

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

**DETECÇÃO DE VÍRUS EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS PROVENIENTES DE
MORCEGOS DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL**

FRANCISCO ESMAILE DE SALES LIMA
Doutor em Microbiologia Agrícola e do Ambiente

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.
Julho de 2014.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

**DETECÇÃO DE VÍRUS EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS PROVENIENTES DE
MORCEGOS DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL**

FRANCISCO ESMAILE DE SALES LIMA
Doutor em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – ICBS/UFRGS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente como um dos requisitos para a obtenção do Grau de Doutor em Microbiologia Agrícola e do Ambiente na Área de Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Cláudia Franco

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

Julho de 2014.

CIP - Catalogação na Publicação

de Sales Lima, Francisco Esmaille
DETECÇÃO DE VÍRUS EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS
PROVENIENTES DE MORCEGOS DO ESTADO DO RIO GRANDE DO
SUL / Francisco Esmaille de Sales Lima. -- 2014.
87 f.

Orientadora: Ana Cláudia Franco.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. Virologia. 2. Morcegos. 3. Vírus emergentes. 4.
Brasil. I. Franco, Ana Cláudia, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

FRANCISCO ESMAILE DE SALES LIMA
MEDICO VETERINÁRIO
UFEC

TESE

Submetida como parte dos requisitos
Para obtenção do Grau de

DOUTOR EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente

Instituto de Ciências Básicas da Saúde


Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Porto Alegre (RS), Brasil


Aprovada em: 18/07/2014
Pela Banca Examinadora

Homologado em: 4/10/2014
Por:

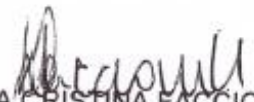

ANA CLAUDIA FRANCO
Orientador


SUELI TERESINHA VAN DER SAND
Coordenadora do PPGMAA


ANA PAULA GUEDES FRAZZON
UFRGS


FABRÍCIO SOUZA CAMPOS
UFRGS


FERNANDO ROSADO SPILKI
FEEVALE


MARIA CRISTINA FACCIÓNI HEUSER
Diretora do ICBS - UFRGS

AGRADECIMENTOS

A Deus, acima de tudo e todos, pois por razões particulares, voltei a confiar Nele e a cada dia, minha fé só aumenta.

Minha família, a coisa mais linda, mais estável que tenho na vida. O meu porto seguro, o resto é bobagem, é quimera.

A todos que estiveram envolvidos neste trabalho, o meu muito obrigado.

Um sincero e especial agradecimento à Profa. Dra. Ana Cláudia Franco pela sua dedicação e paciência em me orientar, pelo desafio de ter sido seu primeiro e único orientado de doutorado, e ainda, pelo apoio e total confiança em mim depositados.

Ao Prof. Dr. Paulo Michel Roehe pelo apoio financeiro que suporta o laboratório, além de incentivo à pesquisa de qualidade, com suas críticas e observações pertinentes.

A todos os amigos e colegas dos Laboratórios de virologia do ICBS/UFRGS e IPVDF. A todos, meus sinceros agradecimentos pela convivência, auxílio nos momentos importantes e alegrias ao longo destes cinco anos.

A todos os professores do Departamento de Microbiologia da UFRGS, que sempre foram atenciosos e gentis comigo.

Aos meus amigos de Porto Alegre, que fizeram, ou não, parte do grupo. Aos grandes amigos de Fortaleza, Curitiba, Porto Velho, São Paulo, Cabo Frio e Montpellier (França), que mesmo distantes, sempre me enviam palavras de apoio.

Às instituições IPVDF /FEPAGRO, UFRGS e CIRAD que mantiveram as portas abertas para a execução deste trabalho.

A CAPES pelos recursos fomentados para a realização deste estudo e ao Programa Ciências Sem Fronteiras, a partir do qual pude realizar meu sonho de estudar na França pela concessão da bolsa.

DETECÇÃO DE VÍRUS EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS PROVENIENTES DE MORCEGOS DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL

Autor: Francisco Esmail de Sales Lima
Orientadora: Profa. Dra. Ana Cláudia Franco

RESUMO

Os morcegos (Ordem *Chiroptera*) estão entre as espécies de mamíferos mais diversificadas e distribuídas no mundo. É reconhecido o papel fundamental que eles exercem na natureza. Por outro lado, são conhecidos como importantes reservatórios de agentes de doenças infecciosas, dentre os quais vírus, até pouco tempo desconhecidos, que nas últimas décadas se tornaram emergentes em humanos e outras espécies. Dentre os vírus RNA emergentes, destacam-se o SARS-CoV, MERS-CoV, vírus Hendra e Nipah e o último a causar importante surto na África, vírus Ebola. Mais de 100 espécies de vírus já foram detectadas em morcegos em todo o mundo, tanto vírus RNA, quanto vírus DNA, embora importância desses últimos como agentes de zoonoses ainda não tenha sido confirmada. Estudos no Brasil com relação à detecção de vírus em morcegos são praticamente inexistentes, e são focados apenas na vigilância e epidemiologia do vírus rábico. Portanto, este trabalho objetivou a detecção de vírus, tanto RNA, quanto DNA, em amostras de morcegos no estado do Rio Grande do Sul, através de técnicas moleculares e sequenciamento dos fragmentos obtidos. Identificamos a presença de vírus da família *Coronaviridae*, *Circoviridae* e *Adenoviridae* em amostras de fezes e tecidos de morcegos insetívoros e hematófagos. A detecção de novas espécies de vírus da família *Circoviridae* confirma a diversidade viral que estes vírus podem apresentar. Os resultados obtidos por investigação não podem afirmar se tais vírus apresentam potencial zoonótico, mas por serem dados inéditos no país, reforçam a importância da vigilância e de estudos adicionais para melhor compreender o papel que diferentes espécies de morcegos tem como reservatórios de vírus que possam ter impacto na saúde animal e humana

¹Tese de Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente - Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (86 p.) Julho, 2014

DETECTION OF VIRUSES IN BIOLOGICAL SAMPLES FROM RIO GRANDE DO SUL STATE BATS

Author: Francisco Esmaille de Sales Lima

Advisor: Profa. Dra. Ana Cláudia Franco

ABSTRACT

Bats (Order *Chiroptera*) are among the most diverse and worldwide distributed mammal species. It is recognized the important role they play in nature, but, on the other hand, they are known as important reservoirs of infectious diseases, including viruses, until then unknown, that have become emerging in recent decades. Among RNA viruses of great importance are the SARS-CoV, MERS-CoV, Hendra and Nipah viruses and the one responsible to cause major outbreaks in Africa recently, the Ebola virus. More than 100 species of virus have been detected in bats in the world, both RNA and DNA viruses DNA, although the latter still hasn't confirmed its importance on zoonosis or the impact it would cause to the host itself. Studies in Brazil are practically nonexistent, because they are focused only on surveillance and epidemiology of rabies virus. Therefore, this work aimed to virus detection, both RNA and DNA in samples from bats in the State of Rio Grande do Sul, through molecular techniques and sequencing of the fragments obtained. We identify the presence of viruses of the family *Coronaviridae*, *Circoviridae* and *Adenoviridae* in stool samples and tissues. In addition, the discovery of new species of viruses of the family *Circoviridae* confirms viral diversity that these bats can carry. The results obtained in this investigation cannot confirm if such viruses have zoonotic potential, but as they are the first data published in the country, it underscores the importance of vigilance and additional studies to better understand the role that different species of bats have as reservoirs of viruses that may have an impact on animal and human health.

¹Doctoral Thesis in Agricultural and Environmental Microbiology. Health Basic Sciences Institute Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil. (86 p.) January, 2014

Sumário

RELAÇÃO DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	ix
1.INTRODUÇÃO	1
1.2. Justificativa e objetivos gerais.....	4
1.2.1 Objetivos específicos.....	4
2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	7
2.1. Morcegos: Aspectos Ecológicos e Biológicos	7
2.2 Vírus RNA identificados em morcegos e patogênicos aos humanos	11
2.2.1 <i>Coronaviridae</i>	11
2.2.2 <i>Paramyxoviridae</i>	15
2.2.3 <i>Filoviridae</i>	20
2.3 Vírus DNA detectados em morcegos e objetos de estudo neste trabalho.....	24
2.3.1 <i>Circoviridae</i>	24
2.3.2 <i>Adenoviridae</i>	26
3.MATERIAL E MÉTODOS	30
4.RESULTADOS	31
4.1. Detection of Alphacoronavirus in velvety free-tailed bats (<i>Molossus molossus</i>) and Brazilian free-tailed bats (<i>Tadarida brasiliensis</i>) from urban area of Southern Brazil.....	32
4.2. First detection of adenovirus in the vampire bat (<i>Desmodus rotundus</i>) in Brazil.	37
4.3. Molecular detection and characterization of novel circular ssDNA viruses from insectivorous bats in Southern Brazil.....	42
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	67
6. CONCLUSÕES.....	70
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

RELAÇÃO DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%: Porcentagem
ADV: Adenovirus
ADV EDS-76: Adenovirus of Egg Drop Syndrome-76
BtAdV-2: Bat Adenovirus type 2
BLAST: Basic Local Alignment Search Tool
CAdV: Canine adenovirus
cap: Gene do capsídeo
Cap: Proteína do capsídeo
CoV: Coronavírus
DNA: Ácido Desoxirribonucleico
EBOV: Ebola virus
F: Fusion Protein
H: hemaglutinina
HeV: Hendra virus
HN: hemaglutinina-neuraminidase
ICTV: *International Committee on Taxonomy of Viruses*
L: Large Protein
MERS: Middle East Respiratory Syndrome
MERS-CoV: Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus
NiV: Nipah virus
ORF: Open Reading Frame
PCV1: Porcine Circovirus type 1
PCV2: Porcine Circovirus type 2
PPV1: *Pipistrellus pipistrellus* virus 1
RNA: Ácido Ribonucleico
RdRp: *RNA-dependent RNA polymerase*
rep: Gene da replicase
Rep: Proteína da replicase
SARS: *Severe acute respiratory syndrome*
SARS-CoV: *Severe Acute Respiratory Syndrome* Coronavirus
WHO: World Health Organization
ZEBOV: Zaire ebolavirus

1.INTRODUÇÃO

Diversos vírus podem ser mantidos na natureza por uma ou mais espécies reservatórias, na maioria animais silvestres (Taylor et al., 2001). Eventualmente, estes vírus têm a chance de serem transmitidos a outras espécies animais, o que pode causar infecções emergentes. Os fatores que facilitam a transmissão destes agentes a partir de um reservatório são: a expansão da população humana e invasão de áreas de floresta, alterações climáticas, a expansão de atividades profissionais como a mineração e agropecuária, o deflorestamento (e consequente aumento da população de vetores virais como mosquitos), a proliferação de animais silvestres, como roedores em regiões povoadas por humanos, e alterações genômicas, mais frequentes principalmente em vírus RNA (Chomel et al., 2007).

Como exemplos de reservatórios de vírus podem-se citar: roedores, macacos, aves silvestres, marsupiais e morcegos, além de artrópodes. Estes animais podem portar diversos agentes virais, e os manter na natureza, através de infecções persistentes, sintomáticas ou assintomáticas (Kuiken et al., 2005).

Os morcegos estão entre os vertebrados mais abundantes, em número de espécies e mais dispersos geograficamente. Embora se saiba muito sobre sua ecologia, informações detalhadas ainda são necessárias para

explicar as grandes variações em sua anatomia, estilo de vida, papel no ecossistema, e importância como reservatórios de vírus de potencial impacto para a saúde humana e veterinária (Kunz et al., 2003). Morcegos de diferentes espécies alimentam-se de insetos, pequenos mamíferos, peixes, sangue, frutas e pólen. São encontrados em todos os continentes com exceção da Antártica, correspondendo a, aproximadamente, 20% de todas as espécies de mamíferos descritas até o momento (Kunz et al., 2003).

Os morcegos são reconhecidos como hospedeiros reservatórios de vírus que podem cruzar a barreira inter-espécie (“spillover”) e infectar humanos e outros mamíferos domésticos e selvagens (Woolhouse et al., 2005). No entanto, estudos sobre a história natural dos morcegos e sua importância como hospedeiros reservatórios de vírus zoonóticos vem sendo subapreciados, exceto por seu papel na manutenção e transmissão do vírus da raiva. Apesar de a percepção pública ser negativa em relação aos morcegos, eles são elementos críticos para todas as comunidades bióticas terrestres (Calisher et al., 2006). Eles auxiliam no controle de insetos que podem agir como praga na agricultura, são dispersores de sementes, polinizam plantas que fornecem alimento para humanos e outras espécies, além do guano, excretado por eles, servir como fertilizante e combustível. (Neretti et al., 2003; Sanderson et al., 2003).

Mitos e incompreensões sobre o papel dos morcegos no ecossistema e o seu papel como transmissor do vírus da raiva para outras espécies levou a esforços para extirpar populações de morcegos, com sérias

consequências no controle de insetos, sem redução na já baixa incidência da transmissão da raiva pelos morcegos (Mayen, 2003).

Os morcegos tem apresentado importância destacada como reservatórios de vírus emergentes. Mais de 100 espécies de vírus foram identificadas em diversas espécies de morcegos em todo o mundo (Li et al., 2010). Alguns destes vírus são conhecidamente agentes de doenças importantes para humanos e animais, como o vírus rábico e outros lissavírus relacionados. Foi demonstrada a importância de morcegos como reservatórios dos paramixovírus Nipah e Hendra e coronavírus “SARS-like”, sendo os três exemplos de vírus patogênicos para humanos. Outros vírus como filovírus, alphavírus, flavivírus e bunivírus foram detectados em morcegos, mas não se sabe da real importância destes animais como reservatórios e transmissores destes vírus (Leroy et al., 2005; Calisher et al., 2006).

A detecção e identificação de agentes infecciosos em animais silvestres, seguida de estudos de patogenia e monitoramento das infecções, têm sido utilizadas com sucesso para explorar a relação entre vírus e reservatórios e para contribuir com a detecção e controle de infecções zoonóticas emergentes (Kuiken et al., 2005). Estes estudos auxiliam epidemiologistas e profissionais de saúde pública na tomada de medidas que contribuem para a redução do risco de infecção e para auxiliar na identificação de surtos, a exemplo dos estudos sobre a síndrome respiratória causada pelo hantavírus (Calisher et al., 2006).

É importante salientar que a grande maioria dos estudos que comprova a distribuição de vírus em morcegos tem sido desenvolvida principalmente na Ásia e Austrália, e mais recentemente na África, Europa e América do Norte. No Brasil, à exceção do monitoramento de morcegos portadores do vírus rábico, feito regularmente em áreas de prevalência de morcegos hematófagos, o monitoramento de agentes infecciosos em morcegos no País é praticamente inexistente. Conseqüentemente, apesar do Brasil possuir cerca de 140 espécies das 1.000 conhecidas no mundo, sendo 3 hematófagas, 87 insetívoras, 49 frugívoras e nectarívoras e 5 carnívoras, pouco se sabe sobre os vírus que esses animais mantêm e dispersam na natureza. Entre os estudos sobre vírus encontrados em morcegos coletados em diferentes regiões do País até o momento, há a descrição de adenovírus, bunivírus, paramixovírus e coronavírus (Calisher et al., 1982; Wanzeller et al., 2002; Wang et al., 2007; Brandão et al., 2008; Lima et al., 2013a; 2013b).

1.2. Objetivos gerais

- Detecção dos principais vírus RNA e DNA em amostras biológicas de diferentes espécies de morcegos encontrados no Rio Grande do Sul;
- Contribuir para monitoramento e controle de infecções virais emergentes transmitidas por estes morcegos.

1.2.1 Objetivos específicos

- Desenvolvimento e padronização de métodos para extrair ácidos nucléicos virais em amostras de morcegos;

- Desenvolver e otimizar métodos de amplificação de DNA e RNA para detecção;

- Identificação de vírus emergentes em amostras biológicas de morcegos insetívoros, frugívoros e hematófagos do estado do Rio Grande do Sul.

2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Morcegos: Aspectos Ecológicos e Biológicos

Há, atualmente mais de 4600 espécies de mamíferos conhecidas (Classe *Mammalia*). A maior ordem dentro desta classe consiste dos roedores (Ordem *Rodentia*), com mais de 2000 espécies descritas até o momento.

Os morcegos representam a segunda maior ordem dentro dos mamíferos(Ordem *Chiroptera*), tendo sido descritas mais de 930 espécies de morcegos, os quais representam 20% de todas as espécies de mamíferos (Teeling et al., 2005). Há duas subordens dentro da ordem *Chiroptera*: *Megachiroptera* e *Microchiroptera*. *Pteropodidae* (raposas voadoras) é a única família dentro da subordem *Megachiroptera* (166 espécies) e alimentam-se, principalmente, de frutas (Maryanto et al., 2012). Há 16 famílias dentro da subordem *Microchiroptera* (mais de 760 espécies) com grande diversidade biológica e ecológica (Simmons, 2005).

Morcegos são encontrados em todos os continentes, exceto nas regiões polares e algumas ilhas oceânicas. Representantes da subordem *Megachiroptera* ocorrem na Oceania e Ásia, enquanto que os membros da subordem *Microchiroptera* apresentam distribuição mundial.A natureza de sua dieta é igualmente diversa, variando de plantas, insetos, animais e são

osúnicos entre os mamíferos ao se alimentarem também de sangue.

A diversidade das espécies de morcegos, e algumas de suas características biológicas e ecológicas, os permite tornarem-se os hospedeiros de um grande número de agentes infecciosos de importância médica (Dobson, 2005). A maioria das espécies possuem hábitos noturnos e buscam por abrigo durante o dia. Algumas poucas espécies possuem hábitos diurnos. Os seus abrigos podem abranger de um ambiente natural a construções feitas pelo homem e podem ser temporários ou permanentes. Abrigos naturais podem ser encontrados em cavernas, fendas de rochas, ninhos de pássaros, cavidades em árvores ou podem ficar expostos nos galhos de árvores. Habitats feitos pelo homem incluem: minas, túmulos, edifícios, pontes, entre outros. A ocupação em habitats construídos pelo homem pode levar os morcegos à uma associação mais próxima com humanos, seus animais de companhia ou de produção (Kunz et al., 2005). O potencial impacto disto é constatado na transmissão de alguns patógenos, tais como o vírus da raiva de morcegos peri domésticos a humanos e ao rebanho (Badrane & Tordo, 2001). O número de morcegos em cada colônia varia enormemente, desde menos de 10 a até 200 000 indivíduos. O grande número de indivíduos, junto aos seus hábitos sociais, como lambeduras, relações mútuas e mordidas durante a cópula, facilitam a transmissão de agentes infecciosos entre eles, através do contato direto, aerossóis ou vetores artrópodes (Calisher et al., 2006).

Quanto aos seus hábitos alimentares, estes podem ser divididos em insetívoros, carnívoros, onívoros e sanguívoros. O hábito de se alimentar de

sangue está limitado a apenas três espécies de morcegos hematófagos, *Desmodus rotundus*, *Diphylla ecaudata* e *Diaemus youngi*, todos pertencendo à família *Phyllostomidae* e encontrados somente na América Latina (Neuweiler, 2000). A dieta dos morcegos pode não ter relação direta com a natureza dos patógenos que eles carregam, já que o mesmo grupo de agentes infecciosos pode ser carregado por diferentes espécies de morcegos com diferentes hábitos alimentares. Entretanto, a busca por alimentos pode trazer certos morcegos ao contato mais próximo com humanos e outros animais, assim, facilitando a transmissão interespecie de agentes infecciosos (Dobson, 2005). Tais interações frequentemente ocorrem como um resultado de perturbações no ambiente natural ou artificial e tem sido implicados na transmissão dos vírus Nipah, vírus da raiva e o vírus Ebola aos primatas (Aguilar-Setien et al., 2005; Pourrut et al., 2007; Epstein et al., 2008).

Morcegos têm a habilidade de voar por longas distâncias a partir do local de abrigo em busca por alimento. Ao confrontar o inverno, ou a falta de alimentos, os morcegos podem hibernar ou migrar. A migração sazonal foi observada em morcegos que habitam ambientes temperados e tropicais, e reflete substanciais mudanças sazonais no suprimento de alimento e/ou temperatura (Speakman & Thomas, 2003). A distância máxima de migração de espécies de morcegos já estudadas varia de 200-300 km a quase 2000 km.

Apesar de serem, em sua maioria, animais pequenos, os morcegos têm uma vida relativamente longa. Muitas espécies vivem por mais de 10-20 anos e algumas espécies vivem por mais de 30 anos no ambiente silvestre. A

longevidade do hospedeiro facilita a persistência de agentes infecciosos em morcegos e assim, aumenta a chance de disseminação natural ou acidental em novas áreas geográficas (Fleming & Eby, 2003).

Dentre os hospedeiros vertebrados de patógenos zoonóticos, os morcegos são considerados menos importantes do que os ungulados, carnívoros, roedores e primatas, em termos de prevalência (Woolhouse & Gowtage-Sequeria, 2005). No entanto, os morcegos podem albergar (e excretar) um número relativamente grande de patógenos potenciais conhecidos (O'Shea et al., 2014). A transmissão de vírus dos morcegos ao homem pode ocorrer de muitas formas, sendo o contato direto através de mordeduras e arranhões os exemplos mais evidentes. Vetores artrópodes podem servir como um modo alternativo de transmissão de patógenos entre morcegos e humanos. Importantes categorias de artrópodes incluem: mosquitos, moscas, e ectoparasitas infestando morcegos, tais como carrapatos, piolhos e pulgas. Insetos podem se alimentar tanto em morcegos quanto em humanos, como já demonstrado em estudos entomológicos e virológicos (Lampo et al., 2000). Ainda não há evidências que impliquem um papel ativo desses vetores na transmissão de doenças, provavelmente pela falta de combinações eficientes vetor-patógeno ou especificidade hospedeira dos vetores.

2.2 Vírus RNA identificados em morcegos e patogênicos aos humanos

2.2.1 Coronaviridae

Os coronavírus (CoVs) são membros da família *Coronaviridae*, a qual é dividida em duas subfamílias, *Torovirinae* e *Coronavirinae*. A subfamília *Coronavirinae* é dividida nos gêneros *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Deltacoronavirus* e *Gammacoronavirus* (Woo et al., 2012). São vírus envelopados, contendo um genoma de RNA de fita simples e polaridade positiva. Seus genomas possuem, aproximadamente 27 a 32 kb de comprimento, contendo de 7 a 14 fases de leitura aberta (ORFs) (Woo et al., 2009). Seis principais ORFs codificam o complexo polimerase (ORF1a e ORF1b), a glicoproteína spike (S), a proteína do envelope (E), a glicoproteína de membrana (M) e a proteína do nucleocapsídeo (N) presentes em todos os coronavírus (Poon et al., 2005). Coronavírus são conhecidos por terem diversos animais hospedeiros, desde mamíferos a espécies de aves (Woo et al., 2012).

Infecções por coronavírus humanos são comumente causadas pelos coronavírus humanos 229E e OC43, os quais resultam normalmente no resfriado comum (Chu et al., 2009). Porém, os coronavírus se tornaram foco de pesquisa desde a epidemia global da Síndrome Respiratória Severa Aguda (SARS), causada pelo SARS-CoV. Os primeiros casos de SARS, cuja etiologia era desconhecida, ocorreram no final de 2002 no sudoeste da China, quando um funcionário de um restaurante teve contato prévio com animais silvestres, que foram servidos como iguaria nesta localidade (Zhong et al., 2003). A partir

desse primeiro caso da infecção, outros casos de pneumonia atípica grave, com alto índice de contaminação entre os familiares e profissionais de saúde que os atendiam, foram relatados. Um nefrologista de Guangdong que viajou para Hong Kong pode ter sido o responsável pela disseminação do vírus pelo continente asiático; esse paciente evoluiu para uma deficiência respiratória grave e morte no hospital de Hong Kong (Chim & Lo, 2004).

A emergência dessa nova infecção viral, junto ao histórico de contatos entre os pacientes na mesma região, levou à busca por um animal que fosse o reservatório do SARS-CoV (Guan et al., 2003). Os mercados de varejo de animais vivos na região dos surtos foram investigados e evidências de infecção foram encontradas nas civetas do Himalaia (*Paguma larvata*), em furões chineses (*Melogale moschata*) e em cães guaxinim (*Nyctereutes procyonides*) (Guan et al., 2003). Evidências posteriores de transmissão zoonótica de SARS-CoV vieram de estudos que mostraram que negociantes de animais silvestres e funcionários de abatedouros apresentavam soroprevalência significativamente maior contra SARS-CoV (20 a 45%) do que aquelas pessoas que negociavam vegetais e populações controle (0 a 5%) (Kuiken et al., 2003; Martina et al., 2003; McCaullife et al., 2004; Greenough et al., 2005; Roberts et al., 2005).

Após evidências de que animais silvestres, que são utilizados no consumo humano, foram a principal fonte de infecção do SARS-CoV, medidas de controle durante a epidemia de SARS na China foram tomadas, com a restrição nas vendas e consumo destes animais. Ao contrário de outros

patógenos zoonóticos que possuem dificuldade em cruzar a barreira interespecie, o SARS-CoV é notável por disseminar-se prontamente, inclusive de pessoa à pessoa (Chim & Lo, 2004). Essa foi uma característica proeminente durante a epidemia de SARS, na qual, pelo menos, 1/5 de todos os casos da doença no mundo foi identificado em trabalhadores da área da saúde (Yang et al., 2004).

O aparecimento repentino do SARS-CoV foi, como dito acima, inicialmente relacionado às civetas e animais silvestres relacionados que eram consumidos e vendidos nos mercados do sudoeste da China (Guan et al., 2003; Zhong et al., 2003). Estudos posteriores, entretanto, não confirmaram uma frequência significativa de soropositivos ou mesmo portadores do vírus entre as civetas selvagens ou de cativeiro, sugerindo que essa espécie não era o reservatório primário do SARS-CoV na natureza. Pelo contrário, esses resultados indicavam que as civetas eram um hospedeiro secundário que serviu para amplificar a carga viral e, por estarem em amplo contato com humanos, proporcionaram a transmissão aos mesmos (Li et al., 2005).

A busca pelo reservatório primário do SARS-CoV levou à procura por coronavírus entre outros animais silvestres e morcegos do Sudeste Asiático. Um betacoronavírus foi detectado em morcegos “horseshoe” (*Rhinolophus sinicu*) em Hong Kong, o qual é, atualmente, chamado “bat SARS-CoV” (Lau et al., 2005). Estudos posteriores demonstraram que esse vírus apresenta uma identidade de, aproximadamente 90% a nível de nucleotídeos com relação ao SARS-CoV. A partir daí assumiu-se que os

morcegos poderiam servir como um reservatório natural do SARS-CoV e que as civetas adquiriram o vírus a partir dos morcegos, passando assim, aos humanos (Chu et al., 2008).

Recentemente, um novo coronavírus relacionado a infecções respiratórias graves de humanos vem causando preocupação na comunidade científica. Esse vírus foi identificado no Oriente Médio em 2012 (MERS-CoV), e até o momento infecções foram confirmadas em 572 pessoas no mundo, com letalidade de 30 % (Lin et al., 2014). Esse vírus é filogeneticamente relacionado ao SARS-CoV e, aparentemente, o reservatório intermediário desse vírus seriam dromedários, embora estudos epidemiológicos demonstraram a presença de um betacoronavírus com 100% de identidade nucleotídica ao MERS-CoV em amostras de fezes de uma espécie de morcego na Arábia Saudita (Memish et al., 2013). É provável que os reservatórios principais do MERS-CoV sejam, assim como no caso do SARS-CoV, morcegos (Memish et al., 2013).

A partir dos surtos de infecções pelo SARS-CoV e antes da emergência do MERS-CoV, pelo menos 30 coronavírus previamente desconhecidos de humanos, encontrados em vários reservatórios animais foram descritos em anos recentes, incluindo CoVs relacionados ao SARS e CoVs de todos os quatro gêneros da subfamília *Coronavirinae* (Woo et al., 2012). Esses estudos tem auxiliado na melhor compreensão sobre a diversidade e complexidade dos CoVs (Woo et al., 2009). Pelo fato de novos coronavírus terem sido detectados em diversas espécies de morcegos em diferentes continentes, pode-se sugerir que eles são, provavelmente, uma fonte

de introdução de CoV em outras espécies e que, possivelmente, tem um papel importante na ecologia e evolução dos CoVs (Chu et al., 2008).

2.2.2 Paramyxoviridae

A família *Paramyxoviridae*, da ordem *Mononegavirales*, compreende vírus de RNA de fita simples não-segmentado e polaridade negativa responsáveis por inúmeras doenças em animais e humanos. São vírus envelopados e seu genoma pode variar de 15-19 kilobases, contendo de 6 a 10 genes que codificam as três principais proteínas que formam o complexo da RNA polimerase dependente de RNA (RdRp), a proteína do nucleocapsídeo (N), a fosfoproteína (P) e a proteína (L) da subunidade catalítica da RdRp. Além disso, também foram identificadas a proteína de fusão (F), a hemaglutinina (H), a hemaglutinina-neuranimidase (HN) e a proteína G, que tem atividade de adesão, mas sem atividade de hemaglutinação, ou neuranimidase (McCarthy & Goodman, 2010).

Os paramixovírus são patógenos comuns dos humanos. Representantes importantes incluem membros dos gêneros *Respirovirus* (vírus da parainfluenza humana 1 e 3), *Rubulavirus* (vírus da parainfluenza humana tipo 2 e 4 e o vírus da caxumba), *Morbillivirus* (vírus do sarampo) e *Metapneumovirus* (Rima et al., 1995). Um dos primeiros paramixovírus identificados em morcegos foi o Vírus da parainfluenza do tipo 2, a partir do morcego frugívoro *Rousettus leschenaulti*, na Índia (Pavri et al., 1971). O vírus Mapuera foi o segundo paramixovírus isolado de um morcego da espécie (*Sturnira lilium*), no Brasil, em 1979. Ambos não causam infecções em

humanos (Henderson et al., 1995). A importância dos paramixovírus em morcegos, entretanto, tornou-se evidente nos anos 90, com a ocorrência de dois surtos em humanos e animais. Com isto, um novo gênero, *Henipavirus*, foi proposto para abranger estes dois paramixovírus que são patogênicos aos humanos, denominados Hendra e Nipah (Baldock et al., 1996; Chua et al., 2000). Os primeiros surtos causados por esses dois vírus estão descritos a seguir.

Em 1994, um surto fatal de uma síndrome respiratória hiperaguda ocorreu em cavalos em Queensland, Austrália. Dois homens (o tratador do cavalo, e o veterinário que realizou a necropsia) que tiveram contato com esses cavalos, foram infectados e desenvolveram uma doença semelhante à influenza. Eles faleceram por falhas respiratória e renal, e um vírus foi isolado dos pacientes, assim como dos cavalos, e depois chamado Hendra vírus (HeV) (Selvey et al., 1995; Baldock et al., 1996). Após os surtos iniciais das infecções pelo HeV, uma investigação sorológica na Austrália, envolvendo 5264 soros de 46 espécies de animais terrestres, falhou em mostrar qualquer evidência de infecção por este novo vírus. Entretanto, soropositividade foi detectada em morcegos frugívoros da família *Pteropodidae*, conhecidos como “raposas voadoras” (Young et al., 1996; Halpin et al., 2000; Field et al., 2001). Posteriormente, uma análise retrospectiva em soros de morcegos mostrou que o vírus estava circulando nesses animais antes de 1982 e, em algumas investigações, uma soroprevalência maior que 50% foi documentada (Field et al., 2001). Como acontece com muitas infecções associadas a morcegos, o

vírus Hendra não causa doença ou patologia em morcegos. A rota de transmissão dos morcegos “raposas voadoras” aos cavalos não foi concretamente estabelecida, entretanto, a exposição à urina infectada foi considerada possível. A rota de transmissão aos humanos, já que estes desenvolveram a síndrome após o contato com cavalos, provavelmente foi o contato com secreções respiratórias dos animais (Field, 2005).

Em 1999, um surto de encefalite ocorreu, inicialmente em criadouros de suínos na Malásia. O agente etiológico desta doença era um novo paramixovírus, chamado Nipah vírus (NiV), que, após infectar humanos, foi isolado do fluido cérebro-espinhal dos pacientes. Pelo menos 265 humanos foram envolvidos no surto, com uma taxa de letalidade de 40%, sendo que 15% dos sobreviventes apresentaram déficits neurológicos (Chua et al., 2000). O surto em humanos foi precedido de mortes súbitas e massivas de porcos, devido a uma síndrome respiratória e encefalite. Um contato próximo com os suínos infectados foi confirmado como o principal fator de risco para aquisição da infecção (Chua et al., 2000; Goh et al., 2000). A presença do vírus em secreções respiratórias e urina de suínos infectados sugeriu que o contato com estas secreções é a provável rota de transmissão. Entretanto, aproximadamente 8% dos pacientes não possuíam um histórico de contato com suínos. Sendo assim, cães eram suspeitos de ser um possível vetor para a transmissão, já que eles também podem ser infectados pelo NiV (Mills et al., 2009). O controle desse surto foi obtido somente após o abate de mais de um milhão de suínos (Johara et al., 2001).

Estudos de vigilância sobre a vida selvagem identificaram as raposas voadoras da Malásia (*Pteropus vampyrus* e *Pteropus hypomelanus*) como prováveis hospedeiros naturais de NiV (Johara et al., 2001). Estudos subsequentes também encontraram evidências sorológicas de infecção por NiV em diferentes espécies de raposas voadoras na Índia, Cambódia e em Bangladesh (Olson et al., 2002; Hsu et al., 2004; Wacharapluesadee et al., 2005). Após os surtos de NiV na Malásia, cinco outros surtos de uma doença associada ao NiV foram descritas em Bangladesh entre 2001 e 2005, levando a óbito 78 pacientes dos 122 casos reconhecidos pelos órgãos de saúde de Bangladesh (Hsu et al., 2004; Harcourt et al., 2005). Muitas das características do surto ocorrido em Bangladesh foram semelhantes às aquelas que ocorreram na Malásia: reconhecimento tardio, apresentação de sintomatologia febril e neurológica e um alto índice de letalidade. Por outro lado, o surto em Bangladesh não foi associado com doenças em suínos e evidências indicaram transmissão humana horizontal. Além disso, o padrão do surto de Bangladesh sugeriu uma ocorrência esporádica e geograficamente dispersa da infecção em humanos (Harcourt et al., 2005). Essa ocorrência dispersa pode estar ligada à possibilidade, ainda não comprovada, de uma transmissão direta entre morcegos e humanos através da exposição acidental aos morcegos ou às suas secreções. Embora o vírus tenha sido detectado em amostras de urina de morcegos da região, o NiV não foi associado à doença clínica nessas espécies (Eaton et al., 2006).

A descoberta dos henipavírus teve um significativo impacto na compreensão da diversidade genética, evolução viral e alcance de hospedeiros pelos paramixovírus. Paramixovírus, como o vírus do sarampo e da cinomose, são tradicionalmente considerados por terem uma estreita gama de hospedeiros e por apresentarem características genômicas semelhantes (Lamb & Parks, 2007). Os henipavírus mudaram este paradigma em todos os sentidos, já que podem infectar uma gama hospedeira mais ampla e possuem um genoma significativamente maior do que outros gêneros dessa família (Eaton et al., 2007).

Além dos *Henipavirus* outros paramixovírus foram identificados em morcegos, embora com menor impacto na saúde de outros animais e de humanos. Em 1997, porcas em Nova Gales do Sul, na Austrália, apresentaram uma queda na taxa de prenhez e também no tamanho da ninhada. Houve um aumento de leitões mumificados e deformados. Os leitões afetados apresentavam uma severa degeneração do sistema nervoso central e alguns, miocardite (Philbey et al., 1998). Subsequentemente, um novo vírus - chamado vírus Menangle- foi isolado de leitões infectados. Dentre as 251 pessoas que tinham contato com os suínos nas granjas, duas eram soropositivas para o vírus. Ambos os pacientes desenvolveram uma doença febril, com dor de cabeça, mal-estar, mialgia e erupções cutâneas, sem qualquer sequela a longo prazo (Chant et al., 1998). As “raposas voadoras” *Pteropus policephalus* e *P. alecto* foram soropositivas para o vírus Menangle. A rota de transmissão do vírus Menangle a partir dos morcegos aos suínos e humanos ainda é

desconhecida. O sequenciamento completo do genoma do Menangle confirmou sua posição na família *Paramyxoviridae* (Philbey et al., 1998; Philbey et al., 1999; Westenberg et al., 1999).

Como resultado do aumento da vigilância para vírus associados a morcegos no sudoeste asiático e Oceania, dois outros paramixovírus foram descritos: o vírus Tioman e o vírus Cedar. O vírus Tioman foi isolado da urina do morcego *Pteropus hypomelanus*, na Malásia (Chua et al., 2001). Com base na identificação da sequência de nucleotídeos, esse vírus foi classificado no gênero *Rubulavirus* (Chua et al., 2002). Infecções em humanos por este vírus ainda não foram descritas. O vírus Cedar foi isolado em células de cultivo primário de rins de morcegos, a partir de amostras de urinas da espécie *Pteropus alecto* (Marsh et al., 2012). Estudos de infecção experimental em camundongos e cobaias mostraram que esse vírus não se multiplica nessas espécies, o que descarta, até o momento, a hipótese de que ele possa atravessar a barreira interespecie (Marsh et al., 2012).

2.2.3 Filoviridae

Os filovírus, conhecidos por causarem infecções fatais em humanos, pertencem a dois gêneros: *Marburgvirus* e *Ebolavirus*. Este último contém quatro espécies: Sudan, Zaire, Reston e Costa do Marfim. Pertencem à família *Filoviridae*, ordem *Mononegavirales*. O vírion é pleomórfico, produzindo tanto as formas em “U”, a forma em “6” ou também circular, mas as formas predominantes do vírion, observadas por microscopia eletrônica, são de longas estruturas tubulares. Eles contêm uma molécula de RNA de fita simples e

polaridade negativa de 19 kb(Kuhn et al., 2011). Ambos os gêneros *Marburgvirus* e o *Ebolavirus* são endêmicos na África, exceto pelo Ebola Reston que foi identificado nos Estados Unidos, na cidade de Reston, em primatas importados das Filipinas (Barrete et al., 2009). Esses vírus causam tipicamente uma febre hemorrágica em humanos, com alta letalidade (até 90 %).

O mais recente surto de febre hemorrágica causada pelo vírus Ebola (EBOV) começou em março de 2014, atingindo países como Libéria, Guiné e Serra Leoa, na África Ocidental. Este é considerado um dos piores surtos de Ebola na história, pois já provocou mais de 300 fatalidades, entre 413 casos suspeitos até o momento (CDC, 2014). Amostras de sangue obtidas de pacientes infectados durante esse surto confirmam, através da análise filogenética completa do vírus, que ele forma um grupo separado dos EBOV já caracterizados em Guiné, mas com estreita relação (97% de identidade) com outras cepas de EBOV conhecidas (vírus Ebola - Zaire, por exemplo). Sugere-se que o vírus da Guiné evoluiu em paralelo com cepas da Republica Democrática do Congo e Gabão (Baize et al., 2014).

Infecções em humanos devido aos filovírus, tipicamente, ocorrem em surtos, devido à transmissão interpessoal e nosocomial, com índices de letalidade que podem alcançar 75 a 90 % (Pourrut et al., 2005). As infecções humanas, na maioria dos casos, foram associadas ao contato com primatas não-humanos que, geralmente, adoecem ou morrem como resultado da infecção pelo filovírus. Os primatas, entretanto, não são considerados

reservatórios importantes na natureza, uma vez que eles normalmente morrem da infecção. Estudos epidemiológicos sugeriram que os surtos de infecção por filovírus em humanos, provavelmente, não ocorreram como resultado de uma transmissão direta interespecie com primatas, mas sim, devido ao contato indireto com um animal desconhecido, até o momento (Swanepoel et al., 1996).

As primeiras evidências de que morcegos poderiam estar envolvidos na cadeia de transmissão de filovírus surgiram com um estudo em que 19 espécies de vertebrados e invertebrados foram inoculadas experimentalmente com *Ebolavirus*. Nesse trabalho foi observado que tanto morcegos insetívoros quanto frugívoros podem replicar e disseminar esse vírus (Swanepoel et al., 1996). Desde então, as pesquisas se direcionaram aos morcegos como potenciais reservatórios de *Ebolavirus*. De fato, um estudo sorológico revelou a presença de anticorpos específicos para o vírus Ebola-Zaire em seis espécies de morcegos capturadas (*Epomops franqueti*, *Hypsignathus monstrosus*, *Myonycteris torquata*, *Micropteropus pusillus*, *Mops condylurus* and *Rousettus aegyptiacus*) (Pourrut et al. 2005). Posteriormente, sangue e tecidos de 44 espécies de morcegos do Sudão e Congo foram coletados e estudos de detecção, de patogenicidade e de inoculação experimental foram realizados para melhorar a compreensão dos ciclos de transmissão dos filovírus a partir desses animais (Leroy et al., 2009).

Sequências de ácidos nucleicos de filovírus também foram encontradas em três espécies de morcegos frugívoros durante surtos de febre hemorrágica entre os anos de 2001 e 2003 no Gabão e na República do Congo

(Leroy et al., 2005). Essa indicação de circulação de filovírus nesses morcegos foi corroborada em um estudo retrospectivo em que amostras coletadas na mesma região entre 1998 e 2000 foram analisadas. Nessa época, houve um surto de febre hemorrágica em humanos por *Marburgvirus*, também na República do Congo. Esse surto foi caracterizado por ocorrências de infecções em trabalhadores de uma mina, na qual um grande número de morcegos estava presente (Swanepoel et al., 2007). Diversas linhagens genéticas do vírus Marburg foram detectadas em morcegos frugívoros (*Rhinolophus aegypticus*), e em duas espécies de morcegos insetívoros encontrados na mina (*Rhinolophus eloquens* e *Miniopterus inflatus*). Além disso, estas linhagens correspondiam às isoladas de humanos que trabalhavam na mina (Muyembe-Tamfum et al., 2012).

Recentemente, um terceiro gênero dentro da família *Filoviridae* foi sugerido em estudos realizados em um distinto nicho geográfico, o que sugere uma grande diversidade e potencial de distribuição dos filovírus. Trata-se do *Cuevavirus*, que foi detectado em amostras de morcegos insetívoros (gênero *Myotis*) na Espanha. Este novo vírus possui 74% de identidade com o *Ebolavirus* Zaire e estudos histopatológicos, feitos a partir de tecidos dos morcegos infectados, demonstraram que este vírus é patogênico aos morcegos, diferentemente do *Marburgvirus* e *Ebolavirus* (Negredo et al., 2011).

Apesar de demonstrada a presença do ácido nucleico do EBOV, ou mesmo de anticorpos anti-virais em morcegos, o vírus nunca foi isolado a partir deles, ou de qualquer outro possível animal reservatório até o momento.

Entretanto, o isolamento de *Marburgvirus* a partir de morcegos frugívoros (Towner et al., 2009) reforça a suposição de que os morcegos são fortes candidatos a reservatórios de EBOV. Baseado nesta hipótese, um modelo de disseminação do vírus foi proposto. Neste, os morcegos poderiam transmitir o vírus diretamente aos humanos e primatas não humanos, ou através de um vetor desconhecido (Muyembe-Tamfum et al., 2012).

2.3 Vírus DNA detectados em morcegos e objetos de estudo neste trabalho

2.3.1 *Circoviridae*

Os membros da família *Circoviridae* são conhecidos por infectar uma ampla gama de hospedeiros vertebrados. São vírus não-envelopados, com diâmetro variando de 17 a 24 nm e genoma de DNA circular de fita simples, que varia de 1,7 a 2kb (Fauquet & Fargette, 2005).

A família *Circoviridae* contém dois gêneros bem caracterizados: *Gyrovirus* e *Circovirus* e somente recentemente foi incluído um novo gênero, nomeado *Cyclovirus*. No gênero *Gyrovirus* estão classificados o vírus da anemia das galinhas (CAV), o gyrovírus aviário tipo 2 (AGV2) e o gyrovírus humano tipo 1 (HGV1) (Noteborn et al., 1991; dos Santos et al., 2011; Rijsewijk et al., 2011; Sauvage et al., 2011). *Gyrovirus* possuem genoma em sentido negativo, ao contrário dos *Circovirus*, que possuem genoma codificado por dupla polaridade (positivo e negativo). Esses vírus possuem duas fases de leitura abertas (ORFs) organizadas inversamente e responsáveis por codificar

as proteínas replicase (Rep) e do capsídeo (Cap). Essas ORFs são separadas por uma região 3' intergênica entre os códons de terminação e uma região 5' intergênica entre os códons de iniciação (Li et al., 2010).

Até o momento, apenas dois circovírus demonstraram ser capazes de replicar extensivamente mamíferos, os circovírus suíno tipos 1 e 2 (PCV1 e PCV2). Desses, o PCV1 é considerado não-patogênico, enquanto a infecção pelo PCV2 pode ser tanto assintomática, quanto causar uma variedade de sinais clínicos com um significativo impacto econômico (Opriessnig et al., 2007; Grau-Roma et al., 2011).

Estudos de metagenômica, utilizando técnicas de sequenciamento de alto desempenho, levaram à detecção de pequenos genomas circulares de DNA contendo o gene *rep* a partir de amostras de mamíferos e de insetos. Entretanto, estas detecções não estavam associadas a qualquer doença nos indivíduos analisados (Li et al., 2010; Ge et al., 2011). Muitos desses genomas são semelhantes aos circovírus, mas filogeneticamente diferentes dos circovírus aviários e suínos (Ge et al., 2011). Suas diferenças filogenéticas permitiram aos pesquisadores agrupá-los no novo gênero *Cyclovirus*, o qual possui um genoma bem menor que os outros gêneros (aproximadamente 1,7kb). Nesses vírus os genes *rep* e *cap* são menores, com uma curta, ou nenhuma região 3' intergênica e uma região 5' intergênica maior (Li et al., 2010).

Abordagens moleculares utilizando PCR *consensus* direcionadas à região *rep*, conservada entre os circovírus e os cyclovirus, demonstrou a

presença destes vírus em fezes humanas do Paquistão, Tunísia e Nigéria, assim como em amostras de chimpanzés africanos, sendo que estas detecções não estavam associadas a qualquer doença nos indivíduos analisados (Li et al., 2011). DNA de ciclovírus também foi detectado em amostras de carnes de bovinos, caprinos, frangos e camelos da Nigéria e Paquistão, como também em amostras de carne de suíno nos Estados Unidos (Li et al., 2010, 2011).

Cyclovirus também tem sido identificados em fezes de morcegos dos Estados Unidos e China (Li et al., 2010; Ge et al., 2011). Além disso, foi encontrado também em tecidos musculares de morcegos, o que provavelmente, demonstra a probabilidade de replicação viral nesses animais silvestres (Li et al., 2011).

No mesmo estudo em que ciclovírus foram descritos em fezes de morcegos China, foram encontradas sequencias que formam um novo cladoda família *Circoviridae*, distinto de outras sequencias obtidas de pássaros, suínos, e morcegos da mesma região geográfica. Foi sugerido que essas sequências se agrupam, filogeneticamente, ficando fora do gênero *Cyclovirus* (Ge et al., 2011).

2.3.2 Adenoviridae

Membros da família *Adenoviridae* são vírus não-envelopados, icosaédricos, com aproximadamente 70 a 100 nm de diâmetro. A família é dividida em cinco grupos: *Mastadenovirus*, *Aviadenovirus*, *Atadenovirus*, *Ictadenovirus* e *Siadenovirus*. Seu genoma consiste em uma dupla fita de DNA,

linear, não segmentada, com tamanho variando de 26 a 45 kb (Ariel, 2011).

A infecção pelo adenovírus (AdV) pode ocorrer em mamíferos, aves, anfíbios, répteis e peixes e o seu isolamento já foi obtido a partir de, pelo menos, 40 espécies de vertebrados (Wellehan et al., 2004; Schrenzel, et al., 2005).

Os AdVs são muito prevalentes na população humana e podem causar infecções que variam de doenças respiratórias e conjuntivite à gastroenterites (Vogels et al., 2003). Entre os adenovírus animais importantes, pode-se citar os AdVs caninos tipo 1 e tipo 2, agentes de hepatite, além das síndromes respiratória e entérica em cães (Buonavoglia & Martella, 2007). Em aves, o aviadenovírus EDS-76 é um vírus proeminente, pois é o agente da síndrome da queda da postura, doença economicamente importante que leva a uma queda súbita na postura e na produção de ovos (Li et al., 2010).

O primeiro AdV de morcego foi isolado de um morcego frugívoro da subordem *Megachiroptera* (Maeda et al., 2008). Ainda em 2008, um segundo adenovírus (bat adenovirus2 *Pipistrellus pipistrellus* virus 1 [BtAdV-2 PPV1]) foi identificado a partir de um morcego microquiróptero na Alemanha (Sonntag et al., 2009). Na Ásia, um terceiro vírus, o BtAdV-3, foi isolado de um *Myotis ricketti* (Li et al., 2010). Desde então, quase 30 AdVs de morcegos foram detectados na China, Hungria e Alemanha e nos Estados Unidos através de técnicas moleculares como PCR *consensus* e estudos de metagenômica (Drexler et al., 2011; Janoska et al., 2011; Li et al., 2010).

Estudos iniciais demonstraram que o BtAdV-2 apresenta uma relação filogenética muito próxima ao adenovírus canino (CAdV) (Kohl et al., 2011). Embora muitos AdVs tenham hospedeiro específico restrito, CAdVs tem sido detectados em uma ampla variedade de carnívoros (ursos, lobos, mão pelada e leões marinhos) (Buonovaglia & Martella, 2007; Sonntag et al., 2009). Além disso, em seus respectivos hospedeiros, os CAdVs são mais patogênicos que a maioria dos outros adenovírus. Estas observações levam à hipótese, ainda não confirmada, da ocorrência de que tenha havido uma transmissão interespecie de um AdV de morcegos a carnívoros, com a posterior adaptação do vírus ao novo hospedeiro (Kohl et al., 2011). O uso da ferramenta de metagenômica para detecção de novos vírus em fezes de morcegos tem permitido concluir que os BtAdVs estão presentes em uma ampla variedade de espécies de morcegos (de microquirópteros a morcegos frugívoros). Entre as espécies observadas, os AdVs tem sido encontrados mais frequentemente no gênero *Myotis*. Além disso, a comparação entre as sequências de AdVs obtidas em diferentes espécies de *Myotis sp.* ou mesmo entre indivíduos da mesma espécie em um mesmo local, demonstra que esses vírus apresentam uma grande diversidade genética. Esta diversidade viral em morcegos que ocorrem em um mesmo local tem sido descrita como uma característica de vírus de morcegos, e é raramente observada em outros vírus animais, à exceção de vírus RNA (Tang et al., 2006; Chu et al., 2008; Zhu et al., 2009).

Estudos histopatológicos, aliados a ferramentas moleculares, indicam que o BtAdV-2 pode estar associado tanto a um curso de infecção inaparente

até infecções entéricas em morcegos. Como existem muitos outros AdVs de vesperilionídeos similares a BtAdV-2 e BtAdV-3, a hipótese mais óbvia é que os CAdVs originaram-se a partir dos AdVs de morcegos por uma troca de hospedeiros em algum ponto no passado, já que a adaptação incompleta no novo hospedeiro é consistente com a alta patogenicidade do CAdV-1 e com a facilidade com que este pode cruzar a barreira entre espécies de carnívoros (Kohl et al., 2011).

3.MATERIAL E MÉTODOS

Os materiais e os métodos específicos para cada um dos experimentos desenvolvidos nesta pesquisa estão descritos nos respectivos artigos, apresentados nos resultados desta tese.

Este estudo foi realizado na cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul nos Laboratórios de Virologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) (Lab. 208) e de Virologia do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF) em Eldorado do Sul, Rio Grande do Sul.

4.RESULTADOS

Os resultados deste trabalho estão apresentados na forma de artigos científicos. Os subtítulos deste capítulo correspondem aos títulos dos artigos publicados e do artigo formatado de acordo com as normas do periódico escolhido para submissão.

4.1. Detection of Alphacoronavirus in velvety free-tailed bats (*Molossus molossus*) and Brazilian free-tailed bats (*Tadarida brasiliensis*) from urban area of Southern Brazil.

Lima FE, Campos FS, Kunert Filho HC, Batista HB, Carnielli P Jr, Cibulski SP, Spilki FR, Roehe PM, Franco AC. Detection of Alphacoronavirus in velvety free-tailed bats (*Molossus molossus*) and Brazilian free-tailed bats (*Tadarida brasiliensis*) from urban area of Southern Brazil.

Virus Genes. 2013 Aug;47(1):164-7. doi: 10.1007/s11262-013-0899-x.

Abstract

A survey was carried out in search for bat coronaviruses in an urban maternity roost of about 500 specimens of two species of insectivorous bats, *Molossus molossus* and *Tadarida brasiliensis*, in Southern Brazil. Twenty-nine out of 150 pooled fecal samples tested positive by reverse transcription-PCR contained fragments of the RNA-dependent RNA polymerase gene of coronavirus-related viruses. The sequences clustered along with bat alphacoronaviruses, forming a subcluster within this group. Our findings point to the need for risk assessment and continued surveillance of coronavirus infections of bats in Brazil.

Detection of *Alphacoronavirus* in velvety free-tailed bats (*Molossus molossus*) and Brazilian free-tailed bats (*Tadarida brasiliensis*) from urban area of Southern Brazil

Francisco Esmalle de Sales Lima · Fabrício Souza Campos · Hiran Castagnino Kumert Filho · Helena Beatriz de Carvalho Ruthner Batista · Pedro Carnielli Júnior · Samuel Paulo Cibulski · Fernando Rosado Spilki · Paulo Michel Roehle · Ana Cláudia Franco

Received: 2 January 2013 / Accepted: 6 March 2013
© Springer Science+Business Media New York 2013

Abstract A survey was carried out in search for bat coronaviruses in an urban maternity roost of about 500 specimens of two species of insectivorous bats, *Molossus molossus* and *Tadarida brasiliensis*, in Southern Brazil. Twenty-nine out of 150 pooled fecal samples tested positive by reverse transcription-PCR contained fragments of the RNA-dependent RNA polymerase gene of coronavirus-related viruses. The sequences clustered along with bat alphacoronaviruses, forming a subcluster within this group. Our findings point to the need for risk assessment and continued surveillance of coronavirus infections of bats in Brazil.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s11262-013-0899-x) contains supplementary material, which is available to authorized users.

F. E. S. Lima (✉) · F. S. Campos · A. C. Franco
Virology Laboratory, Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Institute of Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Rua Samento Leite 500, Porto Alegre, RS CEP 90050-170, Brazil
e-mail: esmalle.sales@gmail.com

H. C. Kumert Filho · S. P. Cibulski · P. M. Roehle
Institute of Veterinary Research "Desidério Finamor" (IPVDF), Estrada do Conde 6000, Eldorado do Sul, RS CEP 92990-000, Brazil

H. B. C. R. Batista · P. Carnielli Júnior
Pasteur Institute, Avenida Paulista, 393, Cerqueira César, São Paulo, SP CEP 01311-000, Brazil

F. R. Spilki
Molecular Microbiology Laboratory, Feevale University, University Campus II, Novo Hamburgo, RS CEP 93352-000, Brazil

Keywords Coronavirus · Insectivorous bats · RNA-dependent RNA polymerase · Phylogenetic analyses

Bats (order Chiroptera, suborders Megachiroptera and Microchiroptera) are one of the most diverse and widely distributed groups of mammals, representing ~20 % of all known mammalian species [1]. About a 100 different viruses have been identified in bats of different species in Asia, Europe, North America and Africa. Therefore, such species may be natural reservoirs for a large variety of potentially zoonotic RNA viruses, such as lyssaviruses, paramyxoviruses, Ebola and Marburg viruses as well as the recently emerged severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) [2–6]. A variety of other coronaviruses have been detected in many bat species from Asia, including specimens of the genus *Rhinolophus*, which were found to be infected with SARS-like CoV. Phylogenetic analyses of such viruses revealed that those form a large clade within *Betacoronavirus* genus, along with SARS coronaviruses from palm civets and the SARS coronaviruses recovered from humans during the 2003 outbreak [7, 8]. These data suggested that the agent responsible for the 2002–2003 pandemic might have originated from bats. In addition, in 2012, a new human coronavirus (HCoV-EMC), which has been associated to clinical disease that resembles SARS, emerged in the Middle East. This new virus appears to have originated from bats, raising the possibility that HCoV-EMC jumped species directly from bats to humans [9].

In Brazil, most studies looking for associations between bats and viruses have focused on the role for those species as reservoirs for rabies virus [10]. However, to date, more than 160 bat species have been detected in Brazil, comprising members of the families Phyllostomidae, Vespertilionidae, and Molossidae. It is estimated that at least 40 bat species live

in the state of Rio Grande do Sul, Southern Brazil, where the predominantly sub-tropical climate seems to favor the settlement of such species [11].

In view of the potential role that bats may play in the transmission of new viral infections to humans and other species, this study was set up in search for coronavirus genomes in bats from the urban area of Porto Alegre (30°01'59"S; 51°13'48"W), a town with about 1.5 million inhabitants and capital of the state of Rio Grande do Sul, Brazil. With that purpose, coronavirus RNA was searched in feces of two species of synanthropic insectivorous bats collected in a maternity roost within the urban area of the city.

A maternity roost of bats known to have direct contact with people and domestic animals was identified in the summer of 2012 in the attic of a residence in the central area of Porto Alegre, Southern Brazil. The colony was estimated to harbor about 500 bat specimens of insectivorous bats of two species, velvety free-tailed bats (*Molossus molossus*) and brazilian free-tailed bats (*Tadarida brasiliensis*). Speciation was confirmed by amplification and sequencing of the mitochondrial cytochrome b (*cytb*) gene as described [12].

One hundred and fifty fecal samples were collected from the attic floor as follows: a plastic film was spread on the ground of the attic compartment and fresh droppings were collected with clean disposable forks in the following night. Each sample consisted of five fecal droppings, which were immediately sent to the laboratory and stored at -80 °C. The samples were then submitted to total RNA extraction with TRIzol (Invitrogen™). CoV RNA screening was performed by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) in a total volume of 25 µL reaction using conserved primers for the RNA-dependent RNA polymerase gene (forward: 5'-GGTTGGGACTATCCTAAGTGTGA-3' and reverse: 5'-CCATCATCAGATAG AATCATCATA-3'). This pair of primers is expected to give rise to amplicons of 440 bp [7].

The cycling conditions were: 5 min at 94 °C followed by 35 cycles of 1 min at 94 °C, 1 min at 49 °C and 1 min at 72 °C, followed by a final extension time of 5 min at 72 °C. Bovine coronavirus (BCoV) RNA was used as a positive control to optimize the assay. Standard precautions were taken to avoid PCR contamination; blank controls without template were included in every set of five RT-PCR assays. Five microliters of the PCR products were electrophoresed in 1.5 % agarose gels and the products visualized on UV light after staining with ethidium bromide. The amplicons obtained were cloned into pCR® 2.1-TOPO® cloning kit (Invitrogen) before being submitted to nucleic acid sequencing.

Sequencing was performed with the Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems, UK) in an ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer (ABI,

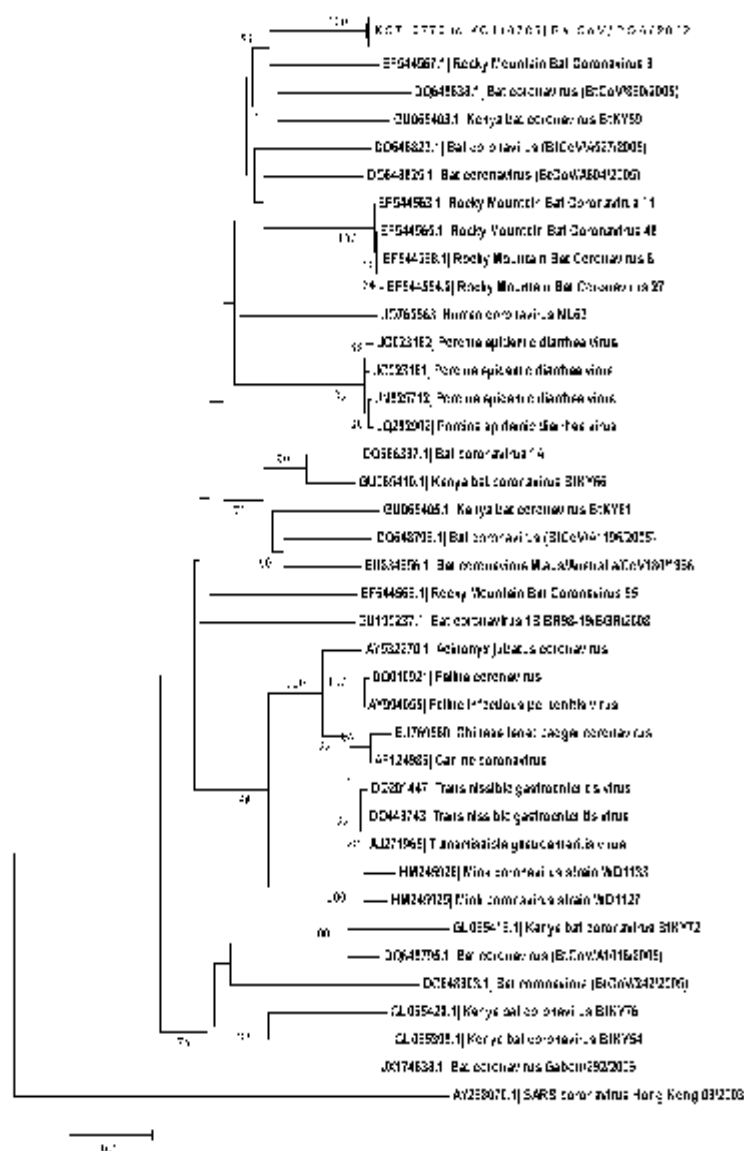
Foster City, CA), following the manufacturer's protocol. Sequence analyses were performed with the BLAST software [13]. Nucleotide sequences were aligned and compared to human and animal CoV sequences available at GenBank database with the program ClustalX 2.0 [14]. Alignments were optimized with the BioEdit Sequence Alignment Editor program version 7.0.9 [15]. The protocol to generate the phylogenetic trees was selected with the program Modeltest 3.7 [16]. Phylogenetic analysis was carried out using MEGA 5.0; pairwise genetic distances were calculated by the Tamura 3-parameter model and phylogenetic trees were constructed using the neighbour-joining method. Bootstrap values were determined by 1,000 replicates to assess the confidence level of each branch pattern.

PCR amplicons with the expected size of the targeted region were obtained from 29 out of the 150 (19.33 %) pools of bat fecal samples. The nucleotide sequences of sixteen randomly selected amplicons were determined and submitted to GenBank (accession numbers KC 110770 to KC 110785). Genetic analyses provided evidence that the viruses circulating in these two species of insectivorous bats belong to the genus *Alphacoronavirus*. When compared with each other, all the obtained sequences showed a high nucleotide and amino acid identity (90.6 to 100 % and 98 to 100 %, respectively) (supplemental material). The *RdRp* sequences examined here were distantly related (<75 % nt identity) to other known alphacoronaviruses. The closest bat coronaviruses *RdRp* sequences found in GenBank were the Asian (BtCoV/A633/2005) and North American (RM-BtCoV 6 and RM-BatCoV 11) bat coronaviruses (Fig. 1). The percentage of nucleotide similarity between the sequences described here and those of Asian and North American coronaviruses ranged from 72.4 to 76 %, whereas at the amino acid level, the similarity ranged from 74 to 81 % (data not shown).

During the last two decades, several studies have shown that various important human and animal pathogens are of bat origin; these species have become targets for several surveillance studies aiming the detection of other potentially pathogenic viruses for humans and other animals. The association of these pathogens and possible disease outbreaks caused by direct or indirect contact of humans with bats stimulated the development of research activities on bat-borne viruses. In addition, the advances of molecular techniques offer opportunities for the discovery of novel DNA and RNA bat viruses without the need for virus isolation and bat pooled fecal samples being used as source for viruses, preventing animal manipulations [17, 18].

In our study, we detected *RdRp* sequences of batCoV at a frequency of 19.33 % in the examined samples; such frequency is comparable to previous results obtained in similar studies from different bat species in other countries (ranging

Fig. 1 Phylogenetic relationship between the nucleotide sequences corresponding to a portion of 440 bp of the RNA-dependent RNA polymerase gene amplified from insectivorous bat species in Porto Alegre, RS, Brazil. Sequences from other alpha and betacoronaviruses were obtained from GenBank (accession numbers in the figure). The tree was generated based on the neighbor joining method in the MEGA program. The nucleotide sequence of the equivalent genome fragment of SARS-CoV was included as outgroup



from 2 to 55 %) [19–25]. The findings reported here demonstrate that the bats in this particular maternity roost are infected by coronaviruses, genomes of which may be detected in their fecal droppings. Due to methodological limitations, we were not able to determine to which bat species the bat CoVs-positive samples belonged. Nevertheless, it becomes clear that such viruses do circulate within bats that share this particular roost. Although all

tested samples clustered within *Alphacoronavirus* genus, the *RdRp* sequences of Brazilian bat CoVs formed a single subgroup within it, yet distinct from previously identified coronavirus *RdRp* sequences recovered from a number of species. Our samples clustered with another known alphacoronaviruses found in *Myotis ricketti* BtCoV/A633/2005, and *Myotis occultus* Rocky Mountain bat coronavirus 6 and 11, reported previously in Asia and North America [18, 24]

(Fig. 1). These results show that similar coronaviruses are found in different bat species that are distributed in geographically distant regions, suggesting a low degree of host restriction for coronavirus in those bat populations.

In contrast to the enormous diversity of CoV genomes found in Old World bats [12, 25], in this study and in several others concerning the CoV detection in New World bats, only alphacoronaviruses were detected [2, 3, 17, 18]. Based on these results, it has been hypothesized that CoVs found in New World bats are less diverse than those detected among Old World bats [26].

In this initial study, samples were restricted in location and variety of bat species, and we found only alphacoronaviruses. Such findings do not reflect data on incidence or prevalence of such infections in bat populations. However, one cannot exclude the possibility that a greater diversity may become apparent in Brazilian bats as long as larger numbers of samples from a wider spectrum of species are examined.

To our knowledge, this is the first report of CoV detection in feces from presumably healthy insectivorous bats in Brazil. However, it is very likely that other bat species might also be infected with similar viruses. Additional studies with larger numbers of bats and bat species, as well as the continued vigilance on the occurrence of viral infections in bats over the years is required to follow the evolution of bat coronaviruses in its interactions with the different bat host species. In addition, the detection of CoVs in Brazilian bat populations in close proximity to human inhabitants may represent a risk to human health. Our findings point to the need to identify the prevalence of CoVs in Brazilian bats, to perform risk assessment studies and continued surveillance of coronavirus infections from both urban and rural environments.

Acknowledgments We would like to thank the government agencies FINEP, CNPq, and CAPES by the financial support. P.M. Roehs, A.C. Franco, and F.R. Spilki are CNPq research fellows.

References

- N.B. Simmons, in *Mammal Species of the World: A Taxonomic Reference*, ed. by W.A.D.M. Reader (Smithsonian Institution Press, Washington DC, 2005), pp. 312–529
- C.H. Calisher, J.E. Childs, H.E. Field, K.V. Holmes, T. Schountz, *Clin. Microbiol. Rev.* **19**, 531–545 (2006)
- J.S. Mackenzie, *J. Neurovirology* **11**, 434–440 (2005)
- W.H. van der Poel, P.H. Lina, J.A. Kramps, *Vector Borne Zoonotic Dis.* **6**, 315–324 (2006)
- S. Wong, S. Lau, P. Woo, K.Y. Yuen, *Rev. Med. Virol.* **17**, 67–91 (2007)
- X. Pourrut, M. Souris, J.S. Towner, P.E. Rollin, S.T. Nichol, J.P. Gonzalez, E. Lemoy, *BMC Infect. Dis.* **9**, 159 (2009)
- S.K. Lau, P.C. Woo, K.S. Li, Y. Huang, H.W. Tsoi, B.H. Wong, S.S. Wong, S.Y. Leung, K.H. Chan, K.Y. Yuen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 14040–14045 (2005)
- W. Li, Z. Shi, M. Yu, W. Ren, C. Smith, J.H. Epstein, H. Wang, G. Cramer, Z. Hu, H. Zhang, J. Zhang, J. McElachern, H. Field, P. Daszak, B.T. Eaton, S. Zhang, L.F. Wang, *Science* **310**, 676–679 (2005)
- M.A. Muller, V.S. Raj, D. Muth, B. Meyer, S. Kallies, S.L. Smits, R. Wolny, T.M. Bestebroer, S. Specht, T. Suliman, K. Zimmermann, T. Binger, I. Eckerle, M. Tschapka, A.M. Zaki, A.D. Osterhaus, R.A. Fouchier, B.L. Haagmans, C. Drosten, *MBio* **3**(6), e00515–e005112 (2012)
- M.M. Sodre, A.R. da Gama, M.F. de Almeida, *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* **52**, 75–81 (2010)
- P.H. Gallo, N.R. dos Reis, F.R. Andrade, I.G. de Almeida, *Rev. Biol. Trop.* **58**, 1311–1322 (2010)
- J.F. Drexler, F. Gloza-Rausch, J. Glende, V.M. Cosman, D. Muth, M. Gottsche, A. Seebens, M. Niedrig, S. Pfefferle, S. Yordanov, L. Zhelyazkov, U. Hermanns, P. Vallo, A. Lukashev, M.A. Muller, H. Deng, G. Herrler, C. Drosten, *J. Virol.* **84**, 11336–11349 (2010)
- J. Ye, S. McGinnis, T.L. Madden, *Nucleic Acids Res.* **34**, W6–W9 (2006)
- M.A. Larkin, G. Blackshields, N.P. Brown, R. Chenna, P.A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I.M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J.D. Thompson, T.J. Gibson, D.G. Higgins, *Bioinformatics* **23**, 2947–2948 (2007)
- T.A. Hall, *BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT*. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **41**, 95–98 (1999)
- D. Posada, K.A. Crandall, *Syst. Biol.* **50**, 580–601 (2001)
- L. Li, J.G. Victoria, C. Wang, M. Jones, G.M. Fellers, T.H. Kunz, E. Delwart, *J. Virol.* **84**, 6955–6965 (2010)
- E.F. Donaldson, A.N. Haskew, J.E. Gates, J. Huynh, C.J. Moore, M.B. Frieman, *J. Virol.* **84**, 13004–13018 (2010)
- L.L. Poon, D.K. Chu, K.H. Chan, O.K. Wong, T.M. Ellis, Y.H. Leung, S.K. Lau, P.C. Woo, K.Y. Suen, K.Y. Yuen, Y. Guan, J.S. Peiris, *J. Virol.* **79**, 2001–2009 (2005)
- F. Gloza-Rausch, A. Ipsen, A. Seebens, M. Gottsche, M. Panning, J.F. Drexler, N. Petersen, A. Amann, K. Grywna, M. Müller, S. Pfefferle, C. Drosten, *Emerg. Infect. Dis.* **14**, 626–631 (2008)
- C.V. Carrington, J.E. Foster, H.C. Zhu, J.X. Zhang, G.J. Smith, N. Thompson, A.J. Augustine, V. Ramkissoon, A.A. Adesiyun, Y. Guan, *Emerg. Infect. Dis.* **14**, 1890–1893 (2008)
- V. Misra, T. Dameron, J. Dubois, C. Willis, S. Nadin-Davis, A. Severini, A. Wandeler, R. Lindsay, H. Artsob, *J. Gen. Virol.* **90**, 2015–2022 (2009)
- S.K. Lau, K.S. Li, Y. Huang, C.T. Shek, H. Tse, M. Wang, G.K. Choi, H. Xu, C.S. Lam, R. Guo, K.H. Chan, B.J. Zheng, P.C. Woo, K.Y. Yuen, *J. Virol.* **84**, 2808–2819 (2010)
- S. Watanabe, J.S. Masangkay, N. Nagata, S. Morikawa, T. Mizutani, S. Fukushi, P. Alviola, T. Omatu, N. Ueda, K. Iha, S. Taniguchi, H. Fujii, S. Tsuda, M. Endoh, K. Kato, Y. Tohya, S. Kyuwa, Y. Yoshikawa, H. Akashi, *Emerg. Infect. Dis.* **16**, 1217–1223 (2010)
- P.C. Woo, S.K. Lau, Y. Huang, K.Y. Yuen, *Exp. Biol. Med.* **234**, 1117–1127 (2009)
- C. Osborne, P.M. Cryan, T.J. O’Shea, L.M. Oko, C. Ndaluika, C.H. Calisher, A.D. Berglund, M.L. Klavetter, R.A. Bowen, K.V. Holmes, S.R. Dominguez, *PLoS ONE* **6**, e19156 (2011)

4.2. First detection of adenovirus in the vampire bat (*Desmodus rotundus*) in Brazil.

Lima FE¹, Cibulski SP, Elesbao F, Carnieli Junior P, Batista HB, Roehe PM, Franco AC. First detection of adenovirus in the vampire bat (*Desmodus rotundus*) in Brazil.

Virus Genes. 2013 Oct;47(2):378-81. doi: 10.1007/s11262-013-0947-6.

Abstract

This paper describes the first detection of adenovirus in a Brazilian *Desmodus rotundus* bat, the common vampire bat. As part of a continuous rabies surveillance program, three bat specimens were captured in Southern Brazil. Total DNA was extracted from pooled organs and submitted to a nested PCR designed to amplify a 280 bp long portion of the DNA polymerase gene of adenoviruses. One positive sample was subjected to nucleotide sequencing, confirming that this DNA fragment belongs to a member of the genus *Mastadenovirus*. This sequence is approximately 25 % divergent at the nucleotide level from equine adenovirus 1 and two other recently characterized bat adenoviruses.

First detection of adenovirus in the vampire bat (*Desmodus rotundus*) in Brazil

Francisco Esmalle de Sales Lima · Samuel Paulo Cibulski · Felipe Elesbao · Pedro Carnieli Junior · Helena Beatriz de Carvalho Ruthner Batista · Paulo Michel Roehle · Ana Cláudia Franco

Received: 5 March 2013 / Accepted: 19 June 2013
© Springer Science+Business Media New York 2013

Abstract This paper describes the first detection of adenovirus in a Brazilian *Desmodus rotundus* bat, the common vampire bat. As part of a continuous rabies surveillance program, three bat specimens were captured in Southern Brazil. Total DNA was extracted from pooled organs and submitted to a nested PCR designed to amplify a 280 bp long portion of the DNA polymerase gene of adenoviruses. One positive sample was subjected to nucleotide sequencing, confirming that this DNA fragment belongs to a member of the genus *Mastadenovirus*. This sequence is approximately 25 % divergent at the nucleotide level from equine adenovirus 1 and two other recently characterized bat adenoviruses.

Keywords *Desmodus rotundus* · Adenovirus · Rabies

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s11262-013-0947-6) contains supplementary material, which is available to authorized users.

F. E. S. Lima · S. P. Cibulski · P. M. Roehle
Veterinary Research Institute "Desiderio Finamor"
(IPVDF), Estrada do Conde 6000, Eldorado do Sul,
RS CEP 92990-000, Brazil

F. E. S. Lima (✉) · S. P. Cibulski · F. Elesbao ·
P. M. Roehle · A. C. Franco
Virology Laboratory, Department of Microbiology, Immunology
and Parasitology, Institute of Basic Health Sciences,
Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS),
Rua Samento Leite 500, Porto Alegre,
RS CEP 90050-170, Brazil
e-mail: esmalle.sales@gmail.com

P. Carnieli Junior · H. B. C. R. Batista
Pasteur Institute, Avenida Paulista 393, Cerqueira César,
São Paulo, SP CEP 01311-000, Brazil

Introduction

Short report

Bats (order *Chiroptera*) have increasingly been recognized as sources of viruses that can cause disease in humans and animals. Among these, a number of RNA viruses (lyssaviruses, coronaviruses, filoviruses, paramyxoviruses, and astroviruses) [1–4] as well as several DNA viruses (circoviruses [5], polyomaviruses [6], adenoviruses [7], and herpesviruses [8]) have been detected in bats, some of them with clear zoonotic potential, which highlights the importance of bat species as reservoirs for such agents.

As part of a larger study comprising the identification of novel bat viruses that could present zoonotic potential to humans and other mammals, this report concerns the identification of adenoviruses in tissues collected from the common vampire bat *Desmodus rotundus*. These are members of the *Adenoviridae* family, which to date comprises five known genera: *Mastadenovirus*, *Aviadenovirus*, *Atadenovirus*, *Siadenovirus*, and *Ichtadenovirus* (International Committee on Taxonomy of Viruses—9th report, 2011) [9]. The genus *Mastadenovirus* includes viruses that infect mammals and usually cause mild or asymptomatic infections. Nonetheless, some virus types/subtypes have often been associated with a wide range of clinical conditions, ranging from respiratory, ocular, and gastrointestinal disease in humans [10] to viral hepatitis and fatal respiratory infections in dogs [11].

In bats, the first adenovirus (AdV) reported was recovered from a fruit bat classified in the suborder *Megachiroptera*, during attempts to establish a specific cell line from the *Ryukyu flying fox* (*Pteropus dasymallus yaezamae*) [12]. Later, the first AdV isolated from a microchiropteran bat (*Pipistrellus pipistrellus*) was reported in Germany and

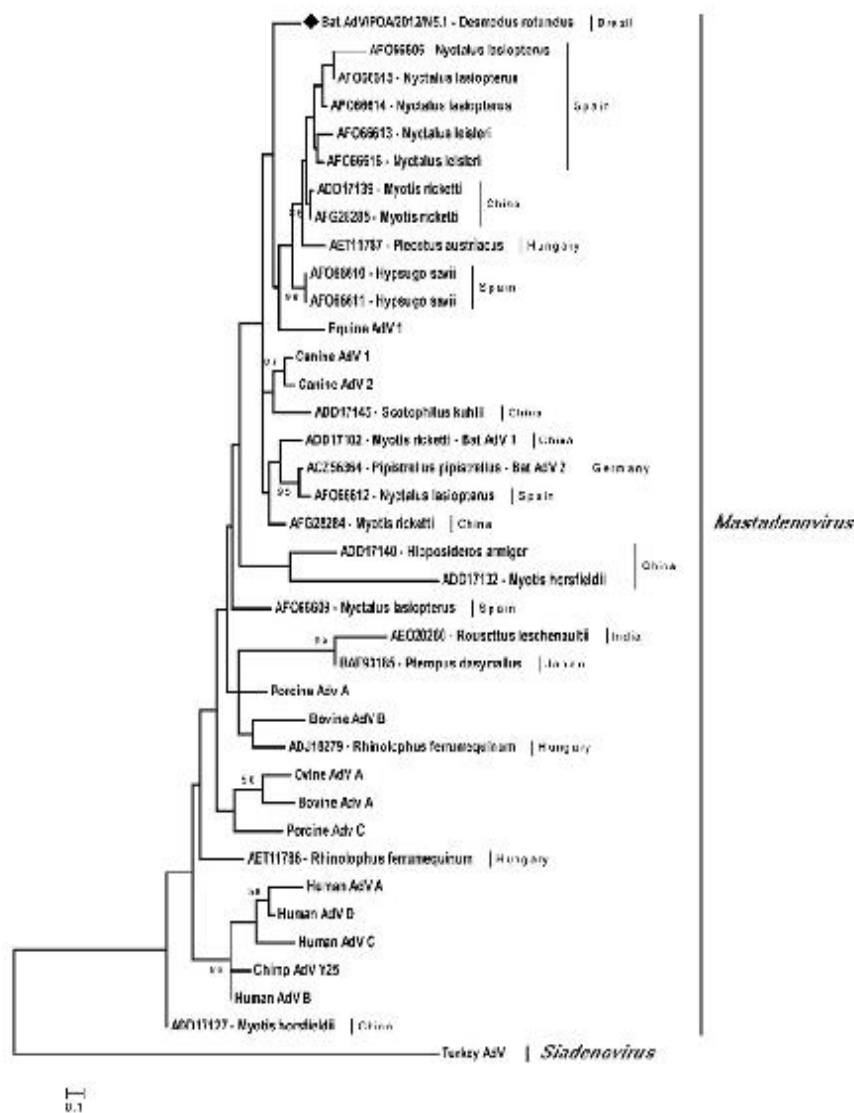


Fig. 1 Molecular phylogenetic analysis by the ML method of adenoviruses based on an analysis of partial amino acid sequences of DNA polymerase protein from the 280 bp long sequence Bat AdV/POA/2012/N5.1 (KC 110769) and other *Mastadenoviruses*. The

evolutionary history was inferred by using the maximum likelihood method based on the Poisson correction model. Evolutionary analyses were conducted in MEGA5 [22]

other bat AdVs sequences allowed us to conclude that N5.1 is genetically diverse from the bat adenoviruses already described (e.g., Bat AdV TJM and AdV2 PPV1), as they share nucleotide identities ranging from 66.2 to 72.7 % (supplemental material 1). Moreover, the amino acid identities between the sequence obtained in the present study and other bat AdVs ranged from 61.5 to 79.3 % (Table 1).

The phylogenetic analysis indicated that N5.1 forms a monophyletic clade with bat AdVs detected in Hungary [23], Spain (data unpublished), China [7], and Germany [24] (Fig. 1). These sequences, however, seem to be distinct from the homologous sequences of most AdVs detected in primates, some domesticated animals, humans, and some bat AdVs previously characterized in the Old World. The phylogenetic

tree topology suggests that coevolution is taking place involving most AdVs and bats species, as it is notable that different species host different adenoviruses [7].

A further comparison between N5.1 and other *Mastadenovirus* sequences shows that it is more closely related to AdVs of equine origin, such as *Equine adenovirus 1* (EAdV-1), than to any other AdV sequence. N5.1 and EAdV-1 share nucleotide and amino acid identities of 74.5 and 75.8 %, respectively. This relationship is particularly noteworthy, as a previous genetic characterization of EAdV-1 revealed a close relationship with Bat AdV TJM and Bat AdV2 PPV1, suggesting that they may have a common ancestor [25]. On the other hand, previous deposited AdV sequences obtained from different bat species share higher identities to *Canine adenovirus 1* and 2, which are known to display an unusually broad host range (e.g., bears, wolves, raccoons, and sea lions) [11, 13].

Desmodus rotundus is a serious threat to both animal and human health in Latin America, as it is a major reservoir for rabies virus in this subcontinent region [15]. This fact has limited investigations on the significance of bats as potential carriers of other viral pathogens. Nevertheless, intense epidemiological work is required to fully understand the genetic diversity and distribution of bat AdVs in Brazil. Such studies might be broadened and include other bat species considering the great variability of bats distributed in the country (about 140 species already identified) [15].

It must be highlighted that the amplified DNA polymerase gene fragment used in the phylogenetic analyses is short, allowing only a preliminary virus classification. More consistent sequence data from additional genomic regions will be required for an elucidative taxonomic classification of the N5.1 detected herein in *D. rotundus*. Further studies should be conducted in the future to examine the potential pathogenic role of bat AdVs to other species, providing new insights into the ecology and evolution of AdVs in different bat species.

Acknowledgments This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq) and by Financiadora de Estudos e Pesquisas (FINEP). PMR and ACP are CNPq research fellows. FESL is in receipt of a PhD grant of Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico. SPC is in receipt of a PhD grant from CNPq.

References

- C.H. Calisher, J.E. Childs, H.E. Field, K.V. Holmes, T. Schountz, *Clin. Microbiol. Rev.* **19**, 531–545 (2006)
- D.K. Chu, J.S. Peiris, H. Chen, Y. Guan, L.L. Poon, *J. Gen. Virol.* **89**, 1282–1287 (2008)
- J.F. Drexler, V.M. Corman, M.A. Müller, G.D. Maganga, P. Vallo, T. Binger, F. Gloza-Rausch, A. Rasche, S. Yordanov, A. Seebens, S. Oppong, Y. Adu Sarkodie, C. Pongombo, A.N. Lukashov, J. Schmidt-Chanasit, A. Stocker, A.J. Carneiro, S. Erbar, A. Mäuser, F. Fronhoffs, R. Buettner, E.K. Kalko, T. Kruppa, C.R. Franke, R. Kallies, E.R. Yandoko, G. Herler, C. Reusken, A. Haswain, D.H. Kruger, S. Matthee, R.G. Ulrich, E.M. Lemy, C. Drosten, *Nat. Commun.* **3**, 796 (2012)
- D.K. Chu, L.L. Poon, Y. Guan, J.S. Peiris, *J. Virol.* **82**, 9107–9114 (2008)
- X. Ge, J. Li, C. Peng, L. Wu, X. Yang, Y. Wu, Y. Zhang, Z. Shi, *J. Gen. Virol.* **92**, 2646–2653 (2011)
- V. Misra, T. Dumonceaux, J. Dubois, C. Willis, S. Nadin-Davis, A. Severini, A. Wandeler, R. Lindsay, H. Artsob, *J. Gen. Virol.* **90**, 2015–2022 (2009)
- Y. Li, X. Ge, H. Zhang, P. Zhou, Y. Zhu, Y. Zhang, J. Yuan, L.F. Wang, Z. Shi, *J. Virol.* **84**, 3889–3897 (2010)
- G. Wibbelt, A. Kurth, N. Yasunum, M. Bannert, S. Nagel, A. Nitsche, B. Ehlers, *J. Gen. Virol.* **88**, 2651–2655 (2007)
- A.M.Q.A. King, E.B. Carstens, E.J. Lefkowitz, *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses* (Elsevier, Amsterdam, 2012)
- T. Kojaogluhanian, P. Flomenberg, M.S. Horwitz, *Rev. Med. Virol.* **13**, 155–171 (2003)
- C. Buonavoglia, V. Mantella, *Vet. Res.* **38**, 355–373 (2007)
- K. Maeda, E. Hondo, I. Terakawa, Y. Kiso, N. Nakachi, D. Endoh, K. Sakai, S. Morikawa, T. Mizutani, *Emerg. Infect. Dis.* **14**, 347–349 (2008)
- M. Sonntag, K. Muhlendorfer, S. Speck, G. Wibbelt, A. Kurth, *Emerg. Infect. Dis.* **15**, 2052–2055 (2009)
- C. Kohl, M.Z. Vidovszky, K. Muhlendorfer, P.W. Dabrowski, A. Radonic, A. Nitsche, G. Wibbelt, A. Kurth, B. Harrach, *J. Virol.* **86**, 1888–1892 (2012)
- E.S. da Rosa, I. Kotait, T.F. Barbosa, M.L. Carrieri, P.E. Brandao, A.S. Pinheiro, A.L. Begot, R.C. de Oliveira, E.C. Grisard, M. Ferreira, R.J. Lima, L. Montebello, D.B. Medeiros, R.C. Sousa, G. Bensabath, E.H. Camo, P.F. Vasconcelos, M.Y. Wada, *Emerg. Infect. Dis.* **12**, 1197–1202 (2006)
- P.E. Brandao, K. Scheffer, L.Y. Villarreal, S. Achkar, R.N. Oliveira, W. Fahl, J.G. Castilho, I. Kotait, L.J. Richtzenhain, *Braz. J. Infect. Dis.* **12**, 466–468 (2008)
- J.F. Drexler, F. Gloza-Rausch, J. Glende, V.M. Corman, D. Muth, M. Goetsche, A. Seebens, M. Niedrig, S. Pfeiffle, S. Yordanov, L. Zhelyazkov, U. Hermanns, P. Vallo, A. Lukashov, M.A. Müller, H. Deng, G. Herler, C. Drosten, *J. Virol.* **84**, 11336–11349 (2010)
- J. Sambrook, D.W. Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edn. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 2001), p. 863
- J. Ye, S. McGinnis, T.L. Madden, *Nucleic Acids. Res.* **34**, W6–W9 (2006)
- M.A. Larkin, G. Blackshields, N.P. Brown, R. Chenna, P.A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I.M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J.D. Thompson, T.J. Gibson, D.G. Higgins, *Bioinformatics* **23**, 2947–2948 (2007)
- T.A. Hall, BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids. Symp. Ser.* **41**, 95–98 (1999)
- K. Tamam, D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, S. Kumar, *Mol. Biol. Evol.* **28**, 2731–2739 (2011)
- M. Janoska, M. Vidovszky, V. Molnar, M. Liptovszky, B. Harrach, M. Benko, *Vet. J.* **189**, 118–121 (2011)
- J.F. Drexler, V.M. Corman, T. Wegner, A.P. Taten, R.M. Zerbini, F. Gloza-Rausch, A. Seebens, M.A. Müller, C. Drosten, *Emerg. Infect. Dis.* **17**, 449–456 (2011)
- H.M. Cavanagh, T.J. Mahony, T. Vanniasinkam, *Vet. Microbiol.* **185**, 33–37 (2012)

4.3. Molecular detection and characterization of novel circular ssDNA viruses from insectivorous bats in Southern Brazil

Francisco Esmale de Sales Lima¹, Samuel Paulo Cibulski², Paulo Michel Roehle^{1,2} and Ana Cláudia Franco²

Artigo ser submetido para o periódico **Journal of General Virology**

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- 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: Lima, F.E.S., 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: esmaile.sales@gmail.com

Proofs should be sent to: Lima, F.E.S., 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: esmaile.sales@gmail.com

Abstract

Circoviruses are highly prevalent porcine and avian pathogens. In recent years, novel circular ssDNA genomes have recently been detected in a variety of other mammals, like bats and in environmental samples using metagenomic and next generation sequencing approaches. In this study, using pan-primers targeting the conserved *rep* region of circoviruses and cycloviruses, we screened bat fecal samples. Using this approach, we detected partial *rep* sequences which formed five groups distributed among *Circovirus* and *Cyclovirus* genera within the *Circoviridae* family. Among these groups differences ranging from 10% to 76% on the amino acid level were observed. Further analysis using inverse PCR based on the prior sequences obtained led to the identification and characterization of four new members of the family *Circoviridae*. The newly obtained circovirus/cyclovirus-like genomes ranged from 1,608 to 1,790 bp in size, each one with two ORFs inversely arranged, potential stem-loop regions and conserved nonamer sequences typical of *Circoviridae*. Phylogenetic analysis indicated that these sequences are distantly related to the circoviruses and/or cycloviruses already described. In addition, two of them could possibly be included within a new genus to be proposed belonging to *Circoviridae*.

Keywords: insectivorous bats, circovirus, cyclovirus, REP protein, CAP protein.

Introduction

The *Circoviridae* family is known to infect a wide range of vertebrates. Its virions consist of naked nucleocapsids of about 20 nm in diameter, with a circular single stranded DNA (ssDNA) genome of approximately 2.0 kb [1]. Some circoviruses are major pathogens of pigs [2-4], e.g. porcine circovirus 2 (PCV2) which causes either asymptomatic or clearly apparent disease, being responsible for large economic losses [5-9]. In birds, avian circoviruses have been identified in a broad range of avian species linked to signs of lymphoid depletion, immunosuppression and developmental abnormalities such as deformities of the beak and claws, feathering disorders and growth retardation [10-14].

To date, the family comprises two genera: *Gyrovirus* and *Circovirus*. Members of genus *Gyrovirus* (chicken anemia virus; CAV [15], the recently discovered avian gyrovirus type 2 (AGV2) [16,17] and human gyrovirus type 1 (HGV1) have negative sense genomes [18]. This is in contrast with the other circoviruses, which have an ambisense genome organization containing two major open reading frames (ORFs) inversely arranged, responsible for encoding the replicase (REP) and capsid (CAP) proteins, and are separated by a 3' intergenic region (IGR) between the stop codons and a 5' IGR between the start codons [19].

Recent metagenomic approaches, high-throughput sequencing techniques and degenerate PCRs have led to the surge of small circular DNA genomes containing the *rep* gene discovered in fecal samples of wild mammals, in insects and environmental samples as well [19-22]. Some detected circular genomes are similar to those of circoviruses, but phylogenetically different from the well-studied avian and porcine circoviruses [22]. The

phylogenetic distances found on these genomes allowed them to be grouped into the newly proposed genus *Cyclovirus*, which have a smaller genome that encodes REP and CAP proteins. Both *rep* and *cap* genes are smaller than those of circoviruses, with shorter or no 3' IGR between the stop codons of the two major ORFs and a longer 5' IGR between the start codons of the two major ORFs [19]. Cycloviruses were also found to be prevalent in the muscle tissue of farm animals, such as chickens, cows, sheep, goats, and camels [23]. Circoviruses and cycloviruses have been detected in human tissues and feces, wild and farmed animal's samples, suggesting possible cross-species transmissions and zoonotic potential [22,23].

Using consensus/degenerate PCR and whole genome sequencing in order to detect new members of the family *Circoviridae* from bat fecal samples, this paper reports the detection of distantly related viral genomes to circoviruses/cycloviruses already described. Extensive phylogenetic analyses allow us to infer that these genomes may represent 4 novel species within the family *Circoviridae*.

Material and methods

Sample collection and preparation

A maternity roost of bats was identified in the summer of 2012 in the attic of a residence in the central area of the municipality of Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Southern Brazil. The colony was estimated to harbor about 500 bat specimens of insectivorous bats of two species, velvety free tailed bats (*Molossus molossus*) and brazilian free tailed bats (*Tadarida brasiliensis*). Speciation was confirmed by DNA extraction from fecal pellets, amplification and sequencing of the mitochondrial cytochrome b (*cytb*) gene as described [24].

One hundred fecal samples were collected from the attic floor as follows: a plastic film was spread on the ground of the attic compartment and fresh droppings were collected with clean disposable forks in the following night. Each sample consisted of 5 fecal droppings, which were immediately sent to the laboratory and stored at -80 °C. The fecal samples were then thawed, resuspended and vortexed in 1 mL of Hank's balanced salt solution (HBSS). The suspensions were centrifuged at 10.000 x g for 5 min in a microfuge. The supernatants were then transferred to fresh tubes, filtered through 0.45 µm pore-size syringe filters (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) and submitted to DNA extraction.

DNA extraction and PCR

Total fecal DNA was extracted from 400 µL of the supernatants (above) with phenol-chloroform (Invitrogen™)[25]. The extracted DNA was eluted in 50 µL of TE (Tris-hydrochloride buffer, pH 8.0, containing 1.0 mM EDTA), treated with 20 µg/mL of

RNaseA(Invitrogen™)and stored at -80°C. Subsequently, samples were submitted to amplification in a nested-PCR targeting the *rep* gene with the following degenerate primers: CV-F1 (5-GGIAYICCICAYYTICARGG-3), CV-R1 (5-AWCCAICCRTARAARTCRTC-3), CV-F2 (5-GGIAYICCICAYYTICARGGITT-3), and CV-R2 (5-TGYTGYTCRTAICCRTCCCACCA-3) [19]. These were expected to amplify part of the *rep* gene of circoviruses and cycloviruses. Briefly, the first reaction was performed in a 25 µL reaction mixture volume containing 20 to 50 ng of sample DNA 1 mM MgCl₂, 0.2 µM of each primer (CV-F1 and CV-R1), 1.5 U Taq DNA polymerase (Invitrogen™), 10% PCR buffer and 0.6 mM dNTPs. 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 1st reaction product, 1 mM MgCl₂, 0.2 µM of each primer (CV-F2 and CV-R2), 1.5 U Taq DNA polymerase (Invitrogen™), 10% PCR buffer and 0.6 mM dNTPs. 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. Products 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 the protocol of the manufacturer. Sequences similar to the *rep* gene sequences of circoviruses like-genomes were aligned for designing of new sets of primers to perform the inverse PCR (iPCR). The iPCR were carried out in a 25 µl reaction mixture optimized with Platinum Taq HiFI (Invitrogen™) (cycling conditions can be informed upon request) and the oligo sequences as follows: Circo1_F(5'-CTTTCTCCCAGTTAATTCTCC-3'), Circo1_R (5'-GAGCAAGTGGAACAGGTAAAT-3'), Circo2_F(5'-

TCAAAGCGTGCACTTGA-3'), Circo2_R(5'-ACAGGATTGTAGATCAGTACGT-3'),
Circo5_F(5'-GAGATGCAAGAATGGATTGC-3'), Circo5_R(5'-
GCAATATTTGCTTGCCGC-3'), Circo6_F(5'-GAGAGTATCAACGCAGAAAG-3'),
Circo6_R(5'-CTTTGATAAATTAGCGAACC-3'), Circo7_F(5'-
AGAGGCTCAACAAATAGACGC-3'), Circo7_R(5'-TGCTTTTTGATGGTACTGAA-3').

Standard precautions were taken to avoid contamination and negative controls were added to each PCR assay. Five microliters of the PCR products were electrophoresed in 0.7% agarose gels and the products visualized on UV light after staining with ethidium bromide. The amplicons corresponding to the sizes ranging from 1-2kb were purified and cloned into pCR[®]2.1-TOPO[®] cloning kit (Invitrogen[™]). Three insert-containing plasmids of each clone were sequenced with M13 forward and reverse primers as described above. The full-length sequence of genomes was constructed according to the methodology of "genome walking" using the Geneious software (version 7.1.3).

Gene identification and phylogenetic analysis

Identification of putative ORFs was made by ORF Finder of NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>). 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 ClustalW [26]. The alignments were optimized with the BioEdit Sequence Alignment Editor Program version 7.0.9 [27]. The hairpin and stem-loop structures were identified in Mfold[28]. Phylogenetic analysis was carried out in MEGA5.05[29]. The confidence of each branch in the phylogeny was estimated with bootstrap values calculated from 2000 replicates. For the purpose of this

work, the samples were named Bat Circovirus Porto Alegre (BatCV POA), followed by the cluster number to which each one belonged.

Results

Molecular detection and genetic diversity of circovirus-like rep sequences in feces of insectivorous bats

Amplicons with the expected size (about 400 bp) were obtained from 24 out of the 100 (24%) fecal samples screened. The amplified DNA was sequenced. The nucleotide sequences corresponding to part of the *rep* gene were determined and submitted to GenBank (accession numbers...). BLASTX analysis showed that these partial *rep* sequences have an amino acid identity of 10-76% with those of known circoviruses and 87-100% among themselves. A phylogenetic tree was constructed based on the alignment of the deduced amino acid sequences herein detected with those of the representative *Circovirus* and *Cyclovirus* sequences (Figure 1). As shown in the tree, it was observed the arrangement of five main groups with clusters II (4 sequences), VI (3 sequences) and VII (2 sequences) falling into the clade of cycloviruses, in contrast to clusters I (13 sequences) and V (2 sequences) that formed distinct and distant groups from those formed by circoviruses and cycloviruses. The arbitrary division of these sequences in clusters was carried out to analyse their genomic features, assuming that according to the criteria used for *Circovirus* diversity analysis, a deduced amino acid identity of >85% in the conserved REP protein is considered to classify genomic fragments as an individual viral species [19]. According to this, we could infer the detection of five potential new species from bat samples (3 cycloviruses and 2 circoviruses) to be confirmed after following analysis of their genomic organization.

Genomic characterization of the new putative circovirus-like sequences in insectivorous bats

Two full-length circular ssDNA genomes of 1,755 and 1,790bp (named BatCV POA/2012/II and BatCV POA/2012/VI, respectively) and two nearly complete circular DNA genomes of 1,750 and 1,760 bp (named BatCV POA/2012/I and BatCV POA/2012/V) were identified (GenBank accession numbers: XXXXX). It was not possible to amplify the genome comprising those of cluster VII.

The impossibility to achieve the complete sequencing of virus DNA from clusters I and V was probably due to the high GC-rich content present in the 3' IGR GC region, even though attempts on PCR amplification before sequencing were made without much success by varying the concentrations of DMSO and/or in the presence of 50% 7-deaza-GTP and 50% dGTP (New England Biolabs), as performed by Rijsewijk et al. [17].

The predicted two ORFs, *rep* and *cap*, are present and inversely arranged in all sequences as shown in Figure 2. The predicted CAP protein sequences consist of 197-231 amino acids and share an amino acid similarity of 24-76% with the known cycloviruses/circoviruses and 15.5-88.8% among themselves (Tables 1 and 2). The predicted REP protein sequences ranged from 232 to 280 amino acid and have an amino acid similarity ranging from 9.2-44.4% among themselves (Tables 1 and 2).

Stem-loop structures were found in all 4 bat circular genomes. They have a conserved nonanucleotide motif located at the 5' IGR and are considered to be responsible for initiating the rolling-cycle replication of circoviruses [22,30]. As shown in table 3, all four BatCV POA also contain a conserved nonamer sequence in the loop region of the 5' IGR, different from the conserved cyclovirus and circovirus nonanucleotide motif sequence, but similar to the loop motif of cycloviruses found on bat, human and chimpanzee feces (as

seen for BatCV POA V and VI), in chicken cyclovirus (BatCV POAII) and slightly modified from those of cyclovirus and circovirus (BatCV POA I) [19,21-23].

The predicted protein sequences encoded by ORF2 (*cap*) and ORF1 (*rep*) of BatCV I-VI genomes were used for phylogenetic analysis with representative and recently discovered circoviruses/cycloviruses; Pepper golden mosaic virus was used as an outgroup, as they are somewhat related to other members in the *Circoviridae* family (Figure 3A, 3B and 3C). As shown in the trees, BatCV POA/2012/II and VI fell into the cyclovirus clade already identified in chickens, chimps, bats, goats, humans and dragonflies [19,21-23,31]. When analyzing the *cap*-encoding region (Figure 3A), BatCV POA/2012/II was related to a *Cyclovirus* detected in muscle tissues of a goat from Pakistan through degenerate/consensus PCR [23], and BatCV POA/2012/VI was more related to dragonfly *Cyclovirus* detected through viral metagenomics [31]. However, when analyzing both genomes according to the conserved *rep*-encoding region, it was observed that they formed a monophyletic clade (Figure 3B). On the other hand, BatCV POA/2012/I and V fell outside the *Circovirus* and *Cyclovirus* clades, not yet related to any genus of *Circoviridae* family along with Bat circovirus-like virus TM6 and batCV-SC703[21,22]. This situation was confirmed based on the alignments of the whole genomes, producing a similar tree topology (see figure 3C). These sequences are closer to sequences detected in guano and fecal samples collected from bats in the United States and China through metagenomic approaches, suggesting that these viruses have the same host origin, likely from bats [21,22]. However, currently, no classification has been fully considered to these sequences.

Discussion

In this work we report the discovery of 4 novel circular ssDNA genomic sequences from insectivorous bats feces from Brazil. In the recent years, many genomes of circoviruses, cycloviruses and *rep*-containing circular DNA viruses have been characterized in mammals, bringing to light a high level of genetic diversity among these viruses [32]. According to our results, two genomes, undoubtedly belong to genus *Cyclovirus* (BatCV POA II and VI). These genomes are organized and contain two major ORFs in opposite directions, presenting in their 5' IGR of the *rep* ORF the cyclovirus-conserved nonanucleotide motif (5'-TAATACTAT-3') in their loop region (Table 3). BatCV POA I presents its *cap* located in the positive strand, and the larger *rep* located on the minus strand, as expected for circoviruses, but this pattern was not present in BatCV POA II, V and VI, as shown in Table 1. The phylogenetic analysis constructed based on the alignments of the complete REP and CAP protein confirms that BatCV POA/II and VI are supposed to be clustered into the genus *Cyclovirus*. BatCV POA I and V had a low amino acid identity with CAP (<20%) and REP (<10%) sequences of two other sequences detected in bat feces in this study with known circoviruses/cycloviruses (Table 2). Consequently, they formed a distinct clade along with other bat-sourced sequences, corroborating with data from Ge et al. [22], where such results could imply that diverse unknown *Circovirus*-like exist in bat fecal samples.

In our study, we detected *Cyclovirus* and *Circovirus* related sequences at a frequency of 24% in the examined samples. However, due to methodological limitations, restriction in location and variety of bat species, we were not able to extrapolate our results to epidemiological data (such as incidence and prevalence) or to which bat species the ssDNA

positive samples belonged. As performed by Ge et al. in China [33], further investigation is needed to determine the prevalence of circoviruses in other Brazilian bat species. Nevertheless, it becomes clear that such study is worthy to understand the great diversity of circoviruses found and to be found worldwide.

Based on the phylogenetic analysis and comparison to the sequences recovered and other already described, we assume that most sequences originate from bats, except BatCV POA/VI which is related to a cycloviruses identified in a dragonfly, sharing 65% of identity at the CAP/REP amino acid level [33]. The finding of an insect virus in bat feces reflects the diet of these insectivorous bats, as they play an important role on preying insects that are plagues for agriculture. However its detection does not support the possibility of viral replication in bats or if the virus simply passes through the digestive track from ingested food [23,32].

To date, few members of the family *Circoviridae* can be related to severe clinical conditions in animals, with the exception of CAV and PCV2 [4]. Even with the recent discovery of many cycloviruses, circoviruses-like or rep-like sequences in a variety of mammals, including humans [23,33,34], there is no syndrome related to these viruses. Nevertheless, a recent identification of a new *Cyclovirus* from two Vietnamese patients with acute central nervous system infection of unknown etiology raises the suspicion about its pathogenicity as it was detected in cerebrospinal fluid specimens, showing that this virus can spread through the organism [35].

Here we report the detection of four novel circular ssDNAs after whole-genome characterization, indicating that the sequences BatCVPOA II and VI represent novel species within the genus *Cyclovirus*. For this recently proposed genus, there are no defined criteria for classifying a new viral species within it. However, the International Committee on

Taxonomy of Viruses proposes as criteria: the whole genome sequence identities of less than 75% at the nucleotide level and amino acid sequence identities of the CAP protein of less than 70% to classify a new species within the genus *Cyclovirus*. These species demarcation criteria were used by Li and colleagues, who first described the genus *Cyclovirus*, to classify new cycloviral species[19]. To determine whether BatCVs represent new cyclovirus species, their complete genome sequence was compared to 16 representative full length genomes of 16 different *Cyclovirus* species.

In addition to BatCV I and V, considered to be two other novel species, it should be noted, as well, the low amino acid similarity of these genomes, thus falling outside the clade of *Circovirus* and *Cyclovirus* grouping with TM6 and batCV-SC703[21,22]. With the discovery of other sequences grouping along with these genomes, it will be of interest to include them in a new genus of the *Circoviridae* family by the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV).

References

1. King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ (2012) *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses*. USA: Elsevier.
2. Darwich L, Segales J, Mateu E (2004) Pathogenesis of postweaning multisystemic wasting syndrome caused by Porcine circovirus 2: An immune riddle. *Arch Virol* 149: 857-874.
3. Ellis J, Hassard L, Clark E, Harding J, Allan G, et al. (1998) Isolation of circovirus from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Can Vet J* 39: 44-51.
4. Firth C, Charleston MA, Duffy S, Shapiro B, Holmes EC (2009) Insights into the evolutionary history of an emerging livestock pathogen: porcine circovirus 2. *J Virol* 83: 12813-12821.
5. Allan GM, Ellis JA (2000) Porcine circoviruses: a review. *J Vet Diagn Invest* 12: 3-14.
6. Segales J, Calsamiglia M, Olvera A, Sibila M, Badiella L, et al. (2005) Quantification of porcine circovirus type 2 (PCV2) DNA in serum and tonsillar, nasal, tracheo-bronchial, urinary and faecal swabs of pigs with and without postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Vet Microbiol* 111: 223-229.
7. Chae C (2005) A review of porcine circovirus 2-associated syndromes and diseases. *Vet J* 169: 326-336.
8. Opriessnig T, Meng XJ, Halbur PG (2007) Porcine circovirus type 2 associated disease: update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. *J Vet Diagn Invest* 19: 591-615.
9. Grau-Roma L, Fraile L, Segales J (2011) Recent advances in the epidemiology, diagnosis and control of diseases caused by porcine circovirus type 2. *Vet J* 187: 23-32.
10. Bassami MR, Berryman D, Wilcox GE, Raidal SR (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.
11. Hattermann K, Schmitt C, Soike D, Mankertz A (2003) Cloning and sequencing of Duck circovirus (DuCV). *Arch Virol* 148: 2471-2480.
12. Todd D, Weston JH, Soike D, Smyth JA (2001) Genome sequence determinations and analyses of novel circoviruses from goose and pigeon. *Virology* 286: 354-362.
13. Todd D (2000) Circoviruses: immunosuppressive threats to avian species: a review. *Avian Pathol* 29: 373-394.
14. Stewart ME, Perry R, Raidal SR (2006) Identification of a novel circovirus in Australian ravens (*Corvus coronoides*) with feather disease. *Avian Pathol* 35: 86-92.
15. Noteborn MH, de Boer GF, van Roozelaar DJ, Karreman C, Kranenburg O, et al. (1991) Characterization of cloned chicken anemia virus DNA that contains all elements for the infectious replication cycle. *J Virol* 65: 3131-3139.
16. Dos Santos HF, Knak MB, de Castro FL, Slongo J, Ritterbusch GA, et al. (2011) Variants of the recently discovered avian gyrovirus 2 are detected in Southern Brazil and The Netherlands. *Vet Microbiol*.
17. Rijsewijk FA, Dos Santos HF, Teixeira TF, Cibulski SP, Varela AP, et al. (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.

18. Sauvage V, Cheval J, Foulongne V, Gouilh MA, Pariente K, et al. (2011) Identification of the first human gyrovirus, a virus related to chicken anemia virus. *J Virol* 85: 7948-7950.
19. Li L, Kapoor A, Slikas B, Bamidele OS, Wang C, et al. (2010) Multiple diverse circoviruses infect farm animals and are commonly found in human and chimpanzee feces. *J Virol* 84: 1674-1682.
20. Blinkova O, Rosario K, Li L, Kapoor A, Slikas B, et al. (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.
21. Li L, Victoria JG, Wang C, Jones M, Fellers GM, et al. (2010) Bat guano virome: predominance of dietary viruses from insects and plants plus novel mammalian viruses. *J Virol* 84: 6955-6965.
22. Ge X, Li J, Peng C, Wu L, Yang X, et al. (2011) Genetic diversity of novel circular ssDNA viruses in bats in China. *J Gen Virol* 92: 2646-2653.
23. Li L, Shan T, Soji OB, Alam MM, Kunz TH, et al. (2011) Possible cross-species transmission of circoviruses and cycloviruses among farm animals. *J Gen Virol* 92: 768-772.
24. Drexler JF, Gloza-Rausch F, Glende J, Corman VM, Muth D, et al. (2010) Genomic characterization of severe acute respiratory syndrome-related coronavirus in European bats and classification of coronaviruses based on partial RNA-dependent RNA polymerase gene sequences. *J Virol* 84: 11336-11349.
25. Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
26. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, et al. (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23: 2947-2948.
27. Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT; 1999. pp. 95-98.
28. Zuker M, Jacobson AB (1995) "Well-determined" regions in RNA secondary structure prediction: analysis of small subunit ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res* 23: 2791-2798.
29. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, et al. (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28: 2731-2739.
30. Cheung AK (2006) Rolling-circle replication of an animal circovirus genome in a theta-replicating bacterial plasmid in *Escherichia coli*. *J Virol* 80: 8686-8694.
31. Rosario K, Marinov M, Stainton D, Kraberger S, Wiltshire EJ, et al. (2011) Dragonfly cyclovirus, a novel single-stranded DNA virus discovered in dragonflies (Odonata: Anisoptera). *J Gen Virol* 92: 1302-1308.
32. Delwart E, Li L (2012) Rapidly expanding genetic diversity and host range of the Circoviridae viral family and other Rep encoding small circular ssDNA genomes. *Virus Res* 164: 114-121.
33. Abe C, Uto Y, Nakae T, Shinmoto Y, Sano K, et al. (2011) Evaluation of the in vivo radiosensitizing activity of etanidazole using tumor-bearing chick embryo. *J Radiat Res (Tokyo)* 52: 208-214.
34. Acosta-Leal R, Bryan BK, Rush CM (2010) Host effect on the genetic diversification of beet necrotic yellow vein virus single-plant populations. *Phytopathology* 100: 1204-1212.

35. Tan le V, van Doorn HR, Nghia HD, Chau TT, Tu le TP, et al. (2013) Identification of a new cyclovirus in cerebrospinal fluid of patients with acute central nervous system infections. *MBio* 4: e00231-00213.

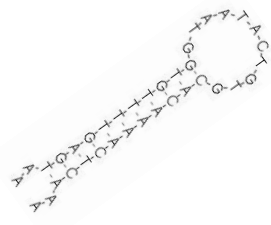
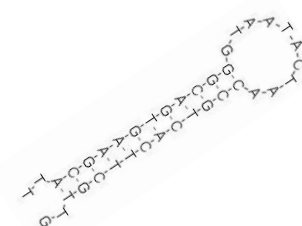
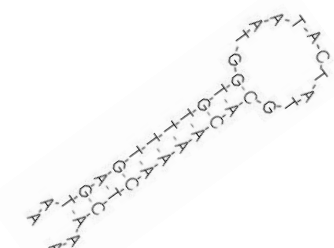
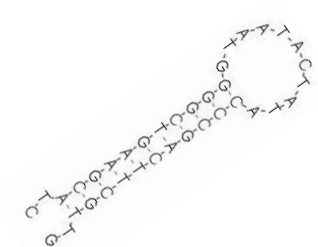
able 1.Main features of BatCV POA genomes.

	Nt	Cap	Strand	Size(nt)	Size(aa)	Rep	Strand	Size(nt)	Size (aa)
CI	1608	967-1560	+	594	197	953-120	-	834	277
CII	1755	1676-981	-	696	231	142-984	+	843	280
CV	1728	643-47	-	597	198	657-1490	+	834	277
CVI	1790	1583-924	-	660	219	88-786	+	699	232

Table 2. Pairwise comparison of the BatCVs POA I,II, V and VI based on aminoacid identities (%) shared by CAP and REP proteins.

Genomes	Cap protein				Rep protein			
	BatCV POA/I	BatCV POA/II	BatCV POA/V	BatCV POA/VI	BatCV POA/I	BatCV POA/II	BatCV POA/V	BatCV POA/VI
BatCV POA/I	-	15.5	88.8	17.5	-	30.4	9.2	21.4
BatCV POA/II	15.5	-	15.9	33.9	30.4	-	31.8	44.4
BatCV POA/V	88.8	15.9	-	17.5	9.2	31.8	-	20.7
BatCV POA/VI	17.5	33.9	17.5	-	21.4	44.4	20.7	-

Table 3. Organization and genomic features of the potential stem-loop structures found in the four BatCVPOA genomes.

Genome	Putative stem-loop structure	Hairpin length	Loop length	Nonamer sequence
BatCV POA/I		31	13	TAATACTGT
BatCV POA/II		34	12	TAATACTAA
BatCV POA/V		31	13	TAATACTAT
BatCV POA/VI		33	13	TAATACTAT

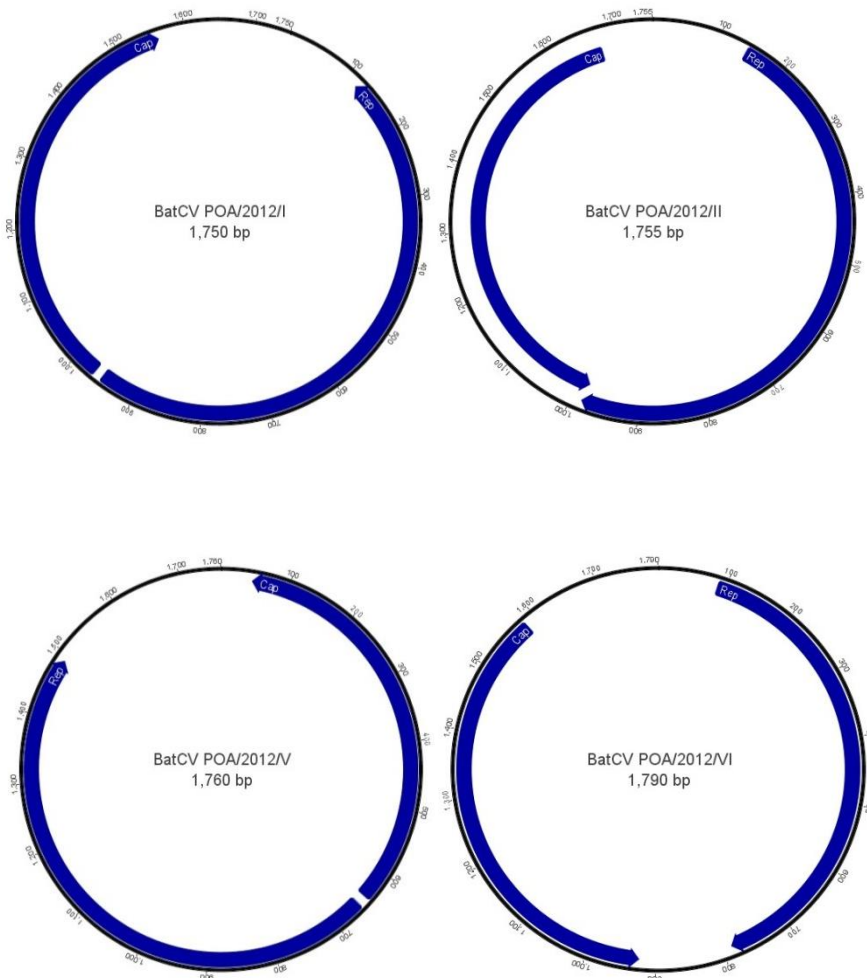
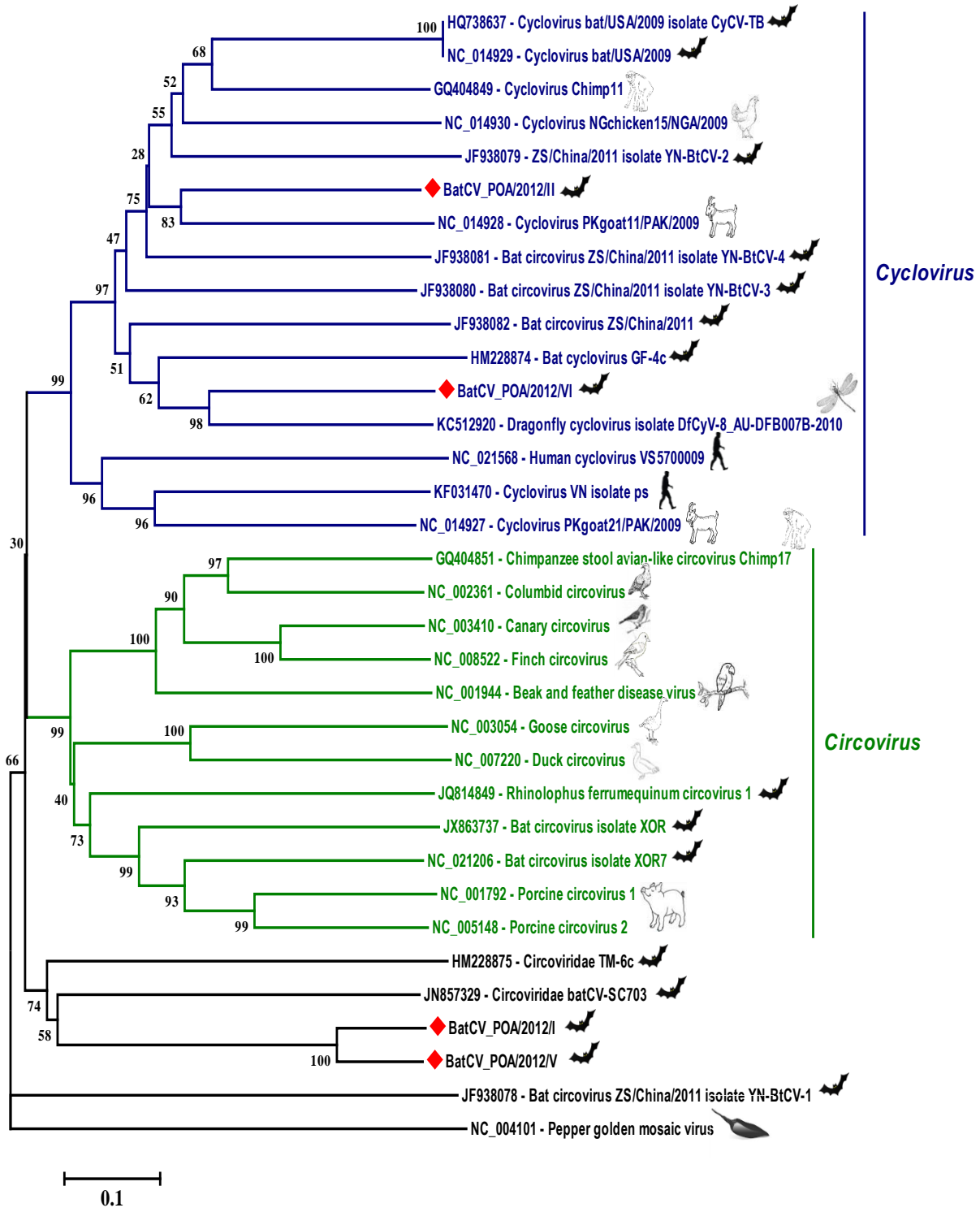
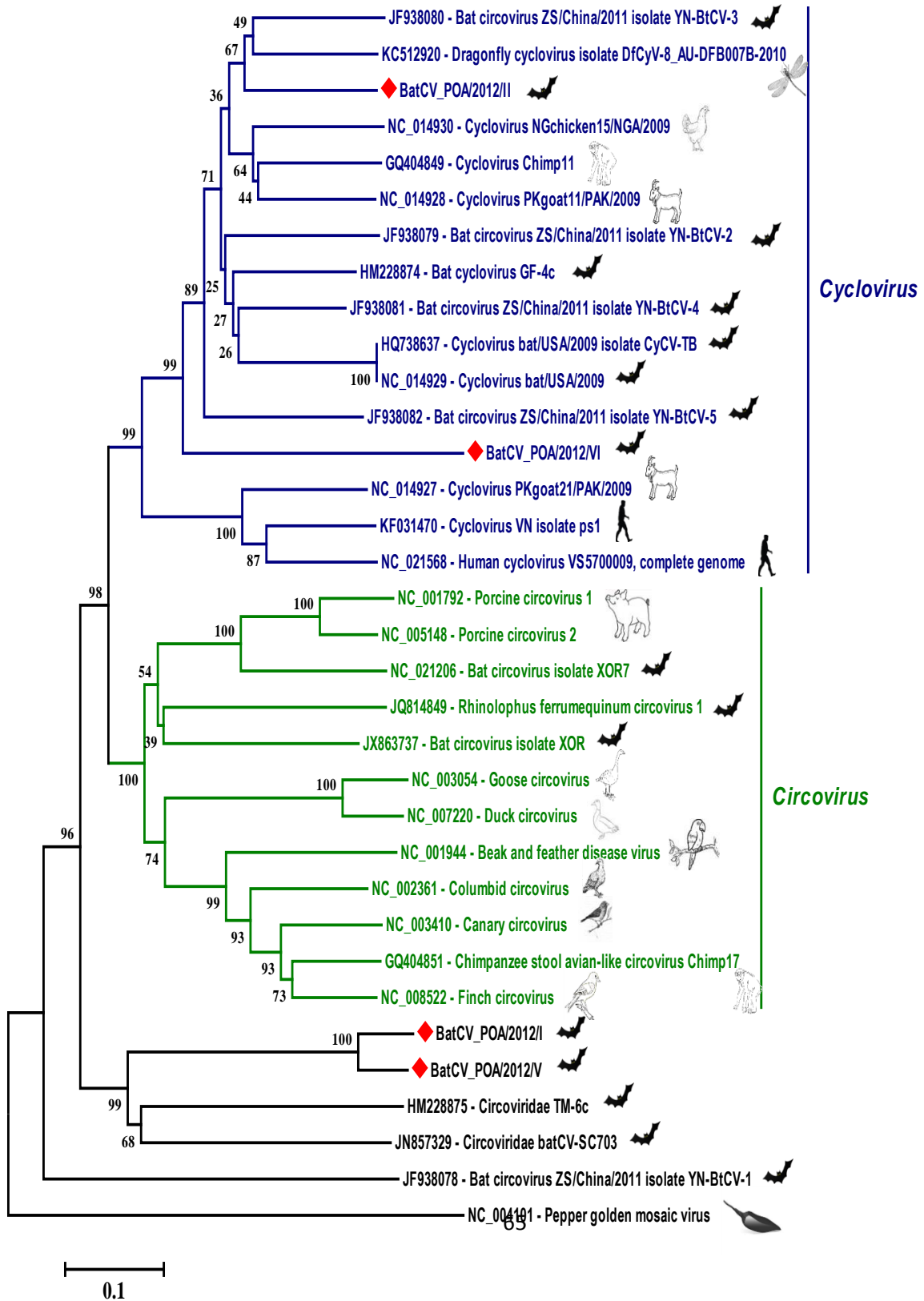


Figure 2. Predicted genome organization of the four circular ssDNA sequences recovered from bat feces in Southern Brazil. The two inversely arranged ORFs responsible for encoding the putatives replication associated protein (REP) and capsid protein (CAP) are shown in blue boxes.

A



B



C

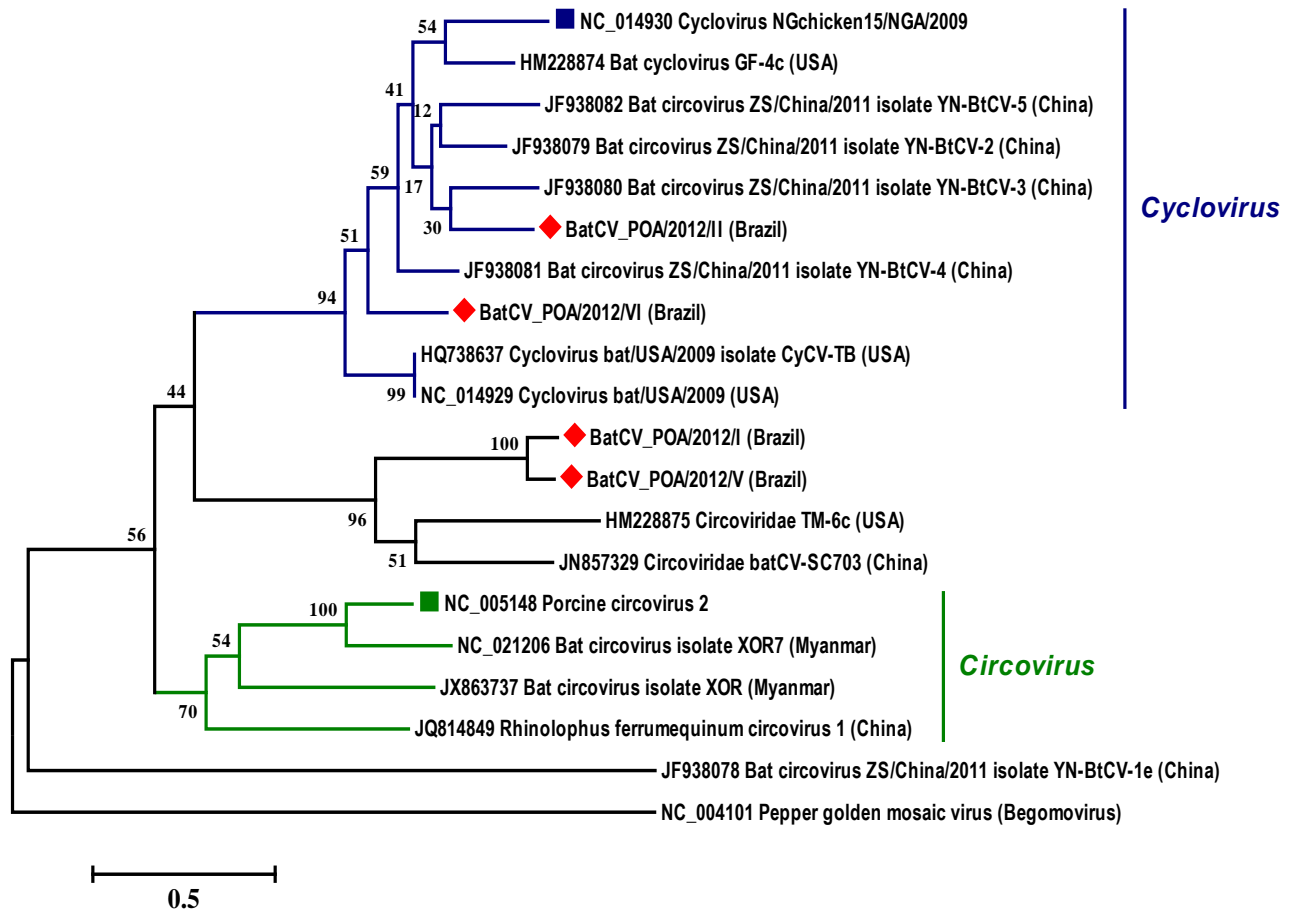


Figure 3. Phylogenetic analysis of the complete CAP (A) and REP (B) and complete genomes (C) from *Circovirus* and *Circovirus*-like genomes identified in mammals, birds and insects. Host denomination is demonstrated after each retrieved sequence from GenBank with their accession numbers and clustered along, according to genus classification. The sequences identified in bat feces from Southern Brazil are labeled by red diamonds. Evolutionary analyses were conducted in MEGA5 [29].

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Entre as diferentes espécies de animais silvestres que podem agir como reservatórios de vírus na natureza, os morcegos parecem ter importância destacada. Até o momento foram identificados vírus de quinze famílias em pelo menos duzentas espécies de morcegos de 12 diferentes famílias ao redor do mundo (O'Shea et al., 2014). Até o momento não se sabe por que diferentes espécies de morcegos podem albergar tantas espécies de vírus. Fatos como a longevidade (25-35 anos de vida), aspectos da sua evolução (morcegos surgiram muito cedo e não mudaram muito em comparação com outros mamíferos), a estrutura populacional (formação de metapopulações) e aspectos da imunologia dos morcegos parecem contribuir para o seu papel como reservatórios desta grande variedade de vírus. Além disso, são animais capazes de voar por longas distâncias e compartilhar, em alguns casos, o mesmo abrigo ou ambientes. Especula-se que estas características possam facilitar a persistência e transmissão de vírus entre morcegos (Calisher et al., 2006; O'Shea et al., 2014).

Detectamos a presença de RNA viral da família *Coronaviridae* em colônia de morcegos insetívoros em área densamente povoada na região central do município de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. Neste trabalho, apenas alphacoronavírus foram detectados, os quais, diferentemente de betacoronavírus

de morcegos, aparentemente não apresentam potencial zoonótico. Destacamos que este é o primeiro trabalho realizado no país para a detecção de alphacoronavírus em espécies de morcegos insetívoras (*Molossus molossuse Tadarida brasiliensis*) com uma frequência de 20% de detecção nas amostras analisadas. Estudos epidemiológicos adicionais precisam ser realizados visando à identificação de outros coronavírus, com atributos filogenéticos mais complexos em colônias e espécies de morcegos distintas e verificando, se esse padrão filogenético é comum a outras espécies na região Sul do Brasil.

Também foi possível amplificar DNA viral da família *Adenoviridae* a partir de espécimes de morcego hematófago *Desmodus rotundus*. Trata-se da primeira detecção nesta espécie de morcego, que ocorre apenas na América do Sul. Entretanto, o limitado tamanho da sequência gênica obtida não permitiu a confirmação de que se trata de uma nova espécie de vírus, mesmo apresentando 75% de identidade a nível de nucleotídeos no gene que codifica a DNA polimerase.

Por fim, descrevemos a presença de quatro novos DNAs circulares pertencentes à família *Circoviridae* detectados em fezes de morcegos insetívoros (*Molossus molossus* e *Tadarida brasiliensis*), utilizando técnicas de PCR *consensus* e inversa para um vírus DNA fita simples circular. A grande diferença a nível de aminoácidos observada no sequenciamento inicial do gene *rep*, foi confirmada após o sequenciamento completo, ou quase completo dos quatro genomas. Esses dados confirmam que essas são novas espécies dentro da família *Circoviridae*. Além disso, provavelmente, dois desses genomas pertencem a um possível novo gênero dentro desta família.

A detecção desses vírus a partir de amostras de fezes e tecidos de diferentes espécies de morcegos encontrados no estado do Rio Grande do Sul é inédita e contribuirá para que estudos subsequentes o utilizem como parâmetro em investigações que abranjam outras regiões do país e uma maior diversidade de espécies analisadas. Por serem estudos iniciais, não se conhece a real distribuição desses vírus entre diferentes espécies de morcegos ou outros hospedeiros, nem o potencial patogênico para esses animais ou mesmo para humanos. Sendo assim, esse estudo deverá ser ampliado com relação à amostragem analisada e às técnicas utilizadas para detecção viral. Somente assim poderemos ter uma ideia mais precisa sobre o papel dos morcegos na manutenção de vírus na natureza e na disseminação para outros hospedeiros, avaliando o impacto que um eventual surto de viroses emergentes teria em relação à fauna silvestre e levando em consideração, humanos que poderiam estar expostos a um risco de infecção, tanto em ambientes inhóspitos, como em grandes centros urbanos.

6. CONCLUSÕES

As atuais técnicas moleculares têm auxiliado epidemiologistas e profissionais de saúde a detectar possíveis surtos de vírus que possam se tornar emergentes, colocando em risco a saúde humana e animal.

Ainda não é possível prever quando e como ocorreriam surtos de vírus emergentes, mas é importante realizar estudos de vigilância epidemiológica sobre a vida animal selvagem, já que evidências mostram que estes sejam os principais carreadores de enfermidades infecciosas.

Com ações de desflorestamento, atividades antropogênicas e a maior invasão do homem em ambientes tidos como inóspitos, há uma maior predisposição ao contato com a vida silvestre, o que possibilitaria uma provável transmissão interespecie. O estudo da diversidade viral em morcegos e sua biologia ajudarão a compreender e a ter uma resposta a novos vírus emergentes.

O objetivo deste trabalho foi alcançado no que diz respeito à detecção de diferentes vírus em amostras biológicas de morcegos no Sul do Brasil. Esses estarão disponíveis, para que possam servir de base para futuros estudos envolvendo estudos de diversidade viral e biologia em morcegos, tanto do Sul do

Brasil, como em outras regiões, o que auxiliará a melhor compreender a presença de possíveis vírus emergentes nessas espécies.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILAR-SETIEN, A.; E. LOZA-RUBIO, M.; SALAS-ROJAS, N.; BRISSEAU, F.; CLIQUET, P. P.; PASTORET, S.; ROJAS-DOTOR, E.; TESORO, R. Salivary excretion of rabies virus by healthy vampire bats. **Epidemiol. Infect.** 133:517–522, 2005.

BADRANE, H.; TORDO, N. Host switching in Lyssavirus history from the Chiroptera to the Carnivora orders. **J Virol** ; 75: 8096–810, 2001.

BAIZE, S.; PANNETIER, D.; OESTEREICH, L.; RIEGER, T.; KOIVOGUI, L.; MAGASSOUBA, N. et al., Emergence of Zaire Ebola Virus Disease in Guinea — Preliminary Report. **N. England j. M.** 1-8, 2014.

BALDOCK, F.C.; DOUGLAS, I.C.; HALPIN, K.; FIELD, H.; YOUNG, P.L.; BLACK, P.F. Epidemiological investigations into the 1994 equine morbillivirus outbreaks in Queensland, Australia, **Singapore Vet J**20:57-61, 1996.

BARRETTE, R.W.; METWALLY, S.A.; ROWLAND, J.M.; XU, L., ZAKI, S.R.; NICHOL, S.T. Discovery of swine as a host for the Reston ebolavirus. **Science**: 325, 204–206, 2009.

BENKO, M.; B. HARRACH. Molecular evolution of adenoviruses. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.** 272:3–35, 2003.

BRANDÃO, P.E.; SCHEFFER, K.; VILLARREAL, L.Y.; ACHKAR, S.; OLIVEIRA, N., FAHL, W. O; CASTILHO, J.G.; KOTAIT, I.; RICHTZENHAIN, L.J. A coronavirus detected in the vampire bat *Desmodus rotundus*. **Braz J Infect Dis.** 6: 466-468, 2008.

BUONAVOGLIA, C.; MARTELLA, V. Canine respiratory viruses. **Vet. Res.** 38:355–373, 2007.

CALISHER, C.H.; KINNEY, R.M.; DE SOUZA LOPES, O.; TRENT, D.W.; MONATH, T.P.; FRANCY, D.B. Identification of a new Venezuelan equine encephalitis virus from Brazil. **Am J Trop Med Hyg.** 48: 1260-1272, 1982.

CALISHER, C.H.; CHILDS, J.E.; FIELD, H.E.; HOLMES, K.V.; SCHOUNTZ, T. Bats: important reservoir hosts of emerging viruses. **Clin Microbiol Rev.** 19:531-545. Review, 2006.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC) "Outbreak of Ebola in Guinea, Liberia, and Sierra Leone" (<http://www.cdc.gov/vhf/ebola/outbreaks/guinea/>)

CHANT, K.; CHAN, R.; SMITH, M.; DWYER, D.E.; KIRKLAND, P. Probable human infection with a newly described virus in the family Paramyxoviridae, *Emerg Infect Dis* 4:273-275, 1998.

CHIM, S.S.; DENNIS, L.O. Molecular Epidemiology of the Coronavirus Associated with Severe Acute Respiratory Syndrome: A Review of Data from The Chinese University of Hong Kong, *Clin. Biochem. Rev.* 25:143-147, 2004.

CHOMEL, B.B.; BELOTTO, A.; MESLIN, F.X. Wildlife, exotic pets, and emerging zoonoses. *Emerg Infect Dis.* 13:6-11, 2007.

CHU, D.K.; PEIRIS, J.S.; CHEN, H.; GUAN, Y.; POON, L.L. Genomic characterizations of bat coronaviruses (1A, 1B and HKU8) and evidence for co-infections in *Miniopterus* bats. *J Gen Virol.*;89:1282–7, 2008

CHUA, K.; BELLINI, W.; ROTA, P.; HARCOURT, B.H.; TAMIN, A.; LAM, S.K.; KSIAZEK, T.G.; ROLLIN, P.E.; ZAKI, S.R.; SHIEH, W.; GOLDSMITH, C.S.; GUBLER, D.J.; ROEHRIG, J.T.; EATON, B.; GOULD, A.R. Nipah virus: a recently emergent deadly paramyxovirus. *Science* 288: 1432-1435, 2000.

CHUA, K.; WANG, L.; LAM, S.; CRAMERI, G.; YU, M.; WISE, T.; BOYLE, D.; HYATT, A.D.; EATON, B.T. Tioman virus, a novel paramyxovirus isolated from fruit bats in Malaysia, *Virology* 283:215-219, 2001.

CHUA, K.B.; WANG, L.; LAM, S.K.; EATON, B.: Full length genome sequence of Tioman virus, a novel paramyxovirus in the genus *Rubulavirus* isolated from fruit bats in Malaysia, *Arch Virol* 147:1323-1348, 2002.

DAVISON, A.J.; BENKO, M.; HARRACH, B. Genetic content and evolution of adenoviruses. *J. Gen. Virol.* 84:2895–2908, 2003.

DOBSON, A.P. What links bats to emerging infectious diseases? *Science.*;310:628–9, 2005.

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.; CLAASSEN, E.A.; CORNELISSEN, L.A.; LOVATO, M.; FRANCO, A.C.; ROEHE, P.M.; RIJSEWIJK, F.A. Variants of the recently discovered avian gyrovirus 2 are detected in Southern Brazil and The Netherlands. *Vet Microbiol.* 3;155(2-4):230-236, 2011.

DREXLER, J.F.; CORMAN, V. M.; WEGNER, T.; TATENO, A. F.; ZERBINATI, R.; GLOZA- RAUSCH, F.; SEEBENS, A. Amplification of emerging viruses in a bat colony. **Emerg. Infect. Dis.** 17:449–456, 2011.

EATON, B.T.; BRODER, C.C.; MIDDLETON, D.; WANG, L. Hendra and Nipah viruses: different and dangerous, **Nat Rev Microbiol** 4:23-35, 2006.

EPSTEIN, J.H.; PRAKASH, V.; SMITH, C.S.; DASZAK, P.; MCLAUGHLIN, A.B.; MEEHAN, G. Henipavirus infection in fruit bats (*Pteropus giganteus*), India. **Emerg Infect Dis.** 14:1309–1311, 2008.

FAUQUET, C. M.; FARGETTE, D. International Committee on Taxonomy of Viruses and the 3,142 unassigned species. **Virology**, 2: 64, 2005.

FIELD, H.; YOUNG, P.; YOB, J.M.; MILLS, J.; HALL, L.; MACKENZIE, J. The natural history of Hendra and Nipah viruses. **Microbes Infect.** 3: 307–314, 2001.

FIELD, H.E. The ecology of Hendra virus and Australian bat lyssavirus, Brisbane, University of Queensland (PhD thesis), 2005.

FLEMING, T.H.; EBY, P. Ecology of bat migration. **The University of Chicago Press: Chicago.** 156–208, 2003.

GE, X.; LI, J.; PENG, C.; WU, L.; YANG, X.; WU, Y.; ZHANG, Y.; SHI, Z. Genetic diversity of novel circular ssDNA viruses in bats in China. **J Gen Virol.** 92: 2646–2653, 2011.

GOH, K.J.; TAN, C.T.; CHEW, N.K.; TAN, P.S.; KAMARULZAMAN, A.; SARJI, S.A.; WONG, K.T.; ABDULLAH, B.J.; CHUA, K.B.; LAM, S.K. Clinical features of Nipah virus encephalitis among pig farmers in Malaysia. **N Engl J Med** ; 342: 1229–1235, 2000.

GONÇALVES, M.A.; SA´-NETO, R.J.; BRAZIL, T.K. Outbreak of aggressions and transmission of rabies in human beings by vampire bats in northeastern Brazil. **Ver Soc Bras Med Trop.** 35: 461–464, 2002.

GRAU-ROMA, L.; FRAILE, L.; SEGALÉS, J. Recent advances in the epidemiology , diagnosis and control of diseases caused by porcine circovirus type 2. **Vet. J.** 187: 23-32, 2011.

GREENOUGH, T.C.; CARVILLE, A.; CODERRE, J. Pneumonitis and multi-organ system disease in common marmosets (*Callithrix jacchus*) infected with the severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus. **Am J Pathol.** 167: 455–463, 2005.

GUAN, Y.; ZHENG, B.J.; HE, Y.Q. Isolation and characterization of viruses related to the SARS coronavirus from animals in southern China. **Science.** 302: 276–278, 2003.

HALPIN, K., YOUNG, P.L.; FIELD, H.E.; MACKENZIE, J.S. Isolation of Hendra virus from pteropid bats: a natural reservoir of Hendra virus. **J Gen Virol** 81: 1927–1932, 2000.

HANNA, J. N., I. K. CARNEY, G. A. SMITH, A. E. TANNENBERG, J. E. DEVERILL, J. A. BOTHA, I. L. SERAFIN, B. J. HARROWER, P. F. FITZPATRICK, AND J. W. SEARLE. Australian bat lyssavirus infection: a second human case, with a longincubation period. **Med. J. Aust.**172:597–599, 2000.

HARCOURT, B.H.; LOWE, L.; TAMIN, A.; LIU, X.; BANKAMP, B.; BOWDEN, N.; ROLLIN, P.E.; COMER, J.A.; ROTA, P.A. Genetic characterization of Nipah virus, Bangladesh, 2004, **Emerg Infect Dis**11(10):1594-1597, 2005.

HENDERSON, G.W.; LAIRD, C.; DERMOTT, E.; RIMA, B.K.; Characterization of Mapuera virus: structure, proteins and nucleotide sequence of the gene encoding the nucleocapsid protein. **J Gen Virol.** 76: 2509-2518, 1995.

HSU, V.P.; HOSSAIN, M.J.; PARASHAR, U.D.; KUZMIN, I.; NIEZGODA, M.; RUPPRECHT, C.; BRESEE, J. Nipah virus encephalitis reemergence, Bangladesh, **Emerg Infect Dis**10:2082-2087, 2004.

JÁNOSKA, M.; VIDOVSZKY, M.; MOLNÁR, V.; LIPTOVSKY, M.; HARRACH, B.; BENKO, M. Novel adenoviruses and herpesviruses detected in bats. **Vet. J.** 189:118 –121, 2011.

JOHARA, M.; FIELD, H.; RASHDI, A. Serological evidence of infection with Nipah virus in bats (order Chiroptera) in peninsular Malaysia, **Emerg Infect Dis.** 7:439-441, 2001.

KOHL, C.; VIDOVSZKY, M.Z.; MÜHLDORFER, K.; DABROWSKI, P.W.; RADONIĆ, A.; NITSCHKE, A.; WIBBELT, G.; KURTH, A.; HARRACH, B. Genome Analysis of Bat Adenovirus 2: Indications of Interspecies Transmission. **Journal of Virology** p. 1888–1892, 2011.

KUHN, S.; BECKER; EBIHARA, H.; GEISBERT, T. W.; JAHRLING, P. B.; KAWAOKA, Y.; NETESOV, S. V.; NICHOL, S. T. "Family Filoviridae", **Virus Taxonomy—Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Press.** 665–671, 2011.

KUIKEN, T.; FOUCHIER, R.A.; SCHUTTEN, M. Newly discovered coronavirus as the primary cause of severe acute respiratory syndrome. **Lancet** 2003; 362: 263–270, 2003.

KUIKEN, T.; LEIGHTON, F.A.; FOUCHIER, R.A.; LEDUC, J.W.; PEIRIS, J.S.; SCHUDEL, A.; STÖHR, K.; OSTERHAUS, A.D. Pathogen surveillance in animals. **Science.** 309:1680-1681, 2005.

KUNZ, T.H.; LUMSDEN, L.F. Ecology of cavity and foliage roosting bats. **The University of Chicago Press: Chicago**. 3–89, 2003.

LAMB, R.A.; PARKS, G.D. (2007) *Paramyxoviridae*: The viruses and their replication. In: Knipe DM, Griffin DE, Lamb RA, Straus SE, Howley PM et al., editors. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 1449–1496, 2007.

LAU, S.K.; WOO, P.C.; LI, K.S.; HUANG, Y.; TSOI, H.W.; WONG, B.H.; WONG, S.S.; LEUNG, S.Y.; CHAN, K.H.; YUEN, K.Y. Severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in Chinese horseshoe bats. **Proc Natl Acad Sci**. 102: 14040–14045, 2005.

LAMPO, M.; FELICIANGELI, M.D., MARQUEZ, L.M.; BASTIDAS, C.; LAU, P. A possible role of bats as a blood source for the Leishmania vector *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). **Am J Trop Med Hyg**. 62: 718–719, 2000.

LEROY, E.M.; KUMULUNGUI, B.; POURRUT, X.; ROUQUET, P.; HASSANIN, A.; YABA, P.; DÉLICAT, A.; PAWESKA, J.T.; GONZALEZ, J.P.; SWANEPOEL, R. Fruit bats as reservoirs of Ebola virus. **Nature**. 438: 575-576, 2005

LEROY, E.M.; EPELBOIN, A.; MONDONGE, V.; POURRUT, X.; GONZALEZ, J.P.; MUYEMBE-TAMFUM, J.J. Human Ebola outbreak resulting from direct exposure to fruit bats in Luebo, Democratic Republic of Congo, 2007. **Vector Borne Zoonotic Dis**. 9:723–8, 2009

LI, W.; SHI, Z.; YU, M.; REN, W.; SMITH, C.; EPSTEIN, J.H.; Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses. **Science**. 310:676–9, 2005.

LI, Y.; GE, X.; ZHANG, H.; ZHOU, P.; ZHU, Y.; ZHANG, Y.; YUAN, J.; WANG, L.F.; SHI, Z. Host range, prevalence, and genetic diversity of adenoviruses in bats. **J. Virol**. 84:3889–3897, 2010.

LI, L.; VICTORIA, J.G.; WANG, C.; JONES, M.; FELLERS, G.M.; KUNZ, T.H.; DELWART, E. Bat guano virome: predominance of dietary viruses from insects and plants plus novel mammalian viruses. **J. Virol**. 84: 6955–6965, 2010.

LI, L.; SHAN, T.; SOJI, O.B.; ALAM, M.M.; KUNZ, T.H.; ZAIDI, S.Z.; DELWART, E. Possible cross-species transmission of circoviruses and cycloviruses among farm animals. **J Gen Virol** 92: 768-772, 2011.

LIMA, F.E.; CIBULSKI, S.P.; ELESBAO, F.; CARNIELI JUNIOR, P.; BATISTA, H.B.; ROEHE, P.M.; FRANCO, A.C. First detection of adenovirus in the vampire bat (*Desmodus rotundus*) in Brazil. **Virus Genes**. 47: 378-381, 2013a.

LIMA, F.E.; CAMPOS, F.S.; KUNERT FILHO, H.C.; BATISTA, H.B.; CARNIELLI P JR.; CIBULSKI, S.P.; SPILKI, F.R.; ROEHE, P.M.; FRANCO, A.C. Detection of Alphacoronavirus in velvety free-tailed bats (*Molossus molossus*) and Brazilian free-tailed bats (*Tadarida brasiliensis*) from urban area of Southern Brazil. **Virus Genes**. 47:164-167, 2013b.

LIN MH, CHUANG SJ, CHEN CC, CHENG SC, CHENG KW, LIN CH, SUN CY, CHOU CY. Structural and functional characterization of MERS coronavirus papain-like protease. **J Biomed Sci**. 21:54, 2014.

LUBY, S.P.;HOSSAIN, M.J.;GURLEY, E.S., AHMED, B.N., BANU, S., KHAN, S.U. Recurrent zoonotic transmission of Nipah virus into humans, Bangladesh, 2001–2007.**Emerg Infect Dis**.;15:1229–35, 2009.

MACKENZIE, J.; CHUA, K.; DANIELS, P. Emerging viral diseases of South-East Asia and the Western Pacific: a brief review, **Emerg Infect Dis**7:497-504, 2001.

MAEDA, K.; HONDO, E.; TERAKAWA, J.; KISO, Y.; NAKAICHI, N.; ENDOH, K. SAKAI, K.; MORIKAWA, S.; MIZUTANI, T. Isolation of novel adenovirus from fruit bat (*Pteropusdasymallus yayeyamae*). **Emerg. Infect. Dis**.14:347–349, 2008.

MARYANTO, I.; YANI, M.; NURAMALIATI, S.; WIANTORO, S. Records of the Western Australian Museum. 27: 68-84, 2012.

MARSH, G.A.; DE JONG, C.; BARR, J.A. TACHEDJIAN, M.; SMITH, C.; MIDDLETON, D.; YU, MENG.; TODD, S. et al. Cedar Virus: A novel henipavirus isolated from Australian bats. **Plos Pathogens**.8:8-e1002836, 2012.

MARTINA, B.E.; HAAGMANS, B.L.; KUIKEN, T.; FOUCHIER, R.A.; RIMMELZWAAN, G.F.; VAN AMERONGEN, G.; PEIRIS, J.S.; LIM, W. SARS virus infection of cats and ferrets. **Nature**; 425: 915, 2003.

MAYEN, F. Haematophagous bats in Brazil, their role in rabies transmission, impact on public health, livestock industry and alternatives to an indiscriminate reduction of bat population. **J. Vet. Med. B** 50:469–472, 2003.

MCAULIFFE J, VOGEL L, ROBERTS A. Replication of SARS coronavirus administered into the respiratory tract of African Green, rhesus and cynomolgus monkeys. **Virology**, 330: 8–15, 2004

MCCARTHY, A.J.; GOODMAN, S.J. Reassessing conflicting evolutionary histories of the Paramyxoviridae and the origins of respiroviruses with Bayesian multigene phylogenies. *Infect Genet Evol*, 10:97-107, 2010.

MEMISH, Z.A.; MISHRA, N.; OLIVAL, K.J.; FAGBO, S.F.; KAPOOR, V.; EPSTEIN, J.H.; ALHAKEEM, R.; DUROSINLOUN, A.; ASMARI, M.A.; ISLAM, A.; KAPOOR, A.; THOMAS BRIESE, T.; DASZAK, RABEEAH, A.; LIPKIN, W.I. Middle East

Respiratory Syndrome Coronavirus in Bats, Saudi Arabia. **Emerg Infect Dis.**19:1819-1823, 2013.

MILLS, J.N.;ALIM, A.N.;BUNNING, M.L.;LEE, O.B.;WAGONER, K.D.;AMMAN B.R.;STOCKTON, P.C..KSI AZEK, T.G. Nipah virus infection in dogs, Malaysia, 1999. **Emerg Infect Dis.**15: 950-952, 2009.

MUYEMBE-TAMFUM, J.J.; MULANGU, S.; MASUMU, J.; KAYEMBE, J.M.; KEMP, A.; PAWESKA, J.T.Ebola virus outbreaks in Africa: Past and present. *Journal of Veterinary Research.* 79:8-12, 2012.

NEGREDO A.; PALACIO, G.; VASQUEZ-MORO, S.; GONZALEZ, F.; DOPAZO, H.; MOLERO, F.; JUSTE, J.; QUETGLAS, J.; SAVIJ, N.; DE LA CRUZ MARTINEZ, M.; HERRERA, E.; PIZARRO, M.; HUTCHISON S.K.; ECHEVARRIA, J. E.; LIPKIN, W.I.; TENORIO, A. Discovery of an Ebolavirus-Like Filovirus in Europe. **Plos Pathogens** 7 :10 , e1002304, 2011.

NERETTI, N.; SANDERSON, M.I.; INTRATOR, N.; SIMMONS, J.A. Time frequency model for echo-delay resolution in wideband biosonar.**J. Acoust. Soc. Am.** 113:2137–2145, 2003.

NEUWEILER, G. The Biology of the Bats.**Oxford University Press:** Oxford, 2000

NOTEBORN, M.H.; DE BOER, G.F.; VAN ROOZELAAR, D.J.; KARREMAN, C.; KRANENBURG, O. et al. Characterization of cloned chicken anemia virus DNA that contains all elements for the infectious replication cycle. **J Virol** 65: 3131-3139, 1991.

NKOGHE, D.; KONE, M.L.; YADA, A.; LEROY, E. , 'A limited outbreak of Ebola haemorrhagic fever in Etoumbi, Republic of Congo, 2005', *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*105, 466–472, 2011.

OLSON, J.; RUPPRECHT, C.; ROLLIN, P.; AN, U.; NIEZGODA, M.; CLEMINS, T.: Antibodies to Nipah-like virus in bats (*Pteropus lylei*), Cambodia, **Emerg Infect Dis**8(9):987-988, 2002.

OPRIESSNIG, T.; MENG, X.J.; HALBUR, P.G. Porcine circovirus type 2 associated disease: update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. **J.Vet.Diag. Invest**, 19: 591-615, 2007.

O'SHEA T.J; CRYAN, P.M.; CUNNINGHAM, A.A.; FOOKS, A.R.; HAYMAN, D.T.; LUIS A.D.; PEEL, A.J.; PLOWRIGHT; R.K.; WOOD, J.L. Bat flight and zoonotic viruses. **Emerg Infect Dis.** 20:741-745, 2014

PAVRI, K., SINGH, K.; HOLLINGER, F. Isolation of a new parainfluenza virus from a frugivorous bat, *Rousettus leschenaulti*, collected at Poona, India, **Am J Trop Med Hyg** 20:125-130, 1971.

PHILBEY A, KIRKLAND P, ROSS A .An apparently new virus (family Paramyxoviridae) infectious for pigs, humans and fruit bats, **Emerg Infect Dis**4:269- 271, 1998.

PHILBEY A.W.; KIRKLAND, P.D.; ROSS, A.D.; DAVIS, R.J.; LOVE, P.: Menangle virus: a new member of the family Paramyxoviridae infectious for pigs, humans and fruit bats, **Abstr XI Int Congr Virol**, Sydney , p 21, 1999.

POON, L.L; CHU, D.K.; CAHN, K.H.; WONG, O.K.; ELLIS, T.M.; LEUNG, Y.H.; LAU, S.K.; SUEN, K.Y.; YUEN, K.Y; GUAN, Y.; PEIRIS, J.S. Identification of a novel coronavirus in bats. **J. Virol.** 79:2001-2009.,2005.

POURRUT, X.; KUMULUNGUI, B.; WITTMANN. T. The natural history of Ebola virus in Africa. **Microb Infect.** 7: 1005–1014, 2005.

POURRUT, X.;DELICAT, A.; ROLLIN, P.E.; KSIAZEK, T.G., GONZALEZ, J.P.;LERO, E.M. Spatial and temporal patterns of Zaire ebolavirus antibody prevalence in the possible reservoir bat species.**J Infect Dis.**196(Suppl 2):S176–83, 2007.

RIJSEWIJK, F.A.; DOS SANTOS, H.F.; TEIXEIRA, T.F.; CIBULSKI, S.P.; VARELA, A.P.; DEZEN, D.; FRANCO, A.C.; ROEHE, P.M. 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, 2011.

RIMA, B.K.; ALEXANDER, D.J.; BILLETER, M.A.; MURPHY, F.A.; FAUQUET, C.M.; BISHOP, D.H.L. Family Paramyxoviridae. IN, editors: *Virus taxonomy*, Sixth Report of International Committee on Taxonomy of Viruses, New York, **Springer-Verlag**: 268-274, 1995.

ROBERTS, A.; VOGEL, L.; GUARNER, J.;LAMIRANDE, E.W.; ELKINS, W.R. Severe acute respiratory syndrome coronavirus infection of golden Syrian hamsters. **JVirol**; 79: 503–511, 2005.

SAMBROOK J. & RUSSELL DW. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, Cold Spring Harbor, New York, 2001.

SANDERSON, M. I.; NERETTI, N.; INTRATOR, N.; SIMMONS, J.A... Evaluation of an auditory model for echo delay accuracy in wideband biosonar.**J. Acoust. Soc. Am.**114:1648–1659, 2003.

SCHNEIDER, M.C.; ARON, J.; SANTOS-BURGOA, C.; UIEDA, W.; RUIZ-VELAZCO, S. Common vampire bat attacks on humans in a village of the Amazon region of Brazil. **Cad Saude Publica**; 17: 1531–1536, 2001.

SCHRENZEL, M.; OAKS, J.L.; ROTSTEIN, D. MAALOUF, G.; E. SNOOK, C. SANDFORT, AND B. RIDEOUT.. Characterization of a new species of adenovirus infalcons.**J. Clin. Microbiol.**43:3402–3413, 2005.

SELVEY, L., WELLS R.M.; MCCORMACK, J.G. Infection of humans and horses by a newly described morbillivirus, **Med J Aust**162:642-645, 1995.

SIMMONS, N. B. Order Chiroptera,. Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference, **Johns Hopkins University Press**, Baltimore, Md, p. 3rd ed. 312–529, 2005.

SONNTAG, M.; MÜHLDORFER, K.; SPECK, S.; WIBBELT, G.; KURTH, A.New adenovirus in bats, Germany.**Emerg. Infect. Dis.** 15:2052–2055, 2009.

SPEAKMAN, J.R., THOMAS, D.W. Physiological ecology and energetics of bats. **The University of Chicago Press**: Chicago, 430–490, 2003.

SWANEPOEL, R., LEMAN, P.A., BURT, F.J., ZACHARIADES, N.A., BRAACK, L.E.O., KSIAZEK, T.G. Experimental inoculation of plants and animals with Ebola virus.**Emerg. Infect. Dis.**2, 321–325, 1996.

SWANEPOEL, R.; SMIT, S.B.; ROLLIN, P.E.; FORMENTY, P.; LEMAN, P.A.; KEMP, A. 'Studies of reservoir hosts for Marburg virus', **Emerg. Infect. Dis.** 13, 1847–1851, 2007.

TANG, X. C.; ZHANG, J.X.; ZHANG, S.Y.; WANG, P. ; FAN, X.H.; LI, L.F.; LI, DONG,B.Q.; LIU, W.; CHEUNG, C.L.;XU, K.M.; SONG, , W.J.; VIJAYKRISHNA, D.; POON, L.L.;PEIRIS, J.S.;SMITH, G.J.; CHEN, H.; GUAN, Y. Prevalence and genetic diversity of coronaviruses in bats from China. **J. Virol.** 80:7481-7490, 2006.

TAYLOR, L.H.; LATHAM, S.M.; WOOLHOUSE, M.E.Risk factors for human disease emergence.**Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.** 356:983-989, 2001

TEELING, E. C.; SPRINGER, M.S.; MADSEN, O.; BATES, P.; O'BRIEN, S.J.; MURPHY, W.J.. A molecular phylogeny for bats illuminates biogeography and the fossil record. **Science**307:580–584, 2005.

TOWNER, J.S., AMMAN, B.R.; SEALY, T.K.; REEDER CARROL, S.A.; COMER, J.A., KEMP, A. 'Isolation of genetically diverse Marburg viruses from Egyptian fruit bats', **PLoS Pathogens**5, e1000536. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1000536>, PMID:19649327, 2009.

VICTORIA, J.G.; KAPOOR, A.; LI, L.; BLINKOVA, O.; SLIKAS, B.; WANG, C.; NAEEM, A.; ZAIDI, S.; DELWART, E. Metagenomic analysis of viruses in stool samples from children with acute flaccid paralysis. **J Virol**, 83: 4642-4651., 2009.

VOGELS, R., ZUIJDGEEST, D.; VAN RIJNSOEVER, R.; HARTKOORN, E.; DAMEN, I.; DE BETHUNE, M.P.; KOSTENSE, S.; PENDERS, G.; HELMUS, N.; KOUDSTAAL, W.; CECCHINI, M.; WETTERWALD, A.; SPRANGERS, M.; LEMCKERT, A.; OPHORST, O.; KOEL, B.; VAN MEERENDONK, M.; QUAX, P.; PANITTI, L.; GRIMBERGEN, J.; BOUT, A.; GOUDSMIT, J.; HAVENGA, M.. Replication-deficient human adenovirus type 35 vectors for gene transfer and vaccination: efficient human cell infection and bypass of preexisting adenovirus immunity. **J. Virol.** 77:8263–8271, 2003.

WACHARAPLUESADEE, S.; LUMLERTDACHA, B.; BOONGIRD, K. Bat Nipah virus, Thailand, **Emerg Infect Dis** 11:1949-1951, 2005.

WANG, L., YU, M.; HANSSON. The exceptionally large genome of Hendra virus: support for creation of a new genus within the family Paramyxoviridae, **J Virol** 74:9972-9979, 2000.

WANG, L.F.; HANSSON, E.; YU, M.; CHUA, K.B.; MATHE, N.; CRAMERI, G.; RIMA, B.K.; MORENO-LÓPEZ, J.; EATON, B.T. Full-length genome sequence and genetic relationship of two paramyxoviruses isolated from bat and pigs in the Americas. **Arch Virol.** 7:1259-1267, 2007.

WANZELLER A.L.; DINIZ, J.A.; GOMES, M.L.; CRUZ, A.C.; SOARES, M.C.; DE SOUZA, W.; TRAVASSOS DA ROSA, A.P.; VASCONCELOS, P.F. Ultrastructural, antigenic and physicochemical characterization of the Mojuí dos Campos (Bunyavirus) isolated from bat in the Brazilian Amazon region. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 3:307-311, 2002.

WELLEHAN, J. F.; JOHNSON, A.J.; HARRACH, B.; BENKO, M.; PESSIER, A.P. JOHNSON, C.M.; GARNER, M.M.; CHILDRESS, A.; JACOBSON, E.R.. Detection and analysis of six lizard adenoviruses by consensus primer PCR provides further evidence of a reptilian origin for the adenoviruses. **J. Virol.** 78:13366–13369, 2004.

WESTENBERG, M.; EATON, B.; BOYLE, D. Menangle virus, a new Paramyxoviridae member, infectious for pigs, humans and fruit bats is closely related to viruses in the genus *Rubulavirus*, **Abstr XI Int Congr Virol**, Sydney, 1999, p 404, 1999.

WOO, P.C.Y.; LAU, S. K. P.; HUANG, Y.; YUEN, K.Y. Coronavirus diversity, phylogeny and interspecies jumping. **Exp. Biol. Med.**, 234:1117- 27, 2009.

WOO, P.C.; LAU, S.K.; LAM, C.S.; LAU, C.C.; TSANG, A.K.; LAU, J.H.; BAI, R.; TENG, J.L., TSANG, C.C.; WANG, M.; ZHENG, B.J.; CHAN, K.H.; YUEN, K.Y. Discovery of seven novel Mammalian and avian coronaviruses in the genus deltacoronavirus supports bat coronaviruses as the gene source of alphacoronavirus and betacoronavirus and avian coronaviruses as the gene source of gammacoronavirus and deltacoronavirus. **J. Virol.** 86: 3995-4008, 2012.

WOOLHOUSE, M.E.;GOWTAGE-SEQUERIA S. Host range and emerging and reemerging pathogens. **Emerg Infect Dis.** 11: 1842–1847, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Laboratory Biosafety Manual – ThirdEdition(http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO_CDS_CSR_LYO_2004_11/en/)

YANG, M., LI, C.K.; LI, K.; HON, K.L.; NG, M.H.; CHAN, P.K.; FOK, T.F. "Hematological findings in SARS patients and possible mechanisms (review)". **International Journal of Molecular Medicine.**14: 311–315, 2004.

YOUNG, P. L., HALPIN, K., SELLECK, P. W., FIELD, H., GRAVEL, J. L., KELLY, M. A.; MACKENZIE, J. S. Serologic evidence for the presence in Pteropus bats of a paramyxovirus related to equine morbillivirus. **Emerg Infect Dis.** 2: 239-240, 1996.

ZHONG, N.S.; ZHENG, B.J.; LI, Y.M.; POON, L.L.M.; XIE, Z.H.; CHAN, K.H.. Epidemiology and cause of severe acute respiratory syndrome (SARS) in Guangdong, People's Republic of China, in February, 2003. **Lancet.** 362: 1353–1358, 2003.

ZHU, H. C.; CHU, D.K.; LIU, W.; DONG, B.Q.; ZHANG, S.Y.; ZHANG, J.X.; L LI, L.F.; VIJAYKRISHNA, D.; SMITH, G.J.; CHEN, H.L.; POON, L.L.; J. S. PEIRIS, J.S.; GUAN, Y. Detection of diverse astroviruses from bats in China. **J. Gen. Virol.** 90:883-887, 2009.