

## IDENTIFICAÇÃO DE REPTARENAVIRUS EM *EPICRATES CENCHRIA* COM OU SEM SINAIS CLÍNICOS DE INFECÇÃO

Sally Vieira, Anthony Broering Ferreira, Camilli Steuck, Nicoly Ferreira Fernades, Ubirajara Maciel da Costa

### INTRODUÇÃO

O Reptarenavirus pertence à família *Arenaviridae* (Maes *et al.*, 2018) e é reconhecido como principal agente causador da Doença do Corpúsculo de Inclusão (BIBD) em serpentes (Hepojoki *et al.*, 2015; Hyndman *et al.*, 2019). Essa enfermidade foi registrada pela primeira vez na década de 1970, e foi responsável pela morte de quase todas as serpentes do gênero *Python* em um criatório nos Estados Unidos (Schumacher *et al.*, 1994). Entretanto, a correlação do Reptarenavirus com a BIBD foi descrita pela primeira vez em 2012 (Stenglein *et al.*, 2012), desde então, diferentes grupos de pesquisa têm evidenciado essa relação (Hetzl *et al.*, 2013, 2021; Hepojoki *et al.*, 2015; Stenglein *et al.*, 2017; Simard *et al.*, 2020). A sintomatologia clássica da doença do corpúsculo de inclusão envolve manifestações neurológicas, como déficit proprioceptivo, opistótono, tremores de cabeça e dificuldade em manter o tônus muscular. Além disso, podem ocorrer alterações secundárias, incluindo anorexia, perda de peso, regurgitação e infecções oportunistas, como pneumonia e estomatite bacteriana (Hetzl *et al.*, 2013, 2021; Hyndman *et al.*, 2019). Até o presente momento são poucos os estudos que isolaram Reptarenavirus no Brasil (Argenta *et al.*, 2020; Ferreira *et al.*, 2024). O nosso grupo de pesquisa é um dos responsáveis por identificar a presença do vírus em jiboias arco íris (*Epicrates cenchria*) e estamos buscando identificar a espécie de Reptarenavirus que afeta estes animais, possivelmente sendo uma nova espécie circulante (Ferreira *et al.*, 2024) e com possibilidade de ser descrita pela primeira vez nesse trabalho. Portanto, o objetivo desse trabalho é identificar e caracterizar o Reptarenavirus presente em *Epicrates cenchria* com ou sem sinais clínicos de infecção.

### DESENVOLVIMENTO

O projeto foi aprovado no Comitê de Ética no Uso de Animais do CAV-UDESC, Nº 7395161224. A coleta de amostras de sangue foi realizada em 29 serpentes *Epicrates cenchria* provenientes de coleções particulares no Brasil, por punção da veia paravertebral. As amostras foram armazenadas em tubos de 1,5 mL com EDTA e congeladas a -20 °C, posteriormente, foram transportadas ao CEDIMA/CAV/UDESC, onde permaneceram a -80 °C até a inoculação em cultivos celulares e posterior extração do material genético. Para cada animal, logo após a coleta foi confeccionado um esfregaço sanguíneo, corado pelo método May-Grünwald-Giemsa e avaliado em microscopia óptica (100x) para detecção de corpúsculos de inclusão. Com base no diagnóstico citológico, foram selecionadas amostras de cinco animais positivos, quatro negativos e feito um pool de cinco resultados inconclusivos. Essas amostras foram inoculadas em cultivo de células renais de *Boa constrictor* (I/1Ki) e essas foram incubadas a 30 °C com 5% de CO<sub>2</sub> em ar, por duas horas para a propagação e isolamento viral. Após esse período foi trocado o meio de cultivo e as células retornaram à incubação nas mesmas condições de temperatura e concentração de CO<sub>2</sub>. Após oito dias, as células foram removidas das placas,

centrifugadas e fixadas em formalina tamponada. O *pellet* celular foi levado para a Universidade de Zurique, processado histologicamente e submetido à imunohistoquímica com marcações para mRav (proteína de marcação do corpúsculo de inclusão) e Gp2 (proteína de superfície viral). O sobrenadante celular foi armazenado a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  para posterior extração do material genético, realização de RT-qPCR para Reptarenavírus e sequenciamento. As sequências obtidas na extração serão alinhadas no software MEGA v.11 com as sequências disponíveis no GenBank (NCBI), a fim de avaliar a semelhança entre as amostras e as espécies de Reptarenavirus já descritos.

## RESULTADOS

Na análise das lâminas confeccionadas a partir de 29 amostras de sangue das serpentes *Epicrates cenchria*, corpúsculos compatíveis com os descritos na literatura foram identificados em células sanguíneas de 19 animais. Em 17 desses casos, a presença foi observada em eritrócitos, enquanto em 2 animais os corpúsculos foram detectados em trombócitos. Quatro animais não apresentaram estruturas indicativas de BIBD, e em seis os achados foram considerados inconclusivos, pois, embora houvesse formações sugestivas no citoplasma, estas não correspondiam plenamente às características típicas, variando quanto à coloração e ao tamanho. Quanto as células cultivadas e inoculadas com as amostras selecionadas para o isolamento viral, o exame imunohistoquímico revelou que todos os animais do grupo positivo apresentaram marcação para a proteína associada ao corpúsculo de inclusão (mRav) no entanto, apenas dois desses animais exibiram detecção da glicoproteína de superfície viral (Gp2). Nos animais classificados como negativos não foi observada imunorreatividade para mRav nem para Gp2. Já nas células inoculadas com o pool de amostras inconclusivas, houve marcação apenas para mRav.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados até o momento obtidos na imunohistoquímica indicam que o isolamento viral foi bem-sucedido. Esses achados representam um avanço significativo no objetivo de identificar o Reptarenavirus em *Epicrates cenchria*. No entanto, ainda se faz necessária a extração e sequenciamento do material genético, além do alinhamento com as sequências já descritas até o momento, etapas que serão determinantes para confirmar a espécie viral circulante nesses animais.

**Palavras-chave:** serpentes; doença do corpúsculo de inclusão; virologia.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARGENTA, Fernando Froner *et al.* Identification of Reptarenaviruses, hartmaniviruses, and a novel chuvirus in captive native Brazilian boa constrictors with boid inclusion body disease. **Journal of virology**, v. 94, n. 11, p. 10.1128/jvi. 00001-20, 2020.
- FERREIRA, Anthony B. *et al.* Multifocal cutaneous neoplastic vascular proliferations in a rainbow boa (*Epicrates cenchria*) collection with boid inclusion body disease. **PloS one**, v. 19, n. 11, p. e0311015, 2024.
- HEPOJOKI, Jussi. *et al.* Arenavirus Coinfections Are Common in Snakes with Boid Inclusion Body Disease. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 89, n. 16, p. 8657–8660, 2015.
- HETZEL, Udo *et al.* Isolation, Identification, and Characterization of Novel Arenaviruses, the Etiological Agents of Boid Inclusion Body Disease. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 87, n. 20, p. 10918–10935, 2013.
- HETZEL, Udo. *et al.* Experimental Reptarenavirus Infection of Boa constrictor and Python regius. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 95, n. 7, 2021.
- HYNDMAN, T. H. *et al.* Reptarenaviruses in apparently healthy snakes in an Australian zoological collection. **Australian Veterinary Journal**, [s. l.], v. 97, n. 4, p. 93–102, 2019.
- MAES, Piet *et al.* Taxonomy of the family Arenaviridae and the order Bunyavirales: update 2018. **Archives of Virology**, [s. l.], v. 163, n. 8, p. 2295–2310, 2018.
- SCHUMACHER, Juergen *et al.* Inclusion body disease in boid snakes. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, p. 511-524, 1994.
- SIMARD, Jules *et al.* Prevalence of inclusion body disease and associated comorbidity in captive collections of boid and pythonid snakes in Belgium. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 15, n. 3, 2020.
- STENGLEIN, Mark D. *et al.* Identification, characterization, and in vitro culture of highly divergent arenaviruses from boa constrictors and annulated tree boas: Candidate etiological agents for snake inclusion body disease. **mBio**, [s. l.], v. 3, n. 4, 2012.
- STENGLEIN, Mark D. *et al.* Differential Disease Susceptibilities in Experimentally Reptarenavirus-Infected Boa Constrictors and Ball Pythons. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 91, n. 15, 2017.
- WOZNIAK, E. *et al.* Isolation and characterization of an antigenically distinct 68-kd protein from nonviral intracytoplasmic inclusions in Boa constrictors chronically infected with the inclusion body disease virus (IBDV: Retroviridae). **Veterinary pathology**, v. 37, n. 5, p. 449-459, 2000.

---

**DADOS CADASTRAIS**

---

**BOLSISTA:** Sally Vieira

**MODALIDADE DE BOLSA:** PROBIC/UDESC

**VIGÊNCIA:** 01/09/2024 a 31/08/2025 – Total: 12 meses

**ORIENTADOR(A):** Ubirajara Maciel da Costa

**CENTRO DE ENSINO:** CAV

**DEPARTAMENTO:** Medicina Veterinária

**ÁREAS DE CONHECIMENTO:** Ciências Agrárias / Medicina Veterinária

**TÍTULO DO PROJETO DE PESQUISA:** Identificação de Reptarenavirus em *Epicrates cenchria* com ou sem sinais clínicos de infecção.

**Nº PROTOCOLO DO PROJETO DE PESQUISA:** PVAV140-2024