

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**DETECÇÃO DE FRAGMENTOS DE GENOMAS VIRAIS EM FEZES DE  
LOBOS MARINHOS**

**Autora: CATARINA MARCON CHIAPPETTA**

**Orientador: PAULO MICHEL ROEHE**

**Porto Alegre**

**2014**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**DETECÇÃO DE FRAGMENTOS DE GENOMAS VIRAIS EM FEZES DE  
LOBOS MARINHOS**

Autora: Catarina Marcon Chiappetta

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias, especialidade Virologia.

Orientador: Paulo Michel Roehle

**Porto Alegre, março de 2014**

Chiappetta, Catarina Marcon  
DETECÇÃO DE FRAGMENTOS DE GENOMAS VIRAIS EM FEZES  
DE LOBOS MARINHOS / Catarina Marcon Chiappetta. --  
2014.  
82 f.

Orientador: Paulo Michel Roehe.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária,  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias,  
Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. vírus. 2. pinípedes. I. Roehe, Paulo Michel,  
orient. II. Título.

**Catarina Marcon Chiappetta**

**DETECÇÃO DE FRAGMENTOS DE GENOMAS VIRAIS EM FEZES DE  
LOBOS MARINHOS**

Dissertação aprovada em 17 de março de 2014 pela comissão formada pelos doutores:

---

**Prof. Dr. Paulo Michel Roehe**

Orientador e Presidente da Comissão

---

**Prof. Dr. Fernando Rosado Spilki**

Membro da Comissão

---

**Dra. Fabiana Quoos Mayer**

Membro da Comissão

---

**Dr. André Felipe Streck**

Membro da Comissão

## **DEDICATÓRIA**

*Com carinho, dedico este trabalho ao meu amor de tanto tempo, meu melhor amigo, meu companheiro Bruno de Godoy. Por todo apoio, carinho, compreensão... A ti dedico e te agradeço imensamente por tudo!!!*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu porto-seguro, minha mãe Cinthia Marcon, pela vida e pelo amor.

Ao meu pai Júlio Chiappetta por todo o apoio e carinho em todos os momentos, mesmo que de longe.

Aos meus irmãos Laura Marcon e Pedro Chiappetta por serem tão camaradinhas!

Aos meus queridos avós Addis e Orestes Marcon, pelo amor e pelos ensinamentos que definiram o que sou hoje.

Aos meus tios, em especial ao Orestes, ao Luciano, à Katia e à Adriana, não só pelos almoços, jantares, cafés e hospedagens, mas também pelas conversas, conselhos e por serem a família em todo e qualquer lugar.

Ao meu orientador Prof. Dr. Paulo Michel Roehe pelos valiosos ensinamentos, pela confiança e principalmente pelas grandes oportunidades de formação acadêmica, profissional e pessoal.

Aos colegas, amigos e professores dos laboratórios de virologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da UFRGS, da Faculdade de Veterinária da UFRGS e do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor. Especialmente à Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Cláudia Franco, pelo apoio e conhecimento fundamentais para realização desse trabalho.

Aos amigos e parceiros de empreitada, Maurício Tavares e Derek Amorim do Centro de Estudos Costeiros, Limnológicos e Marinhos (CECLIMAR) pela disponibilidade das amostras, pelo conhecimento, e por demonstrarem na prática que boas ideias funcionam quando se trabalha com dedicação, ética e companheirismo.

Aos amigos Ingrid Stein, Raquel Mesquita, Gabriela Bettiol, Gabriela Veiga, Roberto Zanoni, Andrea Gallupo, Hellen Duarte, Paula Tozzeto, Mariana Taffarel, Letícia Mota e Felipe Barroco, por tornarem a vida mais divertida.

Aos meus sogros prediletos, Lucila e Antônio Godoy por me acolherem como parte da família.

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

Ao pessoal, da Palavraria – livraria e café, pela compreensão, pelos deliciosos cafés e pelo frescor do ar-condicionado.

Enfim, a todos que, ao seu modo, contribuíram ou simplesmente torceram para que esse trabalho desse certo.

A todos vocês, meu sincero Muito Obrigada!!!

*Cheers!!!*

*“In the end we will conserve only what  
we love; we will love only what we  
understand; and we will understand only  
what we have been taught.”*

*Baba Dioum*

## RESUMO

O presente estudo foi realizado com o objetivo de identificar genomas de vírus em fezes de lobos marinhos sul-americanos (*Arctocephalus australis*) e lobos marinhos subantárticos (*Arctocephalus tropicalis*), duas espécies de pinípedes encontradas no litoral do Rio Grande do Sul. Embora já existam estudos sobre esse tema em outras espécies de pinípedes, nas espécies aqui trabalhadas o tema permanece inexplorado. Amostras de fezes foram obtidas de vinte e um lobos marinhos sul-americanos e dois lobos marinhos subantárticos encontrados no litoral rio-grandense com indícios de morte recente, durante os meses de Junho e Julho de 2012. Através de técnicas de PCR e sequenciamento buscou-se identificar genomas de circovírus, adenovírus, morbilivírus, calicivírus e coronavírus. A amplificação de um fragmento do gene *rep* permitiu a identificação de prováveis circovírus em amostras de seis lobos marinhos sul-americanos. Análises filogenéticas revelaram que três dos seis segmentos são sugestivos de prováveis membros do gênero *Cyclovirus*. Os genes amplificados de outras duas amostras provavelmente correspondem a membros do gênero *Circovirus*. Uma das amostras deu origem a um segmento gênico que não apresenta similaridade com nenhum gênero já proposto da família *Circoviridae*. Além disso, foi possível detectar também fragmentos de genomas de adenovírus em duas amostras; estes apresentam alto grau de similaridade de nucleotídeos com amostras de adenovírus humano tipo C. Nenhum fragmento genômico indicativo da presença de morbilivírus, calicivírus ou coronavírus foi encontrado. Os resultados aqui obtidos sugerem a presença de circovírus, ciclovírus e adenovírus em populações de lobos marinhos encontrados na costa do Rio Grande do Sul. Estes achados reforçam a necessidade da ampliação do conhecimento a respeito da ocorrência de infecções virais nestas espécies.

Palavras-chave: *Circovirus*, *Cyclovirus*, adenovírus, lobo marinho, *Arctocephalus*.



## ABSTRACT

*This study was conducted with the objective of identifying genomes of viruses in feces of south american fur seals (*Arctocephalus australis*) and subantarctic fur seals (*Arctocephalus tropicalis*), two species of pinnipeds found on the coast of Rio Grande do Sul. Although there are studies about this topic in other species of pinnipeds, it remains unexplored in these two species. Stool samples were obtained from twenty-one south american fur seals and two subantarctic fur seals found in Rio Grande do Sul coastline with evidences of recent death, during the months of June and July 2012. PCR and sequencing techniques were utilized to identify circovirus, adenovirus, morbillivirus, calicivirus and coronavirus genomes. The amplification of a rep gene fragment allowed the identification of supposed circoviruses in samples of six south american fur seals. Phylogenetic analysis revealed that three of the six segments are suggestive of probable members of the genus Cyclovirus. The amplified genes from two other samples probably correspond to members of the genus Circovirus. One of the samples gave rise to a gene segment that has no similarity with any genera already proposed of the Circoviridae family. Furthermore, it was also possible to detect fragments of adenovirus genomes in two samples: these have a high degree of nucleotide similarity with a human adenovirus type C genomic fragment. No indication of the presence of morbillivirus, calicivirus and coronavirus genomes was found. The work reported here provide evidence for the occurrence of circoviruses, cicloviruses and adenoviruses in fur seal populations found in Rio Grande do Sul. These findings reinforce the need to expand the knowledge about the occurrence of viral infections in these species.*

*Keywords: Circovirus, Cyclovirus, adenoviruses, fur-seal, Arctocephalus.*

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Distribuição geográfica do lobo marinho sul-americano, *Arctocephalus australis*..... 16
- Figura 2.** Lobo marinho sul-americano, *A. australis*, juvenil na Praia do Cassino, RS, 1999..... 17
- Figura 3.** Distribuição geográfica do lobo marinho subantártico, *A. tropicalis*..... 18
- Figura 4.** Lobo marinho subantártico, *A. tropicalis*, adulto, no litoral norte do Rio Grande do Sul..... 19

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1	Apresentação das espécies.....	14
2.1.1	Lobo marinho sul-americano.....	15
2.1.2	Lobo marinho subantártico.....	17
2.2	Infecções virais em pinípedes.....	19
2.2.1	Circovírus.....	20
2.2.2	Adenovírus.....	24
2.2.3	Morbilivírus.....	27
2.2.4	Calicivírus.....	31
2.2.5	Coronavírus.....	34
3	OBJETIVOS.....	38
4	ARTIGOS CIENTÍFICOS.....	39
4.1	Molecular detection and characterization of <i>Circoviridae</i> members in fecal matter of fur seals ( <i>Arctocephalus sp.</i> ).....	40
4.2	Molecular search for viruses in fur seals ( <i>Arctocephalus sp.</i> ) fecal matter..	57
5	DISCUSSÃO GERAL.....	70
6	CONCLUSÕES.....	72
	REFERÊNCIAS.....	73

## 1. INTRODUÇÃO

Os pinípedes são mamíferos marinhos carnívoros que, taxonomicamente, são divididos em três famílias: Otariidae (lobos e leões marinhos), Odobenidae (morsas), e Phocidae (focas e elefantes marinhos). Embora estes animais façam parte de uma megafauna considerada carismática por ativistas ambientais, pouco se sabe a respeito de aspectos importantes de sua biologia e, particularmente, a respeito da sua microbiota.

No Estado do Rio Grande do Sul, embora não haja sítios reprodutivos ou de parada prolongada desses animais, são observadas pelo menos sete espécies de pinípedes. Dentre estas, o lobo marinho sul-americano (*Arctocephalus australis*) é uma das espécies que ocorrem com maior frequência. Por terem o hábito de vir à praia para descansar, esses animais acabam ocasionalmente dividindo o habitat com seres humanos e animais domésticos.

Muitas vezes, lobos marinhos e outras espécies de mamíferos marinhos, chegam debilitados ao litoral ou são encontrados mortos. Os patógenos que esses animais carregam bem como as possíveis causas de morte são, em sua maioria, desconhecidos.

Infecções virais têm sido frequentemente relatadas em diversas espécies de pinípedes ao redor do mundo. Em sua maioria, essas infecções estão associadas com doenças clinicamente evidentes em animais de cativeiro ou em surtos esporádicos observados em animais de vida livre.

A relevância de pesquisas sobre vírus de animais marinhos se fundamenta em aspectos como a necessidade de maiores conhecimentos sobre a ocorrência de agentes potencialmente causadores de mortalidade em animais de vida livre, como é o caso dos morbilivírus, ou a capacidade de infectar múltiplas espécies inclusive humanos como os calicivírus, ou ainda a possibilidade de emergência de novos agentes causadores de

doenças no próprio meio aquático. É importante ressaltar que tais aspectos podem ser favorecidos por amplo desequilíbrio ambiental, em que atividades humanas geram mudanças ecológicas e climáticas que favoreçam a insurgência e ressurgência de vírus e outros patógenos que afetam tanto os mamíferos terrestres quanto marinhos.

Recentemente, técnicas de metagenômica e PCR consenso tem permitido o descobrimento de novos vírus circulando em populações de animais marinhos. Dentre eles podemos citar os adenovírus, os coronavírus e os circovírus.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Apresentação das espécies

Pinípedes (latim científico: *Pinnipedia*) são mamíferos marinhos e pertencem à ordem Carnivora. Os pinípedes dividem-se em três famílias: Otariidae (lobos e leões-marinhos), Odobenidae (morsas), e Phocidae (focas e elefantes-marinhos). Estes animais fazem parte de uma megafauna considerada carismática por ativistas ambientais.

No Brasil, embora não existam colônias reprodutivas de nenhuma espécie de pinípede, dezenas de exemplares de lobos marinhos, leões marinhos e, eventualmente, elefantes marinhos e focas antárticas chegam ao litoral do Rio Grande do Sul, entre o outono e a primavera, favorecidos em seus deslocamentos pós-reprodutivos principalmente pela corrente fria das Malvinas (Pinedo, 1990; Simões-Lopes & Ott, 1995; Oliveira *et al.*, 2006). Algumas espécies, como as sul-americanas, possuem marcada sazonalidade (Simões-Lopes & Ott, 1995). Contudo, a ocorrência das espécies antárticas e subantárticas tem sido considerada ocasional e consequente a movimentos erráticos (Pinedo, 1990; Simões-lobes & Ott, 1995; Oliveira, 1999; Oliveira *et al.*, 2001, 2006), principalmente nos meses de verão.

Até o presente momento, foram identificados animais de sete espécies de pinípedes no litoral brasileiro. As espécies mais frequentemente identificadas, particularmente na costa do Rio Grande do Sul, são o leão marinho sul-americano (*Otaria flavescens*) e o lobo marinho sul-americano (*Arctocephalus australis*), seguidas pelo lobo marinho subantártico (*Arctocephalus tropicalis*), lobo marinho antártico (*Arctocephalus gazela*), elefante marinho do sul, (*Mirounga leonina*), foca caranguejeira (*Lobodon carcinophaga*) e foca leopardo (*Hydrurga leptonyx*).

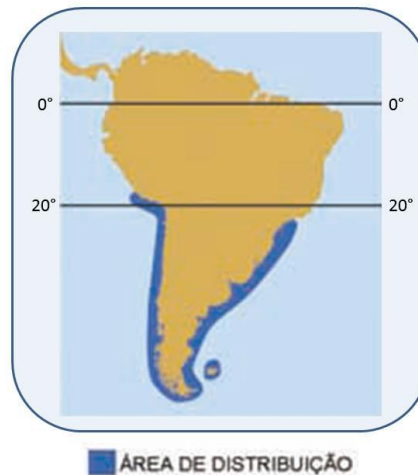
As duas espécies mais frequentemente detectadas, o leão marinho sul-americano e o lobo marinho sul-americano, além de possuírem colônias reprodutivas próximas localizadas em águas uruguaias, utilizam dois locais de concentração invernal no Rio Grande do Sul: a Ilha dos Lobos, em Torres, e o Molhe Leste da Lagoa dos Patos, em São José do Norte (Gliesh, 1925; Vaz-Ferreira, 1981; Rosas *et al.*, 1994). Acredita-se que a crescente incidência de pinípedes sul-americanos e até mesmo antárticos e subantárticos, na costa brasileira, possa estar relacionada ao aumento populacional devido à proteção destes animais após o término da caça e/ou ao aumento dos monitoramentos da costa brasileira, por parte de pesquisadores, o que conseqüentemente leva a um maior número de registros.

### **2.1.1. Lobo marinho sul-americano**

O lobo marinho sul-americano apresenta o focinho fino e alongado. Os machos adultos atingem 188,5 cm e as fêmeas 142,5 cm. A espécie possui hábitos pelágicos, se reproduz durante o verão (outubro a dezembro) e é um dos pinípedes mais amplamente distribuídos, possuindo colônias reprodutivas tanto na costa Atlântica quanto Pacífica da América do Sul (Figura 1). Na costa Atlântica da América do Sul, ocorre desde o extremo sul da Argentina e ilhas vizinhas (Ilha dos Estados e Ilhas Falklands) até a costa do Uruguai, onde existe a maior colônia reprodutiva da espécie na Isla de los Lobos (35°01'38"S, 54°52'55"W), com mais de 150.000 indivíduos (Vaz-Ferreira, 1982; Ximenez & Langguth, 2002).

Os primeiros registros dessa espécie no Brasil foram feitos por Gliesh (1925) na região de Torres. Desde então, uma grande compilação de informações a respeito da ocorrência desses animais foi realizada, e não somente no Rio Grande do Sul, mas

também nos estados de São Paulo, Santa Catarina, Rio de Janeiro e Bahia (Vieira, 1955; Carvalho, 1975; Vaz-Ferreira, 1982; Pinedo & Marmontel, 1992; Moura & Siciliano, 2007; Velozo *et al.*, 2009).



**FIGURA 1.** Distribuição geográfica do lobo marinho sul-americano, *Arctocephalus australis*. (Fonte: Bastida *et al.*, 2007).

No sul do Brasil, há um predomínio de ocorrência de espécimes juvenis (Figura 2) de ambos os sexos que geralmente são recolhidos e encaminhados para centros de reabilitação (Oliveira, 1999). Para uma melhor compreensão de sua biologia, em especial de seus deslocamentos, assim como sobre a efetividade do tratamento de reabilitação, têm sido realizados desde 2003 projetos de marcação desta espécie, assim como de outros pinípedes no sul do Brasil (Oliveira *et al.*, 2006). Atualmente não existe estimativa populacional exata para a espécie na América do Sul, mas acredita-se que existam entre 300.000 e 450.000 indivíduos (Seal Conservation Society, 2013).

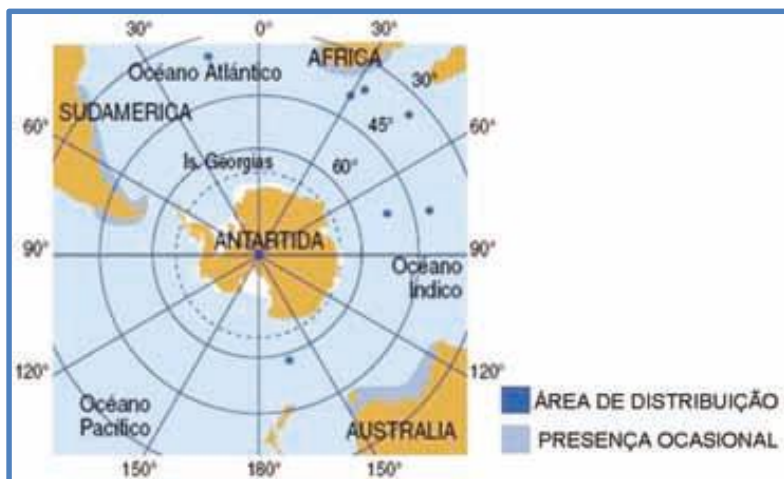




**FIGURA 2.** Lobo marinho sul-americano (*A. australis*) juvenil na Praia do Cassino, RS, 1999. (Fonte: Ronald A. Raske, 1999).

### **2.1.2. Lobo marinho subantártico**

O lobo marinho subantártico, também chamado de lobo marinho da Ilha-Amsterdã, ou ainda lobo marinho do peito branco, apresenta no peito, garganta e face uma tonalidade pardo-amarelada e uma mecha de pelos no alto da cabeça, semelhante a um "topete" (Pinedo, 1990). Machos adultos podem atingir 180 cm e as fêmeas, 130 cm de comprimento total (King, 1983). A espécie habita principalmente as ilhas ao norte da Convergência Antártica (Figura 3) (Bester, 1980; Wynen *et al.*, 2000).



**FIGURA 3.** Distribuição geográfica do lobo marinho subantártico, *A. tropicalis*. (Adaptado de Bastida *et al.*, 2007).

No entanto, muitos espécimes erráticos foram registrados no Brasil, Angola, Ilhas Juan Fernández e Comoro, além da Austrália, Nova Zelândia e África do Sul (Ferreira *et al.*, 2008; Moura & Siciliano, 2007). As colônias reprodutivas mais próximas da costa do sul do Brasil estão a mais de 4.000 km de distância, nas Ilhas Tristão da Cunha e Gough (Pinedo, 1990). De acordo com a Seal Conservation Society (2013), a população corrente seria de 277.000 a 356.000 indivíduos. Esta espécie apresenta marcada sazonalidade, ocorrendo na costa brasileira principalmente de junho a outubro, representada basicamente por indivíduos adultos (Figura 4), subadultos e juvenis (Simões-Lopes & Ott, 1995; Oliveira, 1999).



**FIGURA 4.** Lobo marinho subantártico (*A. tropicalis*) adulto, no litoral norte do Rio Grande do Sul. (Fonte: Edson Luiz Souza de Araújo).

## 2.2. Infecções virais em pinípedes

Ao mesmo tempo em que o habitat entre animais marinhos e humanos se estreita, uma ansiedade global com relação à sanidade de ambientes aquáticos aumenta. Essa ansiedade é particularmente importante em países como o Brasil, onde quase a metade da população habita ecossistemas costeiros (IBGE, 2010). Nesse cenário mamíferos marinhos como os pinípedes, que possuem hábitos costeiros e predam muitas vezes as mesmas espécies consumidas por humanos, são considerados importantes sentinelas ambientais. No entanto, pouco se sabe até então a respeito do espectro viral e potencialmente patogênico a que esses animais podem estar expostos (Bossart, 2006).

Sabe-se que algumas infecções virais, geram resultados catastróficos sobre populações destes animais. Um exemplo relativamente recente e que levou a um aumento significativo dos estudos a respeito de vírus dessas espécies foram os surtos de cinomose focina, um morbilivírus, responsável pela morte de milhares de focas na Europa em 1988 e 2002 (Hall *et al.*, 2006).

Além dos morbilivírus, alguns dos vírus já detectados em populações de pinípedes incluem: adenovírus (Britt *et al.*, 1979), calicivírus (Smith *et al.*, 1973), herpesvírus (Osterhaus *et al.*, 1985), parvovírus (Burek *et al.*, 2005) e o vírus influenza (Geraci *et al.*, 1982). Nestes casos, a maioria deles foi associada a achados clínicos claramente descritos. Alguns desses vírus ainda representam potencial risco zoonótico, como é o caso dos calicivírus (Smith *et al.*, 2006).

Outros vírus, como é o caso dos circovírus, foram recentemente detectados em amostras de pinípedes, porém, sua origem, infectividade e patogenicidade ainda não foram esclarecidas (Sikorski *et al.*, 2013). Entretanto, afora estes poucos agentes mencionados acima, pouco se sabe a respeito da diversidade viral nestas espécies, sobre os reservatórios naturais de vírus e outros aspectos de sua ecologia no meio aquático (Suttle, 2007).

## **2.2.1 Circovírus**

### 2.2.1.1. Características gerais

A família *Circoviridae* compreende 3 gêneros: *Circovirus*, *Gyrovirus* e o recentemente descrito, *Cyclovirus*. Os membros dessa família apresentam partículas virais de aproximadamente 20 nm de diâmetro, não envelopados, com capsídeo de simetria icosaédrica, que envolve um genoma constituído de uma molécula de fita simples de DNA circular de aproximadamente 2 kb. Os circovírus são os menores vírus capazes de infectar animais de que se tem conhecimento (Todd *et al.*, 2005).

Tanto os membros do gênero *Circovirus* como os do gênero *Cyclovirus* possuem genomas com duas “ORFs” (ou fases de leitura abertas) principais, organizadas de

maneira inversa, que codificam o gene da proteína iniciadora da replicação em círculo rolante (*rep*) e o gene da proteína do capsídeo (*cap*) (Todd *et al.*, 2005). Uma estrutura em alça cuja extremidade consiste em uma sequência de nove nucleotídeos (nonâmero) altamente conservada, localizada entre as porções 5' das duas principais ORFs, tem papel fundamental na iniciação da replicação viral em ambos os gêneros (Hattermann *et al.*, 2003; Johne *et al.*, 2006; Mankertz *et al.*, 2000; Niagro *et al.*, 1998; Stewart *et al.*, 2006; Todd *et al.*, 2001, 2007).

No entanto, em comparação com os circovírus, os ciclovírus possuem proteínas Rep e Cap menores e a região intergênica (IGR) 3' entre os códons de parada das duas ORFs está ausente ou é formada somente por poucas bases (Li *et al.*, 2010b, 2011). Os ciclovírus ainda apresentam modificações em pequenas sequências de aminoácidos localizadas na região terminal da Rep associadas com a replicação em círculo rolante e com a ligação de desoxirribonucleotídeos. Em contrapartida, a porção terminal de Cap nos ciclovírus, assim como nos circovírus, tem caráter altamente básico e é rica em arginina. Portanto, ciclovírus são distintos dos circovírus com relação a diversas características únicas do seu genoma, além de filogeneticamente formarem um grupo distinto (Delwart & Li, 2011).

#### 2.2.1.2. Hospedeiros

Os circovírus infectam inúmeras espécies de aves incluindo papagaios, pombas, gaivotas, patos, gansos, cisnes, corvos, canários, tentilhões, estorninhos e galinhas (Niagro *et al.*, 1998; Mankertz *et al.*, 2000; Todd *et al.*, 2001, 2007; Hattermann *et al.*, 2003; Johne *et al.*, 2006; Stewart *et al.*, 2006; Halami *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2011). Em mamíferos, os circovírus suínos 1 e 2 (PCV1 e PCV2) são as duas espécies desse gênero

que têm sido mais extensivamente documentadas (Allan & Ellis, 2000; Mankertz *et al.*, 2004). Recentemente, houve uma grande expansão dos conhecimentos a respeito da presença de circovírus em outros animais (Li *et al.*, 2010b, 2011; Ge *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2010a; Lorincz *et al.*, 2011; Ng *et al.*, 2011; Rosario *et al.*, 2011).

Em mamíferos marinhos, o primeiro relato de detecção desses vírus ocorreu recentemente em fezes de lobo marinho neo-zelandês (*Arctocephalus forsteri*). No entanto, observou-se que, apesar de seu genoma apresentar duas principais ORFs inversamente organizadas (1,050 nt e 1,095 nt) além de duas IGRs (198 nt e 462 nt), esse vírus não pôde ser classificado (Sikorski *et al.*, 2013). Portanto, a capacidade desses vírus de infectar determinadas espécies animais, em especial mamíferos marinhos, ainda é pouco explorada.

#### 2.2.1.3. Sinais clínicos

Devido ao desconhecimento a respeito da capacidade dos circovírus em infectar pinípedes e demais animais marinhos, não se tem nenhum relato de sinais clínicos associados com a infecção por circovírus nesses animais. No entanto, sabe-se que em aves circovirus aviários têm sido associados com depleção linfóide, imunossupressão e problemas de desenvolvimento como deformidades do bico e das garras, crescimento retardado e problemas nas penas (Bassami *et al.*, 1998; Stewart *et al.*, 2006; Todd, 2000). Em mamíferos, a infecção por PCV2 pode ser desde assintomática ou causar uma variedade de sinais clínicos em suínos, incluindo a síndrome multissistêmica do definhamento, dermatite, nefropatia e problemas reprodutivos em suínos (Darwich *et al.*, 2004; Ellis *et al.*, 1998, 2004; Firth *et al.*, 2009).

#### 2.2.1.4. Patogenia

A julgar pelo que se conhece sobre o PCV-2, uma vez que a patogenia de circovírus em pinípedes ainda é desconhecida, sabe-se que em suínos o circovírus é transmitido principalmente pela via oronasal e infecta células do sistema imunológico, como macrófagos, linfócitos e células dendríticas. Após a infecção e replicação em células do sistema imunológico, o PCV-2 produz viremia e se dissemina sistemicamente no organismo. Um desequilíbrio das substâncias mediadoras da imunidade, morte de linfócitos e falhas na reposição de células linfóides colaboram para esta imunodeficiência. As lesões macroscópicas mais importantes incluem a hipertrofia de linfonodos (inguinais, submandibulares, mesentéricos e mediastínicos), atrofia do timo e ausência de colabamento pulmonar (Zanella, 2007).

#### 2.2.1.5. Epidemiologia

Estudos demonstraram que tanto circovírus como ciclovírus são altamente prevalentes em amostras de fezes de humanos de países em desenvolvimento como Paquistão, Nigéria e Tunísia (Ge *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2011). Outros estudos revelaram que ciclovírus presentes em amostras de tecido muscular (carne) de frango, gado, cabra, ovelha e camelo possuem características similares a ciclovírus detectados em amostras de fezes de humanos e de chimpanzés, indicando uma possível transmissão interespecífica (Li *et al.*, 2010b, 2011). Além disso, circovírus também foram detectados em amostras ambientais (Rosario *et al.*, 2009a,b; Blinkova *et al.*, 2009; López-Bueno *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2008). Por isso se imagina que em pinípedes esses processos se deem de maneira semelhante.

## 2.2.2. Adenovírus

### 2.2.2.1. Características gerais

A família *Adenoviridae* abriga um grupo de vírus não envelopados, de simetria icosaédrica e diâmetro de 70-100 nm. Os membros dessa família são classificados em quatro gêneros: *Mastadenovirus*, *Aviadenovirus*, *Atadenovirus*, and *Siadenovirus* (Benko & Harrach, 2003; Davison *et al.*, 2000; Farkas *et al.*, 2002). Os adenovírus (AdVs) possuem genoma linear constituído de uma molécula de fita dupla de DNA (dsDNA) sendo que o tamanho do genoma varia de 30-36 kbp nos mastadenovírus, 31-36 kbp nos atadenovírus, e 26-45 kbp nos siadenovírus (Benko & Harrach, 2003).

O genoma codifica aproximadamente 40 proteínas, com genes presentes nas duas cadeias de DNA, transcritos em direções opostas. Vários desses genes originam transcritos que são processados pelo mecanismo de *splicing* antes de serem exportados para o citoplasma, onde serão traduzidos. Uma mesma região transcrita pode originar diferentes RNAs mensageiros (mRNAs), que são produzidos por clivagem e remoção de *introns*. O genoma é dividido em onze regiões de transcrição, baseadas na regulação temporal da expressão, sendo cinco delas iniciais (E1A, E1B, E2, E3 e E4), duas intermediárias (IX e IVa2) e uma tardia (que origina cinco mRNAs – L1 a L5). Destas regiões, os genes iniciais codificam proteínas não-estruturais, e as tardias codificam proteínas estruturais (Moraes & Costa, 2007).



#### 2.2.2.2. Hospedeiros

Infecções por adenovírus (AdVs) já foram descritas em mamíferos, aves, répteis, anfíbios, e peixes; partículas virais já foram isoladas de pelo menos 40 espécies de vertebrados (Benko & Harrach, 2003; Davison *et al.*, 2000; Schrenzel *et al.*, 2005; Wellehan *et al.*, 2004). Em humanos, ao todo 52 sorotipos de adenovírus (hAdVs) já foram identificados e classificados em sete grupos, designados “A” a “G”.

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

Em mamíferos marinhos, AdVs foram isolados do trato digestório de algumas espécies de cetáceos tais como baleia sei (*Balaenoptera borealis*), baleia da Groelândia (*Balaena mysticetus*) e belugas (*Delphinapterus leucas*) (Smith & Skilling 1979; Smith *et al.*, 1987; De Guise *et al.*, 1995), sendo que a patogenicidade e correlação entre esses vírus não foram esclarecidas. No entanto, em pinípedes, AdVs foram observados pela primeira vez em fígados de leões marinhos californianos (*Zalophus californianus*) encalhados na costa da Califórnia que apresentavam quadro clínico de hepatite (Britt *et al.*, 1979; Dierauf *et al.*, 1981) e um novo AdV – o adenovírus otarídeo tipo 1 (OtAdV-1) foi isolado de animais dessa mesma espécie (Goldstein *et al.*, 2011).

#### 2.2.2.3. Sinais clínicos

AdVs estão associados principalmente com hepatite em leões marinhos californianos. Os principais sinais clínicos são observados em animais encalhados em

processo de reabilitação e consistem em fraqueza, emaciação, fotofobia, polidipsia, diarreia sanguinolenta, entumecimento abdominal, linfopenia e monocitose. Esses sinais clínicos são muito semelhantes aos apresentados por cães infectados por CAV-1 (Dierauf *et al.*, 1981).

#### 2.2.2.4. Patogenia

A exposição a AdVs se dá pela via oronasal ou conjuntival. O vírus replica inicialmente nas tonsilas e placas de Peyer, disseminando-se para os linfonodos regionais e, eventualmente, atinge a circulação sanguínea. A fase de viremia resulta na disseminação do vírus para vários órgãos, como o fígado, os rins, o baço e os pulmões. As células parenquimatosas e as células endoteliais do organismo são os alvos principais para a replicação viral (Moraes & Costa, 2007).

No fígado, são observadas congestão e necrose de coagulação multifocal, com o envolvimento dos hepatócitos da zona três do ácino de Rappaport (região centrolobular) ou necrose lobular generalizada em casos graves. A extensão e a gravidade das lesões hepáticas estão relacionadas com a imunidade humoral (Moraes & Costa, 2007).

Achados histopatológicos observados em leões marinhos californianos (*Zalophus californianus*) de vida livre, durante processo de reabilitação, são muito semelhantes aos observados em casos de hepatite por adenovírus em cães domésticos e consistem em necrose multifocal, presença de partículas virais no núcleo das células e lipidose hepática (Britt *et al.*, 1979, Dierauf *et al.*, 1981).

#### 2.2.2.5. Epidemiologia

A fonte de infecção por AdVs em pinípedes ainda é pouco esclarecida. No entanto, especulações são feitas a respeito da relação entre os AdVs que infectam leões marinhos e o CAV-1, devido ao fato desse vírus ser capaz de infectar múltiplas espécies de carnívoros.

Além disso, os AdVs são altamente prevalentes em populações humanas e fato de serem excretados em grandes quantidades nas fezes e urina de indivíduos infectados levou a realização de estudos que demonstraram a alta prevalência de AdVs em diferentes ambientes aquáticos, como efluentes, rios e mares (Tavares *et al.*, 2005). Isso também poderia representar uma fonte potencial de infecção para mamíferos marinhos.

### 2.2.3. Morbilivírus

#### 2.2.3.1. Características gerais

Os vírus classificados no gênero *Morbillivirus* são pertencentes à família *Paramyxoviridae*, subfamília *Paramyxovirinae*, juntamente com outros cinco gêneros: *Respirovirus*, *Rubulavirus*, *Henipavirus*, *Avulavirus* e *Virus TPMV-like*. Os morbilivírus incluem o vírus da cinomose canina (CDV), o vírus da cinomose focina (PDV), o morbilivírus dos cetáceos (CeMV), o vírus da peste bovina (RPV), o vírus da peste dos pequenos ruminantes (PPRV) e o vírus do sarampo (MV) (King *et al.*, 2011).

Os vírions são envelopados, em sua maioria pleomórficos, com projeções glicoprotéicas na superfície e aproximadamente 150 a 300 nm de diâmetro (Arns *et al.*, 2012). O genoma dos morbilivírus é constituído por uma cadeia de RNA de fita simples

e polaridade negativa, não segmentada, de aproximadamente 15,9 kb. Possui seis genes que codificam oito proteínas virais, duas não estruturais, C e V, e seis proteínas estruturais: a proteína do nucleocapsídeo (NC), a fosfoproteína (P), a proteína da matriz (M), a proteína de fusão (F), a hemaglutinina (H) e a grande proteína (L). O gene *p* gera três proteínas através da presença de fases de leitura sobrepostas. Das proteínas estruturais, três estão associadas ao nucleocapsídeo (NC, P e L), e três proteínas estão associadas à membrana (M, F e H) (Maclachlan & Dubovi, 2011).

#### 2.2.3.2. Hospedeiros

Desde 1987, morbilivírus tem sido responsáveis por importantes surtos epizoóticos com altas taxas de mortalidade em pinípedes como focas (*Phoca vitulina*), focas cinzentas (*Halichoerus grypus*) na Europa, focas do lago Baikal (*Phoca sibirica*) na Sibéria, focas do mar Cáspio (*Phoca caspica*) no mar Cáspio (Kennedy *et al.*, 2000). Assim como em cetáceos como golfinhos listrados (*Stenella ceoruleoalba*) no mar Mediterrâneo, golfinhos comuns do Mar Negro (*Delphinus delphis ponticus*) e golfinhos nariz-de-garrafa (*Tursiops truncatus*) a longo da costa leste do Estados Unidos e Golfo do México (Kennedy, 1998) dentre outras espécies.

Estudos sorológicos demonstraram a presença de anticorpos em 14 de 18 espécies de odontocetos analisadas na costa do oceano Atlântico, do Canadá até o Golfo do México, e em três espécies do Pacífico sul (Van Bresse *et al.*, 1998; Duignan *et al.*, 1995). Em pinípedes, anticorpos contra morbilivírus já foram detectados em diversas espécies de focas que migram em águas do noroeste da Europa e o norte do Canadá até a região da Nova Inglaterra na costa dos Estados Unidos, bem como em focas leopardo (*Hydrurga leptonyx*) e focas caranguejeiras (*Lobodon carcinophagus*) da Antártica e

lobos marinhos neo-zelandeses (*Arctocephalus fosteri*) (Kennedy *et al.*, 1988; Osterhaus & Vedder, 1988; Grachev *et al.*, 1989; Duignan *et al.*, 1995). Manatis (*Trichecus manatus*) na costa da Florida e ursos polares (*Ursus maritimus*) nas águas do Alasca e Rússia também possuem anticorpos contra morbilivírus (Garner *et al.*, 2000).

#### 2.2.3.3. Sinais clínicos

Os sinais clínicos associados com a infecção por morbilivírus em pinípedes são muito semelhantes aos da cinomose em cães, incluindo febre, descarga oronasal serosa ou mucopurulenta, ceratoconjuntivite, dermatite, tosse, dispneia, diarreia e abortos. Espasmos musculares, postura anormal e tolerância a humanos também podem ser observados, assim como alterações na fluutuabilidade e na capacidade de mergulhar decorrente de enfisema subcutâneo da região cervical e torácica (Kennedy-Stoskopf, 2001).

#### 2.2.3.4. Patogenia

A exemplo do que ocorre para o CDV em cães, após a inalação das partículas víricas, ocorre a replicação viral no epitélio e em macrófagos do trato respiratório superior e, a seguir, o vírus alcança os linfonodos regionais. Em um período de até uma semana após a infecção, o vírus é carregado por linfócitos e se dissemina pelos órgãos linfóides ocasionando a fase de viremia primária. A progressão da infecção depende da resposta imune do animal. Nos animais que não conseguem montar uma resposta eficiente, o vírus é carregado por linfócitos e monócitos, produzindo a viremia secundária e se disseminando para a pele e para os tratos digestivo, respiratório, urogenital e sistema nervoso. Células

mononucleares carregam o CDV para o SNC, por diferentes vias: através da barreira hematoencefálica, pelo fluido cefalorraquidiano e/ou pelo epêndima dos ventrículos. Os sítios de predileção do vírus são: a substância branca do cerebelo, ao redor do quarto ventrículo, a medula óssea e a via óptica (Arns *et al.*, 2012).

O achado mais comum em pinípedes infectados por morbilivírus é pneumonia com edema pulmonar e áreas de consolidação. Pneumonia broquiointersticial com congestão, edema, exudato serofibroso nos alvéolos, assim como formação de sincícios e inclusões tanto intracitoplasmáticas quanto intranucleares. O sistema nervoso central também pode apresentar alterações como necrose neuronal, gliose, formação de manguitos perivasculares e desmielinização com astrocitose, caracterizando um quadro de encefalite. A depleção linfocitária caracteriza um quadro de infecção aguda (Kennedy, 1998; Duignan, 1999).

#### 2.2.3.5. Epidemiologia

Acredita-se que as principais espécies reservatório de PDV e CeMV sejam as focas da Groelândia (*Pagophilus groenlandicus*) e as baleias piloto (*Globicephala* sp.) respectivamente. Ambas as espécies de mamíferos marinhos possuem hábitos migratórios e gregários populações suficientemente numerosas para manter o vírus circulando (Kennedy-Stoskopf, 2001). CVD também foi isolado a partir de focas cinzentas hígidas de cativeiro no Canadá (Lyons *et al.*, 1993) e a partir de focas do lago Baikal e do mar Cáspio durante eventos de alta mortalidade (Kennedy-Stoskopf, 2001). Dentre as espécies de morbilivírus as duas mais relacionadas entre si são o CDV e o PDV, sendo possível que o PDV tenha sido originado do CDV (Barret, 1999).

## 2.2.4. Calicivírus

### 2.2.4.1. Características gerais

A família *Caliciviridae* é constituída de quatro gêneros: *Vesivirus*, *Lagovirus*, *Norovirus* (NoV) e *Sapovirus* (SaV). Seus membros não possuem envelope lipoprotéico, apresentam simetria icosaédrica e diâmetro variando de 27 a 39 nm. O genoma desses vírus é constituído por RNA fita simples, linear, de polaridade positiva, com tamanho variando de 7,4 a 8,3 kb. Na extremidade 5' de algumas estirpes virais há uma proteína (VPg), de aproximadamente 16 kDa, ligada covalentemente. A VPg está presente tanto no RNA genômico quanto no subgenômico, este último transcrito para codificar as proteínas estruturais do vírus (Wirblich *et al.*, 1996; Sosnovtsev *et al.*, 2002; Belliot *et al.*, 2003).

O gênero *Vesivirus* compreende o vírus dos leões marinhos de São Miguel (SMSLV), o calicivírus felino (FCV) e o vírus do exantema vesicular dos suínos (VESV) extinto desde 1959 (Neill *et al.*, 1995). A organização genômica dos vesivírus se dá em três ORFs. Na ORF1 é codificada uma poliproteína que é clivada, simultaneamente à sua síntese, pela protease viral originando as proteínas não-estruturais do vírus. As ORF2 e ORF3 codificam as proteínas estruturais VP1 (principal) e VP2 (secundária), respectivamente (Green *et al.*, 2000).

### 2.2.4.2. Hospedeiros

Desde 1972, mais de 20 sorotipos de calicivírus tem sido isolados de várias espécies de mamíferos marinhos, incluindo leões marinhos californianos (*Zalophus*

*californianus*), lobos marinhos do norte (*Callorhinus ursinus*), elefantes marinhos do norte (*Mirounga angustirostris*), morsas do Pacífico (*Odobenus rosmarus divergens*), leões marinhos de Steller (*Eumetopias jubatus*) e golfinhos nariz-de-garrafa (*Tursiops truncatus*) (Smith & Boyt, 1990; Barlough *et al.*, 1998).

Atualmente o SMSLV é um dos vírus mais comumente relatados em diferentes espécies de mamíferos marinhos (Van Bonn *et al.*, 2000). Além disso, entre os vírus que infectam vertebrados, o SMSLV é o que possui a maior gama de hospedeiros e é capaz de infectar diversas espécies incluindo peixes (Smith *et al.*, 1980), anfíbios, répteis (Barlough *et al.*, 1998) e primatas (Smith *et al.*, 1983a).

Em humanos existem evidências de que o SMSLV pode estar associado com lesões vesiculares e hepatite (Smith *et al.*, 1998a; Smith *et al.*, 2006). A transmissão inter-espécies já foi descrita entre focas, martas e suínos por meio da ingestão de alimentos e fezes contaminados com o SMSV (Wilder & Dardiri, 1978).

#### 2.2.4.3. Sinais clínicos

Mamíferos marinhos infectados com o SMSLV apresentam formações vesiculares nas partes mais frias do corpo, como nadadeiras, mucosa oral e genital (Schaffer & Soergel, 1973; Smith *et al.*, 1983b). A infecção pelo SMSLV também tem sido associada com falhas reprodutivas e mortalidade neonatal. Recentemente o SMSLV também foi associado com surtos epizoóticos de gastroenterite em leões marinhos californianos (Schmitt *et al.*, 2009).



#### 2.2.4.4. Patogenia

O vírus penetra principalmente pela via oronasal e replica inicialmente na orofaringe (Neill, 2007). Microscopicamente, as lesões iniciam com a espongiose da camada espinhosa da epiderme, e se disseminam pela extensão da camada lúcida até a membrana basal com a formação de vesículas (Moeller, 2002).

#### 2.2.4.5. Epidemiologia

O SMSLV se dissemina pelo contato direto com animais infectados e também por via oral, através da alimentação. Como o VESV e o SMSLV são morfológica e imunologicamente similares, compartilham características genéticas e causam o mesmo quadro clínico nos animais infectados, propôs-se inicialmente que as populações de mamíferos marinhos pudessem servir de reservatórios, a partir das quais o SMSLV e o VESV poderiam ser reintroduzidos nas espécies domésticas (Smith *et al.*, 1973). De fato, o SMSLV pode infectar animais domésticos, como suínos e bovinos, no entanto, o fato das populações leões marinhos serem pequenas levou à descoberta de que, na verdade, espécies de peixes como a perca (*Girella nigricans*) podem servir de reservatório tanto para suínos quanto mamíferos marinhos. A doença vesicular dos suínos foi erradicada desde 1959, através da eliminação dos animais infectados e do término da prática de se alimentar suínos com sobejos oriundos do mar não tratados termicamente (Smith & Boyt, 1990).

Estudos sugerem que o SMSLV, que hoje é considerado endêmico em populações de pinípedes, tenha uma origem marinha, e que peixes tenham tido papel significativo na disseminação e propagação da infecção nos demais hospedeiros (Smith

*et al.*, 1998b). Além disso, o calicivírus felino, que recentemente divergiu de um ancestral comum entre o SMSLV/VESV, permanece estável no ambiente aquático (Kadoi & Kadoi, 2001) e capaz de infectar leões marinhos californianos (Smith *et al.*, 1998b).

### 2.2.5. Coronavírus

#### 2.2.5.1. Características gerais

Os membros da família *Coronaviridae* são vírus envelopados, moderadamente pleomórficos, com diâmetro de 100-150 nm, compostos por 5-6 proteínas estruturais dependendo da espécie viral. Inicialmente, os coronavírus (CoVs) foram divididos em três grupos distintos com base em caracterização genética e sorológica (Brian & Baric, 2005; Lai & Cavannagh, 1997; Ziebuhr, 2004). Recentemente foi proposto que os grupos 1, 2 e 3 fossem classificados em gêneros: *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, e *Gammacoronavirus* (ICTV, 2014).

A maioria dos coronavírus de mamíferos está classificada nos gêneros *Alphacoronavirus* e *Betacoronavirus*, enquanto o gênero *Gammacoronavirus* abriga o coronavírus das baleias beluga (BWCoV) e os coronavírus aviários como o vírus da bronquite infecciosa das galinhas (IBV), e o coronavírus dos perus (TCoV) (Cavanagh, 2005; McKinley *et al.*, 2008).

O genoma dos CoVs consiste em uma molécula de RNA de cadeia simples e polaridade positiva. O RNA genômico pode ter de 27 a 32 kb, sendo o maior genoma entre os vírus RNA. A extremidade 5' do genoma possui uma estrutura *cap* e a extremidade 3' é poliadenilada, como ocorre nos mRNA celulares. Nas proximidades da região 5' do genoma se localiza uma sequência de 65 a 98 nucleotídeos denominada *líder*,

seguida de uma sequência de 200 a 400 nt, que não é traduzida. Próxima à extremidade 3' e imediatamente anterior à região poliadenilada está presente uma região não-traduzida (UTR) de 200 a 500 nt (Lovato & Dezengrini, 2007).

As proteínas virais não-estruturais são codificadas na região mais próxima da extremidade 5', enquanto as proteínas estruturais são codificadas próximas à extremidade 3'. Os dois terços iniciais do genoma correspondem ao gene L e codificam a polimerase viral (polimerase de RNA dependente de RNA – replicase). Essa região possui duas fases de leitura abertas (ORFs) sobrepostas, que são traduzidas em uma poliproteína no início do ciclo replicativo. Em todos os coronavírus, o encadeamento dos genes no genoma é 5' Pol – S – E – M – N 3'. Entre esses genes podem ser encontradas outras ORFs que codificam algumas proteínas não-estruturais e também a proteína HE. A presença dessas ORFs, a sua extensão, a forma de expressão e a distribuição podem variar entre os coronavírus (Brian & Baric, 2005).

Os coronavírus, a exemplo de outros vírus RNA, sofrem mutações frequentes no seu genoma em função dos erros cometidos pela RNA polimerase. Alguns coronavírus que causam doenças em animais foram originados a partir de deleções no genoma de vírus preexistentes. A alta frequência de recombinação é outro aspecto importante na genética dos coronavírus, o que pode ter reflexos importantes na patogenia e na epidemiologia desses vírus (Lai & Cavannagh, 1997).

#### 2.2.5.2. Hospedeiros

A tendência observada nos CoVs em recombinar e suas altas taxas de mutação, permite que eles se adaptem facilmente a novos hospedeiros e a novos nichos ecológicos (Herrewegh *et al.*, 1998; Woo *et al.*, 2006). Em mamíferos marinhos, o BWCoV foi o

primeiro a ser relatado em uma baleia beluga, recentemente um vírus semelhante ao BWCoV foi detectado em golfinhos nariz-de-garrafa (BdCoV). Em ambos os casos, os animais analisados eram de cativeiro (Mihindukulasuriya *et al.*, 2008; Woo *et al.*, 2014). Em pinípedes, CoVs foram identificados em três focas de cativeiro que vieram a óbito (Bossart & Schwartz, 1990).

#### 2.2.5.3. Sinais clínicos

Coronavirus (CoVs) são encontrados em uma ampla gama de hospedeiros, normalmente associados com doença respiratória, entérica, hepática e neurológica, cuja gravidade é variável (Lovato & Dezengrini, 2007). O BWCoV está associado com sinais respiratórios e falência hepática em baleia beluga (Mihindukulasuriya *et al.*, 2008). Em pinípedes, dos três animais infectados por CoVs que vieram a óbito, apenas um apresentou leves sinais de anorexia e alterações comportamentais, os outros não apresentaram sinais clínicos (Bossart & Schwartz, 1990).

#### 2.2.5.4. Patogenia

A exemplo do CCoV, a patogenia dos CoVs pode ser restrita ao trato digestório, onde a via de transmissão é normalmente via fecal-oral e a replicação se dá nas células epiteliais das vilosidades intestinais (Lovato & Dezengrini, 2007). No caso de animais infectados por BWCoV, a lesão mais importante é a necrose hepática (Mihindukulasuriya *et al.*, 2008). Em pinípedes pôde-se observar enterite necrosante e edema pulmonar (Bossart & Schwartz, 1990).

#### 2.2.5.5. Epidemiologia

Os surtos de síndrome aguda respiratória (SARS), a descoberta de um coronavírus associado a essa enfermidade (SARS-CoV) e a detecção desse vírus em civetas no Himalaia e em guaxinins na China, foram fatores decisivos para o aumento de estudos sobre a infecção por CoVs em humanos e em outros animais (Cheng *et al.*, 2007; Guan *et al.*, 2003; Marra *et al.*, 2003; Rota *et al.*, 2003; Snijder *et al.*, 2003; Woo *et al.*, 2004). No entanto, em mamíferos marinhos, os conhecimentos epidemiológicos a respeito dos CoVs é restrita a animais de cativeiro.

### **3. OBJETIVOS**

#### **Geral**

- Ampliar os conhecimentos sobre os vírus que circulam na população de lobos marinhos do litoral do Rio Grande do Sul.

#### **Específicos**

- Pesquisar a presença de circovírus, adenovírus, morbilivírus, calivivírus e coronavírus em amostras de fezes de animais encontrados mortos na costa rio-grandense.

- Realizar o sequenciamento e análises filogenéticas dos segmentos genômicos identificados e buscar identificar os prováveis vírus aos quais tais segmentos pertencem e sua provável posição taxonômica.

#### **4. ARTIGOS CIENTÍFICOS**

Os resultados, bem como os materiais e métodos empregados para a realização dos experimentos que compõem essa dissertação, serão apresentados a seguir como parte de dois artigos científicos, como segue:

**1- Molecular detection and phylogenetic analysis of circoviruses in fecal matter of South American fur seals (*Arctocephalus australis*)**

Artigo completo a ser submetido ao periódico *Journal of General Virology*.

**2- Molecular search for morbillivirus, calicivirus, adenovirus and coronaviruses in fecal matter of fur seals (*Arctocephalus* spp.)**

*Short communication* em elaboração a ser submetida ao periódico *Acta Scientiae Veterinariae*.

#### **4.1. Molecular detection and phylogenetic analysis of circoviruses in fecal matter of South American fur seals (*Arctocephalus australis*)**

Catarina Marcon Chiappetta<sup>1\*</sup>; Derek Blaese Amorim<sup>2</sup>; Samuel Paulo Cibulski<sup>3</sup>; Francisco Esmaille Sales Lima<sup>1</sup>; Ana Paula Muterle Varela<sup>3</sup>; Fabrício Souza Campos<sup>1</sup>; Maurício Tavares<sup>2</sup>; Ana Cláudia Franco<sup>1</sup>; Paulo Michel Roehle<sup>1,3</sup>

1- Virology Laboratory, Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Institute of Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Rua Sarmiento Leite 500, Porto Alegre, CEP 90050-170, Rio Grande do Sul (RS), Brazil.

2- Coastal, Limnological and Marine Studies Center, Biosciences Institute, Federal University of Rio Grande do Sul, Avenida Tramandaí 976, Imbé, CEP 95625-000, Rio Grande do Sul (RS), Brazil.

3- Institute of Veterinary Research "Desidério Finamor" (IPVDF), Estrada do Conde 6000, Eldorado do Sul, CEP 92990-000, Rio Grande do Sul (RS), Brazil.

\*Corresponding author: Chiappetta, C.M., Virology Laboratory, Microbiology, Immunology and Parasitology Department, Institute of Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Rua Sarmiento Leite 500, Porto Alegre, Zip code 90050-170, Rio Grande do Sul (RS), Brazil: tel +55 51 3308 3655 Fax +55 51 3308 3788 E-mail: catarinamarcon@hotmail.com

Proofs should be sent to: Chiappetta, C.M., Virology Laboratory, Microbiology, Immunology and Parasitology Department, Institute of Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Rua Sarmiento Leite 500, Porto Alegre, Zip code 90050-170, Rio Grande do Sul (RS), Brazil: tel +55 51 3308 3655 Fax +55 51 3308 3788 E-mail: catarinamarcon@hotmail.com



**Abstract**

Members of *Circoviridae* family are non-enveloped, spherical viruses with a single-stranded circular DNA genome; the family comprises three genera: *Circovirus*, *Gyrovirus* and the most recently described *Cyclovirus*. Some circoviruses are highly prevalent and genetically diverse pathogens of mammals, birds and in many aquatic environment samples. Little is known about the presence of these viruses in marine mammal populations. This study aimed to identify circoviruses genomes in fecal matter of twenty-one South American fur seals (*Arctocephalus australis*) and two subantarctic fur seals (*Arctocephalus tropicalis*) found dead on Rio Grande do Sul coast. A pan-circovirus PCR was used to detect *rep* gene segments. Samples from six South American fur seals gave rise to amplification of circoviruses genomes fragments; three of these were phylogenetically similar to those of members of *Cyclovirus* genus. Two other samples contained genome segments suggestive of members of *Circovirus* genus, whereas one of the samples gave rise to a gene segment that has no similarity with any *Circoviridae* known genus. These findings indicate the occurrence of circoviruses and cycloviruses in populations of fur seals found in the coast of Rio Grande do Sul, Brazil.

**Keywords:** circovirus, cyclovirus, *Circoviridae*, Pinnipedia

## Introduction

Viruses of *Circoviridae* family are known to infect a wide range of vertebrates. The virions consist of naked nucleocapsids of about 20 nm diameter, with a circular single stranded DNA (ssDNA) genome of 1.7-2.0 kb (Fauquet & Fargette, 2005). The family comprises two genera, *Gyrovirus* and *Circovirus*, although a third genus, *Ciclovirus* has been proposed (Li *et al.*, 2010a). Members of *Gyrovirus* genus (chicken anemia virus; CAV) (Noteborn *et al.*, 1991), avian gyrovirus type 2; AGV2 (dos Santos *et al.*, 2012; Rijsewijk *et al.*, 2011) and human gyrovirus type 1; HGV1 have negative sense genomes (Sauvage *et al.*, 2011), whereas members of *Circovirus* genus have ambisense genome with two major open reading frames (ORFs). The inversely arranged ORFs encode for replicase (Rep) and capsid (Cap) proteins, and are separated by 39 nucleotides intergenic region (IGR) between the stop codons and 59 nucleotides IGR between the start codons (Li *et al.*, 2010a).

The recently described *Cyclovirus* genus members have a smaller genome that encodes Rep and Cap proteins, which are smaller than those of circoviruses, with shorter or no 39 IGR between the stop codons of the two major ORFs and a longer 59 IGR between the start codons of the two major ORFs (Li *et al.*, 2010a). Cycloviruses were also found to be prevalent in the muscle tissue of farm animals, such as chickens, cows, sheep, goats, and camels (Li *et al.*, 2011).

Some circoviruses are major pathogens of pigs (Darwich *et al.*, 2004; Ellis *et al.*, 1998, 2004; Firth *et al.*, 2009). In birds, avian circoviruses have been identified in a broad range of avian species linked to signs of avian lymphoid depletion, immunosuppression and developmental abnormalities such as deformities of the beak and claws, feathering disorders and growth retardation (Bassami *et al.*, 1998; Chae, 2005; Hattermann *et al.*, 2003; Todd *et al.*, 2001; Stewart *et al.*, 2006; Todd, 2000).

Circoviruses, cycloviruses and other more divergent *rep* sequences bearing viruses were recently identified using high-throughput sequencing and/or consensus PCR in the feces of humans, chimpanzees, bats and rodents (Li *et al.*, 2010a; Blinkova *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2010b; Ge *et al.*, 2011; Phan *et al.*, 2011). They were also found in blood fed mosquitoes (Ng *et al.*, 2011), algae (Yoon *et al.*, 2011), fish (Lorincz *et al.*, 2011) and in environmental samples of seawater, reclaimed waters, sewage, and soil (Rosario *et al.*, 2009a,b; Blinkova *et al.*, 2009; López-Bueno *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2008). The same circoviruses and cycloviruses have been detected in humans, wild and farmed animals, suggesting possible cross-species transmissions and zoonotic potential (Li *et al.*, 2011; Ge *et al.*, 2011).

Here, the detection of genetically diverse circovirus-like genomes in fecal samples collected from South American fur seals (*Arctocephalus australis*) is reported. The identified sequences were distantly related to known circovirus/cyclovirus genomes and may represent 3 novel species within *Circoviridae* family.

## Material and methods

### Sample collection and preparation

During the months of June and July 2012, 23 fur seals of *Arctocephalus* genus were found dead on the beach. Fecal samples were collected from 21 specimens of South American fur seal, *A. australis*, and 2 specimens of the Subantarctic fur seal *A. tropicalis* in a coastal area of approximately 300 km comprised between the cities of Torres (coordinates: 29°20'31"S, 49°43'47"W) and Mostardas (coordinates: 31°6'25"S, 50°55'15"W), Rio Grande do Sul state, South Brazil. The area was monitored weekly in search for pinnipeds and other marine animals. The animals were submitted to necropsy. Fecal samples were collected directly from the intestine, kept on ice and sent to the laboratory, where were stored at -80°C. At the time of processing, samples were then thawed and approximately 5 g of fecal material were resuspended in 10 mL of Hank's balanced salt solution (HBSS). The slurry was removed by pelleting at 10.000 *xg* for 10 min in a microcentrifuge. The supernatants were sequentially transferred to fresh tubes and submitted to DNA extraction.

### DNA extraction and polymerase chain reactions (PCR)

Total fecal DNA was extracted from 400 µL of the supernatants (described above) with buffered phenol (Invitrogen™). The extracted DNA was eluted in 50 µL of TE (Tris-hydrochloride buffer, pH 8.0, 1.0 mM EDTA), treated with RNase and stored at -80°C. To ensure the extracted DNA was suitable for amplification, the constitutive ribosomal gene 16s of Gram-positive bacteria was amplified by PCR with primers FC27 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and R530 (5'-CCGCGGCTGCTGGCACGTA-3') (Gontang *et al.*, 2007) in a 25 µL reaction containing 20 to 50 ng of DNA, 1 mM of MgCl<sub>2</sub>, 0.2 µM of each primer (IDT), 1.5 U Taq DNA polymerase (Invitrogen™), 10%

PCR buffer (Invitrogen™) and 0.6 mM dNTP (ABgene). Cycling conditions were: 5 min at 94 °C followed by 35 cycles of 1 min at 94 °C, 1 min at 50 °C and 1 min at 72 °C, followed by a final extension step of 5 min at 72 °C. Five microliters of the amplicons (approximately 500 bp) were electrophoresed in 1.5% agarose gels and visualized on UV light after staining with ethidium bromide. Subsequently, samples that amplified 16s gene were submitted to the amplification in a nested PCR targeting the *rep* gene with the following degenerate primers: CV-F1 (5'-GGIAYICCCICAYYTICARGG-3'), CV-R1 (5'-AWCCAICCRTARAARTCRTC-3'), CV-F2 (5'-GGIAYICCCICAYYTICARGGITT-3'), and CV-R2 (5'-TG YTG YTCRTAICCRTCCCACCA-3') (Li, *et al.*, 2010a). These were expected to amplify part of the *rep* gene of circoviruses and cycloviruses. The first reaction was performed in 25 µL volume, consisting of 20 to 50 ng of DNA, 1 mM MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen™), 0.2 µM of each primer (CV-F1 and CV-R1) (IDT), 1.5 U Taq DNA polymerase (Invitrogen™), 10% PCR buffer (Invitrogen™) and 0.6 mM dNTP (ABgene). The cycling conditions were: 5 min at 95 °C; 40 cycles of 1 min at 95 °C, 1 min at 52 °C, 1 min at 72 °C and a final incubation at 72 °C for 10 min. For the second (nested) reaction, the 25 µL mix components were: 1 µL of the 1<sup>st</sup> reaction product, 1 mM MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen™), 0.2 µM of each primer (CV-F2 and CV-R2) (IDT), 1.5 U Taq DNA polymerase (Invitrogen™), 10% PCR buffer (Invitrogen™) and 0.6 mM dNTP (ABgene). The cycling conditions were: 5 min at 95°C; 40 cycles of 1 min at 95°C, 1 min at 56°C, 1 min at 72°C, and a final incubation at 72°C for 10 min.

## Sequencing and phylogenetic analysis

Amplicons with a size of approximately 400 bp were purified and directly sequenced using primer CV-R2. To confirm the sequences, each product was sequenced three times. Samples were sequenced with the Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems, UK) in an ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer (ABI, Foster City, CA), according to manufacturer's protocol. Sequence analyses were performed with the BLASTX software (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>). Nucleotide sequences were aligned and compared to sequences of human, animal and sewage-associated members of the *Circoviridae* available at GenBank database using ClustalX 2.0 (Larkin *et al.*, 2007). The alignments were optimized with BioEdit Sequence Alignment Editor Program version 7.0.9 (Hall, 1999). The protocol to generate the phylogenetic trees was selected with the program Modeltest 3.7 (Posada & Crandall, 2001). Phylogenetic trees were constructed by the maximum likelihood method by the WAG model, gamma distributed with invariant sites, complete deletion treatment for gaps and missing data, and nearest-neighbor-interchange search heuristic method within MEGA5.05. The confidence of each branch in the phylogeny was estimated with bootstrap values calculated from 1000 replicates. For the purpose of this work, the samples were named fur seal circovirus (FSCV), fur seal cyclovirus (FSCyV) and fur seal feces-associated circovirus (FSfaCV) followed by the last two digits of the sample number.

## Results

### Molecular detection of viral DNA in fur seals feces

Amplicons with the expected size (about 400 bp) were obtained from 6 out of the 23 (26.08%) fecal samples (G1508, G1516, G1518, G1520, G1527 and G1546). These were from South American fur seal specimens. None of the samples from the two subantarctic fur seals resulted positive at PCR.

### Molecular characterization and phylogenetic analyses

The nucleotide sequences corresponding to part of the *rep* gene were determined and submitted to GenBank (accession numbers KF 712527 to KF 712532). BLASTX analysis showed the sequences FSCyV-16, FSCyV-18 and FSCyV-27 were similar to *rep* sequences of *Cyclovirus* genus members. These sequences presented approximately 42% amino acid identity with the closest mammal cyclovirus sequence found in GenBank (Cyclovirus-TN9) (Fig. 1). Amplicons from samples FSCV-20 and FSCV-46 clustered with of *Circovirus* genus members. These sequences presented approximately 69% amino acid identity with the closest mammal circovirus sequence found in GenBank (SFbeef/USA/2010) (Fig. 1). The sequence obtained from the FSsaCV-08 amplicon was distinct from the others and formed a separate branch in the analysis, apart from the circoviruses and cycloviruses (Fig. 1). The alignment revealed that sequences from samples FSCV-20 and FSCV-46, which aligned with *Circovirus* genus members, were identical in its deduced amino acid sequences. Sequences from FSCyV-16, FSCyV-18 and FSCyV- 27 samples, which aligned with similar sequences of members of the genus *Cyclovirus*, were also identical in its deduced amino acid sequences (data not shown).

## Discussion

As a higher number of humans inhabit coastal regions, a global “anxiety” is developing about the health of aquatic ecosystems. This anxiety is particularly prominent in countries like Brazil, where almost half the population inhabits coastal freshwater or marine ecosystems (Brazilian Institute of Geography and Statistics, 2010). In this scenery the concept of marine sentinel organisms, used to gain early warnings about current or potential negative trends and impacts needs to be revisited.

Marine mammals like pinnipeds are probably one of the best sentinel organisms in aquatic and coastal environments because they have long life spans, share the same environment and can consume the same foods as humans (Reddy *et al.*, 2001; Conrad *et al.*, 2006). Additionally, pinnipeds are part of a conspicuous and charismatic megafauna that elicit strong human emotions and are thus more likely to be observed (Bossart, 1999). Thus, investigation of novel possible viral agents present in these species may provide a better understanding of terrestrial viral agents flow and the emergence of disease at the interface among wildlife, domestic animals, and humans besides making humans more likely to pay attention to ocean health issues.

In the present study, phylogenetic analysis supports the evidence that three new circoviruses were identified in feces of South American fur seals.

The deduced amino acid sequences of FSCyV-16, FSCyV-18 and FSCyV-27 samples were identical to each other and highly similar to equivalent sequences displayed by other members of the *Cyclovirus* genus, known to cross-infect multiple animal species (Li *et al.*, 2010a; Li *et al.*, 2011). The deduced amino acid sequences of amplicons FSCV-20 and FSCV-46 were also identical, although were more closely related with members of the *Circovirus* genus. These findings not only indicate that circoviruses and cycloviruses are circulating among South American fur seals, but also provide a baseline for the current



enteric viral burden that can be compared to later virome surveys to detect alterations associated with changes in their health or population size.

The most distinct of the sequences identified, FSfaCV-08, has a low degree of similarity in its deduced amino acid sequence when compared to the other five *rep* gene amplicons obtained. The phylogenetic analysis demonstrated that this sequence was as distinct from the other two genera as fragments of *rep* sequences found in sewage samples and in fecal matter from New Zealand fur seal (*Arctocephalus forsteri*) (Sikorski *et al.*, 2013). This result may indicate that FSfaCV may represent the sequence of a virus which might belong to a different genus, with unknown capacity of infecting mammals, and probably originated from the food that these animals have ingested. The description of new putative circoviruses in pinnipeds is expected to be useful to improve our knowledge on the biology of such viruses in marine hosts and their role in nature. However, the impact of these findings in some animal populations remains to be examined in the future.

### **Acknowledgements**

We would like to thank the government agencies FINEP, CNPq and CAPES for the financial support. PMR and ACF are CNPq research fellows. CMC is a Masters' student at the Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias UFRGS. Work developed while CMC was in receipt of a grant from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). We are very grateful to Grupo de Estudos de Mamíferos Aquáticos do Rio Grande do Sul and all staff from Coastal, Limnological and Marine Studies Center of the Federal University of Rio Grande do Sul State, specially the Sectors of Collections and Rehabilitation, by help in the data collection and necropsies.

## References

- Bassami, M.R., Berryman, D., Wilcox, G.E., Raidal, S.R. 1998. Psittacine beak and feather disease virus nucleotide sequence analysis and its relationship to porcine circovirus, plant circoviruses, and chicken anaemia virus. *Virology* 249, 453–459.
- Blinkova, O., Rosario, K., Li, L., Kapoor, A., Slikas, B., Bernardin, F., Breitbart, M., Delwart, E. 2009. Frequent detection of highly diverse variants of cardiovirus, cosavirus, bocavirus, and circovirus in sewage samples collected in the United States. *J. Clin. Microbiol.* 47, 3507–3513.
- Blinkova, O., Victoria, J., Li, Y., Keele, B.F., Sanz, C., Ndjango, J.B.N., Peeters, M., Travis, D., Lonsdorf, E.V. & other authors 2010. Novel circular DNA viruses in stool samples of wild-living chimpanzees. *J. Gen. Virol.* 91, 74–86.
- Bossart, G.D. 1999. The Florida manatee: on the verge of extinction? *Journal of the American Veterinary Medical Association* 214, 10–15.
- Chae, C. 2000. A review of porcine circovirus 2-associated syndromes and diseases. *Vet. J.* 169, 326–336.
- Conrad, P., Kreuder, C., Mazet, J., Dabritz, H., Miller, M., Jessup, D., Gulland, F., Grigg, M., James, E. 2006. Linkages between cats, run-off and brain disease in sea otters. Paper presented at the Symposium, Marine Mammals on the Frontline: Indicators for Ocean and Human Health. American Association for the Advancement of Science, Annual Meeting, St. Louis, MO, February 18, 2006. American Association for the Advancement of Science, Washington, D.C.
- Darwich, L., Segalès, J., Mateu, E. 2004. Pathogenesis of postweaning multisystemic wasting syndrome caused by Porcine circovirus 2: an immune riddle. *Arch. Virol.* 149, 857–874.

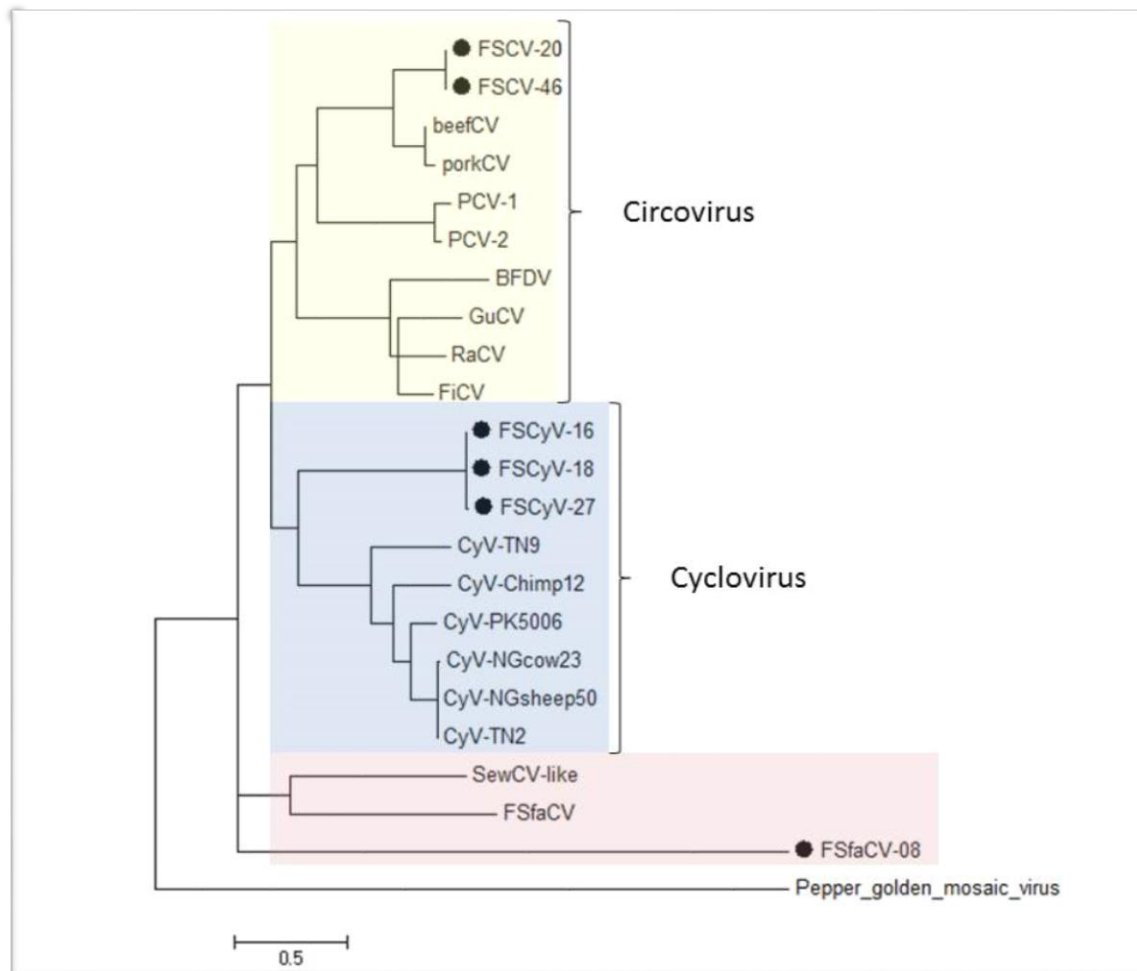
- dos Santos, H.F., Knak, M.B., de Castro, F.L., Slongo, J., Ritterbusch, G.A., Klein, T.A., Esteves, P.A., Silva, A.D., Trevisol, I.M. & other authors 2012. Variants of the recently discovered avian gyrovirus 2 are detected in Southern Brazil and The Netherlands. *Vet. Microbiol.* 155, 230–236.
- Ellis, J., Hassard, L., Clark, E., Harding, J., Allan, G., Willson, P., Strokappe, J., Martin, K., McNeilly, F. & other authors 1998. Isolation of circovirus from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Can. Vet. J.* 39, 44–51.
- Ellis, J., Clark, E., Haines, D., West, K., Krakowka, S., Kennedy, S., Allan, G.M. 2004. Porcine circovirus-2 and concurrent infections in the field. *Vet. Microbiol.* 98, 159–163.
- Fauquet, C.M., Fargette, D. 2005. International Committee on Taxonomy of Viruses and the 3,142 unassigned species. *Virology* 2, 64.
- Firth, C., Charleston, M.A., Duffy, S., Shapiro, B., Holmes, E.C. 2009. Insights into the evolutionary history of an emerging livestock pathogen: porcine circovirus 2. *J. Virol.* 83, 12813–12821.
- Gontang, E.A., Fenical, W., Jensen, P.R. 2007. Phylogenetic diversity of Gram-positive bacteria cultured from marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 3272–3282.
- Hattermann, K., Schmitt, C., Soike, D., Mankertz, A. 2003. Cloning and sequencing of Duck circovirus (DuCV). *Arch. Virol.* 148, 2471–2480.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 95-98.

- Kim, K.H., Chang, H.W., Nam, Y.D., Roh, S.W., Kim, M.S., Sung, Y., Jeon, C.O., Oh, H.M., Bae, J.W. 2008. Amplification of uncultured single-stranded DNA viruses from rice paddy soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 5975–5985.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., Higgins, D.G. 2007. *Bioinformatics* 23, 2947-2948.
- Li, L., Kapoor, A., Slikas, B., Bamidele, O.S., Wang, C., Shaukat, S., Masroor, M.A., Wilson, M.L., Ndjango, J.B.N. & other authors 2010a. Multiple diverse circoviruses infect farm animals and are commonly found in human and chimpanzee feces. *J. Virol.* 84, 1674–1682.
- Li, L., Shan, T., Soji, O. B., Alam, M. M., Kunz, T. H., Zaidi, S. Z. & Delwart, E. 2011. Possible cross-species transmission of circoviruses and cycloviruses among farm animals. *J. Gen. Virol.* 92, 768–772.
- Li, L., Victoria, J.G., Wang, C., Jones, M., Fellers, G.M., Kunz, T.H., Delwart, E. 2010b. Bat guano virome: predominance of dietary viruses from insects and plants plus novel mammalian viruses. *J. Virol.* 84, 6955–6965.
- López-Bueno, A., Tamames, J., Velázquez, D., Moya, A., Quesada, A., Alcamí, A. 2009. High diversity of the viral community from an Antarctic lake. *Science* 326, 858–861.
- Lorincz, M., Cságola, A., Farkas, S.L., Szekely, C., Tuboly, T. 2011. First detection and analysis of a fish circovirus. *J. Gen. Virol.* 92, 1817–1821.
- Ng, T.F., Wheeler, E., Greig, D., Waltzek, T.B., Gulland, F., Breitbart, M. 2011. Metagenomic identification of a novel anellovirus in harbor seal (*Phoca vitulina richardsii*) lung samples and its detection in samples from multiple years. *J. Gen. Virol.* 92, 1318–1323.

- Noteborn, M.H., de Boer, G.F., van Roozelaar, D.J., Karreman, C., Kranenburg, O., Vos, J.G., Jeurissen, S.H., Hoeben, R.C., Zantema, A., Koch, G. 1991. Characterization of cloned chicken anemia virus DNA that contains all elements for the infectious replication cycle. *J. Virol.* 65, 3131–3139.
- Phan, T.G., Kapusinszky, B., Wang, C., Rose, R.K., Lipton, H.L., Delwart, E.L. 2011. The fecal viral flora of wild rodents. *PLoS Pathog.* 7, e1002218.
- Posada, D. & Crandall, K.A. 2001. *Systematic biology* 50, 580-601.
- Reddy, M.L., Dierauf, L.A., Gulland, F.M.D. 2001. Marine mammals as sentinels of ocean health. Pp. 3–13 in *Marine Mammal Medicine, Second Edition*, L.A. Dierauf and F.M.D. Gulland, eds. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Rijsewijk, F.A., Dos Santos, H.F., Teixeira, T.F., Cibulski, S.P., Varela, A.P., Dezen, D., Franco, A.C., Roehe, P.M. 2011. Discovery of a genome of a distant relative of chicken anemia virus reveals a new member of the genus Gyrovirus. *Arch. Virol.* 156, 1097–1100.
- Rosario, K., Duffy, S., Breitbart, M. 2009a. Diverse circovirus-like genome architectures revealed by environmental metagenomics. *J. Gen. Virol.* 90, 2418–2424.
- Rosario, K., Nilsson, C., Lim, Y.W., Ruan, Y.J., Breitbart, M. 2009b. Metagenomic analysis of viruses in reclaimed water. *Environ. Microbiol.* 11, 2806–2820.
- Sauvage, V., Cheval, J., Foulongne, V., Gouilh, M.A., Pariente, K., Manuguerra, J.C., Richardson, J., Dereure, O., Lecuit, M. & other authors 2011. Identification of the first human gyrovirus, a virus related to chicken anemia virus. *J. Virol.* 85, 7948–7950.
- Sikorski, A., Dayaram, A., Varsania, A. 2013. Identification of a Novel Circular DNA Virus in New Zealand Fur Seal (*Arctocephalus forsteri*) Fecal Matter. *Gen. Announc.* 4, e00558-13.

- Stewart, M.E., Perry, R., Raidal, S.R. 2006. Identification of a novel circovirus in Australian ravens (*Corvus coronoides*) with feather disease. *Avian. Pathol.* 35, 86–92.
- Todd, D. 2000. Circoviruses: immunosuppressive threats to avian species: a review. *Avian. Pathol.* 29, 373–394.
- Todd, D., Weston, J., Ball, N.W., Borghmans, B.J., Smyth, J.A., Gelmini, L., Lavazza, A. 2001a. Nucleotide sequence-based identification of a novel circovirus of canaries. *Avian. Pathol.* 30, 321–325.
- Todd, D., Weston, J.H., Soike, D., Smyth, J.A. 2001b. Genome sequence determinations and analyses of novel circoviruses from goose and pigeon. *Virology* 286, 354–362.
- Yoon, H.S., Price, D.C., Stepanauskas, R., Rajah, V.D., Sieracki, M.E., Wilson, W.H., Yang, E.C., Duffy, S., Bhattacharya, D. 2011. Single-cell genomics reveals organismal interactions in uncultivated marine protists. *Science* 332, 714–717.

**Fig. 1** Phylogenetic tree constructed with the deduced amino acid sequences of the partial rep gene sequence using the maximum likelihood method with bootstrap values calculated from 1000 replicates. Sequences detected in this work are marked with the symbol ●. The origin of the sequences of *Circoviridae* members and accession numbers are as follows: beefCV (cow muscle, HQ839724); porkCV (pig muscle, HQ738638); PCV1 (pig tissue, AY660574); PCV2 (pig tissue, AY424401); BFDV (parrot skin, AF071878); GuCV (gull beak/feather, DQ845074); RaCV (raven feather/blood, DQ146997); FiCV (finch beak/feather, DQ845075); CyV-TN9 (human feces, GQ404906); CyV-Chimp12 (chimp feces, GQ404850); CyV-PK5006 (human feces, GQ404844); CyV-NGcow23 (cow muscle, GQ404981); CyV-NGsheep50 (sheep muscle, GQ404982); CyV-TN2 (human feces, GQ404904); SewCV-like (sewage, GQ243671); FSfaCV (fur seal feces). The Geminivirus pepper golden mosaic virus (U57457) was used as the outgroup.



#### **4.2. Molecular search for morbillivirus, calicivirus, adenovirus and coronaviruses in fecal matter of fur seals (*Arctocephalus spp.*)**

Catarina Marcon Chiappetta<sup>1\*</sup>; Derek Blaese Amorim<sup>2</sup>; Fabrício Souza Campos<sup>1</sup>; Maurício Tavares<sup>2</sup>; Ana Cláudia Franco<sup>1</sup>; Paulo Michel Roehle<sup>1,3</sup>

1- Virology Laboratory, Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Institute of Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Rua Sarmiento Leite 500, Porto Alegre, CEP 90050-170, Rio Grande do Sul (RS), Brazil.

2- Coastal, Limnological and Marine Studies Center, Biosciences Institute, Federal University of Rio Grande do Sul, Avenida Tramandaí 976, Imbé, CEP 95625-000, Rio Grande do Sul (RS), Brazil.

3- Institute of Veterinary Research "Desidério Finamor" (IPVDF), Estrada do Conde 6000, Eldorado do Sul, CEP 92990-000, Rio Grande do Sul (RS), Brazil.

\*Corresponding author: Chiappetta, C.M., Virology Laboratory, Microbiology, Immunology and Parasitology Department, Institute of Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Rua Sarmiento Leite 500, Porto Alegre, Zip code 90050-170, Rio Grande do Sul (RS), Brazil: tel +55 51 3308 3655 Fax +55 51 3308 3788 E-mail: catarinamarcon@hotmail.com

Proofs should be sent to: Chiappetta, C.M., Virology Laboratory, Microbiology, Immunology and Parasitology Department, Institute of Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Rua Sarmiento Leite 500, Porto Alegre, Zip code 90050-170, Rio Grande do Sul (RS), Brazil: tel +55 51 3308 3655 Fax +55 51 3308 3788 E-mail: catarinamarcon@hotmail.com



**Abstract**

Since the last decade of the 20<sup>th</sup> century there has been an explosion in recognition and characterization of viruses in marine mammals. The present study aimed to have a glance on possible viral infections of free ranging fur seals in the northern coastline of Rio Grande do Sul, Brazil by searching for viruses of four families: *Morbilliviridae*, *Adenoviridae*, *Caliciviridae* and *Coronaviridae*. Series of polymerase chain reactions were used to search for genome fragments of members of such virus families in fecal matter of twenty-one South American fur seals (*Arctocephalus australis*) and two Subantarctic fur seals (*Arctocephalus tropicalis*). Adenoviruses were investigated in search for fragments of the *pol* gene; morbilliviruses, for fragments of the *P* gene; caliciviruses, for fragments of the *hel* gene; and coronaviruses for fragments of the *1b* gene. Adenovirus genomes were detected in two samples from South American fur seals. These revealed a high degree of nucleotide identity with the same gene of human adenovirus type C. The results suggest that the fur seal populations may be exposed to environmental waters contaminated with human feces.

**Keywords:** PCR, virus, pinnipedia.

Since the last decade of the 20<sup>th</sup> century there has been increase in recognition and characterization of viruses in marine mammals. In part, this increase can be attributed to heightened public concern with repeated morbillivirus epizootics in cetaceans and pinnipeds throughout the waters of the world (Kennedy-Stoskopf, 2001). Initially, success in studying marine mammal viruses was dependent on laboratories maintaining primary pinniped and cetacean cell cultures for viral isolation. Advances in biotechnology now allow the amplification of viral genomes from multiple biological samples (Kennedy-Stoskopf, 2001).

Amongst marine mammals, nearshore predators such as pinnipeds deserve a better attention regarding viral infections since they share the same environment and consume some of the same foods as humans (Conrad *et al.*, 2006). Initially, most of the viral infections that have been previously reported in pinnipeds were associated with clearly described clinical findings (Britt *et al.*, 1979; Kennedy *et al.*, 1988a). Some of viral infections that have been most documented in pinnipeds include: adenoviruses (Britt *et al.*, 1979), caliciviruses (Smith *et al.*, 1973), and morbilliviruses (Kennedy *et al.*, 1988b). Morbilliviruses are single stranded RNA viruses. They have caused several major epizootics with high mortalities in pinnipeds since 1987 (Kennedy-Stoskopf, 2001). Among the affected species are harbour seals (*Phoca vitulina*), grey seals (*Halichoerus grypus*) Baikal seals (*Phoca siberica*) (Kennedy *et al.*, 1988b; Osterhaus & Vedder, 1988; Grachev *et al.*, 1989).

Adenoviruses are double stranded DNA viruses that have been detected in livers of stranded California sea lions (*Zalophus californianus*) with hepatitis (Britt *et al.*, 1979; Dierauf *et al.*, 1981). Recently a novel adenovirus, otarine adenovirus 1 (OtAV1), has been reported associated with viral hepatitis and endothelial cell infection (Goldstein *et al.*, 2011). In addition, an outbreak of fatal acute fulminant hepatitis caused by adenovirus

has been described in an aquarium in Japan affecting three different pinniped species (Inoshima *et al.*, 2013).

Caliciviruses are small positive stranded RNA viruses comprising the San Miguel Sea Lion Virus (SMSLV), first isolated from California sea lions from San Miguel Island in 1972 (Smith *et al.*, 1973). Since then, SMSLV is one of the most commonly reported viruses of marine mammals (Van Bonn *et al.*, 2000). It causes vesicular lesions in the mouth and on flippers of pinnipeds (Schaffer & Soergel, 1973; Smith *et al.*, 1983) and has been suggested as a cause of epizootic gastroenteritis of California sea lions (Schmitt *et al.*, 2009).

Coronaviruses are positive single stranded RNA viruses and have been associated with acute necrotizing enteritis in three harbor seals. Although no virus was isolated, microscopy and immunocytochemical findings were consistent with coronavirus infections in other mammals (Bossart & Shwartz, 1990).

In Brazil, although there are no breeding colonies of any species of pinnipeds, many individuals arrive at Rio Grande do Sul coast of between autumn and spring, during their post-reproductive migration (Pinedo, 1990; Simões-Lopes & Ott, 1995; Oliveira *et al.*, 2006). In view of the previously recognized importance of those viruses, the present study aimed to search for genome fragments of morbilliviruses, adenoviruses, caliciviruses and coronaviruses in fecal matter of two common species of fur seals.

During the months of June and July 2012, twenty one South American fur seals (*Arctocephalus australis*) and two subantarctic fur seals (*Arctocephalus tropicalis*) were found recently dead in a coastal area of approximately 300 km comprised between the cities of Torres (coordinates: 29°20'31"S, 49°43'47"W) and Mostardas (coordinates: 31°6'25"S, 50°55'15"W), Rio Grande do Sul state, Southern Brazil. These animals were submitted to necropsy, when fecal samples were collected directly from the intestine, kept

on ice and sent to the laboratory, where were stored at -80 °C. The samples were then thawed and approximately 5 g of fecal material resuspended in 10 mL of Hank's balanced salt solution (HBSS). The slurry was removed by pelleting at 10.000 x g for 10 min in a microcentrifuge. The supernatants were sequentially transferred to fresh tubes and submitted to DNA extraction.

Total fecal DNA was extracted from 400 µL of the supernatants (above) with buffered phenol (Invitrogen™). Total fecal RNA was extracted from 100 µL of the filtrates (above) with TRIzol (Invitrogen™). The extracted RNA was eluted in 50 µL of RNase-free and the extracted DNA was eluted in 50 µL of TE (Tris-hydrochloride buffer, pH 8.0, containing 1.0 mM EDTA) treated with RNase. Both RNA and DNA were stored at -80 °C. The DNA obtained was then screened for the presence of adenoviruses. Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and random hexamers were used in 20 µL reactions to generate cDNAs from 10 µL of extracted RNA suspension, according to the manufacturer's instructions. The cDNAs were then screened for the presence of morbilliviruses, caliciviruses and coronaviruses.

For adenovirus genomes screening, a segment of 261 bp corresponding to a portion of the viral DNA polymerase (*pol*) gene was amplified with nested PCR (Li *et al.*, 2010). For the first reaction, the 25 µL reaction mix contained 2 µL of extracted DNA, 2.5 µL PCR buffer, 20 pmol each primer (pol-F [5'-CAGCCKCKGTTRTYAGGGT-3'] and pol-R [5'-GCHACCATYAGCTCCAACCTC-3']), 0.2 mM dNTP, and 0.5 U Taq DNA polymerase (Promega™). The cycling conditions were: 5 min at 94 °C, 30 cycles of 30 sec at 94 °C, 30 sec at 48 °C, 30 sec at 72 °C and final extension of 10 min at 72 °C. For the second reaction, 1 µL of first reaction amplicon was used as a template and amplified with forward primer pol-nF (5'-GGGCTCRTTRGTCCAGCA-3') and reverse primer

pol-nR (5'-TAYGACATCTGYGGCATGTA-3') with the same cycling parameters as the first round.

The PCR used to detect morbillivirus targeted a segment of 400 bp of the viral phosphoprotein (*P*) gene (Barret *et al.*, 1993). Primers were: pho-F (5'-ATGTTTATGATCACAGCGGT-3') and pho-R (5'-ATTGGGTTGCACCACTTGTC-3'). The 25  $\mu$ L reaction mix contained 20 to 50 ng of DNA, 1 mM MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen™), 0.2  $\mu$ M of each primer (IDT), 1.5 U Taq DNA polymerase (Invitrogen™), 10% PCR buffer (Invitrogen™) and 0.6 mM dNTP (ABgene). The cycling conditions were: initial incubation step of 5 min at 95 °C, 35 cycles of 45 sec at 94 °C, 45 sec at 49 °C, 45 sec at 72 °C and final extension step of 5 min at 72 °C.

The PCR to detect calicivirus genomes, was performed essentially as described by Neill *et al.* (1995), targeted a fragment of 350 bp of the viral helicase (*hel*) gene. Primers were hel-1 (5'-GTCCCAGTATTCGGATTTGTCTGCC-3') and hel-2 (5'-AGCGGGTAGTTCAGTCAAGTTCACC-3'). The 25  $\mu$ L reaction mix contained 20 to 50 ng of DNA, 1 mM of MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen™), 0.2  $\mu$ M of each primer (IDT), 1.5 U Taq DNA polymerase (Invitrogen™), 10% PCR buffer (Invitrogen™) and 0.6 mM dNTP (ABgene). The cycling conditions were: 5 min at 95 °C, 35 cycles of 45 sec at 94 °C, 45 sec at 59 °C, 45 sec at 72 °C and final extension step of 5 min at 72 °C.

The PCR for screening the presence of coronaviruses was carried out with primers targeting a segment of 450 bp of the RNA-dependent RNA polymerase (*1b*) gene (forward: 5'-GGTTGGGACTATCCTAAGTGTGA-3' and reverse: 5'-CCATCATCAGATAGAATCATCATA-3') (Kan *et al.*, 2005). The 25  $\mu$ L reaction mix contained 1 mM of MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen™), 0.2  $\mu$ M of each primer (IDT), 1.5 U Taq DNA polymerase (Invitrogen™), 10% PCR buffer (Invitrogen™) and 0.6 mM dNTP

(ABgene). The cycling conditions were: 5 min at 94 °C, 35 cycles of 1 min at 94 °C, 1 min at 49 °C and 1 min at 72 °C, and final extension of 5 min at 72 °C.

All amplicons were electrophoresed in 1.5% agarose gels and visualized on UV light after staining with ethidium bromide. Standard precautions were taken to avoid PCR contamination; blank controls without template were included in every set of five assays. The amplicons were cloned into pCR®2.1-TOPO® cloning kit (Invitrogen™) before being submitted to nucleic acid sequencing.

Samples were sequenced with the Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems) in an ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer (ABI, Foster City, CA), according to manufacturer's protocol. Sequence analyses were performed with BLAST software (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>). Nucleotide sequences were aligned and compared to human and animal virus sequences available in GenBank database using Clustal 2.0 (Larkin *et al.*, 2007).

Amplicons whose nucleotide sequences were suggestive of adenovirus genomes were identified in 2 out of the 23 samples examined (samples G1517 and G1526). Both samples were obtained from South American fur seal specimens. These two sequences were closely related to the *pol* gene of human adenovirus C (HAV-C) showing high nucleotide similarity with the HAV-C strain (accession number KF429754) (Table. 1).

None of the samples gave rise to amplicons suggestive of morbillivirus, calicivirus or coronavirus genomes. Since all PCR techniques presented a sensibility  $10^2$ - $10^3$  molecules per reaction, the possibility of these viruses are present in the analyzed samples are rare. Recent studies have suggested human adenoviruses as a better water pollution indicator than coliform bacteria (Connell *et al.*, 2012). The results suggest that the fur seal populations may be exposed to undiagnosed environmental waters contaminated with human feces.

## **Acknowledgements**

We would like to thank the government agencies FINEP, CNPq and CAPES for the financial support. PMR and ACF are CNPq research fellows. CMC is a Masters' student at the Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias UFRGS. Work developed while CMC was in receipt of a grant from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). We are very grateful to Grupo de Estudos de Mamíferos Aquáticos do Rio Grande do Sul and all staff from Coastal, Limnological and Marine Studies Center of the Federal University of Rio Grande do Sul State, specially the Sectors of Collections and Rehabilitation, by help in the data collection and necropsies.

## References

- Barrett, T., Amarel-Doel, C., Kitching, R.P., Gusev, A. 1993. Use of the polymerase chain reaction in differentiating rinderpest field virus and vaccine virus in the same animals. *Revue Scientifique et Technique Office International des Epizooties* 12, 865-872.
- Bossart, G.D. & Schwartz, J.C. 1990. Acute necrotizing enteritis associated with suspected coronavirus infection in three harbour seals (*Phoca vitulina*). *J. Zoo. Wildl. Med.* 21, 84–87.
- Britt, J.O., Nagy, A.Z., Howard, E.B. 1979. Acute viral hepatitis in California sea lions. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 175, 921–923.
- Conrad, P., Kreuder, C., Mazet, J., Dabritz, H., Miller, M., Jessup, D., Gulland, F., Grigg, M., James, E. 2006. Linkages between cats, run-off and brain disease in sea otters. Paper presented at the Symposium, Marine Mammals on the Frontline: Indicators for Ocean and Human Health. American Association for the Advancement of Science, Annual Meeting, St. Louis, MO, February 18, 2006. American Association for the Advancement of Science, Washington, D.C.
- Connell, C., Tong, H.I., Wang, Z., Allmann, E., Lu, Y. 2012. New Approaches for Enhanced Detection of Enteroviruses from Hawaiian Environmental Waters. *PLoS ONE* 7(5): e32442.
- Dierauf, L.A., Lowenstine, L.J., Jerome, C. 1981. Viral hepatitis (adenovirus) in a California sea lion. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 179, 1194–1197.
- Goldstein, T., Colegrove, K.M., Hanson, M., Gulland, F.M.D. 2011. Isolation of a novel adenovirus from California sea lions *Zalophus californianus*. *Dis. Aquat. Organ.* 94, 243–248.



- Grachev, M.A., Kumarev, V.P., Mamaev, L.V., Zorin, V.L., Baranova, L.V., Denikina, N.N., Belikov, S.I., Petrov, E.A., Kolesnik, V.S., Kolesnik, R.S., Dorofeev, V.M., Beim, A.M., Kudelin, V.N., Nagieva, F.A., Sidorov, V.N. 1989. Distemper in Baikal seals. *Nature*, 338, 209.
- Inoshima, Y., Murakami, T., Ishiguro, N., Hasegawa, K., Kasamatsu, M. 2013. An outbreak of lethal adenovirus infection among different otariid species. *Vet. Mic.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.04.013>
- Kan, B., Wang, M., Jing, H., Xu, H., Jiang, X., Yan, M., Liang, W., Zheng, H., Wan, K., Liu, Q., Cui, B., Xu, Y., Zhang, E., Wang, H., Ye, J., Li, G., Li, M., Cui, Z., Qi, X., Chen, K., Du, L., Gao, K., Zhao, Y.T., Zou, X.Z., Feng, Y.J., Gao, Y.F., Hai, R., Yu, D., Guan, Y., Xu, J. 2005. Molecular evolution analysis and geographic investigation of severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in palm civets at an animal market and on farms. *J. Vir.* 79, 11892-11900.
- Kennedy, S., Smyth, J.A., Cush, P.F., McCullough, S.J., Allan, G.M., McQuaid, S. 1988a. Viral distemper now found in porpoises. *Nature*, 336, 21.
- Kennedy, S., Smyth, J.A., McCullough, S.J., Allan, G.M., McNeilly, F., McQuaid, S. 1988b. Confirmation of cause of recent seal deaths. *Nature*, 335, 404.
- Kennedy-Stoskopf, S. 2001. Viral diseases. In: Dierauf, L.A., Gulland, F.M.D. (Eds.), *CRC Handbook of Marine Mammal Medicine*, 2nd Edition. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 285–307.
- Li, Y., Ge, X., Zhang, H., Zhou, P., Zhu, Y., Zhang, Y., Yuan, J., Wang, L.F., Shi, Z. 2010. Host range, prevalence, and genetic diversity of adenoviruses in bats. *J. Virol.* 84, 3889–3897.

- Neill, J.D., Meyer, R.F., Seal, B.S. 1995. Genetic relatedness of the caliciviruses: San Miguel sea lion and vesicular exanthema of swine viruses constitute a single genotype within the Caliciviridae. *J. Virol.* 69, 4484–4488.
- Oliveira, L.R., Arias-Schreiber, M., Meyer, D., Morgante, J.S. 2006. Effective population size in a bottlenecked fur seal population. *Biol. Cons.* 131, 505 -509.
- Osterhaus, A.D.M.E. & Vedder, E.J., 1988. Identification of virus causing recent seal deaths. *Nature*, 335, 20.
- Pinedo, M.C. 1990. Ocorrência de Pinípedes na costa brasileira. *Garcia de Orta, Ser. Zool.*, 15, 37-48.
- Schaffer, F.L. & Soergel, M.E. 1973. Biochemical and biophysical characterization of calicivirus isolates from pinnipeds. *Intervirology* 1, 210-219.
- Schmitt, T.L., Reidarson, T.H., St. Leger, J., Rivera, R., Nollens, H.H. 2009. Novel presentation of San Miguel sea lion virus (Calicivirus) epizootic in adult captive sea lions, *Zalophus californianus*. In: Proceedings, International Association for Aquatic Animal Medicine, 40th Annual Conference, May 2–6, 2009, San Antonio, TX.
- Simões-Lopes, P.C. & Ott, P.H. 1995. Notas sobre os Otariidae e Phocidae (Mammalia Carnivora) da costa norte do Rio Grande do Sul e Santa Catarina - Brasil. *Biociências* (Porto Alegre), Ed. PUCRS, v. 3, n. 1, p. 173-181.
- Smith, A.W., Akers, T.G., Madin, S.H., Vedros, N.A. 1973. San Miguel sea lion virus isolation, preliminary characterization and relationship to vesicular exanthema of swine virus. *Nature* 244, 108-110.
- Smith, A.W., Skilling, D.E., Ridgway, S. 1983. Calicivirus-induced vesicular disease in cetaceans and probable interspecies transmission. *J. Am. Vet. Med. Ass.* 183, 1223–1225.

Van Bonn, W., Jensen, E.D., House, C., House, J.A., Burrage, T., Gregg, D.A. 2000.  
Epizootic vesicular disease in captive California sea lions. *Journal of Wildlife  
Diseases* 36, 500–507.

**Table 1:** Comparison between part of the sequences of adenovirus *pol* gene (261 nt) identified in samples G1526 and G1517, and human adenovirus type C (HAdV-C).

sequences	HAdV-C	G1526	G1517
HAdV-C	ID	0,994	0,954
G1526	0,994	ID	0,948
G1517	0,954	0,948	ID

\* Nucleotide sequence identity matrix.

## 5. DISCUSSÃO GERAL

Apesar de o litoral rio-grandense ser frequentado anualmente por diversas espécies de pinípedes, até presente momento nenhum estudo havia sido realizado sobre os vírus que podem infectar ou circular nessas populações.

No presente estudo foi possível obter um panorama parcial a respeito da presença de genomas de alguns vírus que poderiam infectar ou circular em pinípedes. Com relação aos circovírus, um grande número de novos pequenos vírus de DNA circular tem sido identificado e caracterizado a partir de fezes de várias espécies de vertebrados nos últimos cinco anos inclusive de pinípedes (Sikorski *et al.*, 2013). Em sua maioria, estes novos vírus são extremamente diversos e tem uma variedade de arquiteturas genômicas (Rosario *et al.*, 2012), e em alguns casos não foi possível classificá-los em taxons apropriados (Sikorski *et al.*, 2013).

Os circovírus identificados nas amostras de lobos marinhos sul-americanos apresentaram uma diversidade grande, visto que foram classificados em dois gêneros: *Circovirus* e *Cyclovirus*, e ainda um desses vírus não pode ser classificado em nenhum gênero já proposto. Devido a semelhanças com outros exemplares do mesmo gênero capazes de infectar mamíferos, tais observações indicam que os circovírus e cyclovírus identificados podem estar tanto infectando como circulando nesses animais. No entanto, o vírus que não pôde ser classificado possivelmente seja oriundo de alimentação desses animais.

Outro achado importante deste estudo foi detecção de segmentos genômicos de prováveis adenovírus em duas amostras de lobos marinhos sul-americanos. Tais segmentos apresentaram alto grau de similaridade (cerca de 99% de identidade de nucleotídeos) com adenovírus humano tipo C. Uma vez que os adenovírus humanos são

importantes contaminantes de efluentes, por serem excretados em grandes quantidades nas fezes e urina de indivíduos contaminados, serem resistentes e permanecerem viáveis por longo período em ambientes aquáticos como rios e mares, é bastante provável que tais vírus sejam oriundos das águas em que esses animais vivem (Schwartzbrod, 1995; Pusch *et al.*, 2005; Muscillo *et al.*, 2008). Além disso, estudos recentes sugerem que vírus como os adenovírus possam ser melhores e mais sensíveis indicadores de poluição ambiental em águas costeiras do que coliformes (Connell *et al.*, 2012). Sendo assim, presença desses vírus em pinípedes pode sugerir níveis mais altos que o esperado de contaminação das águas que esses animais habitam por fezes humanas.

Portanto, tais achados indicam que os lobos marinhos do litoral do Rio Grande do Sul, estão suscetíveis a diferentes agentes virais inclusive oriundos de esgoto humano. Novos estudos a respeito do impacto desses vírus nessas populações e de viromas em fezes desses animais merecem ser desenvolvidos com vistas não só da preservação dessas espécies, mas também para monitorar possíveis viroses emergentes em humanos expostos as mesmas fontes de contaminação.

## 6. CONCLUSÕES

Os trabalhos aqui desenvolvidos levaram às seguintes conclusões:

- A) Pela primeira vez foram identificados fragmentos de genes de prováveis membros da família *Circoviridae* em amostras de fezes de lobos marinhos sul-americanos (*Arctocephalus australis*).
- B) Estes vírus foram detectados em seis de vinte e três amostras analisadas de animais da espécie *A. australis*. De acordo com a análise do fragmento da região do gene *rep*, foram agrupados em três grupos distintos.
- C) Foram identificados fragmentos de genes sugestivos da presença de membros tanto do gênero *Cyclovirus* quanto do gênero *Circovirus* nestas espécies.
- D) Um terceiro perfil de fragmento genômico identificado apresentou-se distinto dos demais e provavelmente representa outro grupo ou gênero dentro da família *Circoviridae*, ainda não definido.
- E) Na espécie *A. australis* foi detectado um fragmento de gene sugestivo de adenovírus humanos do tipo C. Este fato pode ser indicador de possível contaminação ambiental por esse vírus nos locais onde esses animais frequentam, tendo em vista que AdCs são frequentes em fezes humanas.

## REFERÊNCIAS

- ALLAN, G. M.; ELLIS, J. A. Porcine circoviruses: a review. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 12, n. 1, p. 3-14, 2000.
- ARNS, C. W. et al. Paramixoviridae. In: FLORES E. F. (Ed.) **Virologia Veterinária: Virologia Geral e Doenças Víricas**. 2. ed. Santa Maria: Editora UFSM, 2012. Cap. 27, p. 759-792.
- BASTIDA, R. et al. Mamíferos Acuáticos de Sudamérica y Antártida. **Vazquez Mazzini Editores**, Buenos Aires, v. 1, p. 360, 2007.
- BARLOUGH, J. E. et al. Isolation of reptilian calicivirus *Crotalus* type 1 from feral pinnipeds. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 34, p. 451-456, 1998.
- BARRET, T. Morbillivirus infections, with special emphasis on morbilliviruses of carnivores. **Veterinary Microbiology**, v. 69, n. 1-2, p. 3-13, 1999.
- BASSAMI, M. R. et al. Psittacine beak and feather disease virus nucleotide sequence analysis and its relationship to porcine circovirus, plant circoviruses, and chicken anaemia virus. **Virology**, v. 249, p. 453–459, 1998.
- BELLIOT, G. et al. In vitro proteolytic processing of the MD145 norovirus ORF1 nonstructural polyprotein yields stable precursors and products similar to those detected in calicivirus-infected cells. **Journal of Virology**, v. 77, n. 20, p. 10957-10974, 2003.
- BENKO, M.; HARRACH, B. Molecular evolution of adenoviruses. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 272, p. 3-35, 2003.
- BERTA, A.; CHURCHILL, M. Pinniped taxonomy: review of currently recognized species and subspecies, and evidence used for their description. **Mammal Review**, v. 42, p. 207–234, 2012.
- BESTER M. N. Population increase in the Amsterdam Island fur seal *Arctocephalus tropicalis* at Gough Island. **South African Journal of Zoology**, v. 15, p. 229-234, 1980.
- BLINKOVA, O. et al. Frequent detection of highly diverse variants of cardiovirus, cosavirus, bocavirus, and circovirus in sewage samples collected in the United States. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, p. 3507–3513, 2009.
- BOSSART, G. D. Marine mammals as sentinel species for oceans and human health. **Oceanography**, v. 19, p. 44–47, 2006.



BOSSART, G. D.; SCHWARTZ, J. C. Acute necrotizing enteritis associated with suspected coronavirus infection in three harbour seals (*Phoca vitulina*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, V. 21, P. 84–87, 1990.

BRIAN, D. A.; BARIC, R. S. Coronavirus genome structure and replication. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 287, p. 1–30, 2005.

BRITT, J. O. et al. Acute viral hepatitis in California sea lions. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 175, p. 921–923, 1979.

BUREK, K. A. et al. Infectious disease and the decline of Steller sea lions (*Eumetopias jubatus*) in Alaska, USA: insights from serologic data. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 41, p. 512–524, 2005.

CARVALHO, C. T. Ocorrência de mamíferos marinhos no Brasil. **Boletim Técnico do Instituto Florestal**, São Paulo, v. 16, p. 13-32, 1975.

CAVANAGH, D. Coronaviruses in poultry and other birds. **Avian Pathology**, v. 34, p. 439–448, 2005.

CHENG, V. C. et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus as an agent of emerging and reemerging infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, p. 660–694, 2007.

CONNEL, C. et al. New Approaches for Enhanced Detection of Enteroviruses from Hawaiian Environmental Waters. **PLoS ONE**, 7(5): e32442, 2012.

DARWICH, L. et al. Pathogenesis of postweaning multisystemic wasting syndrome caused by Porcine circovirus 2: an immune riddle. **Archives of Virology**, v. 149, p. 857–874, 2004.

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

DE GUISE, S. et al. Non-neoplastic lesions in beluga whales (*Delphinapterus leucas*) and other marine mammals from the St. Lawrence Estuary. **Journal of Comparative Pathology**, v. 112, p. 257–271, 1995.

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

DIERAUF, L. A. et al. Viral hepatitis (adenovirus) in a California sea lion. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 179, p. 1194–1197, 1981.

DUIGNAN, P. J. Morbillivirus infections of marine mammals. In: FOWLER M. E.; MILLER R. E. (eds.) **Zoo and wild animal medicine: current therapy**. Philadelphia: W. B. Saunders, 1999. v. 4, p. 497–501.

DUIGNAN, P. J. et al. Epizootiology of morbillivirus infection in North American harbor seals (*Phoca vitulina*) and gray seals (*Halichoerus grypus*). **Journal of Wildlife Diseases**, v. 31, n. 4, p. 491-501, 1995.

ELLIS, J. et al. Isolation of circovirus from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. **Canadian Veterinary Journal**, v. 39, p. 44–51, 1998.

ELLIS, J. et al. Porcine circovirus-2 and concurrent infections in the field. **Veterinary Microbiology**, v. 98, p. 159–163, 2004.

FARKAS, S. L. et al. Genomic and phylogenetic analyses of an adenovirus isolated from a corn snake (*Elaphe guttata*) imply a common origin with members of the proposed new genus *Atadenovirus*. **Journal of General Virology**, v. 83, p. 2403–2410, 2002.

FERREIRA, J. M. et al. Multiple origins of vagrant Subantarctic fur seals: a long journey to the Brazilian coast detected by molecular markers. **Polar Biology**, v. 31, p. 303-308, 2008.

FIRTH, C. et al. Insights into the evolutionary history of an emerging livestock pathogen: porcine circovirus 2. **Journal of Virology**, v. 83, p. 12813–12821, 2009.

GARNER, G. W. et al. Morbillivirus ecology in polar bears (*Ursus maritimus*). **Polar Biology**, v. 23, p. 474–478, 2000.

GE, X. et al. Genetic diversity of novel circular ssDNA viruses in bats in China. **Journal of General Virology**, v. 92, p. 2646–2653, 2011.

GERACI, J. R. et al. Mass mortality of harbor seals: pneumonia associated with influenza A virus. **Science**, v. 215, p. 1129–1131, 1982.

GLIESH, R. A fauna de Torres. **Revista de Engenharia de Porto Alegre**, v. 10, n. 5, p. 253-354, 1925.

GOLDSTEIN, T. et al. Isolation of a novel adenovirus from California sea lions *Zalophus californianus*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 94, p. 243–248, 2011.

GRACHEV, M. A. et al. Distemper in Baikal seals. **Nature**, v. 338, p. 209, 1989.

GREEN, K. Y. et al. Taxonomy of the caliciviruses. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 181, s. 2, p. 322-330, 2000.

GUAN, Y. et al. Isolation and characterization of viruses related to the SARS coronavirus from animals in southern China. **Science**, v. 302, p. 276–278, 2003.

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

HALL, A. J. et al. Phocine distemper virus in the North and European Seas — data and models, nature and nurture. **Biological Conservation**, v. 131, p. 221–229, 2006.

HATTERMANN, K. et al. Cloning and sequencing of Duck circovirus (DuCV). **Archives of Virology**, v. 148, p. 2471–2480, 2003.

HERREWEGH, A. A. et al. Feline coronavirus type II strains 79-1683 and 79-1146 originate from a double recombination between feline coronavirus type I and canine coronavirus. **Journal of Virology**, v. 72, p. 4508–4514, 1998.

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

KADOI, K.; KADOI, B. K. Stability of feline caliciviruses in marine water maintained at different temperatures. **New Microbiology**, v. 24, p. 17–21, 2001.

KENNEDY, S. et al. Confirmation of cause of recent seal deaths. **Nature**, v. 335, p. 404, 1988.

KENNEDY, S. et al. Mass die-off of Caspian seals caused by canine distemper virus, **Emerging Infectious Diseases**, v. 6, p. 637–639, 2000.

KENNEDY, S. Morbillivirus infections in marine mammals. **Journal of Comparative Pathology**, v. 25, p. 119–201, 1998.

KENNEDY-STOSKOPF, S. Viral diseases. In: DIERAUF, L. A., GULLAND, F. M. D. (Eds.) **CRC Handbook of Marine Mammal Medicine**, 2. ed. Florida: CRC Press, Boca Raton, 2001. p. 285–307.

KIM, K. H. et al. Amplification of uncultured single-stranded DNA viruses from rice paddy soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, p. 5975–5985, 2008.

KING, J. E. Seals of the World. **British Museum (Natural History)**, 2. ed, London, p. 240, 1983.

KING, A. M. Q. et al. The negative sense single stranded RNA viruses. In: **Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. 9. ed. San Diego: Academic Press, 2011. Section II, p. 1338.

LAIM, M.; CAVANAGH, D. The molecular biology of coronaviruses. **Advances in Virus Research**, v. 48, p. 1–100, 1997.

LI, L. et al. Multiple diverse circoviruses infect farm animals and are commonly found in human and chimpanzee feces. **Journal of Virology**, v. 84, p. 1674–1682, 2010a.

LI, L. et al. Possible cross-species transmission of circoviruses and cycloviruses among farm animals. **Journal of General Virology**, v. 92, p. 768–772, 2011.

LI, L. et al. Bat guano virome: predominance of dietary viruses from insects and plants plus novel mammalian viruses. **Journal of Virology**, v. 84, p. 6955–6965, 2010b.

LÓPEZ-BUENO, A. et al. High diversity of the viral community from an Antarctic lake. **Science**, v. 326, p. 858–861, 2009.

LORINCZ, M. et al. First detection and analysis of a fish circovirus. **Journal of General Virology**, v. 92, p. 1817–1821, 2011.

LOVATO, L. T.; DEZENGRINI, R. Coronaviridae. In: FLORES E. F. (Ed.) **Virologia Veterinária: Virologia Geral e Doenças Víricas**. 1. ed. Santa Maria: Editora UFSM, 2007. Cap. 24, p. 613-638.

LYONS, C. et al. Canine distemper virus isolated from a captive seal. **Veterinary Records**, v. 132, p. 487-488, 1993.

MACLACHLAN, N. J.; DUBOVI, E. J. **Fenner's Veterinary Virology**. 4. Ed., [S.l.] Academic Press, 2011. P. 507.

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

MANKERTZ, A. et al. Molecular biology of Porcine circovirus: analyses of gene expression and viral replication. **Veterinary Microbiology**, v. 98, p. 81–88, 2004.

MARRA, M. A. et al. The genome sequence of the SARS-associated coronavirus. **Science**, v. 300, p. 1399–1404, 2003.

MCKINLEY, E. T. et al. Avian coronavirus infectious bronchitis attenuated live vaccines undergo selection of subpopulations and mutations following vaccination. **Vaccine**, v. 26, n. 10, p. 1274-1284, 2008.

MIHINDUKULASURIYA, K. A. et al. Identification of a novel coronavirus from a beluga whale by using a panviral microarray. **Journal of Virology**, v. 82, p. 5084–5088, 2008.

MOELLER, R. B. Jr. Pathology of Marine Mammals with Special Reference to Infectious Diseases. In: GARDNER, D. E.; HAYES, J. A. T. W. (Eds). **New Perspectives: Toxicology and the Environment. Toxicology of Marine Mammals**. 1. ed. Nova Yorque: Taylor & Francis Inc., 2002. p. 3–37.

MORAES, M. P.; COSTA, P. R. S. Adenoviridae. In: FLORES E. F. (Ed.) **Virologia Veterinária: Virologia Geral e Doenças Víricas**. 1. ed. Santa Maria: Editora UFSM, 2007. Cap. 16, p. 413-432.

MOURA, J. F.; SICILIANO, S. Straggler subantarctic fur seals (*Arctocephalus tropicalis*) on the coast of Rio de Janeiro state, Brazil. **Latin American Journal of Aquatic Mammals**, v. 6, p. 103–107, 2007.

MUSCILLO, M. et al. Detection and quantification of human adenovirus in surface Waters, by nested PCR, TaqMan real-time PCR and cell culture assays. **Water, Air & Soil Pollution**. v. 191, n. 1, 2008.

NEILL, J. D. et al. Genetic relatedness of the caliciviruses: San Miguel sea lion and vesicular exanthema of swine viruses constitute a single genotype within the Caliciviridae. **Journal of Virology**, v. 69, p. 4484–4488, 1995.

NEILL, J. Caliciviridae. In: FLORES E. F. (Ed.) **Virologia Veterinária: Virologia Geral e Doenças Víricas**. 1. ed. Santa Maria: Editora UFSM, 2007. Cap. 20, p. 525-536.

NG, T. F. et al. Broad surveys of DNA viral diversity obtained through viral metagenomics of mosquitoes. **PLoS ONE**, v. 6, e20579, 2011b.

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

OLIVEIRA, L. R. Caracterização dos padrões de ocorrência dos pinípedes (Carnivora: Pinnipedia) ocorrentes no Litoral do Rio Grande do Sul, Brasil, entre 1993 e 1999. **Dissertação de Mestrado em Biociências (Zoologia)**. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Porto Alegre, Brasil. 154pp. 1999.

OLIVEIRA, L. R. et al. Effective population size in a bottlenecked fur seal population. **Biological Conservation**, v. 131, p. 505-509, 2006.

OLIVEIRA, L. R. et al. New records of the Antarctic fur seal, *Arctocephalus gazelle* (Petters, 1875) (Carnivora: Otariidae) for the Southern Brazilian Coast. **Comunicações do Museu de Ciências e Tecnologia da PUCRS**, Sér. Zool., Porto Alegre, v. 14, n. 2, p. 201-207, 2001.

OSTERHAUS, A. D. M. E. et al. The Isolation and Partial Characterization of a Highly Pathogenic Herpesvirus from the Harbor Seal (*Phoca vilulina*). **Archives of Virology**, v. 86, p. 239-251, 1985.

OSTERHAUS, A. D. M. E.; VEDDER, E. J. Identification of virus causing recent seal deaths. **Nature**, v. 335, p. 20, 1988.

PINEDO, M. C. Ocorrência de Pinípedes na costa brasileira. **Garcia de Orta**, Ser. Zool., v. 15, n. 2, p. 37-48, 1990.

PINEDO, M. C.; MARMONTEL, M. Cetáceos e Pinípedes do Brasil: uma revisão dos registros e guia para identificação das espécies. Manaus: UNEP/FUA, p. 213, 1992.

PUSCH, D. et al. Detection of enteric viruses and bacterial indicators in German environmental waters. **Archives of Virology**, v. 150, p. 929-947, 2005.

ROSARIO, K. et al. Diverse circovirus-like genome architectures revealed by environmental metagenomics. **Journal of General Virology**, v. 90, p. 2418–2424, 2009a.

ROSARIO, K. et al. Dragonfly cyclovirus, a novel single-stranded DNA virus discovered in dragonflies (Odonata: Anisoptera). **Journal of General Virology**, v. 92, p. 1302–2138, 2011.

ROSARIO, K. et al. Metagenomic analysis of viruses in reclaimed water. **Environmental Microbiology**, v. 11, p. 2806–2820, 2009b.

ROSARIO, K. et al. A field guide to eukaryotic circular single-stranded DNA viruses: insights gained from metagenomics. **Archives of Virology**. V. 157, p. 1851–1871, 2012.

ROSAS, F. C. W. et al. Seasonal movements of the South American sea lion (*Otaria flavescens*, Shaw) off the Rio Grande do Sul coast, Brazil. **Mammalia**, v. 58, p. 51-59, 1994.

ROTA, P. A. et al. Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. **Science**, v. 300, p. 1394–1399, 2003.

SCHRENZEL, M. et al. Characterization of a new species of adenovirus in falcons. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 3402–3413, 2005.

SCHAFFER, F. L.; SOERGEL, M. E. Biochemical and biophysical characterization of calicivirus isolates from pinnipeds. **Intervirology**, v. 1, p. 210-219, 1973.

SCHMITT, T. L. et al. Novel presentation of San Miguel sea lion virus (Calicivirus) epizootic in adult captive sea lions, *Zalophus californianus*. In: **Proceedings, International Association for Aquatic Animal Medicine**, 40th Annual Conference, San Antonio, mai. 2–6, 2009.

SCHWARTZBROD, L. et al. Effect of human viruses on public health associated with the use of wastewater and sludge in agriculture and aquiculture. World Health Organization, **Bull WHO/EOS/95.19**, 1995.

SIKORSKI, A. et al. Identification of a Novel Circular DNA Virus in New Zealand Fur Seal (*Arctocephalus forsteri*) Fecal Matter. **Genome Announcements**, v. 1, n. 4, e00558-13, 2013.

SIMÕES-LOPES, P. C.; OTT, P. H. Notas sobre os Otariidae e Phocidae (Mammalia Carnivora) da costa norte do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, Brasil. In: **Biociências**, ed: PUCRS, Porto Alegre, v. 3, n. 1, p. 173-181, 1995.

SMITH, A. W.; BOYT, P. M. Caliciviruses of ocean origin: a review. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, p. 3-23, 1990.

SMITH, A. W. et al. San Miguel sea lion virus isolation, preliminary characterization and relationship to vesicular exanthema of swine virus. **Nature**, v. 244, p. 108-110, 1973.

SMITH, A.W. et al. In vitro isolation and characterization of a calicivirus causing a vesicular disease of the hands and feet. **Clinical Infectious Diseases**, v. 26, p. 434-439, 1998a.

SMITH, A. W. et al. Vesivirus viremia and seroprevalence in humans. **Journal of Medical Virology**, v. 78, p. 693-701, 2006.

SMITH, A. W.; SKILLING, D. E. Virus and virus diseases of marine mammals. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 175, p. 918-920, 1979.

SMITH, A. W. et al. Serology and virology of the bowhead whale (*Balaena mysticetus*). **Journal of Wildlife Diseases**, v. 23, p. 92-98, 1987.

SMITH, A. W. et al. Calicivirus emergence from ocean reservoirs: zoonotic and interspecies movements. **Emerging Infectious Diseases**, v. 4, p. 13-20, 1998b.

SMITH, A. W. et al. Calicivirus pathogenic for swine: a new serotype isolated from opaleye *Girella nigricans*, an ocean fish. **Science**, v. 209, p. 940-941, 1980.

SMITH, A. W. et al. Calicivirus isolation and persistence in a pygmy chimpanzee (*Pan paniscus*). **Science**, v. 221, p. 79-81, 1983a.

SMITH, A. W. et al. Calicivirus-induced vesicular disease in cetaceans and probable interspecies transmission. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 183, p. 1223-1225, 1983b.

SNIJDER, E. J. et al. Unique and conserved features of genome and proteome of SARS-coronavirus, an early split-off from the coronavirus group 2 lineage. **Journal of molecular Biology**, v. 331, p. 991–1004, 2003.

SOSNOVTSEV, S. V. et al. Processing map and essential cleavage sites of the nonstructural polyprotein encoded by ORF1 of the feline calicivirus genome. **Journal of Virology**, v. 76, n. 14, p. 7060-7072, 2002.

STEWART, M. E. et al. Identification of a novel circovirus in Australian ravens (*Corvus coronoides*) with feather disease. **Avian Pathology**, v. 35, p. 86–92, 2006.

SUTTLE, C. A. Marine viruses - major players in the global ecosystem. **Nature Reviews, Microbiology**, v. 5, p. 801–812, 2007.

TAVARES, T. M. et al. Vírus entéricos veiculados por água: aspectos microbiológicos e de controle de qualidade da água. **Revista de Patologia Tropical**, v. 34, n. 2, p. 85-104, 2005.

TODD, D. Circoviruses: immunosuppressive threats to avian species: a review. **Avian Pathology**, v. 29, p. 373–394, 2000.

TODD, D. et al. Circoviridae. In: FAUQUET, C.M., MAYO, M.A., MANILOFF, J., DESSELBERGER, U., BALL, L.A. (Eds.) **Virus Taxonomy: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. San Diego: Elsevier Academic Press, p. 327–334, 2005.

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

TODD, D. et al. Genome sequence determinations and analyses of novel circoviruses from goose and pigeon. **Virology**, v. 286, p. 354–362, 2001.

VAN BONN, W. et al. Epizootic vesicular disease in captive California sea lions. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 36, p. 500–507, 2000.

VAN BRESSEM, M. F. et al. Further insight on the epidemiology of cetacean morbillivirus in the northeastern Atlantic. **Marine Mammal Science**, v. 14, p. 605–613, 1998.

VAZ-FERREIRA, R. South American sea lion, *Otaria flavescens* (Shaw, 1800). In: **Handbook of Marine Mammals**. London: Academic Press, 1981. Vol. 1, p. 39-66.

VAZ-FERREIRA, R. *Arctocephalus australis* Zimmerman, South American fur seal. In: **Mammals in the seas, FAO Fisheries series, Small cetaceans, seals, sirenians and otters**. v. 4, n. 5, p. 497-508, 1982.



VELOZO, R. S. et al. Analysis of subantarctic fur seal (*Arctocephalus tropicalis*) records in Bahia and Sergipe, north-eastern Brazil. **Marine Biodiversity Records**, v. 2, e117, 2009.

VIEIRA, C. C. Lista remissiva dos mamíferos do Brasil. **Arquivos de Zoologia do Estado de São Paulo**, v. 8, p. 341-474, 1955.

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

WILDER, F. W.; DARDIRI, A. H. San Miguel sea Lion virus fed to mink and pigs. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 42, n. 2, p. 200-204, 1978.

WIRBLICH, C. et al. Genetic map of the calicivirus rabbit hemorrhagic disease virus as deduced from In vitro translation studies. **Journal of Virology**, v. 70, n. 11, p. 7974-7983, 1996.

WOO, P. C. et al. Discovery of a novel bottlenose dolphin coronavirus reveals a distinct species of marine mammal coronavirus in Gammacoronavirus. **Journal of virology**, v. 88, n. 2, p. 1318-1331, 2014.

WOO, P. C. et al. Comparative analysis of 22 coronavirus HKU1 genomes reveals a novel genotype and evidence of natural recombination in coronavirus HKU1. **Journal of virology**, v. 80, p. 7136–7145, 2006.

WOO, P.C. et al. Relative rates of non-pneumonic SARS coronavirus infection and SARS coronavirus pneumonia. **The Lancet**, v. 363, p. 841–845, 2004.

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

WYNEN, L. P. et al. Postsealing genetic variation and population structure of two species of fur seal (*Arctocephalus gazella* and *A. tropicalis*). **Molecular Ecology**, v. 9, p. 299–314, 2000.

XIMENEZ, I. M.; LANGGUTH, E. **Isla de Lobos**. Graphis ed., 227pp, 2002.

ZIEBUHR, J. Molecular biology of severe acute respiratory syndrome coronavirus. **Current Opinion in Microbiology**, v. 7, p. 412–419, 2004.