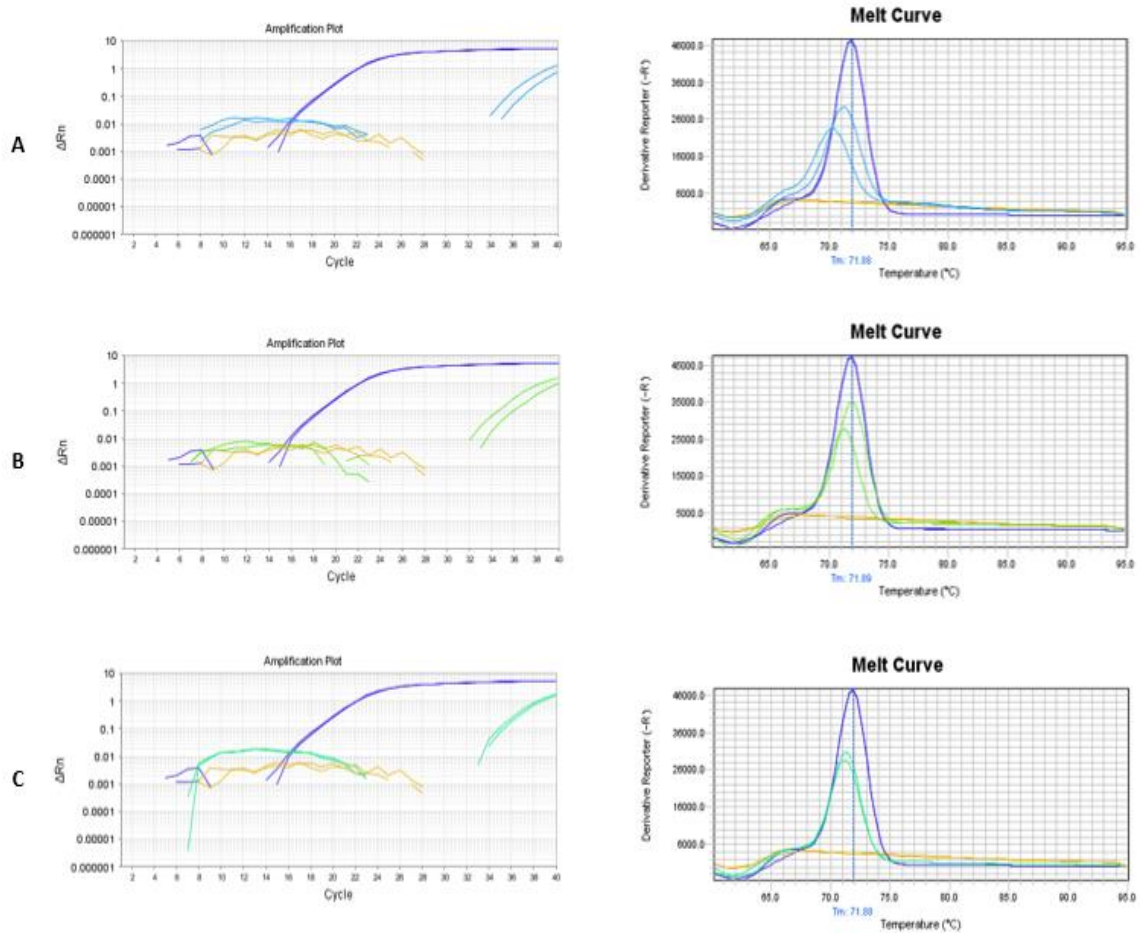
10

15 5.4.1.2. Morcegos

Um total de 18 amostras de rim de morcegos foi testado para a presença do genoma de coronavírus, usando o par de iniciadores HCoV FWD/ HCoV REV. Três amostras foram positivas (16,66 %), apresentando amplificação nas duas replicatas da reação de qPCR, para a presença de HCoV HKU1: (1) Amostra Q496 (Cq: 34.9 /33.8) proveniente de um espécime macho da espécie *Carollia perspicillata*, coletado no JB-UJF, em dezembro de 2012 (FIGURA 17A); (2) amostra Q491(Cq: 33.6 /32.4) proveniente de um espécime fêmea da espécie *Sturnira lilii*, coletado no JB-UFJF, em dezembro de 2012 (FIGURA 17B); e (3) amostra Q1814 (Cq: 33.3 /34.1)

20

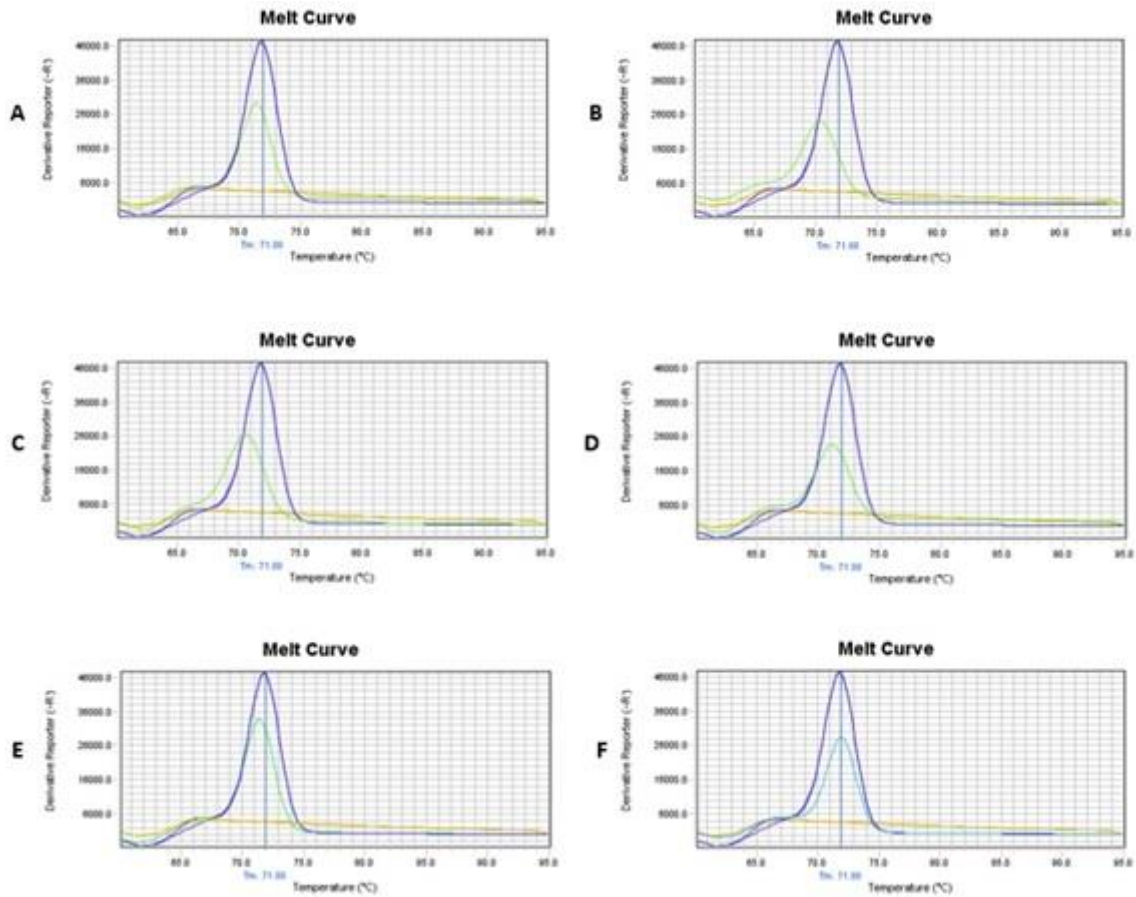
proveniente de um espécime macho da espécie *Carollia perspicillata*, coletado no PESP, em maio de 2012 (FIGURA 17C).



5 **Figura 17 - Gráficos dos produtos amplificados (positivos) na qPCR para HCoV HKU1, referente às amostras de morcegos.** Gráficos de amplificação (fluorescência vs. ciclo) e da curva de *melting* referente às amostras **(A)** Q496. **(B)** Q491. **(C)** Q1814. Legenda: Azul escuro – Controle positivo. Amarelo – Controle negativo. Verde e azul claro – Amostras de rim de morcegos. Gráficos gerados pelo Termociclador StepOnePlus (LifeTechnologies).

10

Seis amostras foram consideradas suspeitas, apresentando amplificação em apenas uma replicata da reação de qPCR, para a presença de HCoV HKU1 (FIGURA 18).



5 **Figura 18 – Gráficos dos produtos amplificados (suspeitos) na reação de qPCR para HCoV HKU1, referente às amostras de morcegos. Gráficos da curva de *melting* referente às amostras (A) Q486. (B) Q495. (C) Q1812. (D) Q484. (E) Q1810. (F) Q1815. Legenda: Azul escuro – Controle positivo. Amarelo – Controle negativo. Verde e azul claro – Amostras de rim de morcegos. Gráficos gerados pelo Termociclador StepOnePlus (LifeTechnologies).**

5.4.2. CORONAVÍRUS POR PCR CONVENCIONAL

Foram escolhidas 50 amostras entre as amostras positivas e suspeitas no qPCR para HCoV-HKU1. Essas foram testadas utilizando-se um pancoronairus *nested-PCR*, em um primeiro momento a partir do cDNA sintetizado com iniciadores aleatórios, e seguidamente com iniciador específico. Das amostras testadas, partindo-se do cDNA sintetizado com iniciadores aleatórios, cinco amostras apresentaram amplicon com tamanho aproximado de 440 pb (dados não mostrados), sendo o estimado para a reação. Após a purificação, sequenciamento e análise das sequências, essas mostraram similaridade com sequências do próprio hospedeiro, e não do vírus de interesse. Das amostras testadas, partindo-se do

cDNA sintetizado com iniciador aleatório, nenhuma amostra apresentou amplicon de tamanho esperado para a reação. Entretanto, seis amostras apresentaram amplicon com tamanho aproximado de 300 pb (dados não mostrados). Essas amostras foram purificadas e enviadas para sequenciamento. A análise das sequências, comparando-as com sequências em bancos de dados (GenBank), indicou similaridade com sequências do hospedeiro, e não com sequências do vírus em questão.

6. DISCUSSÃO

Os agentes virais são responsáveis por uma grande parte das doenças infecciosas emergentes, sendo a maioria desses vírus zoonóticos de origem silvestre (JONES et al., 2008). A emergência dessas doenças está estreitamente relacionada a fatores como, aumento da população humana, degradação ambiental, alterações climáticas e aumento da agricultura, culminado em um maior contato entre humanos e animais silvestres (DOBSON e CARPER, 1996). A maior parte dos hospedeiros reservatórios silvestres conhecidos de vírus são animais pertencentes a Classe *Mammalia*, com destaque para as ordens *Rodentia* e *Chiroptera*, dos quais ainda se tem poucos dados apesar do conhecimento de que os vírus circulam facilmente nestes nichos (MACKENZIE e JEGGO, 2013).

Os morcegos (ordem *Chiroptera*) e os roedores (ordem *Rodentia*) representam as duas maiores ordens em números de espécies entre os mamíferos (PAGLIA et al., 2012). Diversos vírus já foram isolados ou detectados de morcegos naturalmente infectados, com destaque para vírus das famílias *Rhabdoviridae*, *Paramyxoviridae*, *Coronaviridae* e *Filoviridae* (SCHNEEBERGER e VOIGT, 2016). Assim como nos roedores, tais como os pertencentes às famílias *Flaviviridae*, *Bunyaviridae*, *Filoviridae*, *Herpesviridae*, *Reoviridae*, *Rhabdoviridae*, *Paramyxoviridae* e *Togaviridae* (DE THOISY; DUSSART; KAZANJI, 2004; DE THOISY et al., 2009; ROOT, 2013; LEVINSON et al., 2013; MACKENZIE; JEGGO, 2013; WEAVER e BARRETT, 2004). A ordem *Didelphimorphia* inclui a maioria dos marsupiais americanos vivos (NOWAK, 1999), e também há relatos de detecção de agentes virais importantes nesses animais, como os pertencentes às famílias *Flaviviridae* e *Rhabdoviridae* (BACCHIEGA, 2014; DE THOISY et al., 2009). Somado a isso, morcegos, roedores e marsupiais frequentemente habitam ambientes antrópicos rurais e urbanos, o que os coloca em contato próximo com animais domésticos e o homem (BACCHIEGA, 2014). Diante desses fatos, este trabalho se mostra de grande relevância, pois teve como objetivo a investigação de vírus emergentes zoonóticos em pequenos mamíferos silvestres, tais como roedores, marsupiais e morcegos.

Os pequenos mamíferos silvestres dos quais foram investigados os vírus de interesse deste estudo, procederam de três diferentes áreas de estudo do estado de

Minas Gerais, onde foram coletados entre os anos de 2012 e 2013. As três áreas de estudo, Campus Rio Pomba do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia (IFET) do Sudeste de Minas Gerais, Parque Estadual da Serra do Papagaio (PESP) e Jardim Botânico da Universidade Federal de Juiz de Fora (JB-UFJF), estão

5 localizadas no bioma da Mata Atlântica, porém possuem características diferentes. O PESP está inserido na Área de Proteção Ambiental (APA) da Serra da Mantiqueira, portanto possui um elevado grau de conservação da flora e da fauna (IEF/MG, 2010). O JB-UFJF, apesar de estar inserido em um fragmento de Mata Atlântica (Mata do Krambeck) localizado em meio ao ambiente urbano do município

10 de Juiz de Fora, caracteriza-se por uma área com diferentes estágios de conservação, desde trechos florestais antropizados a trechos florestais com baixa interferência antrópica (BRITO, 2013). O Campus Rio Pomba é uma escola-fazenda e consiste de uma propriedade rural (IF/MG, 2016). Neste, os locais de coleta foram em áreas de: pasto (áreas de pastagens próximas a áreas de fragmentos de

15 vegetação nativa), mata (áreas de fragmentos de vegetação nativa) e peridomicílio (áreas próximas às construções da propriedade).

No Campus Rio Pomba, o maior número de capturas e de indivíduos capturados ocorreu durante os meses de junho e agosto de 2013, correspondendo a

20 épocas de estação seca da região. A maior quantidade de animais coletados na estação de seca, pode estar relacionado com o fato da escassez de alimento nessa época, e assim um maior interesse pelas iscas utilizadas nas armadilhas de captura. Além disso, o maior número de animais foi capturado na área de pasto, seguida da área de mata, que foi a área com maior diversidade de espécies capturadas, e por último a área peridomiciliar. A área de pasto pode ser considerada um ambiente de

25 transição entre mata e peridomicílio, e esses resultados demonstram uma grande circulação de animais silvestres nesses locais, apontando uma adaptação a ambientes com circulação de seres humanos, de animais de criação e domésticos. Os roedores representaram a maioria dos animais coletados e também uma maior diversidade. Isso pode estar relacionado com a maior diversidade e quantidade

30 desses animais, pois correspondem a maior ordem da classe *Mammalia*, totalizando quase a metade de todas as espécies de mamíferos e uma maior facilidade de serem encontrados próximos aos humanos, se comparado a outros animais silvestres (MILLS, 2006). Análises detalhadas desses e de outros dados,

relacionados à ecologia desses animais estão sendo realizadas por outros pesquisadores da equipe do grupo de pesquisa ECOVIR.

Com base nesse estudo, pode-se também destacar, que a espécie *Oligorizomys nigripes*, foi encontrada em duas áreas de amostragem (mata e peridomicílio), demonstrando que essa espécie circula nos dois ambientes. Essa espécie já foi descrita como um dos principais reservatórios de hantavírus no Brasil (OLIVEIRA et al., 2014; GUTERRES et al., 2013), juntamente com a espécie *Necromys lasiurus* (SUZUKI et al., 2004), encontrada somente na área de pasto. O gênero, *Didelphis aurita*, o gambá, foi encontrado na mata e em peridomicílio. Na literatura já há relatos da circulação de vírus como, vaccínia vírus (PERES et al., 2013) e vírus da raiva (BACCHIEGA, 2014) nessa espécie. Além disso, outras espécimes de marsupiais que foram analisados neste trabalho, como o gênero *Didelphis* sp., juntamente com a espécie *Caluromys philander* já foram evidenciados como reservatórios de flavivírus (DE THOISY, DUSSART, KAZANJI, 2004; DE THOISY et al., 2009).

Um total de 196 amostras de vísceras de mamíferos silvestres foram investigadas, utilizando o método do PCR em tempo real, para a presença do vírus da raiva. A detecção do vírus foi realizada utilizando-se um par de iniciadores, que tem como alvo uma região do gene da proteína N da espécie *Rabies virus* (RABV). O gene N vem sendo amplamente utilizado (WACHARAPLUESADEE et al. 2008; HAYMAN et al. 2011), pois tem um determinado grau de conservação que permite a detecção dos vírus, mas ao mesmo tempo, possui uma certa variabilidade que permite identificar diferentes genótipos virais (HEATON et al., 1997).

Embora o RABV não tenha sido detectado em pulmão (58 amostras) e soro (120 amostras) dos roedores e marsupiais e em rim (18 amostras) dos morcegos, isso não exclui a possibilidade desses animais estarem desenvolvendo um papel na circulação, manutenção e transmissão desse vírus, nestas áreas, visto que mamíferos são susceptíveis à infecção por este patógeno (WINKLER, 1991). Infelizmente, não foi possível realizar a detecção viral em amostras de cérebro, mais indicadas para a prospecção do RABV, por limitações do trabalho, devido à necessidade da carcaça dos animais para taxidermia e posterior identificação das espécies, principalmente através do crânio (VIZOTTO e TADDEI, 1973; PATTON, PARDIÑAS e D'ELÍA, 2015). O vírus da raiva é altamente neurotrópico (LYLES, KUZMIN e RUPPRECHT, 2013), entretanto, além do SNC, o vírus já foi encontrado

em outros diversos órgãos. Estudos demonstram que o vírus já foi mais frequentemente encontrado no cérebro, seguido das glândulas salivares, rins, bexiga, pulmões e conteúdo fecal (SCHEFFER, 2011). Além disso, a viremia causada pelo vírus tem sido demonstrada em modelos experimentais, sendo fugaz e temporária e não há evidências de que essa tenha relevância na patogênese viral (KOTAIT, CARRIERI e TAKAOKA, 2009). Assim, a detecção do genoma do vírus no soro pode ser complicada, e geralmente se utiliza o soro para pesquisa de anticorpos (KANTAKAMALAKUL et al., 2003). Como a quantidade de soro obtida neste trabalho foi muito pequena, não foi possível a investigação sorológica da circulação do RABV. Com base nisso, vale ressaltar, a perspectiva de se investigar outros órgãos dos mamíferos silvestres coletados para este trabalho.

O ciclo epidemiológico silvestre da raiva é mantido principalmente pelos morcegos hematófagos e não hematófagos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011). Sendo esses animais, fontes de surtos em outros animais silvestres, animais domésticos e em seres humanos (FAVORETTO et al., 2013). As amostras de rim, utilizadas neste trabalho, foram provenientes de espécies não-hematófagas de morcegos, pertencentes às famílias *Phyllostomidae* e *Vespertilionidae*. No Brasil, durante o período de 2002 a 2009, 80% dos casos de detecção do vírus da raiva em morcegos ocorreram em espécies não hematófagas (WADA, ROCHA e MAIA-ELKHOURY, 2011). Já existem relatos de casos positivos para o vírus da raiva em morcegos não-hematófagos na região Sudeste do Brasil. O vírus foi identificado em morcegos não-hematófagos da cidade de Niterói, Rio de Janeiro (MOUTINHO et al., 2015), em cidades do estado de São Paulo (CUNHA et al., 2006; QUEIROZ et al., 2009), e na cidade de Montes Claros, Minas Gerais (CARNEIRO et al., 2009).

A literatura científica ainda é carente a respeito do papel dos marsupiais no ciclo epidemiológico da raiva silvestre (LORETTO e VIEIRA, 2005). Entretanto, alguns estudos já demonstraram a circulação do vírus da raiva, através da detecção de anticorpos neutralizantes antirrábicos em marsupiais, em área de Mata Atlântica (ARAÚJO et al., 2012), em áreas urbanas (ALMEIDA et al., 2001) e em fazendas do estado de São Paulo (BACCHIEGA, 2014). Esses resultados sustentam a ocorrência do contato desses animais silvestres, não vacinados, com o vírus da raiva, mostrando que há circulação viral sem necessariamente morte do animal, quer seja pela indução de uma longa incubação viral ou de um estado de reservatório (BATISTA, FRANCO e ROEHE, 2007). Além disso, a detecção desses anticorpos

em marsupiais, sugere uma infecção natural desses por contato com animais silvestres infectados no mesmo habitat, como por exemplo morcegos (ALMEIDA, 2001). Dado este esse cenário, ainda se pode adicionar o fato dos marsupiais serem animais sinantrópicos, circulando em locais rurais, silvestres e urbanos, tendo
5 contato com animais silvestres, domésticos, de criação e seres humanos (FINNIE, 1986; BACCHIEGA, 2014).

Existem poucos trabalhos na literatura sobre o papel dos roedores na epidemiologia da raiva (MATTOS, MATTOS e RUPPRECHT, 2001). Segundo Childs (1997), o baixo números de casos reportados nestes animais, pode ser explicado
10 devido ao seu pequeno tamanho e pouca probabilidade de sobreviverem aos ferimentos causados por um animal infectado. Contudo, estudos já demonstraram a circulação do vírus em roedores silvestres, pela detecção de anticorpos neutralizantes, no estado de São Paulo (ALMEIDA et al., 2001). Além disso, já foi sugerido a infecção de um roedor após contato com um morcego infectado pelo
15 vírus, baseando-se na estreita associação entre esses animais e relatos prévios de raiva em morcegos no local (WINKLER, 1991).

Estudos confirmam a circulação de animais silvestres infectados em diversos estados brasileiros, sendo esses dados aparentemente subestimados, visto que o monitoramento em animais silvestres é deficiente. Somado a isso, podemos também
20 citar alguns fatores antrópicos que favorecem a reemergência do ciclo silvestre, como a invasão de áreas não habitadas, degradação ambiental, culminado em um maior contato entre animais silvestres, de criação, domésticos, bem como o próprio ser humano (BELOTTO, 2003; TRAVASSOS DA ROSA et al., 2006).

As áreas onde foram capturados os animais para este estudo, com exceção
25 do Parque Estadual da Serra do Papagaio, são áreas onde a interferência humana já é significativa. Esses animais silvestres já demonstram hábitos sinantrópicos, o que pode ser decorrência da busca de alimentos, devido à escassez desses, em seus habitats já degradados pela ação humana (KOTAIT et al., 2007). Dada a possibilidade de transmissão do RABV para humanos ou animais domésticos a partir
30 de animais silvestres, a prospecção viral nesses deve ser considerada. Além disso, animais silvestres como morcego micos, macaco, raposa, guaxinim, quati, gambá e roedores silvestres, devem ser classificados como animais de risco, mesmo que domiciliados e/ou domesticados, haja vista que, nesses animais, a raiva não é bem conhecida (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011). Por fim, dada a ocorrência de casos em

herbívoros (LIMA et al., 2005; MARCOLONGO-PEREIRA et al., 2011), animais silvestres (BACCHIEGA, 2014; MARTORELLI et al., 2014), animais domésticos (CRUZ et al., 2015) e humanos (SILVA et al., 1997) em diversos estados do país, incluindo o estado de Minas Gerais (COSTA et al., 2015; MENEZES et al., 2008; 5 CARNEIRO et al., 2009; BARBOSA et al., 2008), é evidente a relevância de estudos como este que enfatiza a necessidade de uma vigilância maior nos animais silvestres a fim de se entender melhor o comportamento do vírus da raiva.

Um total de 250 amostras de vísceras provenientes de 159 espécimes de mamíferos silvestres foram investigadas, utilizando o método do PCR em tempo real, 10 para a presença do coronavírus humano HKU1 (HCoV-HKU1). Neste estudo, foram detectadas 17 amostras positivas, provenientes de doze roedores e três morcegos. Até onde se saiba, este trabalho indica pela primeira vez a circulação do coronavírus humano HKU1 em pequenos mamíferos silvestres. Embora os iniciadores usados na reação de PCR em tempo real sejam específicos para HCoV-HKU1, pelas análises 15 durante seu desenho, estes dados serão confirmados por outra metodologia. Como o sequenciamento dos produtos de PCR em tempo real é inviável devido ao seu tamanho, devem ser feitas amplificações de regiões maiores do genoma para posterior sequenciamento. Experimentos de amplificação e sequenciamento foram feitas com iniciadores pancoronavírus descritos por Chu e colaboradores, 2011. 20 Contudo os resultados não foram satisfatórios, uma vez, que o resultado do sequenciamento indicou à amplificação de genes do hospedeiro, o que poderia ser explicado pela degeneração dos iniciadores. A sensibilidade de uma reação de PCR para pancoronavírus é considerada baixa, isso pode ser explicado pelo alto nível de degeneração dos iniciadores (VIJGEN et al., 2008), como o caso dos iniciadores 25 externos utilizados na *nested*-PCR neste estudo. Em consequência disso, ocorre a maior probabilidade da ocorrência de amplificações inespecíficas. Assim iniciadores específicos para HCoV-HKU1 serão futuramente usados para esta confirmação.

Os roedores positivos (para coronavírus humano) pertencem as cinco espécies: *Akodon cf. mystax*, *Calomys tener*, *Oligoryzomys nigripes*, *Akodon cursor* 30 e *Juliomys pictipes*. A espécie *Murine coronavirus*, que inclui o vírus protótipo MHC (CHEEVER et al., 1949) e sua variante RCoV (PARKER, CROSS e ROWE, 1970), era até então, a única espécie de coronavírus associada a roedores (DE GROOT et al., 2011). Porém, em 2014, Lau e colaboradores, detectaram um novo CoVs associado a roedores na China, denominado ChRCoV HKU24, que daria suporte

para compor uma nova espécie no gênero β CoVs, sugerindo ainda que os roedores podem ser um importante reservatório de coronavírus ancestrais de vírus como, HCoV-HKU1, *Murine coronavirus* e *Betacoronavirus 1*. Além disso, Wang e colaboradores, em 2015, identificaram mais três coronavírus em roedores na China.

- 5 Um deles, de acordo com critérios do ICTV (DE GROOT et al., 2011), deve ser conhecido como nova espécie do gênero *Alphacoronavirus* e os dois outros pertencem as espécies *Betacornavirus 1* e *Murine coronavirus*, gênero *Betacoronavirus*.

Os coronavírus de roedores compreendem representantes do gênero
10 *Betacoronavirus*, com uma grande diversidade genética. Este gênero contém também os vírus que causam doenças entéricas e respiratórias em seres humanos, como HKU1, bem como em animais domésticos, como por exemplo, coronavírus bovinos (VIJGEN et al., 2006; WOO et al., 2005). Estes dados mostram que existem
15 coronavírus de roedores que são proximamente relacionados a coronavírus humanos. O HCoV-HKU1 somente foi descoberto em 2005, apesar de possuir distribuição mundial e sua variabilidade genética sugerir que este vírus não foi introduzido na população humana recentemente (MASTERS e PERLMAN, 2013). A sua descoberta, levantou a possibilidade do HCoV-HKU1 também representar um agente zoonótico, no entanto, o vírus não foi detectado em nenhuma amostra de
20 animal silvestre (YUEN, LAU e WOO, 2012; GÓES, 2012). Contudo, neste trabalho, os resultados de amostras de roedores silvestres positivas para coronavírus humanos HCoV-HKU1, são um indicativo da circulação de coronavírus humanos nestes animais.

Este estudo também demonstrou que a área de pasto foi onde a maioria dos
25 roedores positivos foram capturados. O pasto, como dito anteriormente, pode ser considerado uma área de transição entre o ambiente silvestre e peridomiciliar, demonstrando a circulação de roedores em um ambiente onde também estão presentes animais de criação (especialmente bovinos), animais domésticos e os seres humanos. As capturas de animais demonstraram também espécies positivas
30 que foram encontradas em mais de uma área de amostragem, como por exemplo a espécie *Akodon cursor*, que foi capturada tanto na mata como no pasto e a espécie *Oligoryzomys nigripes* que foi capturado tanto na mata como em peridomicílio. Isso aponta que esses animais circulam em ambientes silvestres e de transição – pasto - (*Akodon cursor*) e, em ambientes silvestres e o peridomicílio (*Oligoryzomys nigripes*),

assinalando a circulação de animais que podem ser reservatórios de coronavírus entre os três ambientes. Vale ressaltar ainda, que esses dois espécimes de *Oligoryzomys nigripes* positivos, apresentaram a detecção do genoma viral em mais de um órgão. O animal coletado na mata foi positivo no soro e no fígado e o animal
5 coletado na área de peridomicílio foi positivo no pulmão e no fígado, indicando um possível papel desse roedor na dinâmica de circulação de transmissão desse vírus.

Os morcegos positivos incluíram as espécies *Carollia perspicillata* e *Sturnira liliu*. É sabido que os morcegos hospedam uma ampla diversidade de coronavírus (WOO et al., 2006; CARRINGTON et al., 2008; ANTHONY et al., 2013;
10 DONALDSON et al., 2010; HUYNH et al., 2012). Corman e colaboradores, em 2013, detectaram sete novos *Alphacoronavirus* e *Betacoronavirus* de morcegos capturados em países neotropicais, incluindo a detecção de *Betacoronavirus* em morcegos da Costa Rica e *Alphacoronavirus* em morcegos da Costa Rica, Brasil e Panamá. Vale ainda ressaltar que o *Betacoronavirus* foi detectado na espécie *Carollia perspicillata*,
15 umas das positivas para HCoV-HKU1 nesse estudo. É sabido a existência de coronavírus de morcegos relacionados a coronavírus que infectam humanos, como MERS-CoV, SARS-CoV e HCoV-229E (ANNAN et al., 2013; ITHETE et al., 2013; ANTHONY et al., 2013; HUYNH et al., 2012; DREXLER et al., 2010; LAU et al., 2005; PFEFFERLE et al., 2009). Esses fatos demonstram que coronavírus,
20 anteriormente considerados exclusivos de animais, incluindo os morcegos, podem ter potencial zoonótico. Como exemplo, é sugerido que o coronavírus humano HCoV-OC43 teve origem em um hospedeiro bovino há mais de 100 anos, devido à similaridade existente entre esses coronavírus e se tornou endêmico mundialmente (HOLMES e DOMINGUEZ, 2013; VIJGEN et al., 2005). A grande diversidade
25 genética dos coronavírus em morcegos, fazem desses animais excelentes reservatórios de "pools" de genes para os gêneros *AlphaCoV* e *BetaCoVs*, sugerindo que esses animais seriam os principais hospedeiros reservatórios desses vírus (WOO et al., 2009). Os resultados deste trabalho, indicam que os morcegos podem estar contribuindo com um papel como reservatório de coronavírus humanos.

30 Após a emergência do SARS-CoV, houve um grande aumento do número de espécies e genomas sequenciadas dos coronavírus, esse fato proporcionou observar que existem coronavírus estreitamente relacionados que infectam animais distantes entre si (WOO et al., 2009). Isso demonstra que o coronavírus tem cruzado barreiras interespecíficas, podendo essa capacidade do vírus estar relacionada com

surtos de doenças zoonóticas (HOLMES e DOMINGUEZ, 2013). Os resultados mostrando pequenos mamíferos infectados em ambiente silvestre, pasto e peridomicílio tem também implicações importantes na possível emergência de outros coronavírus zoonóticos.

5 Os aspectos patogênicos dos coronavírus dependem das propriedades biológicas do vírus e do hospedeiro infectado, assim a patogênese pode se manifestar distinta em diferentes espécies (SIDDELL, WEGE e TER MEULEN, 1983). A investigação do HCoV-HKU1 em roedores foi realizada em mais de um tipo de amostra. As amostras positivas compreendem duas amostras de pulmão, nove
10 amostras de fígado e três amostras de soro, apontando a prevalência de detecção no fígado. Entretanto, visto que a maioria dos CoVs são transmitidos por vias de infecção respiratória ou fecal-oral, com replicação em células epiteliais do trato respiratório ou do trato entérico (MASTERS e PERLMAN, 2013), vale ressaltar a perspectiva de se também investigar outros órgãos da coleção de mamíferos
15 silvestres, como o intestino.

Neste estudo, em algumas amostras o resultado das investigações de coronavírus foi indeterminado, pois a partir do material destas amostras, foi observada a amplificação somente em uma replicata e foram consideradas suspeitas para a presença do vírus, pois estes poderiam estar apresentando uma carga viral
20 muito baixa, dificultando a detecção no PCR. Adicionalmente, em algumas amostras consideradas negativas ou suspeitas, o gene da β -actina, utilizado como controle interno da reação de qPCR, foi detectado em Cq mais tardios. A partir dessas amostras, pode-se propor a repetição dos experimentos desde a extração de RNA, para uma nova investigação.

25 As amostras positivas para HCoV-HKU1 indicam, pela primeira vez, a possível circulação destes vírus em roedores e morcegos silvestres, indicando um papel destes animais na manutenção e emergência de coronavírus humanos já conhecidos. Além disso, isso enfatiza a importância de estudos de vigilância de espécies animais, como roedores, marsupiais e morcegos, para compreender a
30 circulação, manutenção e transmissão desses vírus, bem como o seu potencial emergente. Além destas importantes questões, este estudo abre perspectivas para novas investigações sobre a diversidade genética dos coronavírus na natureza e sobre a dinâmica de circulação, que serão pesquisadas através de estudos evolutivos, filogenéticos e de filodinâmica.

7. CONCLUSÕES

- Não foi demonstrada a circulação do vírus da raiva nas amostras testadas.
- Este trabalho indica pela primeira vez, a circulação de coronavírus humano (HCoV-HKU1) em roedores, das espécies *Akodon mystax*, *Calomys tener*, *Oligoryzomys nigripes*, *Akodon cursor*, *Juliomys pictipes*, e em morcegos, das espécies *Carollia perspicillata* e *Sturnira liliu*.

8. PERSPECTIVAS

- Confirmar a presença do material genético de coronavírus humano nas amostras positivas e suspeitas de animais silvestres, usando iniciadores específicos para HKU1, que amplifiquem uma região maior do genoma, para sequenciamento.
- 5
- Realizar tentativas de isolamento viral para futura caracterização molecular e biológica dos vírus.
 - Investigar a presença do vírus da raiva em outros órgãos de morcegos, roedores e marsupiais, como bexiga, intestino e coração.
 - Investigar a presença de HCoV-HKU1 em outros órgãos de morcegos, roedores e
- 10
- marsupiais, como intestino.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHÃO, J. S. et al. One more piece in the VACV ecological puzzle: could peridomestic rodents be the link between wildlife and bovine vaccinia outbreaks in Brazil?. **PLoS One**, v. 4, n. 10, p. e7428, 2009.
- 5 ALMEIDA, M. F. et al. Neutralizing antirabies antibodies in urban terrestrial wildlife in Brazil. **Journal of wildlife diseases**, v. 37, n. 2, p. 394-398, 2001.
- AL-TAWFIQ, J. A. Middle East Respiratory Syndrome-coronavirus infection: an overview. **Journal of infection and public health**, v. 6, n. 5, p. 319-322, 2013.
- 10 ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic acids research**, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.
- 15 ALVES, P. A. **Desenvolvimento de plataformas de qPCR para diagnóstico de doenças vesiculares de bovinos e detecção de vírus em pequenos mamíferos**. 2015. 272 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015.
- 20 ANNAN, A. et al. Human betacoronavirus 2c EMC/2012-related viruses in bats, Ghana and Europe. **Emerging Infectious Diseases**, v. 19, n. 3, p. 456-459, 2013.
- 25 ANTHONY, S. J. et al. Coronaviruses in bats from Mexico. **Journal of General Virology**, v. 94, n. 5, p. 1028-1038, 2013.
- 30 ARAUJO, D. B. **Estudo epidemiológico do vírus da raiva em mamíferos silvestres provenientes de área de soltura no litoral Norte do Estado de São Paulo, Brasil**. 2012. 104 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.
- 35 BACCHIEGA, T. S. **Circulação do vírus rábico em gambás (*Didelphis albiventris* e *Didelphis aurita*) nos municípios de Torre de Pedra, Bofete e Anhembi-São Paulo**. 2014. 46 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2014.
- BADRANE, H., TORDO, N. Host switching in Lyssavirus history from the *Chiroptera* to the *Carnivora* orders. **Journal of virology**, v. 75, n. 17, p. 8096-8104, 2001.
- 40 BAER, G. M., BELLI, W. J., FISHBEIN, D. B. Rhabdoviruses. In: FIELDS, B. N., KNIPE, D. M., eds. **Virology**. New York: Raven Press, p. 883-930, 1990.
- 45 BAER, G. M., NEVILLE, J., TURNER, G. S. Rabbits and rabies: a pictorial history of rabies through the ages. **Laboratorios Baer**, S.A. DE C.V., Mexico, D.F., 1996.
- BARBOSA, A. D. et al. Distribuição espacial e temporal da raiva canina e felina em Minas Gerais, 2000 a 2006. **Arq. bras. med. vet. zootec**, v. 60, n. 4, p. 837-842, 2008.

- BATISTA, H. B. C. R., FRANCO, A. C., ROEHE, P. M. Raiva: uma breve revisão. ***Acta scientiae veterinariae***. v. 35, n. 2, p. 125-144, 2007.
- 5 BEAMER, P. D., MOHR, C. O., BARR, T. R. Resistance of the opossum to rabies virus. ***American journal of veterinary research***, v. 21, p. 507, 1960.
- BELLEI, N. et al. Acute respiratory infection and influenza-like illness viral etiologies in Brazilian adults. ***Journal of medical virology***, v. 80, n. 10, p. 1824-1827, 2008.
- 10 BELOTTO, A. J. The Pan American Health Organization (PAHO) role in the control of rabies in Latin America. ***Developments in biologicals***, v. 119, p. 213-216, 2003.
- BERMINGHAM, A. et al. Severe respiratory illness caused by a novel coronavirus, in a patient transferred to the United Kingdom from the Middle East, September 15 2012. ***Euro Surveillance***, v. 17, n. 40, p. 3-7, 2012.
- BERNARDI, F. et al. Antigenic and genetic characterization of rabies viruses isolated from domestic and wild animals of Brazil identifies the hoary fox as a rabies 20 reservoir. ***Journal of General Virology***, v. 86, n. 11, p. 3153-3162, 2005.
- BRITO, P. S. **A Comunidade Arbórea de Trecho de Floresta Atlântica Secundária no Jardim Botânico da Universidade Federal de Juiz de Fora**. 2013. 58 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2013.
- 25 BURT, F. J. et al. Chikungunya: a re-emerging virus. ***The Lancet***, v. 379, p. 662-671, 2012.
- BUSTIN, S. A et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of 30 quantitative real-time PCR experiments. ***Clinical chemistry***, v. 55, n. 4, p. 611-22, 2009.
- CARNEIRO, N. F. D. F., CALDEIRA, A. P., ANTUNES, L. A., CARNEIRO, V. F., & CARNEIRO, G. F. Rabies in *Artibeus lituratus* bats in Montes Claros, State of Minas 35 Gerais. ***Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical***, v. 42, n. 4, p. 449-451, 2009.
- CARRINGTON, C. V. et al. Detection and phylogenetic analysis of group 1 40 coronaviruses in South American bats. ***Emerg Infect Dis***, v. 14, n. 12, p. 1890-1893, 2008.
- CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Presumptive abortive human rabies-Texas, 2009. ***MMWR. Morbidity and mortality weekly report***, v. 59, n. 7, p. 45 185, 2010.
- CDC. Centers for Disease Control and Prevention. **Information about Middle East Respiratory Syndrome (MERS) 2015**. Disponível em: <
http://www.cdc.gov/coronavirus/mers/downloads/factsheet-mers_en.pdf> Acesso em:
50 21/01/2016.

- CHAN, J. F. et al. Is the discovery of the novel human betacoronavirus 2c EMC/2012 (HCoV-EMC) the beginning of another SARS-like pandemic?. **Journal of Infection**, v. 65, n. 6, p. 477-489, 2012.
- 5 CHAN, J. F. et al. Interspecies transmission and emergence of novel viruses: lessons from bats and birds. **Trends in microbiology**, v. 21, n. 10, p. 544-555, 2013.
- CHAN, J. F. et al. Middle East respiratory syndrome coronavirus: another zoonotic betacoronavirus causing SARS-like disease. **Clinical microbiology reviews**, v. 28, n. 2, p. 465-522, 2015.
- 10 CHAVES, L. B. **Produção de anticorpos monoclonais para caracterização de variantes antigênicas brasileiras de vírus da raiva**. 2010. 40 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia). Instituto Butantan, São Paulo, 2010.
- 15 CHEEVER, F. S., et al. A murine virus (JHM) causing disseminated encephalomyelitis with extensive destruction of myelin: I. Isolation and biological properties of the virus. **The Journal of experimental medicine**, v. 90, n. 3, p. 181-194, 1949.
- 20 CHEN, Y. et al. A sensitive and specific antigen detection assay for Middle East respiratory syndrome coronavirus. **Emerging microbes & infections**, v. 4, n. 4, p. e26, 2015.
- 25 CHILDS, J. E. et al. Surveillance and spatiotemporal associations of rabies in rodents and lagomorphs in the United States, 1985-1994. **Journal of wildlife diseases**, v. 33, n. 1, p. 20-27, 1997.
- CHU, D. K. et al. Avian coronavirus in wild aquatic birds. **Journal of virology**, v. 85, n. 23, p. 12815-12820, 2011.
- 30 COLEMAN, C. M., FRIEMAN, M. B. Coronaviruses: important emerging human pathogens. **Journal of virology**, v. 88, n. 10, p. 5209-5212, 2014.
- 35 CONDIT, R. C. General Virology: Principles of Virology. In: KNIPE, D. M., HOWLEY, P. M. eds. **Fields Virology 6ª ed.** Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, cap. 2, p. 21-51, 2013.
- 40 CORMAN, V. M. et al. Highly diversified coronaviruses in neotropical bats. **Journal of General Virology**, v. 94, n. 9, p. 1984-1994, 2013.
- COSTA, E. A. et al. Etiologic diagnosis of diseases of the central nervous system of horses in Minas Gerais State, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 67, n. 2, p. 391-399, 2015.
- 45 CRUZ, C. A. et al. Raiva canina e felina-casos notificados no Brasil em 2014. **Ars Veterinaria**, v. 31, n. 2, p. 110, 2015.
- 50 CUNHA, E. M. S. et al. Raiva em morcegos na região norte-noroeste do Estado de São Paulo: 1997-2002. **Revista de Saúde Pública**, v. 40, n. 6, p. 1082-1086, 2006.

- DASZAK, P., CUNNINGHAM, A. A., HYATT, A. D. Anthropogenic environmental change and the emergence of infectious diseases in wildlife. **Acta tropica**, v. 78, n. 2, p. 103-116, 2001.
- 5 DAVIS, B. M., RALL, G. F., SCHNELL, M. J. Everything You Always Wanted to Know About Rabies Virus (But Were Afraid to Ask). **Annual Review of Virology**, v. 2, p. 451-471, 2015.
- 10 DE GROOT, R. J. et al. Family *Coronaviridae*. In: **Virus Taxonomy: Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses** Edited by King, A.M.Q., Lefkowitz, E., Adams, M.J., Carstens, E.B., Oxford, UK: Elsevier, p. 806-828, 2011.
- 15 DE GROOT, R. J. et al. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV): announcement of the Coronavirus Study Group. **Journal of virology**, v. 87, n. 14, p. 7790-7792, 2013.
- 20 DE MATTOS, C. A., DE MATTOS, C. C., RUPPRECHT, C. E. Rhabdoviruses. In: KNIPE, D. M., HOWLEY, P. M. eds. **Fields Virology 4^a ed.** Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, cap. 39, p. 1245-1277, 2001.
- 25 DE THOISY, B., DUSSART, P., KAZANJI, M. Wild terrestrial rainforest mammals as potential reservoirs for flaviviruses (yellow fever, dengue 2 and St Louis encephalitis viruses) in French Guiana. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, n. 7, p. 409-412, 2004.
- DE THOISY, B. et al. Dengue infection in neotropical forest mammals. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 9, n. 2, p. 157-170, 2009.
- 30 DIETZGEN, R. G. et al. *Rhabdoviridae*. In: **Virus Taxonomy: Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses** Edited by King, A. M. Q., Lefkowitz, E., Adams, M. J., Carstens, E. B., Oxford, UK: Elsevier, p. 686-713, 2011.
- 35 DOBSON, A. P., CARPER, E. R. Infectious diseases and human population history. **Bioscience**, p. 115-126, 1996.
- 40 DOMINGUEZ, S. R. et al. Isolation, propagation, genome analysis and epidemiology of HKU1 betacoronaviruses. **Journal of General Virology**, v. 95, n. 4, p. 836-848, 2014.
- DONALDSON, E. F. et al. Metagenomic analysis of the viromes of three North American bat species: viral diversity among different bat species that share a common habitat. **Journal of virology**, v. 84, n. 24, p. 13004-13018, 2010.
- 45 DREXLER, J. F. et al. Genomic characterization of severe acute respiratory syndrome-related coronavirus in European bats and classification of coronaviruses based on partial RNA-dependent RNA polymerase gene sequences. **Journal of virology**, v. 84, n. 21, p. 11336-11349, 2010.

- DROSTEN, C. et al. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. **New England Journal of Medicine**, v. 348, n. 20, p. 1967-1976, 2003.
- 5 ECKERLE, I. et al. Replicative capacity of MERS coronavirus in livestock cell lines. **Emerging Infectious Diseases**, v. 20, n. 2, p. 276-279, 2014.
- FAVORETTO, S. R. et al. The emergence of wildlife species as a source of human rabies infection in Brazil. **Epidemiology and infection**, v. 141, n. 7, p. 1552-1561,
10 2013.
- FEHR, A. R., PERLMAN, S. Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. **Coronaviruses: Methods and Protocols**, v. 1282, p. 1-23, 2015.
- 15 FINNIE, E. P. Monotremes and Marsupials (Anatomy) In: Fowler, M. E. (Ed.). **Zoo and wild animal medicine**. Estados Unidos: Saunders Company, p.558-560, 1986.
- GAUTRET, P. et al. Rabies in nonhuman primates and potential for transmission to humans: a literature review and examination of selected French national data. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 5, p. e2863, 2014.
20
- GÓES, L. G. B. **Caracterização molecular de coronavírus humano-HCoV, circulantes no município de São Paulo, São Paulo, Brasil**. 2012. 154 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.
25
- GORBALENYA, A. E. et al. Nidovirales: evolving the largest RNA virus genome. **Virus research**, v. 117, n. 1, p. 17-37, 2006.
- GRAHAM, R. L., DONALDSON, E. F., BARIC, R. S. A decade after SARS: strategies
30 for controlling emerging coronaviruses. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 12, p. 836-848, 2013.
- GUTERRES, A. et al. Phylogenetic analysis of the S segment from Jujuitiba hantavirus: Identification of two distinct lineages in *Oligoryzomys nigripes*. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 18, p. 262-268, 2013.
35
- GUY, J. S. et al. Characterization of a coronavirus isolated from a diarrheic foal. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 12, p. 4523–4526, 2000.
- 40 HANLON, C. A., OLSON, J. G., CLARK, C. J. Article I: Prevention and education regarding rabies in human beings. National Working Group on Rabies Prevention and Control. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 215, n. 9, p. 1276-1280, 1999.
- 45 HAYMAN, D. T. S. et al. A universal real-time assay for the detection of Lyssaviruses. **Journal of virological methods**, v. 177, n. 1, p. 87-93, 2011.
- HEATON, P. R. et al. Heminested PCR assay for detection of six genotypes of rabies and rabies-related viruses. **Journal of clinical microbiology**, v. 35, n. 11, p. 2762-
50 2766, 1997.

- HE, Y. et al. Identification of a critical neutralization determinant of severe acute respiratory syndrome (SARS)-associated coronavirus: importance for designing SARS vaccines. **Virology**, v. 334, n. 1, p. 74-82, 2005.
- 5 HOLMES, K. V., DOMINGUEZ, S. R. The new age of virus discovery: genomic analysis of a novel human betacoronavirus isolated from a fatal case of pneumonia. **MBio**, v. 4, n. 1, p. e00548-12, 2013.
- 10 HUYNH, J. et al. Evidence supporting a zoonotic origin of human coronavirus strain NL63. **Journal of virology**, v. 86, n. 23, p. 12816-12825, 2012.
- ICTV. International Committee on Taxonomy of Viruses. 2014. Disponível em: <<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>> Acesso em: 21/01/2015.
- 15 IEF/MG, Instituto Estadual de Florestas de Minas Gerais. 2010. Parque Estadual da Serra do Papagaio. Disponível em: <http://www.ief.mg.gov.br/index.php?option=com_content&task=view&id=211&Itemid=37> Acesso em: 19/12/15.
- 20 IF/MG, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais. 2016. Campus Rio Pomba. Disponível em: <<http://www.riopomba.ifsudestemg.edu.br/portal/node/2>> Acesso em: 19/12/15.
- 25 IGA. Instituto de Geociências Aplicadas. Disponível em: <http://www.iga.br/SiteIGA/mapas/cgi/IGA_09_Cartografia.php> Acesso em: 20/11/2014.
- 30 ISAACS, D. et al. Epidemiology of coronavirus respiratory infections. **Archives of disease in childhood**, v. 58, n. 7, p. 500-503, 1983.
- ITHETE, N. L. et al. Close relative of human Middle East respiratory syndrome coronavirus in bat, South Africa. **Emerging Infectious Diseases**, v. 19, n. 10, p. 1697-1699, 2013.
- 35 JANSEN, A. M. Marsupiais Didelfídeos: gambás e cuícas. In: ANDRADE, A., PINTO, S. C., OLIVEIRA, R. S. eds. **Animais de laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: FioCruz, p. 167-173, 2006.
- 40 JONES, K. E. et al. Global trends in emerging infectious diseases. **Nature**, v. 451, n. 7181, p. 990-993, 2008.
- KALLIO-KOKKO, H. et al. Viral zoonoses in Europe. **FEMS microbiology reviews**, v. 29, n. 5, p. 1051-1077, 2005.
- 45 KANTAKAMALAKUL, W. et al. Prevalence of rabies virus and Hantaan virus infections in commensal rodents and shrews trapped in Bangkok. **Journal of the Medical Association of Thailand= Chotmaihet Thangphaet**, v. 86, n. 11, p. 1008-1014, 2003.
- 50

- KOBAYASHI, Y. et al. Evolutionary history of dog rabies in Brazil. **Journal of General Virology**, v. 92, n. 1, p. 85-90, 2011.
- 5 KOPROWSKI, H. La rage et la vaccination rabique de Pasteur a nos jours. **Bulletin Institut Pasteur**, p. 301-308, 1985.
- KOTAIT, I. et al. Reservatórios silvestres do vírus da raiva: um desafio para a saúde pública. **BEPA. Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 4, n. 40, p. 02-08, 2007.
- 10 KOTAIT, I., CARRIERI, M. L., TAKAOKA, N. Y. Raiva: Aspectos gerais e clínica. In: **Manual Técnico do Instituto Pasteur**. Instituto Pasteur, São Paulo, 2009.
- KSIAZEK, T. G. et al. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. **New England Journal of Medicine**, v. 348, n. 20, p. 1953-1966, 2003.
- 15 LACK, J. B., VOLK, K., VAN DEN BUSSCHE, R. A. Hepatitis E virus genotype 3 in wild rats, United States. **Emerg Infect Dis**, v. 18, n. 8, p. 1268-1273, 2012.
- LAI, M. M. C., PERLMAN, S., ANDERSON, L. J. *Nidovirales: Coronaviridae* and *Arteriviridae. Coronaviridae*. In: KNIPE, D. M., HOWLEY, P. M. eds. **Fields Virology 5^a** ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, cap. 36, p. 1306-1335, 2007.
- 20 LAM, W. Y. et al. Rapid multiplex nested PCR for detection of respiratory viruses. **Journal of clinical microbiology**, v. 45, n. 11, p. 3631-3640, 2007.
- 25 LARSON, H. E., REED, S. E., TYRRELL, D. A. J. Isolation of rhinoviruses and coronaviruses from 38 colds in adults. **Journal of medical virology**, v. 5, n. 3, p. 221-229, 1980.
- 30 LAU, S. K. P. et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in Chinese horseshoe bats. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 39, p. 14040-14045, 2005.
- 35 LAU, S. K. P. et al. Discovery of a novel coronavirus, China *Rattus* coronavirus HKU24, from Norway rats supports murine origin of *Betacoronavirus* 1 with implications on the ancestor of *Betacoronavirus* lineage A. **Journal of virology**, p. JVI. 02420-14, 2014.
- 40 LEDERBERG, J., SHOPE, R. E., OAKS JR, S. C. eds. **Emerging Infections: Microbial Threats to Health in the United States**. National Academies Press, cap. 47, 1992.
- 45 LEDERBERG, J., HAMBURG, M. A., SMOLINSKI, M. S. eds. **Microbial Threats to Health: Emergence, Detection, and Response**. National Academies Press, 2003.
- LE PODER, S. Feline and canine coronaviruses: common genetic and pathobiological features. **Advances in virology**, v. 2011, 2011.

- LEVINSON, J. et al. Targeting surveillance for zoonotic virus discovery. **Emerging infectious diseases**, v. 19, n. 5, p. 270-273, 2013.
- 5 LIMA, E. F. et al. Clinical signs, distribution of the lesions in the central nervous system and epidemiology of rabies in northeastern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 25, n. 4, p.250-264, 2005.
- 10 LISSENBERG, A. et al. Luxury at a cost? Recombinant mouse hepatitis viruses expressing the accessory hemagglutinin esterase protein display reduced fitness in vitro. **Journal of virology**, v. 79, n. 24, p. 15054-15063, 2005.
- 15 LORETTO, D., VIEIRA, M. V. The effects of reproductive and climatic seasons on movements in the black-eared opossum (*Didelphis aurita* Wied-Neuwied, 1826). **Journal of Mammalogy**, v. 86, n. 2, p. 287-293, 2005.
- LU, R. et al. Characterization of human coronavirus etiology in Chinese adults with acute upper respiratory tract infection by real-time RT-PCR assays. **PLoS One**, v. 7, n. 6, p. e38638, 2012.
- 20 LYLES, D. S., KUZMIN, I. V., RUPPRECHT, C. E. *Rhabdoviridae*. In: KNIPE, D. M., HOWLEY, P. M. eds. **Fields Virology 6^a ed.** Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, cap. 31, p. 885-922, 2013.
- 25 MACEDO, I. S. **Freqüência de coronavírus e rinovírus como causa de infecções respiratórias agudas em crianças**. 2002. Dissertação (Mestrado em Imunologia Básica e Aplicada) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2002.
- 30 MACKENZIE, J. S., JEGGO, M. Reservoirs and vectors of emerging viruses. **Current opinion in virology**, v. 3, n. 2, p. 170-179, 2013.
- MARCOLONGO-PEREIRA, C. et al. Raiva em bovinos na Região Sul do Rio Grande do Sul: epidemiologia e diagnóstico imuno-histoquímico. **Pesq. Vet. Bras**, v. 31, n. 4, p. 331-335, 2011.
- 35 MARTORELLI, L. F. A. et al. **Informe Técnico: Diagnóstico de raiva em morcegos na cidade de São Paulo, 2004 a 2013**. 2014.
- 40 MASTERS, P. S., PERLMAN, S. *Coronaviridae*. In: KNIPE, D. M., HOWLEY, P. M. eds. **Fields Virology 6^a ed.** Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, cap. 28, p. 825-858, 2013.
- 45 MCINTOSH, K. Coronaviruses: a comparative review. In: **Current Topics in Microbiology and Immunology/Ergebnisse der Mikrobiologie und Immunitätsforschung**. Springer Berlin Heidelberg, p. 85-129, 1974.
- MENEZES, F. L. et al. Distribuição espaço-temporal da raiva bovina em Minas Gerais, 1998 a 2006. **Arq. bras. med. vet. zootec**, v. 60, n. 3, p. 566-573, 2008.

- MILLS, J. N. et al. **Methods for trapping and sampling small mammals for virologic testing**. US Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centres for Disease Control and Prevention, 1995.
- 5 MILLS, J. N. Biodiversity loss and emerging infectious disease: an example from the rodent-borne hemorrhagic fevers. **Biodiversity**, v. 7, n. 1, p. 9-17, 2006.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Normas Técnicas de Profilaxia da Raiva Humana. Série A: Normas e Manuais Técnicos**. Brasília, 2011.
- 10 **Série A: Normas e Manuais Técnicos**. Brasília, 2011.
- MONTO, A. S. Medical reviews. Coronaviruses. **The Yale journal of biology and medicine**, v. 47, n. 4, p. 234, 1974.
- 15 MORSE, S. S. The public health threat of emerging viral disease. **The Journal of nutrition**, v. 127, n. 5, p. 951S-957S, 1997.
- MOUTINHO, F. F. B. et al. Raiva em morcego não hematófago em área urbana do Município de Niterói-RJ. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 22, n. 2, p. 99-102, 2015.
- 20 **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 22, n. 2, p. 99-102, 2015.
- NIE, Y. et al. Highly infectious SARS-CoV pseudotyped virus reveals the cell tropism and its correlation with receptor expression. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 321, n. 4, p. 994-1000, 2004.
- 25 **Biochemical and biophysical research communications**, v. 321, n. 4, p. 994-1000, 2004.
- NOBRE, A. F. S. et al. Primeira detecção de coronavírus humano associado à infecção respiratória aguda na Região Norte do Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 5, n. 2, p. 37-41, 2014.
- 30 **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 5, n. 2, p. 37-41, 2014.
- NOWAK, R. M. (Ed.). **Walker's mammals of the world 6^a ed.** JHU Press, 1999.
- OLIVEIRA, S. V. et al. Análise do perfil epidemiológico da hantavirose no Brasil no período de 2007 a 2012. **Revista de Patologia Tropical**, v. 43, n. 2, p. 131-142, 2014.
- 35 **Revista de Patologia Tropical**, v. 43, n. 2, p. 131-142, 2014.
- PAGLIA, A. P. et al. Lista Anotada dos Mamíferos do Brasil 2^a Edição/Annotated Checklist of Brazilian Mammals. **Occasional Papers in conservation biology**, n. 6, 2012.
- 40 **Occasional Papers in conservation biology**, n. 6, 2012.
- PARKER, J. C., CROSS, S. S., ROWE, W. P. Rat coronavirus (RCV): a prevalent, naturally occurring pneumotropic virus of rats. **Archiv für die gesamte Virusforschung**, v. 31, n. 3, p. 293-302, 1970.
- 45 **Archiv für die gesamte Virusforschung**, v. 31, n. 3, p. 293-302, 1970.
- PARK, W. B. et al. Kinetics of serologic responses to MERS coronavirus infection in humans, South Korea. **Emerging infectious diseases**, v. 21, n. 12, p. 2186-2189, 2015.
- 50 **Emerging infectious diseases**, v. 21, n. 12, p. 2186-2189, 2015.
- PATTON, J. L., PARDIÑAS, U. F. J., D'ELÍA, G. **Mammals of South America, Volume 2: Rodents**. University of Chicago Press, 2015.

- PEIRIS, J. S. M. et al. The severe acute respiratory syndrome. **New England Journal of Medicine**, v. 349, n. 25, p. 2431-2441, 2003.
- 5 PERACCHI, A. L. et al. Ordem *Chiroptera*. **Mamíferos do Brasil**, p. 153-230, 2006.
- PERES, M. G. et al. Serological study of vaccinia virus reservoirs in areas with and without official reports of outbreaks in cattle and humans in Sao Paulo, Brazil. **Archives of virology**, v. 158, n. 12, p. 2433-2441, 2013.
- 10 PFEFFERLE, S. et al. Distant relatives of severe acute respiratory syndrome coronavirus and close relatives of human coronavirus 229E in bats, Ghana. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 9, p. 1377-1384, 2009.
- 15 POON, L. L. M. et al. Identification of a novel coronavirus in bats. **Journal of virology**, v. 79, n. 4, p. 2001-2009, 2005.
- PYRC, K., BERKHOUT, B., VAN DER HOEK, Lia. The novel human coronaviruses NL63 and HKU1. **Journal of virology**, v. 81, n. 7, p. 3051-3057, 2007.
- 20 QUEIROZ, L. H. et al. Perfil epidemiológico da raiva na região Noroeste do Estado de São Paulo no período de 1993 a 2007. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 1, p. 9-14, 2009.
- 25 RAMIREZ, B. U., RETAMAL, L., VERGARA, C. Ciliary neurotrophic factor (CNTF) affects the excitable and contractile properties of innervated skeletal muscles. **Biological research**, v. 36, n. 3-4, p. 303-312, 2003.
- 30 ROOT, J. J. West Nile virus associations in wild mammals: a synthesis. **Archives of virology**, v. 158, n. 4, p. 735-752, 2013.
- RUPPRECHT, C. E. et al. The ascension of wildlife rabies: a cause for public health concern or intervention? **Emerging infectious diseases**, v. 1, n. 4, p. 107, 1995.
- 35 SAMBROOK, J., RUSSELL, D. W. Gel Electrophoresis of DNA and Pulsed-field Agarose Gel Electrophoresis. In: **Molecular Cloning - A Laboratory Manual**. third ed. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, p. 5.1–5.90, 2001.
- SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.
- 40 SANTOS, J. R. A. et al. Fluconazole alters the polysaccharide capsule of *Cryptococcus gattii* and leads to distinct behaviors in murine Cryptococcosis. **PLoS one**, v. 9, n. 11, p. e112669, jan. 2014.
- 45 SCHEFFER, K. C. **Detecção do vírus da raiva em órgãos de morcegos do gênero *Artibeus* (Leach, 1821) por meio de RT-PCR, Hemi-Nested RT-PCR e Real Time RT-PCR**. 2011. 145 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

- SCHNEEBERGER, K., VOIGT, C. C. Zoonotic viruses and conservation of bats. In: ***Bats in the Anthropocene: Conservation of Bats in a Changing World***. Springer International Publishing, p. 263-292, 2016.
- 5 SIDDELL, S., WEGE, H., TER MEULEN, V. The biology of coronaviruses. **Journal of General Virology**, v. 64, n. 4, p. 761-776, 1983.
- SILVA, J. M., et al. A case of human rabies in the urban area of Ribeirão Preto, SP, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 39, n. 3, p. 175-176, 1997.
- 10
- SMITH, J. S. New aspects of rabies with emphasis on epidemiology, diagnosis, and prevention of the disease in the United States. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 9, n. 2, p. 166, 1996.
- 15
- SMITH, J. S. Rabies virus. In: MURRAY, P. R., ed. **Manual of Clinical Microbiology**, 7^a ed. Washington, DC: ASM Press, p. 1099-1106, 1999.
- SUZUKI, A. et al. Identifying rodent hantavirus reservoirs, Brazil. **Emerging infectious diseases**, v. 10, p. 2127-2134, 2004.
- 20
- TAYLOR, L. H., LATHAM, S. M., MARK, E. J. Risk factors for human disease emergence. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 356, n. 1411, p. 983-989, 2001.
- 25
- TECHNELYSIUM PTY LTD. Chromas Lite. Version 2.01. [S. I.]: Technelysium Pty Ltd., 2005. Disponível em: <http://www.technelysium.com.au /chromas_lite.html> Acesso em: 20/01/16.
- 30
- TEPSUMETHANON, V. et al. Fluorescent antibody test for rabies: prospective study of 8,987 brains. **Clinical infectious diseases**, v. 25, n. 6, p. 1459-1461, 1997.
- TRAVASSOS DA ROSA, E. S. et al. Bat-transmitted human rabies outbreaks, Brazilian Amazon. **Emerg Infect Dis**, v. 12, n. 8, p. 1197-1202, 2006.
- 35
- UJIKE, M., TAGUCHI, F. Incorporation of Spike and Membrane Glycoproteins into Coronavirus Virions. **Viruses**, v. 7, n. 4, p. 1700-1725, 2015.
- VAN BOHEEMEN, S. et al. Genomic characterization of a newly discovered coronavirus associated with acute respiratory distress syndrome in humans. **MBio**, v. 3, n. 6, p. e00473-12, 2012.
- 40
- VAN DER HOEK, L. et al. Identification of a new human coronavirus. **Nature medicine**, v. 10, n. 4, p. 368-373, 2004.
- 45
- VIEIRA, J. O. L. J. et al. Diversidade Florística dos Fragmentos de Mata Atlântica do IF Sudeste MG, campus Rio Pomba. **Cadernos de Agroecologia**, v. 8, n. 2, 2013.
- VIGNOLES, M. et al. Development of a new detection tool by real time PCR for the detection of Middle East Respiratory Syndrome human Coronavirus (MERS-HCoV)
- 50

combining specific primers, probe and a RNA internal control ready to use premix. **Journal of Clinical Virology**, v. 70, p. S59, 2015.

- 5 VIJGEN, L. et al. Complete genomic sequence of human coronavirus OC43: molecular clock analysis suggests a relatively recent zoonotic coronavirus transmission event. **Journal of virology**, v. 79, n. 3, p. 1595-1604, 2005.
- 10 VIJGEN, L. et al. Evolutionary history of the closely related group 2 coronaviruses: porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus, bovine coronavirus, and human coronavirus OC43. **Journal of virology**, v. 80, n. 14, p. 7270-7274, 2006.
- 15 VIJGEN, L. et al. A pancoronavirus RT-PCR assay for detection of all known coronaviruses. **SARS-and Other Coronaviruses: Laboratory Protocols**, v. 454, p. 3-12, 2008.
- 20 VIZOTTO, L. D., TADDEI, V. A. Chave para determinação de quirópteros brasileiros. **Revista da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de São José do Rio Preto Boletim de Ciências**, 1973.
- WACHARAPLUESADEE, S. et al. Development of a TaqMan real-time RT-PCR assay for the detection of rabies virus. **Journal of virological methods**, v. 151, n. 2, p. 317-320, 2008.
- 25 WADA, M. Y., ROCHA, S. M., MAIA-ELKHOURY, A. N. S. Rabies situation in Brazil, 2000 to 2009. **Epidemiol Serv Saúde**, v. 20, p. 509-518, 2011.
- 30 WAKELEY, P. R. et al. Development of a real-time, TaqMan reverse transcription-PCR assay for detection and differentiation of lyssavirus genotypes 1, 5, and 6. **Journal of clinical microbiology**, v. 43, n. 6, p. 2786-2792, 2005.
- 35 WANDELER, A. I. et al. The ecology of dogs and canine rabies: a selective review. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, v. 12, n. 1, p. 51-71, 1993.
- WANG, W. et al. Discovery, diversity and evolution of novel coronaviruses sampled from rodents in China. **Virology**, v. 474, p. 19-27, 2015.
- 40 WARRELL, M. J., WARRELL, D. A. Rabies and other lyssavirus diseases. **The Lancet**, v. 363, n. 9413, p. 959-969, 2004.
- 45 WEAVER, S. C., BARRETT, A. D. Transmission cycles, host range, evolution and emergence of arboviral disease. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 10, p. 789-801, 2004.
- 50 WHO, World Health Organization. Summary table of SARS cases by country, 1 November 2002-7 August 2003. 2003. Disponível em : <http://www.who.int/csr/sars/country/en/country2003_08_15.pdf> Acesso em: 12/11/15.

- WHO, WHO Expert Consultation on Rabies. Second report. **World Health Organization Technical Report Series**, n. 982, p. 1, 2013.
- 5 WHOER, WHO Ebola Response Team, et al. Ebola virus disease in West Africa—the first 9 months of the epidemic and forward projections. **The New England Journal of Medicine**, v. 371, n. 16, p. 1481-1495, 2014.
- 10 WINKLER, W. G. Rodent rabies in the United States. **The Journal of infectious diseases**, p. 565-567, 1972.
- WINKLER, W. G. Rodent rabies. In: BAER, G. M. ed. **The natural history of rabies 2^a ed.**, CRC Press, cap. 21, p. 405-410, 1991.
- 15 WOLFE, N. D., DUNAVAN, C. P., DIAMOND, J. Origins of major human infectious diseases. **Nature**, v. 447, n. 7142, p. 279-283, 2007.
- WONG, S. et al. Bats as a continuing source of emerging infections in humans. **Reviews in medical virology**, v. 17, n. 2, p. 67-91, 2007.
- 20 WOO, P. C. Y. et al. Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia. **Journal of virology**, v. 79, n. 2, p. 884-895, 2005.
- 25 WOO, P. C. Y. et al. Molecular diversity of coronaviruses in bats. **Virology**, v. 351, n. 1, p. 180-187, 2006.
- WOO, P. C. Y. et al. Coronavirus diversity, phylogeny and interspecies jumping. **Experimental Biology and Medicine**, v. 234, n. 10, p. 1117-1127, 2009.
- 30 WOO, P. C. Y. et al. Discovery of seven novel mammalian and avian coronaviruses in *Deltacoronavirus* supports bat coronaviruses as the gene source of *Alphacoronavirus* and *Betacoronavirus* and avian coronaviruses as the gene source of *Gammacoronavirus* and *Deltacoronavirus*. **Journal of Virology**, p. JVI. 06540-11, 2012.
- 35 WOOLHOUSE, M. E. J., GOWTAGE-SEQUERIA, S. Host range and emerging and reemerging pathogens. In: **Ending the War Metaphor: The Changing Agenda for Unraveling the Host-Microbe Relationship-Workshop Summary**. National Academies Press, v. 192, 2006.
- 40 WUNNER, W. H., CONZELMANN, K. Rabies virus. In: Jackson, A. C. ed. **Rabies 3^aed.** Oxford, UK: Academic Press/Elsevier, p. 17-60, 2013.
- 45 YUEN, K. Y., LAU, S. K., WOO, P. C. Wild animal surveillance for coronavirus HKU1 and potential variants of other coronaviruses. **Hong Kong medical journal Xianggang yi xue za zhi/Hong Kong Academy of Medicine**, v. 18, p. 25-26, 2012.
- 50 ZAKI, A. M. et al. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. **New England Journal of Medicine**, v. 367, n. 19, p. 1814-1820, 2012.

ZANLUCA, C. et al. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 4, p. 569-572, 2015.

5 ZAPATA, J. C., SALVATO, M. S. Arenavirus variations due to host-specific adaptation. **Viruses**, v. 5, n. 1, p. 241-278, 2013.

APÊNDICE A – Pequenos mamíferos silvestres (roedores e marsupiais) capturados no município de Rio Pomba, Minas Gerais.

Campanha	Ficha	Espécie	Sexo	Captura	Área	Transecto	Posto	Armadilha	Posição	Data de coleta
1	PRONEM 0009	<i>Akodon Pequeno</i>	Macho	1	Pasto	T8	7	Sherman	Chão	25/10/2012
1	PRONEM 0010	<i>Necromys lasiurus</i>	Macho	1	Pasto	T8	13	Gaiola	Chão	25/10/2012
1	PRONEM 0011	<i>Monodelphis americana</i>	Macho	1	Mata	T1	11	Sherman	Subosque	25/10/2012
1	PRONEM 0012	<i>Calomys tener</i>	Macho	1	Pasto	T6	2	Sherman	Chão	25/10/2012
1	PRONEM 0013	<i>Calomys tener</i>	Macho	1	Pasto	T7	8	Sherman	Chão	26/10/2012
1	PRONEM 0014	<i>Necromys lasiurus</i>	Fêmea	1	Pasto	T7	13	Gaiola	Chão	26/10/2012
1	PRONEM 0015	<i>Akodon cf. mystax</i>	Macho	1	Pasto	T8	6	Sherman	Chão	26/10/2012
1	PRONEM 0016	<i>Oligoryzomys nigripes</i>	Macho	1	Pasto	T8	2	Sherman	Chão	26/10/2012
1	PRONEM 0017	<i>Calomys tener</i>	Fêmea	1	Pasto	T8	15	Sherman	Chão	26/10/2012
1	PRONEM 0018	<i>Necromys lasiurus</i>	Fêmea	1	Pasto	T8	12	Gaiola	Chão	26/10/2012
1	PRONEM 0019	<i>Oligoryzomys nigripes</i>	Macho	1	Peridomicílio	T10	14	Sherman	Chão	26/10/2012
1	PRONEM 0020	<i>Calomys tener</i>	Fêmea	1	Pasto	T6	2	Sherman	Chão	27/10/2012
1	PRONEM 0021	<i>Calomys tener</i>	Macho	1	Pasto	T8	12	Sherman	Chão	27/10/2012
1	PRONEM 0022	<i>Akodon cf. mystax</i>	Macho	1	Pasto	T8	13	Sherman	Chão	27/10/2012
1	PRONEM 0023	<i>Calomys tener</i>	Macho	1	Pasto	T8	15	Sherman	Chão	27/10/2012
1	PRONEM 0024	<i>Calomys tener</i>	Macho	1	Pasto	T5	4	Sherman	Chão	28/10/2012
1	PRONEM 0025	<i>Akodon cursor</i>	Macho	1	Pasto	T5	14	Gaiola	Chão	28/10/2012
1	PRONEM 0026	<i>Akodon cf. mystax</i>	Macho	1	Pasto	T8	8	Sherman	Chão	28/10/2012
1	PRONEM 0027	<i>Akodon cf. mystax</i>	Fêmea	1	Pasto	T8	10	Gaiola	Chão	28/10/2012
1	PRONEM 0028	<i>Akodon cf. mystax</i>	Fêmea	1	Pasto	T8	3	Sherman	Chão	28/10/2012
1	PRONEM 0029	<i>Necromys lasiurus</i>	Fêmea	2	Pasto	T8	15	Sherman	Chão	28/10/2012
1	PRONEM 0030	<i>Akodon cf. mystax</i>	Fêmea	1	Pasto	T8	11	Sherman	Chão	28/10/2012
1	PRONEM 0031	<i>Calomys tener</i>	Macho	1	Pasto	T8	12	Sherman	Chão	28/10/2012

Continuação APÊNDICE A

Campanha	Ficha	Espécie	Sexo	Captura	Área	Transecto	Posto	Armadilha	Posição	Data de coleta
1	PRONEM 0032	<i>Akodon cf. mystax</i>	Fêmea	1	Pasto	T8	14	Sherman	Chão	28/10/2012
2	PRONEM 0045	<i>Akodon cf. mystax</i>	Fêmea	1	Pasto	T8	12	Gaiola	Chão	12/12/2012
2	PRONEM 0046	<i>Calomys tener</i>	Fêmea	1	Pasto	T6	5	Sherman	Chão	12/12/2012
2	PRONEM 0047	<i>Calomys tener</i>	Macho	1	Pasto	T5	13	Gaiola	Chão	12/12/2012
2	PRONEM 0048	<i>Calomys tener</i>	Fêmea	1	Pasto	T5	12	Gaiola	Chão	12/12/2012
2	PRONEM 0049	<i>Akodon cf. mystax</i>	Macho	1	Pasto	T7	8	Sherman	Chão	13/12/2012
2	PRONEM 0050	<i>Oligoryzomys nigripes</i>	Fêmea	1	Peridomicílio	T10	12	Sherman	Chão	13/12/2012
2	PRONEM 0051	<i>Akodon cf. mystax</i>	Fêmea	1	Pasto	T8	14	Gaiola	Chão	13/12/2012
2	PRONEM 0052	<i>Oligoryzomys nigripes</i>	Macho	1	Mata	T2	7	Gaiola	Chão	13/12/2012
2	PRONEM 0053	<i>Calomys tener</i>	Fêmea	2	Pasto	T6	3	Gaiola	Chão	14/12/2012
2	PRONEM 0054	<i>Calomys tener</i>	Macho	1	Pasto	T6	6	Sherman	Chão	14/12/2012
2	PRONEM 0055	<i>Calomys tener</i>	Macho	1	Pasto	T8	11	Gaiola	Chão	14/12/2012
2	PRONEM 0056	<i>Calomys tener</i>	Fêmea	1	Pasto	T6	8	Sherman	Chão	14/12/2012
2	PRONEM 0057	<i>Didelphis aurita</i>	Fêmea	1	Mata	T1	1	Gaiola	Chão	15/12/2012
2	PRONEM 0058	<i>Calomys tener</i>	Macho	1	Pasto	T5	4	Sherman	Chão	15/12/2012
2	PRONEM 0059	<i>Akodon cf. mystax</i>	Fêmea	1	Pasto	T7	6	Gaiola	Chão	15/12/2012
2	PRONEM 0060	<i>Calomys tener</i>	Fêmea	3	Pasto	T6	3	Sherman	Chão	15/12/2012
3	PRONEM 0061	<i>Oligoryzomys nigripes</i>	Macho	1	Peridomicílio	T10	10	Sherman	Chão	05/02/2013
3	PRONEM 0062	<i>Didelphis aurita</i>	Fêmea	1	Peridomicílio	T10	14	Gaiola	Chão	05/02/2013
3	PRONEM 0063	<i>Didelphis aurita</i>	Fêmea	1	Peridomicílio	T10	15	Gaiola	Chão	05/02/2013
3	PRONEM 0064	<i>Didelphis aurita</i>	Fêmea	1	Mata	T4	5	Gaiola	Chão	06/02/2013
3	PRONEM 0065	<i>Akodon cursor</i>	Fêmea	1	Pasto	T5	2	Sherman	Chão	07/02/2013
3	PRONEM 0066	<i>Calomys tener</i>	Fêmea	1	Pasto	T6	8	Sherman	Chão	07/02/2013
3	PRONEM 0067	<i>Akodon cursor</i>	Macho	1	Pasto	T5	4	Gaiola	Chão	07/02/2013

Continuação APÊNDICE A

Campanha	Ficha	Espécie	Sexo	Captura	Área	Transecto	Posto	Armadilha	Posição	Data de coleta
3	PRONEM 0068	<i>Akodon cursor</i>	Ni	1	Pasto	T7	7	Gaiola	Chão	07/02/2013
3	PRONEM 0069	<i>Calomys tener</i>	Ni	1	Pasto	T5	5	Sherman	Chão	08/02/2013
3	PRONEM 0070	<i>Calomys tener</i>	Macho	1	Pasto	T5	11	Sherman	Chão	08/02/2013
4	PRONEM 0080	<i>Calomys tener</i>	Macho	1	Pasto	T5	11	Sherman	Chão	09/04/2013
4	PRONEM 0081	<i>Calomys tener</i>	Fêmea	1	Pasto	T5	5	Sherman	Chão	09/04/2013
4	PRONEM 0082	<i>Didelphis aurita</i>	Fêmea	1	Mata	T4	11	Gaiola	Chão	09/04/2013
4	PRONEM 0083	<i>Nectomys squamipes</i>	Macho	1	Pasto	T7	1	Gaiola	Chão	09/04/2013
4	PRONEM 0084	<i>Calomys tener</i>	Macho	1	Pasto	T5	11	Sherman	Chão	10/04/2013
4	PRONEM 0085	<i>Akodon cursor</i>	Macho	1	Mata	T3	15	Gaiola	Chão	10/04/2013
4	PRONEM 0086	<i>Calomys tener</i>	Fêmea	1	Pasto	T7	13	Sherman	Chão	10/04/2013
4	PRONEM 0087	<i>Akodon cf. mystax</i>	Macho	1	Pasto	T8	5	Sherman	Chão	10/04/2013
4	PRONEM 0088	<i>Didelphis aurita</i>	Macho	1	Mata	T4	10	Gaiola	Subosque	11/04/2013
4	PRONEM 0089	<i>Didelphis aurita</i>	Macho	1	Mata	T2	9	Gaiola	Chão	12/04/2013
5	PRONEM 0096	<i>Akodon cursor</i>	Fêmea	1	Pasto	T8	12	Sherman	Chão	25/06/2013
5	PRONEM 0097B	<i>Calomys tener</i>	Macho	1	Pasto	T8	8	Sherman	Chão	25/06/2013
5	PRONEM 0098	<i>Necromys lasiurus</i>	Macho	1	Pasto	T8	6	Gaiola	Chão	25/06/2013
5	PRONEM 0099	<i>Calomys tener</i>	Macho	1	Pasto	T7	15	Sherman	Chão	25/06/2013
5	PRONEM 0100	<i>Calomys tener</i>	Fêmea	1	Pasto	T6	1	Gaiola	Chão	25/06/2013
5	PRONEM 0101	<i>Calomys tener</i>	Ni	1	Pasto	T6	4	Gaiola	Chão	25/06/2013
5	PRONEM 0102	<i>Calomys tener</i>	Macho	1	Pasto	T6	11	Sherman	Chão	25/06/2013
5	PRONEM 0103	<i>Calomys tener</i>	Macho	1	Pasto	T6	10	Sherman	Chão	25/06/2013
5	PRONEM 0104	<i>Akodon cursor</i>	Macho	1	Pasto	T8	1	Gaiola	Chão	26/06/2013
5	PRONEM 0105	<i>Necromys lasiurus</i>	Fêmea	1	Pasto	T8	9	Gaiola	Chão	26/06/2013

Continuação APÊNDICE A

Campanha	Ficha	Espécie	Sexo	Captura	Área	Transecto	Posto	Armadilha	Posição	Data de coleta
5	PRONEM 0106	<i>Akodon cursor</i>	Macho	1	Pasto	T8	1	Sherman	Chão	26/06/2013
5	PRONEM 0107	<i>Akodon cursor</i>	Macho	1	Pasto	T7	8	Sherman	Chão	26/06/2013
5	PRONEM 0108	<i>Didelphis aurita</i>	Macho	1	Mata	T2	7	Gaiola	Chão	26/06/2013
5	PRONEM 0109	<i>Calomys tener</i>	Macho	1	Pasto	T8	5	Sherman	Chão	26/06/2013
5	PRONEM 0110	<i>Akodon cursor</i>	Macho	1	Pasto	T7	1	Sherman	Chão	26/06/2013
5	PRONEM 0111	<i>Calomys tener</i>	Fêmea	1	Pasto	T7	10	Sherman	Chão	26/06/2013
5	PRONEM 0112	<i>Akodon cursor</i>	Fêmea	1	Mata	T3	12	Gaiola	Chão	26/06/2013
5	PRONEM 0113	<i>Calomys tener</i>	Macho	1	Pasto	T8	6	Gaiola	Chão	26/06/2013
5	PRONEM 0114	<i>Calomys tener</i>	Macho	1	Pasto	T6	7	Sherman	Chão	26/06/2013
5	PRONEM 0115	<i>Calomys tener</i>	Fêmea	1	Pasto	T6	10	Gaiola	Chão	26/06/2013
5	PRONEM 0116	<i>Akodon cursor</i>	Fêmea	1	Mata	T4	11	Gaiola	Chão	26/06/2013
5	PRONEM 0117	<i>Calomys tener</i>	Macho	1	Pasto	T8	7	Gaiola	Chão	26/06/2013
5	PRONEM 0118	<i>Calomys tener</i>	Fêmea	1	Pasto	T8	10	Gaiola	Chão	26/06/2013
5	PRONEM 0119	<i>Calomys tener</i>	Macho	1	Pasto	T6	1	Gaiola	Chão	26/06/2013
5	PRONEM 0120	<i>Calomys tener</i>	Macho	1	Pasto	T8	6	Sherman	Chão	26/06/2013
5	PRONEM 0121	<i>Gracilinanus microtarsus</i>	Macho	1	Mata	T4	3	Sherman	Subosque	26/06/2013
5	PRONEM 0122	<i>Calomys tener</i>	Ni	1	Pasto	T5	3	Gaiola	Chão	27/06/2013
5	PRONEM 0123	<i>Akodon cursor</i>	Fêmea	1	Pasto	T8	10	Gaiola	Chão	27/06/2013
5	PRONEM 0124	<i>Necromys lasiurus</i>	Macho	1	Pasto	T8	9	Gaiola	Chão	27/06/2013
5	PRONEM 0125	<i>Akodon cursor</i>	Macho	1	Pasto	T7	3	Sherman	Chão	27/06/2013
5	PRONEM 0126	<i>Calomys tener</i>	Macho	1	Pasto	T7	2	Sherman	Chão	27/06/2013
5	PRONEM 0127	<i>Necromys lasiurus</i>	Fêmea	1	Pasto	T8	6	Gaiola	Chão	27/06/2013
5	PRONEM 0128	<i>Calomys tener</i>	Fêmea	1	Pasto	T6	8	Sherman	Chão	27/06/2013
5	PRONEM 0129	<i>Calomys tener</i>	Macho	1	Pasto	T7	15	Sherman	Chão	27/06/2013

Continuação APÊNDICE A

Campanha	Ficha	Espécie	Sexo	Captura	Área	Transecto	Posto	Armadilha	Posição	Data de coleta
5	PRONEM 0130	<i>Akodon cf. mystax</i>	Fêmea	1	Pasto	T8	1	Sherman	Chão	27/06/2013
5	PRONEM 0131	<i>Calomys tener</i>	Macho	1	Pasto	T6	10	Gaiola	Chão	27/06/2013
5	PRONEM 0132	<i>Calomys tener</i>	Macho	1	Pasto	T8	7	Gaiola	Chão	27/06/2013
5	PRONEM 0133	<i>Gracilinanus microtarsus</i>	Fêmea	1	Mata	T4	1	Sherman	Subosque	27/06/2013
5	PRONEM 0134	<i>Gracilinanus microtarsus</i>	Fêmea	1	Mata	T3	13	Sherman	Subosque	27/06/2013
5	PRONEM 0135	<i>Akodon cursor</i>	Macho	1	Pasto	T8	9	Sherman	Chão	28/06/2013
5	PRONEM 0136	<i>Oligoryzomys nigripes</i>	Fêmea	1	Pasto	T8	14	Sherman	Chão	28/06/2013
5	PRONEM 0137	<i>Akodon cursor</i>	Macho	1	Pasto	T7	11	Gaiola	Chão	28/06/2013
5	PRONEM 0138	<i>Calomys tener</i>	Macho	1	Pasto	T7	3	Gaiola	Chão	28/06/2013
5	PRONEM 0139	<i>Caluromys philander</i>	Macho	1	Mata	T2	14	Sherman	Chão	28/06/2013
5	PRONEM 0140	<i>Calomys tener</i>	Macho	1	Pasto	T5	1	Gaiola	Chão	28/06/2013
5	PRONEM 0141	<i>Necromys lasiurus</i>	Macho	1	Pasto	T8	9	Gaiola	Chão	28/08/2013
5	PRONEM 0142	<i>Calomys tener</i>	Macho	1	Pasto	T8	6	Sherman	Chão	28/06/2013
5	PRONEM 0143	<i>Necromys lasiurus</i>	Fêmea	1	Pasto	T7	4	Gaiola	Chão	28/06/2013
5	PRONEM 0144	<i>Calomys tener</i>	Fêmea	1	Pasto	T8	14	Sherman	Chão	28/06/2013
5	PRONEM 0145	<i>Calomys tener</i>	Fêmea	1	Pasto	T8	4	Gaiola	Chão	28/06/2013
5	PRONEM 0146	<i>Akodon cf. mystax</i>	Fêmea	1	Pasto	T8	8	Sherman	Chão	28/06/2013
5	PRONEM 0147	<i>Calomys tener</i>	Macho	2	Pasto	T7	9	Sherman	Chão	28/06/2013
5	PRONEM 0148	<i>Calomys tener</i>	Fêmea	1	Pasto	T7	8	Sherman	Chão	28/06/2013
5	PRONEM 0149	<i>Akodon cf. mystax</i>	Ni	1	Pasto	T8	NI	Sherman	Chão	28/06/2013
5	PRONEM 0150	<i>Akodon cursor</i>	Fêmea	2	Mata	T4	NI	Gaiola	Chão	28/06/2013
6	PRONEM 0165	<i>Akodon cf. mystax</i>	Fêmea	1	Pasto	T8	14	Gaiola	Chão	26/08/2013
6	PRONEM 0166	<i>Akodon cursor</i>	Macho	1	Mata	T4	8	Sherman	Chão	26/08/2013
6	PRONEM 0167	<i>Calomys tener</i>	Macho	2	Pasto	T8	6	Gaiola	Chão	26/08/2013

Continuação APÊNDICE A

Campanha	Ficha	Espécie	Sexo	Captura	Área	Transecto	Posto	Armadilha	Posição	Data de coleta
6	PRONEM 0168	<i>Calomys tener</i>	Macho	1	Pasto	T7	15	Gaiola	Chão	26/08/2013
6	PRONEM 0169	<i>Guerlinguetus ingrami</i>	Fêmea	1	Mata	T3	9	Sherman	Chão	26/08/2013
6	PRONEM 0170	<i>Calomys tener</i>	Macho	1	Pasto	T7	13	Gaiola	Chão	26/08/2013
6	PRONEM 0171	<i>Calomys tener</i>	Macho	1	Pasto	T8	2	Sherman	Chão	26/08/2013
6	PRONEM 0172	<i>Calomys tener</i>	Macho	1	Pasto	T6	5	Sherman	Chão	26/08/2013
6	PRONEM 0173	<i>Akodon cf. mystax</i>	Fêmea	1	Pasto	T8	6	Sherman	Chão	26/08/2013
6	PRONEM 0174	<i>Akodon cf. mystax</i>	Fêmea	1	Pasto	T8	8	Sherman	Chão	26/08/2013
6	PRONEM 0175	<i>Calomys tener</i>	Fêmea	1	Pasto	T6	1	Sherman	Chão	26/08/2013
6	PRONEM 0176	<i>Calomys tener</i>	Fêmea	1	Pasto	T6	11	Gaiola	Chão	27/08/2013
6	PRONEM 0177	<i>Akodon cf. mystax</i>	Macho	1	Pasto	T8	14	Sherman	Chão	27/08/2013
6	PRONEM 0178	<i>Juliomys pictipes</i>	Fêmea	1	Mata	T4	2	Gaiola	Chão	27/08/2013
6	PRONEM 0179	<i>Oligoryzomys nigripes</i>	Fêmea	1	Mata	T4	5	Gaiola	Chão	27/08/2013
6	PRONEM 0180	<i>Gracilinanus microtarsus</i>	Fêmea	2	Mata	T3	11	Sherman	Subosque	27/08/2013
6	PRONEM 0181	<i>Akodon cursor</i>	Macho	1	Mata	T3	12	Gaiola	Subosque	27/08/2013
6	PRONEM 0182	<i>Calomys tener</i>	Fêmea	1	Pasto	T6	4	Sherman	Chão	27/08/2013
6	PRONEM 0183	<i>Calomys tener</i>	Macho	1	Pasto	T7	3	Gaiola	Chão	27/08/2013
6	PRONEM 0184	<i>Calomys tener</i>	Fêmea	1	Pasto	T6	7	Gaiola	Chão	27/08/2013
6	PRONEM 0185	<i>Calomys tener</i>	Macho	1	Pasto	T8	3	Gaiola	Chão	27/08/2013
6	PRONEM 0186	<i>Calomys tener</i>	Macho	1	Pasto	T8	7	Sherman	Chão	27/08/2013
6	PRONEM 0187	<i>Akodon cf. mystax</i>	Fêmea	1	Pasto	T7	15	Sherman	Chão	27/08/2013
6	PRONEM 0188	<i>Calomys tener</i>	Fêmea	1	Pasto	T7	6	Gaiola	Chão	27/08/2013
6	PRONEM 0189	<i>Akodon cf. mystax</i>	Fêmea	1	Pasto	T8	5	Gaiola	Chão	27/08/2013
6	PRONEM 0190	<i>Akodon cursor</i>	Fêmea	1	Pasto	T8	10	Sherman	Chão	27/08/2013
6	PRONEM 0191	<i>Calomys tener</i>	Macho	1	Pasto	T8	7	Sherman	Chão	27/08/2013

Continuação APÊNDICE A

Campanha	Ficha	Espécie	Sexo	Captura	Área	Transecto	Posto	Armadilha	Posição	Data de coleta
6	PRONEM 0192	<i>Calomys tener</i>	Macho	1	Pasto	T8	9	Sherman	Chão	27/08/2013
6	PRONEM 0193	<i>Akodon cf. mystax</i>	Fêmea	1	Pasto	T8	14	Gaiola	Chão	27/08/2013
6	PRONEM 0194	<i>Calomys tener</i>	Macho	1	Pasto	T8	11	Sherman	Chão	27/08/2013
6	PRONEM 0195	<i>Akodon cf. mystax</i>	Macho	1	Pasto	T8	10	Gaiola	Chão	27/08/2013
6	PRONEM 0196	<i>Necromys lasiurus</i>	Fêmea	1	Pasto	T8	8	Gaiola	Chão	28/08/2013
6	PRONEM 0197	<i>Necromys lasiurus</i>	Macho	1	Pasto	T8	12	Gaiola	Chão	28/08/2013
6	PRONEM 0198	<i>Calomys tener</i>	Macho	1	Pasto	T6	3	Sherman	Chão	28/08/2013
6	PRONEM 0199	<i>Calomys tener</i>	Fêmea	1	Pasto	T6	2	Sherman	Chão	28/08/2013
6	PRONEM 0200	<i>Calomys tener</i>	Macho	1	Pasto	T5	2	Sherman	Chão	28/08/2013
6	PRONEM 0201	<i>Akodon cf. mystax</i>	Macho	1	Pasto	T8	10	Gaiola	Chão	28/08/2013
6	PRONEM 0202	<i>Calomys tener</i>	Macho	1	Pasto	T7	3	Gaiola	Chão	28/08/2013
6	PRONEM 0203	<i>Calomys tener</i>	Macho	1	Pasto	T5	12	Sherman	Chão	28/08/2013
6	PRONEM 0204	<i>Akodon cursor</i>	Fêmea	1	Mata	T3	11	Gaiola	Chão	28/08/2013
6	PRONEM 0205	<i>Calomys tener</i>	Fêmea	1	Pasto	T8	11	Sherman	Chão	28/08/2013
6	PRONEM 0206	<i>Didelphis aurita</i>	Macho	2	Mata	T2	12	Gaiola	Subosque	28/08/2013
6	PRONEM 0207	<i>Gracilinanus microtarsus</i>	Macho	1	Mata	T3	12	Gaiola	Subosque	28/08/2013
6	PRONEM 0208	<i>Akodon cf. mystax</i>	Fêmea	1	Pasto	T8	4	Gaiola	Chão	28/08/2013
6	PRONEM 0209	<i>Oxymycterus cf. dasytricus</i>	Macho	1	Pasto	T8	6	Gaiola	Chão	29/08/2013
6	PRONEM 0210	<i>Akodon cf. mystax</i>	Macho	1	Pasto	T8	12	Gaiola	Chão	29/08/2013
6	PRONEM 0211	<i>Calomys tener</i>	Macho	1	Pasto	T8	11	Gaiola	Chão	29/08/2013
6	PRONEM 0212	<i>Juliomys pictipes</i>	Fêmea	1	Mata	T4	5	Sherman	Chão	29/08/2013
6	PRONEM 0213	<i>Gracilinanus microtarsus</i>	Macho	1	Mata	T4	11	Sherman	Subosque	29/08/2013
6	PRONEM 0214	<i>Calomys tener</i>	Macho	2	Pasto	T8	10	Sherman	Chão	29/08/2013
6	PRONEM 0215	<i>Akodon cursor</i>	Fêmea	2	Pasto	T8	9	Gaiola	Chão	29/08/2013

Continuação APÊNDICE A

Campanha	Ficha	Espécie	Sexo	Captura	Área	Transecto	Posto	Armadilha	Posição	Data de coleta
6	PRONEM 0216	<i>Akodon cursor</i>	Fêmea	3	Mata	T4	7	Gaiola	Chão	29/08/2013
6	PRONEM 0217	<i>Gracilinanus microtarsus</i>	Macho	1	Mata	T3	10	Gaiola	Subosque	29/08/2013
6	PRONEM 0218	<i>Gracilinanus microtarsus</i>	Macho	1	Mata	T3	5	Sherman	Subosque	29/08/2013
6	PRONEM 0219	<i>Necromys lasiurus</i>	Macho	1	Pasto	T8	7	Gaiola	Chão	29/08/2013
6	PRONEM 0220	<i>Calomys tener</i>	Fêmea	1	Pasto	T5	1	Gaiola	Chão	29/08/2013
6	PRONEM 0221	<i>Akodon cf. mystax</i>	Fêmea	1	Pasto	T8	11	Gaiola	Chão	29/08/2013
6	PRONEM 0222	<i>Necromys lasiurus</i>	Macho	1	Pasto	T8	9	Gaiola	Chão	29/08/2013
6	PRONEM 0223	<i>Necromys lasiurus</i>	Macho	1	Pasto	T8	5	Gaiola	Chão	29/08/2013
6	PRONEM 0224	<i>Calomys tener</i>	Fêmea	2	Pasto	T6	7	Sherman	Chão	29/08/2013

(Ni) Não identificado. (NI) Não informado.

