

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

**ANÁLISE METAGENÔMICA DO VIROMA DE FEZES DE LOBOS-
MARINHOS ENCONTRADOS NA COSTA DO RIO GRANDE DO SUL,
BRASIL.**

MARIANA KLUGE

Bacharel em Biomedicina

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

Agosto, 2015

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

**ANÁLISE METAGENÔMICA DO VIROMA DE FEZES DE LOBOS-
MARINHOS ENCONTRADOS NA COSTA DO RIO GRANDE DO SUL,
BRASIL.**

MARIANA KLUGE

Bacharel em Biomedicina

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia Agrícola e do
Ambiente como um dos
requisitos para a obtenção do
Grau de Mestre em
Microbiologia do Ambiente.

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

Agosto, 2015

MARIANA KLUGE
BACHAREL EM BIOMEDICINA
FEEVALE

DISSERTAÇÃO

Submetida como parte dos requisitos
Para obtenção do Grau de

MESTRE EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente

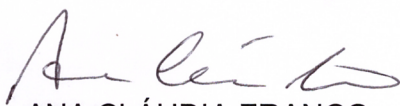
Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

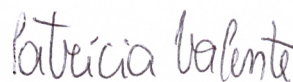
Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovada em: 17/08/2015
Pela Banca Examinadora

Homologado em: 02/09/2015
Por:



ANA CLÁUDIA FRANCO
Orientadora /ICBS-UFRGS



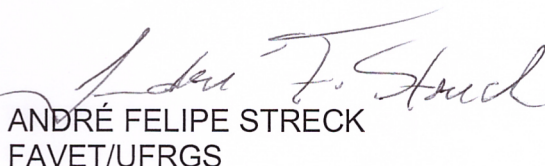
PATRICIA VALENTE
Coordenadora do PPGMAA



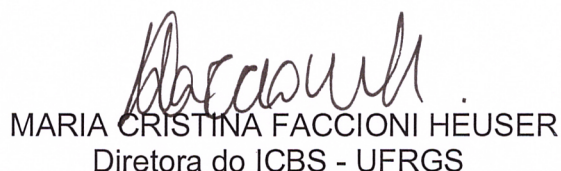
ANA PAULA GUEDES FRAZZON
ICBS/UFRGS



FERNANDO ROSADO SPILKI
PPGQA/FEEVALE



ANDRÉ FELIPE STRECK
FAVET/UFRGS



MARIA CRISTINA FACCIÓNI HEUSER
Diretora do ICBS - UFRGS

CIP - Catalogação na Publicação

Kluge, Mariana

Análise metagenômica do viroma de fezes de lobos-marinhos encontrados na costa do Rio Grande do Sul, Brasil / Mariana Kluge. -- 2015.
136 f.

Orientadora: Ana Cláudia Franco.

Dissertação (Mestrado) -- 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, 2015.

1. Virologia. 2. Metagenômica. I. Franco, Ana Cláudia, orient. II. Título.

ANÁLISE METAGENÔMICA DO VIROMA DE FEZES DE LOBOS-MARINHOS ENCONTRADOS NA COSTA DO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL¹.

Autora: Mariana Kluge

Orientadora: Dr^a Ana Cláudia Franco

RESUMO

A costa do Rio Grande do Sul recebe sazonalmente uma variedade de espécies marinhas que incluem aves, tartarugas e mamíferos. Entre elas, os lobos-marinhos são observados freqüentemente nas praias do litoral, principalmente durante os meses de inverno. Embora muitos destes animais procurem as praias para descansar, muitos deles chegam debilitados ou mortos. Estabelecer quais são os prováveis agentes microbiológicos que possam causar doenças nestes animais e seu potencial para transmissão de zoonoses é uma tarefa difícil pelos dados disponíveis. O objetivo deste estudo foi de aplicar uma análise metagenômica para caracterizar o viroma fecal de lobos-marinhos encontrados mortos ao longo da costa sul-rio-grandense. Duas espécies foram examinadas: o lobo-marinho-sul-americano (*Arctocephalus australis*) e o lobo-marinho-subantártico (*Arctocephalus tropicalis*). Dez amostras de fezes de *A. australis* (n=5) e *A. tropicalis* (n=5) foram coletadas dos intestinos de lobos-marinhos mortos e as partículas virais foram purificadas, extraídas e uma PCR randômica foi realizada. Os produtos amplificados foram seqüenciados por duas plataformas de seqüenciamento, Ion Torrent e Illumina, e os *contigs* foram submetidos ao BLASTx. Ambos os viromas foram predominados por bacteriófagos, no entanto, vírus entéricos de eucariotos e potenciais novos vírus também foram encontrados. Seqüências de anelovírus, parvovírus e picornavírus foram identificadas nas duas espécies de lobos-marinhos. Seqüências de picobirnavírus e semelhantes a hepevírus foram identificadas em *A. australis*, enquanto sapovírus, rotavírus e sakobuvírus foram encontrados em *A. tropicalis*. Estes resultados contribuem para um maior entendimento dos vírus que circulam entre as populações de lobos-marinhos.

¹Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (136 p.) Agosto, 2015.

METAGENOMIC ANALYSIS OF FECAL VIROME OF FUR SEALS FOUND ON THE COAST OF RIO GRANDE DO SUL, BRAZIL¹.

Author: Mariana Kluge

Supervisor: Dr. Ana Cláudia Franco

ABSTRACT

The Rio Grande do Sul coast, the southernmost state in Brazil, seasonally hosts numerous marine species, including birds, turtles and mammals. Among the marine mammals, the Subantarctic and South American fur seals are observed near and on-shore frequently, particularly during winter months. Although some reach the coast to rest, several are found dead or debilitated along the shore. Establishing microbial etiological agents of diseases and the potential for fur seals to serve as reservoirs of zoonotic diseases remains limited due to available data. The aim of this study was to apply a metagenomic approach to characterize the fecal virome of fur seals found dead along the Rio Grande do Sul coast. Two species were analyzed: the South American fur seal (*Arctocephalus australis*) and the Subantarctic fur seal (*Arctocephalus tropicalis*). Ten fecal samples from *A. australis* (n=5) and *A. tropicalis* (n=5) were collected from the intestines of dead fur seals and viral particles were purified, extracted and a random PCR was performed. The amplified products were sequenced through Ion Torrent and Illumina NGS platforms and assembled reads were subjected to BLASTx searches. Both viromes were dominated by bacteriophages, however, enteric and potentially novel eukaryotic viruses were also found. Sequences of anellovirus, parvovirus and picornavirus were identified in both fur seal species. Sequences of picobirnavirus and a hepevirus-like were identified in *A. australis*; while sapovirus, rotavirus and sakubovirus were found in *A. tropicalis*. These findings contribute to a better understanding of the viruses that occur in fur seal populations.

¹Master of Science dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (136 p.) August, 2015.

SUMÁRIO

RELAÇÃO DE TABELAS	vii
RELAÇÃO DE FIGURAS	viii
RELAÇÃO DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Objetivo geral	2
1.2 Objetivos específicos	3
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 Superfamília dos pinípedes	4
2.1.1 Lobo-marinho-sul-americano.....	5
2.1.2 Lobo-marinho-subantártico	6
2.2 Vírus detectados em pinípedes.....	7
2.3 Metagenômica.....	8
2.3.1 Plataformas Ion Torrent e Illumina.....	10
2.3.2 Bioinformática.....	11
2.3.3 Metagenômica viral	13
2.4 Vírus de DNA	15
2.4.1 Anelovírus	15
2.4.2 Parvovírus	17
2.5 Vírus de RNA	18
2.5.1 Picobirnavírus	18
2.5.2 Picornavírus	19
2.5.2.1 Sakobuvírus	20
2.5.2.2 Vírus da Hepatite A (HAV).....	21
2.5.2.3 Vírus da Encefalomielite Aviária (AEV)	21
2.5.3 Rotavírus	21
2.5.4 Sapovírus	23
2.5.5 Hepevírus	24
3. MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1 Amostras.....	26
3.2 Processamento das amostras de fezes.....	31
3.3 Ultracentrifugação em colchão de sacarose.....	31
3.4 Tratamento com DNase e RNase e extração de ácidos nucleicos	32
3.5 Processamento do RNA viral	32
3.6 Processamento do DNA viral	33
3.7 Amplificação independente de seqüência por PCR convencional e seqüenciamento de alto desempenho.....	33
3.8 Bioinformática	34
3.9 Análise filogenética	35
4. RESULTADOS	36
4.1 Visão geral do viroma fecal em <i>A. australis</i> e <i>A. tropicalis</i>	36
4.2 Viroma de lobo-marinho-sul-americano.....	42
4.3 Viroma de lobo-marinho-subantártico	42
4.4 Anelovírus.....	49
4.5 Parvovírus.....	51
4.6 Picobirnavírus	52

4.7 Picornavírus.....	53
4.8 Rotavírus.....	57
4.9 Sapovírus.....	59
4.10 Hepevírus	60
5. DISCUSSÃO.....	62
5.1 Vírus encontrados	64
6. CONCLUSÕES.....	71
7. REFERÊNCIAS	73
8 ANEXOS.....	84

RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
Tabela 1 – Amostras utilizadas neste estudo.....	28
Tabela 2 – Descrição dos <i>contigs</i>	44

RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
Figura 1 – Lobo-marinho-sul-americano.....	6
Figura 2 – Lobo-marinho-subantártico.....	7
Figura 3 – Representação do genoma circular dos anelovírus, utilizando o Torque teno vírus (TTV) como modelo.....	16
Figura 4 – Representação do genoma de membros da subfamília <i>Parvovirinae</i> , ilustrando os dois cassetes de genes: NS e VP.....	17
Figura 5 – Representação do genoma dos picobirnavírus com seus dois segmentos.....	18
Figura 6 – Representação do genoma dos picornavírus, sua poliproteína e peptídeos virais gerados por clivagem proteolítica.....	20
Figura 7 – Representação dos onze segmentos do genoma dos rotavírus.....	22
Figura 8 – Representação do genoma dos sapovírus.....	23
Figura 9 – Representação do genoma do HEV.....	25
Figura 10 – Mapa do trecho do litoral do Rio Grande do Sul com a localização dos espécimes coletados para este estudo.....	29
Figura 11 – Espécime de <i>A. australis</i> (G1537) no local de coleta.....	30
Figura 12 – Espécime de <i>A. tropicalis</i> (G1640) no local de coleta.....	30
Figura 13 – Representação da classificação taxonômica dos <i>contigs</i> (>100 pb) baseada no melhor <i>E-score</i> do BLASTx contra o banco de dados não-redundante de proteínas e de vírus.....	38
Figura 14 – Classificação taxonômica do componente viral dos <i>contigs</i> (>100 pb) baseada no melhor <i>E-score</i> do BLASTx contra o banco de dados não-redundante de proteínas e de vírus.....	40
Figura 15 – Curvas de rarefação geradas pelo servidor Metavir.....	41
Figura 16 – Árvore filogenética construída por NJ utilizando 21 seqüências parciais preditas de aminoácidos (233 aa) da ORF1 de anelovírus.....	50
Figura 17 – Árvore filogenética construída por NJ utilizando 17 seqüências parciais preditas de aminoácidos (261 aa) da NS1 de parvovírus.....	51
Figura 18 – Árvore filogenética construída por NJ utilizando 17 seqüências parciais de nucleotídeos (743 pb) do gene RpRd de picobirnavírus.....	53
Figura 19 – Árvore filogenética construída por NJ utilizando 13 seqüências parciais preditas de aminoácidos (219 aa) da região P1 da poliproteína de picornavírus.....	54

Figura 20 – Árvore filogenética construída por NJ utilizando 12 seqüências parciais preditas de aminoácidos (122 aa) da região P3 da poliproteína de picornavírus.....	55
Figura 21 – Árvore filogenética construída por NJ utilizando 11 seqüências parciais preditas de aminoácidos (409 aa) da região P2 da poliproteína de picornavírus.....	56
Figura 22 – Árvore filogenética construída por NJ utilizando 13 seqüências parciais preditas de aminoácidos (255 aa) da região 3D da poliproteína de picornavírus.....	57
Figura 23 – Árvore filogenética construída por NJ utilizando 19 seqüências parciais preditas de aminoácidos (307 aa) da VP1 de rotavírus.....	58
Figura 24 – Árvore filogenética construída por NJ utilizando nove seqüências de nucleotídeos do gene completo da VP1 de calicivírus.....	59
Figura 25 – Árvore filogenética construída por NJ utilizando nove seqüências de nucleotídeos do gene quase completo da VP2 de calicivírus..	60
Figura 26 – Árvore filogenética construída por NJ utilizando 15 seqüências parciais preditas de aminoácidos (182 aa) da poliproteína de hepevírus.....	61

RELAÇÃO DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

PCR: reação em cadeia da polimerase
rRNA: ácido ribonucléico ribossomal
LASL: linker amplified shotgun library
MDA: amplificação por deslocamento múltiplo
RDA: análise de diferença representacional
OTU: unidade taxonômica operacional
DNA: ácido desoxirribonucléico
RNA: ácido ribonucléico
ORF: open reading frame (fase de leitura aberta)
TTV: Torque teno vírus
NS: proteína não estrutural
VP: viral protein (proteína viral)
RpRd: RNA-polimerase-RNA-dependente
HAV: vírus da hepatite A
AEV: vírus da encefalomielite aviária
HEV: vírus da hepatite E
TNE: Tris NaCl EDTA
TE: Tris-EDTA
cDNA: DNA complementar
dNTP: desoxirribonucleotídeos fosfatados
RT: transcriptase reversa
DTT: Ditiotreitól

1. INTRODUÇÃO

Sazonalmente, a costa do Rio Grande do Sul recebe um grande número de espécies marinhas, constituindo uma rica biodiversidade, entre as quais se destacam tartarugas, aves, cetáceos e pinípedes. Dentre os pinípedes, os principais visitantes são os lobos-marinhos. Embora o Rio Grande do Sul não possua colônias reprodutivas de lobos-marinhos, esses animais chegam ao litoral principalmente durante o inverno, por influência da corrente das Malvinas (PINEDO, 1990; MOURA & SICILIANO, 2007; FERREIRA *et al.*, 2008). De acordo com o CECLIMAR (2014), os lobos-marinhos mais freqüentemente¹ encontrados no litoral do Rio Grande do Sul são o lobo-marinho-sul-americano (*Arctocephalus australis*), o lobo-marinho-subantártico (*Arctocephalus tropicalis*) e o lobo-marinho-antártico (*Arctocephalus gazella*). Os lobos-marinhos têm o hábito de fazer paradas para descanso, todavia, muitos são encontrados debilitados ou mortos ao longo da costa e a determinação da *causa mortis* nem sempre é possível (SIMÕES-LOPES, *et al.*, 1995, OLIVEIRA *et al.*, 2010). Estudos sobre os patógenos que podem infectar esses animais já foram conduzidos, mas ainda há muito a ser investigado, especialmente ao se tratar dos vírus (de BRUYN *et al.*, 2008;

¹ Esta dissertação segue as normas ortográficas da língua portuguesa anteriores ao Acordo Ortográfico de 1990, promulgado em 2008 e cuja aplicação se torna obrigatória apenas a partir de 31 de dezembro de 2015, conforme decreto nº 7.875 de 27 de dezembro de 2012 (http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2007-2010/2008/Decreto/D6583.htm).

KATZ *et al.*, 2012; WALTZEK *et al.*, 2012; SIKORSKI *et al.*, 2013). Além disso, uma vez que esses animais estão sujeitos a entrar em contato com freqüentadores da praia e outros animais, é importante que o risco de zoonoses seja avaliado.

O pouco conhecimento da composição do viroma de mamíferos marinhos que circulam pela costa brasileira, o risco de transmissão de doenças e a limitação de métodos de identificação de patógenos (sorológicos, moleculares e de cultivo) para novos agentes estimulam novos estudos que busquem a caracterização da diversidade viral destes animais. Para alcançar tal objetivo, a metagenômica surge como uma ferramenta importante que vem sendo amplamente utilizada para a identificação de vírus até então desconhecidos. Desta forma, através da metagenômica é possível contribuir para o monitoramento epidemiológico das populações de lobos-marinhos encontrados na costa sul-rio-grandense. Tendo em vista que o trato gastrointestinal é um dos habitats microbianos mais densamente povoados (WHITMAN *et al.*, 1998), amostras de fezes constituem em um rico material a ser analisado por estudos de metagenômica, buscando a identificação das famílias virais que estejam circulando nessas espécies.

1.1 Objetivo geral

- Caracterizar a diversidade viral do trato gastrointestinal de duas espécies de lobos-marinhos encontrados na costa do Rio Grande do Sul, Brasil: lobo-marinho-sul-americano (*Arctocephalus australis*) e lobo-marinho-subantártico (*Arctocephalus tropicalis*).

1.2 Objetivos específicos

- Analisar, por meio de ferramentas de bioinformática, os dados provenientes do seqüenciamento de alto desempenho das amostras em duas plataformas distintas: Ion Torrent e Illumina.
- Identificar as famílias virais que compõem o viroma fecal de lobos-marinhos e comparar os agentes virais encontrados com bancos de dados disponíveis a fim de identificar possíveis patógenos, bem como novos agentes virais.
- Comparar as populações de vírus de eucariotos encontradas nas diferentes espécies de lobos-marinhos, utilizando os dados das duas plataformas de seqüenciamento de alto desempenho.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Superfamília dos pinípedes

Os pinípedes são mamíferos marinhos que se dividem em três famílias: Otariidae, representada por lobos e leões-marinhos; Odobenidae, representada pelas morsas; e Phocidae, representada pelas focas e elefantes-marinhos (CECLIMAR, 2014). Comparados com os cetáceos, os pinípedes são menos adaptados para a vida aquática e necessitam do ambiente terrestre para a sua reprodução. Os pinípedes são carnívoros e sua dieta inclui *krill* e outros crustáceos, moluscos e peixes. Estão geograficamente distribuídos em regiões polares e temperadas (WILSON & REEDER, 2005).

Embora o Rio Grande do Sul não possua colônias reprodutivas de pinípedes, seu litoral recebe sazonalmente vários animais pertencentes a esta superfamília, que costumam aparecer na costa sul-rio-grandense com o início do inverno por influência de correntes marítimas ou como resultado de movimentos erráticos (SIMÕES-LOPES *et al.*, 1995; CECLIMAR, 2014). Dentre as espécies com registro de ocorrência na costa brasileira estão: o leão-marinho-do-sul (*Otaria flavescens*), o lobo-marinho-sul-americano

(*Arctocephalus australis*), o lobo-marinho-antártico (*Arctocephalus gazella*), o lobo-marinho-subantártico (*Arctocephalus tropicalis*), a foca-caranguejeira (*Lobodon carcinophagus*), a foca-leopardo (*Hydrurga leptonyx*) e o elefante-marinho-do-sul (*Mirounga leonina*) (CECLIMAR, 2014).

2.1.1 Lobo-marinho-sul-americano

O lobo-marinho-sul-americano (Figura 1) é a espécie de lobo-marinho mais avistada no litoral do Rio Grande do Sul, dada a proximidade de sua maior colônia reprodutiva, localizada na Ilha dos Lobos no Uruguai. A maioria dos espécimes encontrados no sul do Brasil é juvenil (OLIVEIRA, 1999). Sua população está estimada em cerca de 300.000 a 450.000 indivíduos distribuídos ao longo da costa sul-americana, desde o Peru até o sul do Brasil, e também nas ilhas Falkland (VAZ-FERREIRA, 1982; SEAL CONSERVATION SOCIETY, 2015). Machos adultos medem, em média, 188,5 cm de comprimento e pesam até 159 kg, enquanto fêmeas adultas medem 142,5 cm e pesam 48,5 kg, em média. Sua alimentação se constitui principalmente de peixes e crustáceos (VAZ-FERREIRA, 1982).



FIGURA 1 – Lobo-marinho-sul-americano (Fonte: CECLIMAR).

2.1.2 Lobo-marinho-subantártico

O lobo-marinho-subantártico (Figura 2) é uma espécie que possui ampla distribuição que se estende desde o sul do oceano Atlântico ao oceano Índico, habitando ilhas situadas ao norte da Convergência Antártica. A colônia reprodutiva mais próxima ao Brasil situa-se a mais de 4.000 km de distância, nas ilhas de Gough e Tristão da Cunha, no Atlântico Sul (VAZ-FERREIRA, 1982; PINEDO, 1990). Os espécimes mais comumente encontrados na costa brasileira são adultos, subadultos e juvenis (SIMÕES-LOPES, 1995; OLIVEIRA, 1999). Sua população está estimada entre 277.000 a 356.000 indivíduos (SEAL CONSERVATION SOCIETY, 2015). Em média, machos adultos podem medir 150 cm de comprimento e pesar 150 kg, enquanto as fêmeas adultas podem medir 120 cm e pesar 50 kg (WILSON, D. E. & REEDER, 2005). A dieta destes animais inclui principalmente moluscos e peixes (BESTER, 1987; KERLEY, 1987).

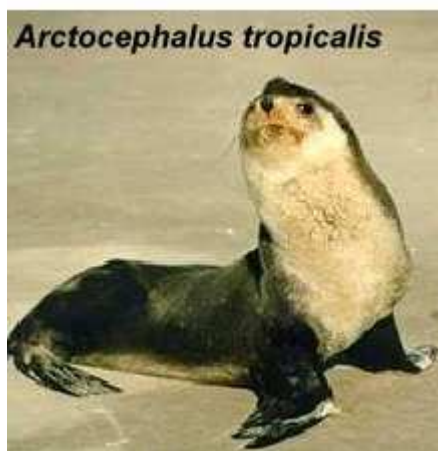


FIGURA 2 – Lobo-marinho-subantártico (Fonte: CECLIMAR).

2.2 Vírus detectados em pinípedes

A detecção de agentes virais em pinípedes já foi reportada por alguns estudos, incluindo uma análise metagenômica de leões-marinhos da Califórnia (LI *et al.*, 2011a). Já foram identificados rotavírus, calicivírus, parvovírus, anelovírus, influenza vírus, herpesvírus, adenovírus, picornavírus, picobirnavírus, astrovírus, entre outros (DIERAUF & GULLAND, 2001; CORIA-GALINDO *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2011a; NG *et al.*, 2011; ARBIZA *et al.*, 2012; WOO *et al.*, 2012; PHAN *et al.*, 2014; BODEWES *et al.*, 2015). Esses vírus podem fazer parte do viroma desses animais sem necessariamente estarem associados a manifestações clínicas ou podem ser agentes patogênicos, oportunistas ou não. Há também os vírus que utilizam os lobos-marinhos como reservatórios e transmissores para outras espécies, como humanos ou outros animais.

Dentre os vírus que podem infectar os pinípedes e ser transmitidos aos humanos encontram-se os poxvírus, que podem causar lesões na pele através do contato com as mãos (WILSON & REEDER, 2000). Ocasionalmente, o contato com outras espécies animais representa um risco para as populações de pinípedes, como já foi relatado em casos fatais de hepatite aguda em leões-marinhos associados ao contato com adenovírus canino tipo 1 (GOLDSTEIN *et al.*, 2011).

Apesar dos esforços até então realizados para identificar os vírus que infectam pinípedes, a maioria dos estudos concentra-se em populações de pinípedes do hemisfério norte, e pouco se sabe sobre os vírus que circulam pelas espécies do hemisfério sul. Da mesma forma, não se conhece como esta diferença geográfica se reflete no viroma destes animais.

2.3 Metagenômica

Os microrganismos são os seres mais predominantes da biosfera. Estima-se que somente as bactérias chegam ao número de 5×10^{30} de células enquanto o número de partículas virais chegam a 10^{31} . Todavia, apesar de estarem em número significativamente elevado, conhece-se apenas 5% deste total. O isolamento e identificação de novas espécies virais e microbianas foram, por mais de um século, dependentes da capacidade de cultivo em laboratório. Isso representava uma grande limitação no descobrimento e na caracterização de novas espécies, uma vez que a maioria dos microrganismos não é cultivável, especialmente os presentes em amostras ambientais (HANDELSMAN *et al.*, 1998; HANDELSMAN, 2004; SINGH *et al.*, 2009;

MOKILI *et al.*, 2011). Com o avanço da biologia molecular, a identificação de espécies foi facilitada por técnicas de amplificação do material genético, tais como a reação em cadeia da polimerase (PCR) e seqüenciamento, que são independentes de cultura. À vista disso, iniciou-se uma nova era na microbiologia, preocupada em explorar as comunidades microbianas até então desconhecidas.

Em 1998, o termo “metagenoma” foi utilizado pela primeira vez por Handelsman e colaboradores para designar o conjunto de todo o material genético presente em um ambiente, sendo que a metagenômica pode ser definida pela análise funcional baseada em seqüências de genomas de comunidades microbianas encontradas em uma amostra ambiental (RIESENFELD *et al.*, 2004). A metagenômica, portanto, consiste em analisar as populações microbianas extraídas diretamente do ambiente, dispensando o seu cultivo (SINGH *et al.*, 2009). Atualmente, é notável o grande número de estudos que buscam identificar e classificar todos os microrganismos presentes tanto em amostras ambientais quanto clínicas, e tentam identificar suas possíveis interações com o ambiente e relações entre si (LECUIT & ELOIT, 2013; POPGEORGIEV *et al.*, 2013).

Os primeiros estudos de metagenômica realizavam a clonagem dos fragmentos de ácidos nucléicos extraídos do ambiente, seguida do seu seqüenciamento (SCHLOSS & HANDELSMAN, 2003; RIESENFELD *et al.*, 2004). Nos últimos anos, o desenvolvimento das técnicas de seqüenciamento revolucionou os estudos de metagenômica, que já dispensam a clonagem dos fragmentos genômicos para a construção de bibliotecas. Ao ser comparado

com método de Sanger, o seqüenciamento de alto desempenho é capaz de gerar um volume de dados muito maior em menos tempo e com uma considerável redução de custo. Dentre as principais plataformas de seqüenciamento de alto desempenho destacam-se a Roche 454, Illumina, Ion Torrent e SOLiD (LOGARES *et al.*, 2012).

Outra ferramenta importante para os estudos da biodiversidade microbiana é a utilização de marcadores filogenéticos: seqüências altamente conservadas entre as espécies que auxiliam na identificação de espécies desconhecidas. Dentre estes marcadores, destaca-se o gene 16S rRNA, que está presente tanto em Bacteria quanto em Archaea (WOESE, 1987; STEIN *et al.* 1996).

2.3.1 Plataformas Ion Torrent e Illumina

A plataforma Ion Torrent faz o enriquecimento das amostras através de uma reação em cadeia da polimerase (PCR) em emulsão, com o uso de *beads*. Após a reação, os *beads* contendo os fragmentos amplificados são carregados em um *chip* semicondutor sensível a alterações de pH que ocorrem quando uma base nitrogenada é incorporada, permitindo o seqüenciamento (LIFE TECHNOLOGIES, 2015). A plataforma Illumina faz o enriquecimento das amostras por PCR em fase sólida, através de uma amplificação em ponte dos fragmentos sobre uma placa. O seqüenciamento é feito através da incorporação de nucleotídeos marcados com cromóforos (ILLUMINA, 2015). Estudos comparativos mostram que a plataforma Illumina apresenta uma menor taxa de erro de seqüenciamento, gerando seqüências de maior

qualidade e com maior cobertura. A plataforma Ion Torrent oferece a vantagem de um tempo médio menor de corrida a um custo menor por amostra, mas apresenta uma taxa de erro maior, especialmente em seqüências com repetições de bases (LOMAN *et al.*, 2012; QUAIL *et al.*, 2012; CHEN *et al.*, 2014).

2.3.2 Bioinformática

Além do uso de técnicas moleculares, a metagenômica depende de outra ferramenta crucial e imprescindível: a bioinformática. Os dados provenientes do seqüenciamento requerem uma análise robusta das seqüências geradas a fim de identificar e distinguir os diferentes genomas presentes nas amostras avaliadas. Para tanto, a bioinformática consiste não somente em uma etapa fundamental para qualquer estudo metagenômico, mas também uma das mais complexas (CHEN & PACHTER, 2005). Após a obtenção dos *reads*¹ do seqüenciamento, ou seja, os fragmentos de seqüências gerados, é realizada uma série de passos - o *pipeline* - até o produto final da análise. Estes passos incluem o descarte de *reads* com baixa qualidade, a trimagem de iniciadores e adaptadores, a montagem de *contigs*, *binning* (classificação taxonômica), predição de genes e anotação (KUNIN *et al.*, 2008; BZHALAVA & DILLNER, 2013).

Há uma série de programas de computadores que realizam estas etapas e cabe ao pesquisador escolher os mais adequados para atingir seu objetivo. A primeira análise consiste em avaliar a qualidade dos *reads*, o que pode ser feito através da nota Phred que estima a probabilidade de erro de

cada base de nucleotídeos. Uma nota Phred de 20 implica em uma probabilidade de 1% de erro, 30 implica em 0,1% e 40 em 0,01%. A remoção de iniciadores e adaptadores também deve ser feita antes da montagem dos *contigs* (KUNIN *et al.*, 2008; PHRAP, 2015).

Vários programas de computadores de montagem estão disponíveis, e os mais indicados para montagem de *reads* curtos são os que utilizam os grafos de Bruijn. Grafos de Bruijn são grafos orientados, ou seja, um conjunto de elementos representados por nodos ou vértices ligados por arestas direcionadas. Brevemente, os *reads* são quebrados em fragmentos menores de tamanho fixo, os *k-mers*. Estes *k-mers* são utilizados para construir um grafo, em que cada *k-mer* é um vértice. O objetivo é construir um caminho euleriano em que cada vértice pode ser visitado apenas uma vez, formando arestas. O resultado final é uma seqüência consenso denominada *contig* (COMPEAU *et al.*, 2011). Uma informação importante para os programas de montagem é se o seqüenciamento foi feito de forma *single-read* ou *paired-end*. Quando a forma *single-read* é utilizada, apenas uma extremidade do fragmento de DNA será seqüenciada, gerando um *read* por fragmento amplificado. Já com o seqüenciamento *paired-end*, ambas as pontas são seqüenciadas, gerando dois *reads* por fragmento. Uma vez que se conhece o tamanho dos fragmentos e conseqüentemente a distância entre os *reads*, esta informação pode ser utilizada na montagem dos genomas, que fica mais precisa (ILLUMINA, 2015).

Outro fator importante para a montagem dos genomas é a cobertura. A cobertura de um genoma é definida pelo número médio de *reads* que se anelam a cada base consenso. Quando o tamanho dos *reads* é pequeno, é

necessária uma cobertura mínima que garanta que os *reads* se sobreponham e permitam a reconstrução do genoma (WOOLEY *et al.*, 2010). Em metagenômica, estimar a cobertura necessária para obter o genoma completo de todos os microrganismos presentes em uma amostra é uma tarefa complexa que depende do número total de espécies, do tamanho do genoma de cada uma e da sua abundância relativa. As curvas de rarefação auxiliam nesse sentido, pois fornecem uma visão geral da cobertura da amostra analisada. Essas curvas relacionam o número de espécies ou unidades taxonômicas operacionais (OTU¹) de uma amostra com o número de seqüências obtidas. Uma vez que o número de espécies/OTUs em uma amostra é finito, espera-se que um seqüenciamento que cubra todas as espécies acabe atingindo um platô (GOTELLI & COLWELL, 2001; WOOLEY *et al.*, 2011).

Os atuais programas para análise e processamento de metagenomas, contudo, ainda encontram dificuldades no processamento de metadados, dada a sua complexidade. Uma vez que os dados dizem respeito a uma população heterogênea, a montagem dos *reads* torna-se um desafio maior, podendo facilmente gerar as denominadas quimeras. Além disso, a falta de bancos de dados mais completos resultam em um grande número de buscas improdutivas (*no hits*), fazendo com que a maioria das seqüências permaneça desconhecida (SCHOLTZ *et al.*, 2012).

2.3.3 Metagenômica viral

Os vírus são os seres mais abundantes e ubíquos do universo, chegando a um número estimado de 10^{31} partículas virais na Terra

(WOMMACK & COLWELL, 2000; ANGLY *et al.*, 2005; BREIBART *et al.*, 2005). Em ambientes aquáticos, o número de partículas virais pode variar entre 10^4 a 10^8 /ml, compondo o que se denomina de virioplâncton, cujos principais representantes são os bacteriófagos (BERGH *et al.*, 1989; PROCTOR & FUHRMAN, 1990; COCHLAN *et al.*, 1993; SUTTLE, 1994; JIAO *et al.*, 2006). Todavia, mesmo estando presentes em maiores quantidades, grande parte da diversidade viral permanece desconhecida (ROHWER & EDWARDS, 2002; WOMMACK *et al.*, 2012).

O primeiro estudo de metagenômica viral foi realizado em 2002 por Breibart e colaboradores em amostras de águas marinhas. Diferentemente das bactérias, os vírus não apresentam um gene comum a todas as famílias, dificultando seu rastreamento por marcadores filogenéticos (ROHWER & EDWARDS, 2002), o que requer outra abordagem de estudo. Duas principais técnicas obtiveram destaque nos primeiros estudos de metagenômica viral: *linker amplified shotgun library* (LASL) e amplificação por deslocamento múltiplo (MDA). Mais tarde, outros métodos foram desenvolvidos tais como *sequence-independent single primer amplification* (SISPA), análise de diferença representacional (RDA) e PCR randômica (REYES & KIM, 1991; AMBROSE & CLEWLEY, 2006; KARLSSON *et al.*, 2013) e atualmente vários estudos metagenômicos são conduzidos tanto para vírus de genoma de DNA quanto RNA.

Diversos tipos de amostras já foram utilizados para estudos de metagenômica viral. A caracterização do viroma, isto é, o componente viral do microbioma, é uma linha de estudo bastante explorada, incluindo o viroma do

trato gastrointestinal humano (MINOT *et al.*, 2011). Amostras de solo provenientes da Antártica e de arrozais já foram utilizadas em estudos de diversidade viral (KIM *et al.*, 2008; SRINIVASIAH *et al.*, 2013) e o viroma de oceanos como o Pacífico e Índico também foi explorado (WILLIAMSON *et al.*, 2012; HURWITZ & SULLIVAN, 2013). Amostras de saliva e biofilmes também já foram utilizadas para pesquisas por bacteriófagos (SEDGHIZADEH *et al.*, 2013) e análises metagenômicas do viroma fecal de animais como gatos, morcegos e suínos foram realizadas (DONALDSON, *et al.*, 2010; SHAN *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2014). Desta forma, surge um grande interesse em caracterizar as populações virais de diferentes ambientes, contribuindo para um melhor entendimento da dinâmica entre microrganismos e outros seres vivos, bem como para a identificação de novas espécies de vírus.

2.4 Vírus de DNA

2.4.1 Anelovírus

Anelovírus são vírus não-envelopados, com cerca de 30 nm de diâmetro, simetria icosaédrica. Pertencem à família *Anelloviridae*, que possui onze gêneros reconhecidos. Seu genoma é de DNA circular de fita simples, apresentando duas ORFs principais, ORF1 e ORF2, que se sobrepõem parcialmente. Conforme a espécie, outras ORFs adicionais podem aparecer e o tamanho do genoma pode variar entre 2-4 kb (Figura 3). As diferentes espécies de anelovírus apresentam alta variabilidade entre si, sendo que estudos comparativos entre membros desta família utilizam seqüências completas da

ORF1, que codifica proteínas do capsídeo viral e envolvidas na replicação (BIAGINI *et al.*, 2011).

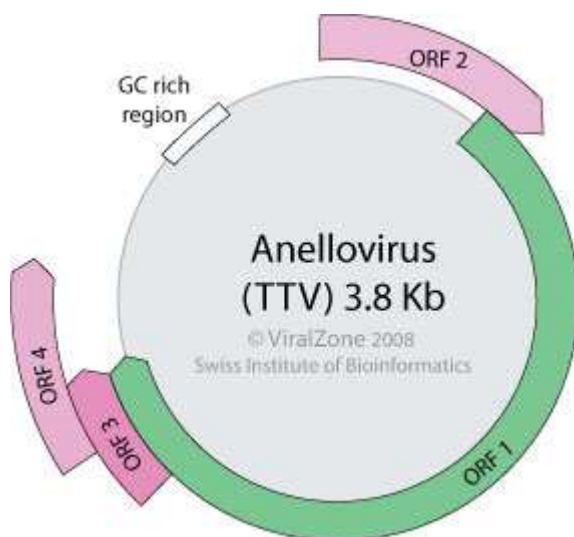


FIGURA 3 - Representação do genoma circular dos anelovírus, utilizando o Torque teno vírus (TTV) como modelo. (Fonte: ViralZone, 2015)

O primeiro anelovírus foi descoberto em 1997 no Japão, em um paciente com hepatite pós-transfusional (NISHIZAWA *et al.*, 1997). Desde então, outros anelovírus já foram isolados de humanos, outros primatas, animais domésticos e selvagens, incluindo pinípedes, tanto em amostras de fezes quanto em outros tecidos (NG *et al.*, 2009; OKAMOTO, 2009; van den BRAND *et al.*, 2012). Sua transmissão dá-se por via fecal-oral, transfusão sanguínea e vertical e, até o momento, seu papel como agente patogênico não foi estabelecido (MARTÍNEZ-GUINÓ *et al.*, 2009; OKAMOTO *et al.*, 2009).

2. 4.2 Parvovirus

Parvovirus são vírus não-envelopados, com 18-26 nm de diâmetro e de simetria icosaédrica. Pertencem à família *Parvoviridae* que é dividida em duas subfamílias: *Parvovirinae*, que infecta vertebrados, e *Densovirinae*, que infecta invertebrados. Seu genoma é de DNA circular de fita simples, com tamanho que varia entre 4 a 6 kb, e é dividido em dois cassetes de genes: o gene NS, que codifica as proteínas envolvidas na replicação, e o gene VP, que codifica as proteínas estruturais (Figura 4). A proteína NS1 possui domínios conservados entre as espécies, sendo a proteína de escolha para análises filogenéticas (TIJSSEN *et al.*, 2011, COTMORE *et al.*, 2014).

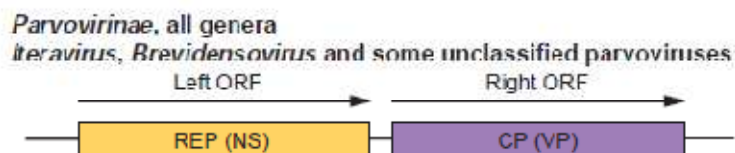


FIGURA 4 – Representação do genoma de membros da subfamília *Parvovirinae*, ilustrando os dois cassetes de genes: NS e VP. (Fonte: TIJSSEN *et al.*, 2011)

A subfamília *Parvovirinae* infecta uma gama de hospedeiros que inclui aves, répteis e mamíferos, incluindo pinípedes, sendo isolados de fezes, sangue e outros tecidos. A transmissão pode ocorrer via fecal-oral, através de secreções respiratórias e contato com sangue, e as manifestações clínicas das

parvovírose em diferentes espécies como cães e humanos são variadas e vão desde assintomáticas a leucopenias, miocardites, gastroenterites e abortamentos (STEINEL *et al.*, 2001; IKEDA *et al.*, 2002; HOELZER & PARRISH, 2010).

2. 5 Vírus de RNA

2.5.1 Picobirnavírus

Picobirnavírus são vírus não-envelopados, com 33-37 nm de diâmetro e de simetria icosaédrica. Pertencem à família *Picobirnaviridae*, cujo único gênero é *Picobirnavirus*. Possuem genoma de RNA de fita dupla e bisegmentado, com cerca de 4 kb. O primeiro segmento é o mais longo e possui três ORFs, enquanto o segundo segmento codifica a RNA-polimerase-RNA-dependente (RpRd) (Figura 5). Os picobirnavírus são classificados em dois genogrupos, GI e GII, baseado nas similaridades das seqüências da RpRd (DELMAS, 2011; GANESH *et al.*, 2014).

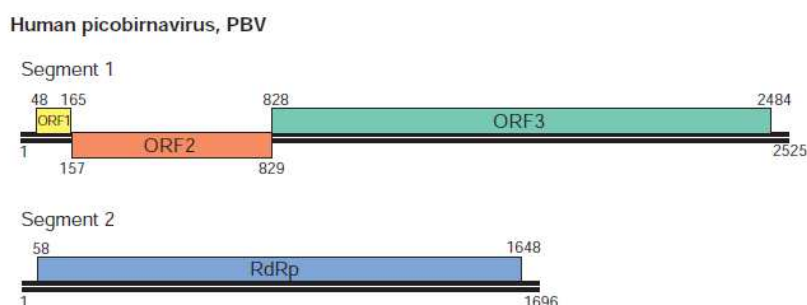


FIGURA 5 – Representação do genoma dos picobirnavírus com seus dois segmentos. (Fonte: DELMAS, 2011).

O primeiro picobirnavírus reportado foi detectado em ratos no Brasil (PEREIRA *et al.*, 1988), sendo encontrado desde então em fezes humanas e de outros animais, incluindo um picobirnavírus de otariídeos encontrado em leões-marinhos (WOO *et al.*, 2012; MALIK *et al.*, 2014). Os picobirnavírus têm transmissão fecal-oral e já foram detectados tanto em indivíduos assintomáticos quanto em aqueles que apresentavam quadro diarréico, sendo difícil estabelecer uma associação etiológica como causadores de gastroenterites. (BHATTACHARYA *et al.*, 2007; GIORDANO *et al.*, 2008; MALIK *et al.*, 2014; CARRUYO-NUÑEZ *et al.*, 2014).

2.5.2 Picornavírus

Os picornavírus são vírus não-envelopados, com cerca de 30 nm de diâmetro e de simetria icosaédrica. Pertencem à família *Picornaviridae* que, até o momento, tem 29 gêneros reconhecidos. Seu genoma é de RNA fita simples e polaridade positiva, que pode variar de 7 a 8,8 kb, e codifica uma única poliproteína. Esta poliproteína é dividida em três regiões funcionais: P1, que codifica proteínas estruturais, e P2-P3 que codificam proteínas envolvidas na replicação (Figura 6). É através da análise destas regiões que os gêneros e espécies de picornavírus são classificados (KNOWLES *et al.*, 2011; ADAMS *et al.*, 2013).

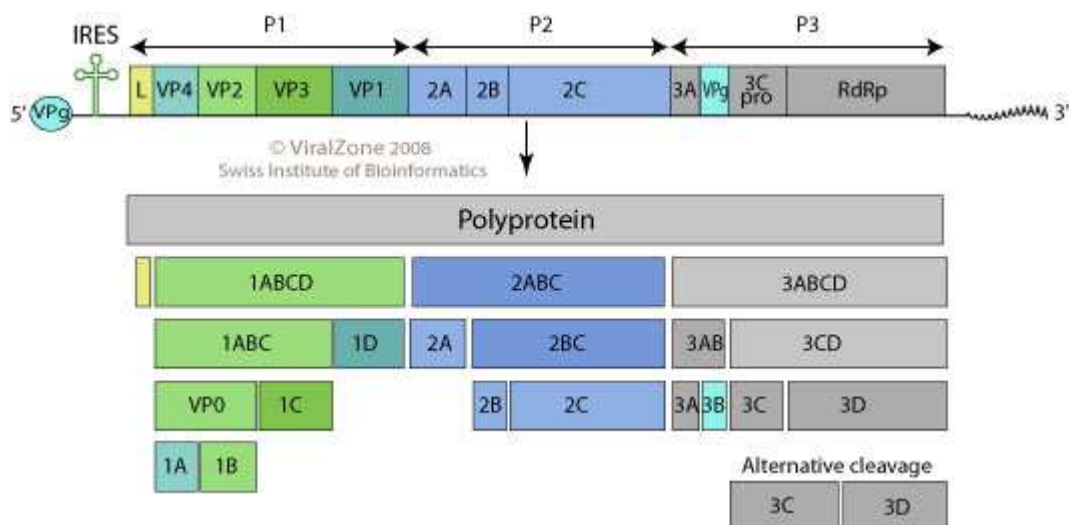


FIGURA 6 – Representação do genoma dos picornavírus, sua poliproteína e peptídeos virais gerados por clivagem proteolítica (Fonte: ViralZone, 2015).

2.5.2.1 Sakobuvírus

Sakovirus é um novo gênero da família *Picornaviridae* descoberto em fezes de gatos em Portugal, cujo único representante é o *Sakobivirus felino A*. O genoma do *Sakobivirus felino A* possui 7,8 kb e está filogeneticamente relacionado aos gêneros *Kobuvirus*, *Salivirus* e *Passerivirus* (NG *et al.*, 2014). Os kobuvírus e salivírus já foram associados a casos de gastroenterites em humanos e suínos, enquanto os passerivírus foram encontrados em *swabs* traqueias e cloacais de aves e sua patogenicidade é desconhecida (SHAN *et al.*, 2010, KHAMRIN, *et al.*, 2014; NG *et al.*, 2014).

2.5.2.2 Vírus da Hepatite A (HAV)

O HAV é o único membro do gênero *Hepatovirus*. Seu genoma possui 7,4 kb e há apenas um sorotipo de HAV, que tem suas propriedades antigênicas conservadas. O HAV é causador da hepatite A, de transmissão fecal-oral e que se manifesta por infecções agudas cujos sintomas são febre, icterícia, fezes claras, dores abdominais e diarreia (KNOWLES *et al.*, 2011). Os humanos são o principal hospedeiro do HAV, embora este vírus já tenha sido reportado em outros primatas (BALAYAN, 1992).

2.5.2.3 Vírus da Encefalomielite Aviária (AEV)

O AEV é o único representante do gênero *Tremovirus* e seu genoma possui 7 kb. Dentro da família *Picornaviridae*, o AEV é mais filogeneticamente relacionado com o HAV, apresentando 39% de identidade de aminoácidos, comparado com cerca de 20% em relação aos demais gêneros dessa família. Até o momento, apenas um sorotipo é conhecido. O AEV é causador da encefalomielite aviária e sua transmissão dá-se via fecal-oral e vertical (KNOWLES *et al.*, 2011; MARVIL *et al.*, 1999).

2.5.3 Rotavírus

Os rotavírus são vírus não-envelopados, com diâmetro de 80 nm e de simetria icosaédrica. Possuem genoma de RNA de fita dupla segmentado (onze segmentos), de aproximadamente 18 kb (Figura 7), e estão inseridos na família *Reoviridae*, gênero *Rotavirus*. Baseado em análises sorológicas e da seqüência da proteína estrutural VP6, o gênero *Rotavirus* comporta sete espécies, também denominado grupos, de A a G, e recentemente um novo

grupo H foi proposto. Além da VP6, a proteína VP1, correspondente à RNA polimerase, também é utilizada para análises filogenéticas dentro do gênero e da família *Reoviridae* (ATTOUI *et al.*, 2011; MATTHIJNSSENS *et al.*, 2012).

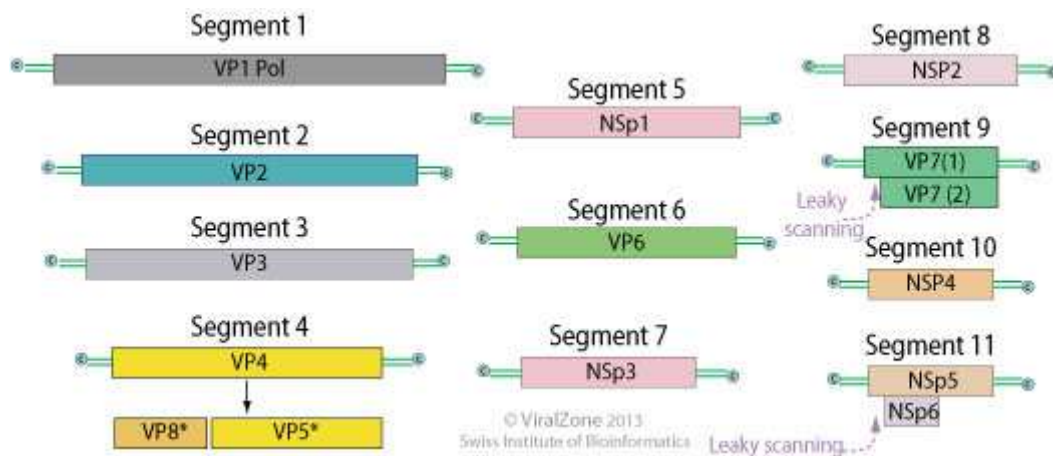


FIGURA 7 – Representação dos onze segmentos do genoma dos rotavírus (Fonte: ViralZone, 2015).

Os rotavírus foram detectados em fezes de aves e mamíferos, incluindo pinípedes (CORIA-GALINDO *et al.*, 2009; OTTO *et al.*, 2012). Os rotavírus tem transmissão fecal-oral e podem causar gastroenterites. Entre os grupos de rotavírus, o grupo A é o que mais acomete seres humanos e animais domésticos e é um dos principais agentes causadores de diarreia em crianças de até cinco anos (CAPRIOLI *et al.*, 1996; MIDTHUN & KAPIKIAN, 1996). Outros grupos, tais como o rotavírus do grupo C, já foram associados com

surtos esporádicos de gastroenterites em humanos e outros animais como suínos e bovinos (GABBAY *et al.*, 1999; KIM *et al.*, 1999; MAWATARI *et al.*, 2004; ESONA *et al.*, 2008).

2.5.4 Sapovírus

Os sapovírus são vírus não-envelopados, com diâmetro de 35-39 nm e simetria icosaédrica da família *Caliciviridae* e gênero *Sapovirus*. Seu genoma é de RNA fita simples de polaridade positiva e possui de 7,3 a 8,3 kb. O genoma é organizado em três ORFs, duas com funções conhecidas: a ORF1 codifica a poliproteína, que origina proteínas não-estruturais e a VP1; e a ORF2 codifica a VP2 (Figura 8). Até o presente, cinco genogrupos de *Sapovirus* foram reconhecidos, baseados na análise das seqüências do gene da VP1 (CLARKE *et al.*, 2011).

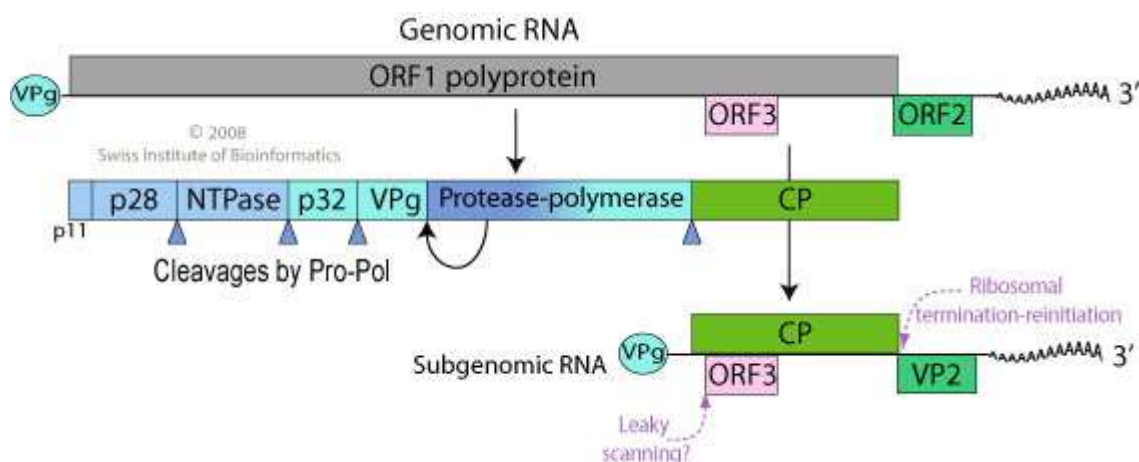


FIGURA 8 – Representação do genoma dos sapovírus. (Fonte: ViralZone, 2015)

Os sapovírus foram primeiramente encontrados em um surto de gastroenterite em crianças na cidade de Sapporo, Japão (CHIBA *et al.*, 2000). Desde então, os sapovírus foram detectados em fezes de humanos e outros animais e já foram detectados em pinípedes. Os sapovírus têm transmissão fecal-oral e já foram associados a casos de diarreia (WANG *et al.*, 2006; LI *et al.*, 2011a; LI *et al.*, 2011b; SOMA *et al.*, 2015).

2.5.5 Hepevírus

Os hepevírus são vírus não-envelopados, com 27-34 nm de diâmetro e simetria icosaédrica, pertencentes à família *Hepeviridae*. Seu genoma é de RNA de fita simples e polaridade positiva, contendo entre 6,6 a 7,3 kb e três ORFs (Figura 9). As análises filogenéticas entre membros da família *Hepeviridae* são complicadas, dada a dificuldade de alinhamento de seqüências genômicas de diferentes variantes. No entanto, sub-regiões conservadas da ORF1, tais como as que codificam a helicase, RpRd e metiltransferase, podem ser utilizadas para distinguir diferentes gêneros (SMITH *et al.*, 2014).

O vírus da Hepatite E (HEV) é um conhecido agente da família *Hepeviridae*, pertencente ao gênero *Hepevirus*. O HEV infecta humanos e também já foi isolado de outros animais, tanto em amostras de fezes quanto de outros tecidos. O HEV tem transmissão fecal-oral e pode causar desde infecções assintomáticas até hepatite aguda, podendo ser responsável por zoonoses (BIHL & NEGRO, 2010). Outros membros da família *Hepeviridae*

foram encontrados em aves e peixes (HAQSHENAS *et al.*, 2001; MENG, 2010; BATTS *et al.*, 2011).

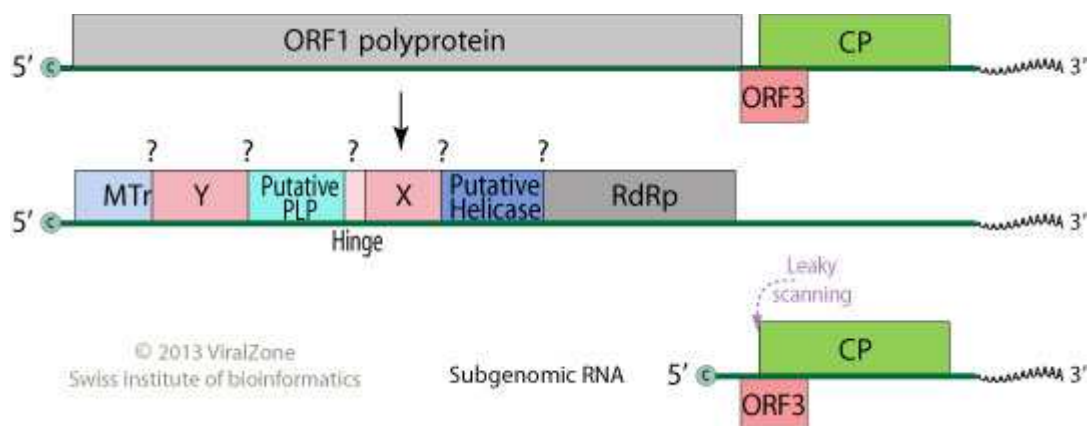


FIGURA 9 – Representação do genoma do HEV. (Fonte: ViralZone, 2015)

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostras

As amostras utilizadas neste estudo foram de amostras de fezes de lobos-marinhos encontrados mortos no litoral do Rio Grande do Sul pertencentes às espécies *A. australis* e *A. tropicalis*. Estas amostras foram coletadas e fornecidas pelo CECLIMAR (Centro de Estudos Costeiros, Limnológicos e Marinhos), órgão vinculado ao Instituto de Biociências da UFRGS, e obtiveram autorização para atividades com finalidade científica concedida pelo Ministério do Meio Ambiente (número da licença SISBIO: 20185-4).

A coleta das amostras foi feita entre julho de 2012 a setembro de 2013. O procedimento de coleta das amostras foi realizado diretamente do intestino dos animais, seguindo técnicas assépticas. Instrumentos estéreis (bisturi ou tesoura) foram utilizados para realizar a abertura da porção final do intestino grosso dos espécimes de lobos-marinhos e o conteúdo fecal (40 mL) foi coletado com o auxílio de uma espátula estéril e armazenado em frascos

estéreis. Estes frascos foram mantidos sob refrigeração durante o transporte até o laboratório, onde posteriormente foram congelados em *freezer* -80°C.

Os cadáveres dos espécimes utilizados neste estudo encontravam-se em grau de decomposição 2 e 3 na escala estabelecida por Geraci & Lounsbury (1993), o que correspondem a cadáveres frescos (grau 2) e em estágio inicial de decomposição porém com órgãos basicamente intactos (grau 3). No total foram processadas dez amostras de fezes, sendo cinco de *A. australis* e cinco de *A. tropicalis*. Os locais de coleta e descrições dos espécimes utilizados estão contidos na Tabela 1 e podem ser visualizados nas Figuras 10, 11 e 12.

TABELA 1 – Amostras utilizadas neste estudo

Pool nº.	Nº.	Espécie	Comprimento (cm)	Massa (kg)	Sexo*	Código de classificação da carcassa**	Data de coleta	Local de coleta	Geolocalização Latitude/Longitude
1	G1529	Lobo-marinho-sul-americano (<i>Arctocephalus australis</i>)	94.2	10.6	M	2	02/08/2012	Osório, RS	-29.878119/ -50.073.224
1	G1560	Lobo-marinho-sul-americano (<i>Arctocephalus australis</i>)	92	9.5	M	2	09/08/2012	Cidreira, RS	-30.165946/ -50.197728
1	G1574	Lobo-marinho-sul-americano (<i>Arctocephalus australis</i>)	89.4	10.8	M	2	16/08/2012	Imbé, RS	-29.94758/ -50.105842
1	G1604	Lobo-marinho-sul-americano (<i>Arctocephalus australis</i>)	92	15.5	M	2	31/08/2012	Capão da Canoa, RS	-29.657469/ -49.954338
1	G1657	Lobo-marinho-sul-americano (<i>Arctocephalus australis</i>)	88	12	M	2	11/09/2013	Imbé, RS	-29.94579/ -50.10498
2	G1535	Lobo-marinho-subantártico (<i>Arctocephalus tropicalis</i>)	91.9	8.4	M	2	02/08/2012	Capão da Canoa, RS	-29.730323/ -49.995557
2	G1537	Lobo-marinho-subantártico (<i>Arctocephalus tropicalis</i>)	90.6	9	M	2	02/08/2012	Capão da Canoa, RS	-29.665492/ -49.959170
2	G1561	Lobo-marinho-subantártico (<i>Arctocephalus tropicalis</i>)	91.9	8.8	M	2	09/08/2012	Cidreira, RS	-30.174591/ -50.200809
2	G1577	Lobo-marinho-subantártico (<i>Arctocephalus tropicalis</i>)	80.5	7.1	M	3	16/08/2012	Osório, RS	-29.917806/ -50.091768
2	G1640	Lobo-marinho-subantártico (<i>Arctocephalus tropicalis</i>)	157.5	40.9	M	2	25/07/2013	Tramandaí, RS	-30.13273/ -50.18535

Legenda: *Sexo: M (macho). **Código de classificação de carcassa de acordo com Geraci & Lounsbury (1993): recentemente mortos (2); em decomposição, mas com órgãos basicamente intactos (3).

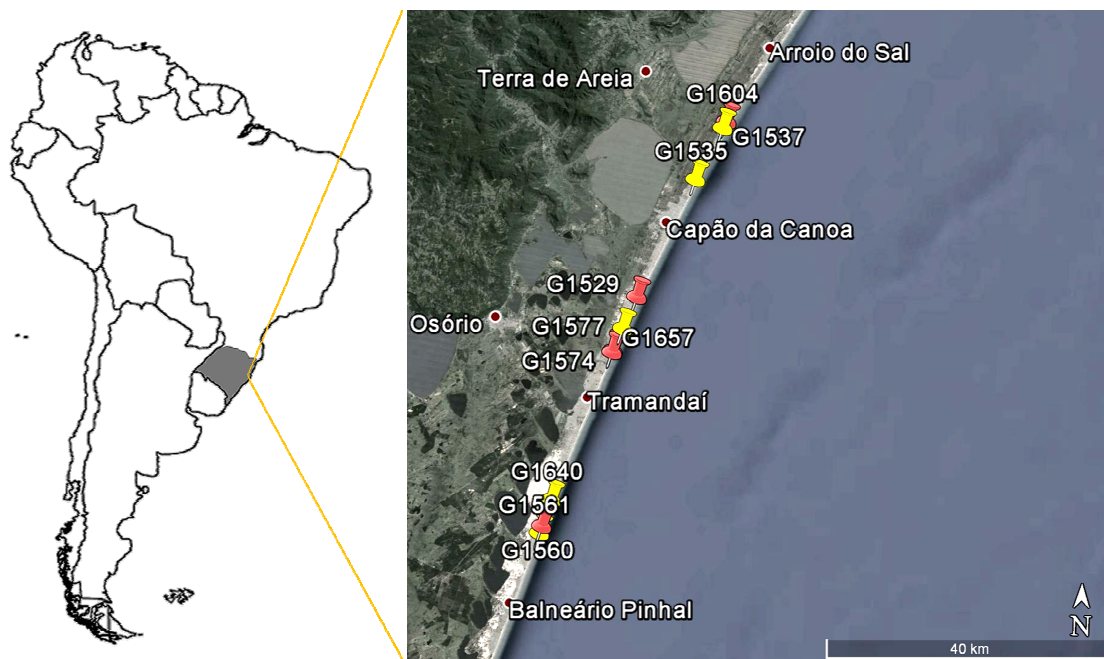


FIGURA 10 - Mapa do trecho do litoral do Rio Grande do Sul com a localização dos espécimes coletados para este estudo. Em vermelho, espécimes de *A. australis*; em amarelo, espécimes de *A. tropicalis*.



FIGURA 11 – Espécime de *A. australis* (G1537) no local de coleta. (Fonte: CECLIMAR).



FIGURA 12 – Espécime de *A. tropicalis* (G1640) no local de coleta. (Fonte: CECLIMAR).

3.2 Processamento das amostras de fezes

As amostras de fezes coletadas foram processadas em *pools* de cinco animais para cada espécie. Para cada *pool*, aproximadamente 2 g de fezes por amostra foram adicionados a um tubo de 50 mL, no qual se acrescentou *beads* de vidro (em torno de 5 mL) e completou-se o volume com solução de Hank's 1x (1,261 mM CaCl₂; 0,49 mM MgCl₂ · 6H₂O; 0,406 mM MgSO₄ · 7H₂O; 5,33 mM KCl; 0,441 mM KH₂PO₄; 137,93 mM NaCl; 0,336 mM Na₂HPO₄ · 7H₂O; 5,55 mM dextrose). Os tubos foram agitados por 4 minutos e centrifugados a 2500 x *g* por 90 min a 4°C. O sobrenadante foi transferido para tubos de 1,5 mL e novamente centrifugado por 10 min à velocidade máxima. O sobrenadante final foi filtrado em uma membrana de 0.45 µm com o auxílio de uma seringa. As amostras foram armazenadas em *freezer* -80°C até futuro processamento, realizado no dia seguinte.

3.3 Ultracentrifugação em colchão de sacarose

Para a purificação e concentração das partículas virais, as amostras foram submetidas a uma etapa de ultracentrifugação em colchão de sacarose 25% (25 g em 100 mL de TNE – 50 mM Tris, 140 mM NaCl, 5 mM EDTA, pH 8), na qual foram ultracentrifugadas a 190000 x *g* (40000 rpm) por 4h a 4°C (ultracentrífuga Sorvall ODT Combi, rotor AH-650). Os *pellets* foram ressuspensos em TE 1X e agitados vigorosamente. Ao volume final foi adicionado clorofórmio em mesma proporção, que foi misturado por inversão durante 30 min. Os tubos foram centrifugados por 5 min à velocidade máxima e o sobrenadante foi aliquoteado em novos tubos, desprezando-se a fase

orgânica. O volume final foi completado com TE 1X para 500 µL e congelado em freezer -80°C.

3.4 Tratamento com DNase e RNase e extração de ácidos nucleicos

Uma alíquota de 500 µL de cada *pool* foi tratada com 20 U de RNase (Invitrogen) e 100 U de DNase I (Roche) por 2h a 37°C para a eliminação de DNA e RNA exógenos. As amostras foram posteriormente extraídas utilizando o *kit* comercial PureLink® Viral RNA/DNA (Invitrogen) para a extração de DNA e o *kit* comercial RNeasy® Mini Kit (Qiagen) para a extração de RNA, seguindo instruções dos fabricantes. A partir da extração, as amostras de RNA e DNA foram processadas separadamente, conforme descrito por Allander *et al.* (2005), com pequenas modificações.

3.5 Processamento do RNA viral

A partir do RNA total extraído, foi realizada a síntese de cDNA por transcrição reversa, utilizando o iniciador *K-randoms* (GAC CAT CTA GCG ACC TCC ACM NN MNM), descrito por Stang *et al.*, 2005. A segunda fita de cDNA foi sintetizada com o fragmento Klenow da DNA polimerase 1 de *Escherichia coli*, utilizando o mesmo iniciador da reação anterior. A reação foi conduzida nas seguintes condições: para a síntese de cDNA foram utilizados 10 µL de RNA total extraído, 3 µL iniciador *K-randoms* (20 µM) e 2 µL dNTP (10 mM) que foram incubados a 75°C por 5 min e seguidos de mais uma incubação no gelo por 5 min. Em seguida, foram adicionados 2 µL de tampão RT (10X), 1 µL DTT (0,1 M), 40 U RNaseOUT (Invitrogen) e 200 U da enzima

transcriptase reversa M-MLV (Invitrogen). Após uma incubação por 1h a 42°C e 10 min a 90° C, foi adicionada 1 U da enzima Klenow (New England Biolabs), seguido de uma incubação por 1h a 37°C e inativação da enzima a 75°C por 10 min.

3.6 Processamento do DNA viral

O processamento do DNA extraído ocorreu de forma similar ao do RNA, sendo que, em vez da síntese de cDNA seguida da síntese da segunda fita, a reação de Klenow foi realizada duas vezes utilizando o iniciador *K-randoms* (GAC CAT CTA GCG ACC TCC ACM NN MNM). As condições das reações foram: 5 µL de DNA extraído, 2 µL iniciador *K-randoms* (20 µM), 1 µL dNTP (10 mM), 2.5 µL de tampão Klenow (10X) e 15,5 µL água ultra-pura foram incubados a 94°C por 2 min e colocados sobre o gelo em seguida. Foi adicionado 1 U da enzima Klenow (New England Biolabs) e a reação foi incubada por 1h a 37°C e por fim inativada a 75° C por 10 min.

3.7 Amplificação independente de seqüência por PCR convencional e seqüenciamento de alto desempenho

Após a obtenção de uma fita dupla de DNA com os iniciadores *K-randoms* incorporados a partir das amostras de RNA e DNA, foi realizada a PCR, em condições adaptadas de Stang *et al.*, 2005.

Brevemente, as reações ocorreram em um volume final de 50 µL, contendo 5 µL de amostra, 0,8 µM do iniciadores *K-s* (GAC CAT CTA GCG ACC TCC AC), 0.2 mM de cada dNTP, 1X de tampão PCR, 2,5 mM de MgCl₂, e 1 U de *Taq* DNA polimerase. As reações foram conduzidas nas seguintes

condições: 1 ciclo de 95°C por 5 min, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 min, anelamento a 53°C por 1 min e extensão a 72°C por 1 min; e extensão final a 72°C por 7 min. Os produtos de PCR foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1% e encaminhados para seqüenciamento de alto desempenho. Duas plataformas de seqüenciamento foram utilizadas: Ion Torrent (PGM) e MiSeq da Illumina, e a etapa de PCR foi repetida para cada uma delas. O seqüenciamento com o Ion Torrent utilizou um chip Ion 316 e foi realizado pelo laboratório do Centro de Excelência em Pesquisa e Inovação em Petróleo, Recursos Minerais e Armazenamento de Carbono (CEPAC) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS). O seqüenciamento da Illumina utilizou o kit v2 (2x150 *paired-end*) e foi realizado pelo Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF) em Eldorado do Sul, RS.

3.8 Bioinformática

Os *reads* gerados pelo Ion Torrent foram trimados utilizando o PRINSEQ (prinseq.sourceforge.net) e a qualidade das seqüências foi analisada com o programa de computador FastQC (www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/). Os *reads* trimados foram montados *de novo* através do MetaVelvet¹ v1.2.01 (metavelvet.dna.bio.keio.ac.jp) com um *k-mer* de 51. Os *reads* provenientes da Illumina tiveram seus iniciadores trimados pelo Geneious 8.1.3 e foram montados *de novo* através do SPAdes² 3.5.0 (bioinf.spbau.ru/spades). Os

¹ As linhas de comando utilizadas para o montador MetaVelvet seguiram as instruções disponíveis em: <http://metavelvet.dna.bio.keio.ac.jp/MV.html>.

² As linhas de comando utilizadas para o montador SPAdes seguiram as instruções disponíveis em: <http://spades.bioinf.spbau.ru/release3.5.0/manual.html>.

contigs resultantes das montagens acima de 100 pb foram submetidos ao BLASTx contra o banco de dados não-redundante de proteínas do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI - www.ncbi.nlm.nih.gov) e também contra o banco de dados de proteínas virais do NCBI. O valor de *cut-off* escolhido para os *E-values* foi de 10^{-5} . Baseado nos menores valores de *E-value*, os *contigs* foram classificados como vírus de eucariotos, bacteriófagos, bactérias, eucariotos e desconhecido. Os *contigs* atribuídos a vírus de eucariotos de cada plataforma de seqüenciamento foram combinados para que se obtivesse *contigs* finais maiores.

Os *reads* trimados de ambas as plataformas de seqüenciamento também foram submetidos ao servidor *online* Metavir (ROUX *et al.*, 2014) para a obtenção das curvas de rarefação.

3.9 Análise filogenética

As seqüências de nucleotídeos ou traduzidas em aminoácidos provenientes dos *contigs* de anelovírus, parvovírus, picornavírus, picobirnavírus, rotavírus, sapovírus e hepevírus foram alinhadas com seqüências homólogas do NCBI utilizando o MUSCLE (www.drive5.com/muscle). As árvores filogenéticas foram construídas através do MEGA6 (<http://www.megasoftware.net/>). O método utilizado para a montagem das árvores foi o de Neighbor-Joining (NJ) com *bootstrap* de 1000 réplicas, pelo modelo de *p-distance* e as *gaps* foram tratadas como *pairwise deletion*.

4. RESULTADOS

As PCRs randômicas resultaram em produtos de diferentes tamanhos e concentrações. As amostras de DNA amplificado utilizadas para o seqüenciamento de alto desempenho apresentaram concentração entre 3,1-13,1 ng/ μ L.

4.1 Visão geral do viroma fecal em *A. australis* e *A. tropicalis*

Uma fração considerável dos *contigs* >100pb gerados pela montagem dos *reads* de ambas as espécies de lobos-marinhos não apresentou similaridade significativa a nenhuma seqüência de aminoácidos até então depositados no banco de dados do GenBank do NCBI. Na plataforma Ion Torrent, cerca de 70% dos *contigs* não apresentaram *hits* significativos nas buscas com o BLASTx. Já na plataforma Illumina, este número não passou de 35%. Quando os *reads* de ambas as plataformas foram combinados, a fração de *contigs* desconhecidos alcançou os 65%.

A fração de *contigs* classificados como bactérias ficou em torno de 25% para a plataforma Ion Torrent e em 60% para a Illumina, independente da

espécie de lobo-marinho analisada. Combinadas, a fração bacteriana não ultrapassou os 30%. A porção atribuída a eucariotos não ultrapassou 1% do total, independente da espécie ou plataforma utilizada. Em relação ao componente viral, os *contigs* representaram entre 4-5% do total em ambas as plataformas de seqüenciamento, independente da espécie de lobo-marinho examinada.

De uma forma geral, quando uma mesma plataforma foi comparada entre espécies distintas, as proporções de vírus, bactérias, eucariotos e *contigs* desconhecidos foram muito semelhantes. Quando plataformas distintas foram comparadas entre si, a proporção de bactérias e *contigs* desconhecidos foram diferentes, mas as de vírus e eucariotos foram semelhantes. Estes dados podem ser mais bem visualizados na Figura 13.

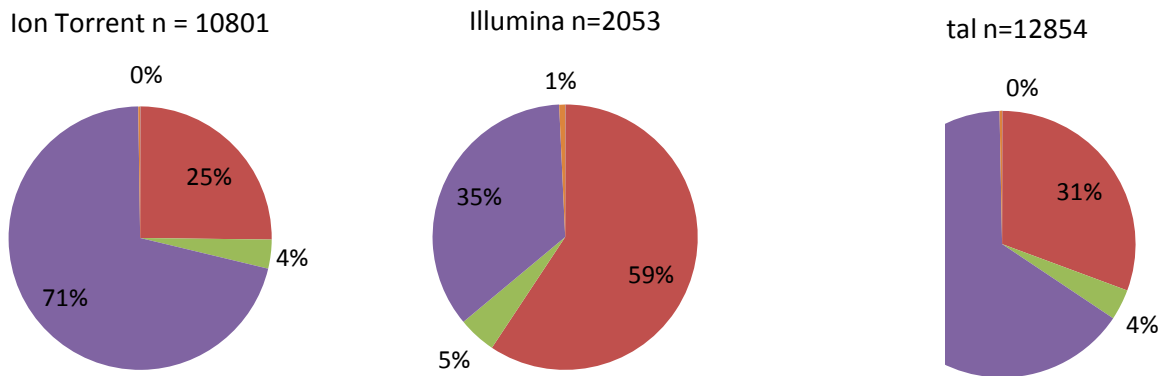
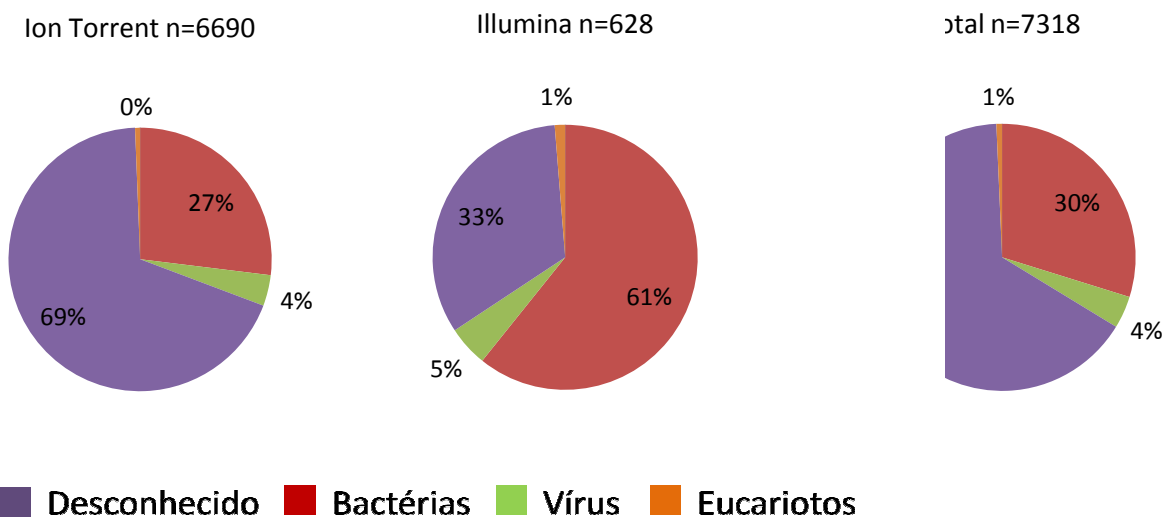
o (*A. australis*)o (*A. tropicalis*)

FIGURA 13 - Representação da classificação taxonômica dos *contigs* (>100 pb) baseada no melhor *E-score* do BLASTx contra o banco de dados não-redundante de proteínas e de vírus.

Analisando apenas o componente viral e considerando os *contigs* provenientes de ambas as plataformas somados, a maioria dos *hits* foi classificada como bacteriófagos (67 a 89% do total de *hits* atribuídos a vírus em *A. tropicalis* e *A. australis*, respectivamente). O lobo-marinho-subantártico apresentou a maior proporção de vírus de eucariotos (95 *hits*, correspondendo a 33% do total de *contigs* atribuídos a vírus), enquanto o lobo-marinho-sul-americano teve uma proporção menor (53 *hits*, correspondendo a 11% do total de *contigs* atribuídos a vírus). Estas proporções podem ser visualizadas na Figura 14. As curvas de rarefação de cada viroma geradas pelo servidor Metavir estão representadas na Figura 15.

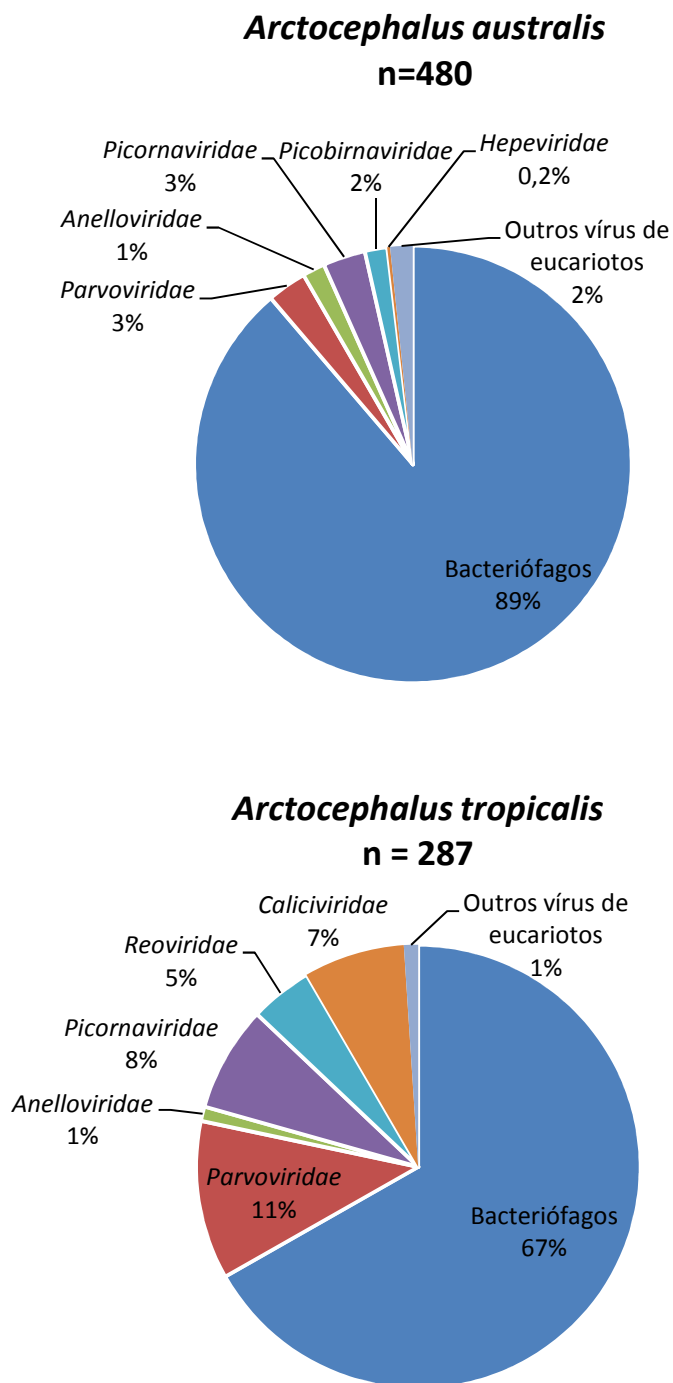


FIGURA 14- Classificação taxonômica do componente viral dos *contigs* (>100 pb) provenientes das plataformas Ion Torrent e Illumina, baseada no melhor *E-score* do BLASTx contra o banco de dados não-redundante de proteínas e de vírus.

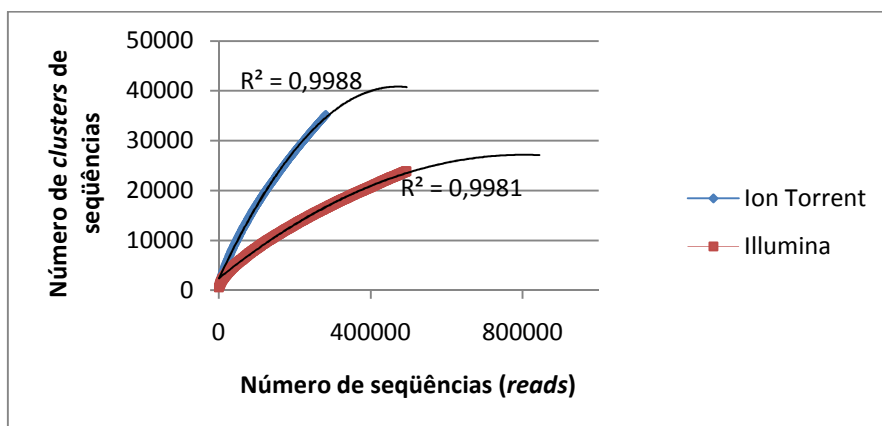
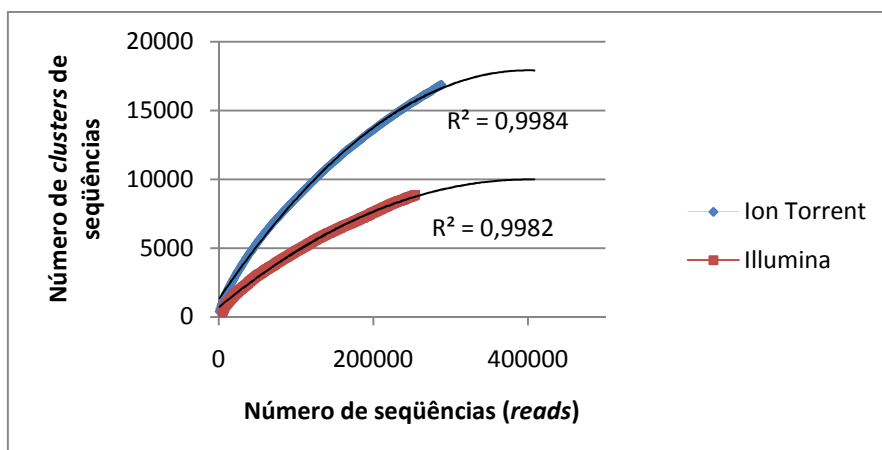
(a) *A. australis* – Ion Torrent e Illumina**(b) *A. tropicalis* – Ion Torrent e Illumina**

FIGURA 15 - Curvas de rarefação geradas pelo servidor Metavir. Seqüências atribuídas a vírus são comparadas entre si e as que apresentam similaridade igual ou maior que 75% são agrupadas em um *cluster*. Estes *clusters* (eixo y) são comparados com o número total de *reads* (eixo x). Um platô é atingido quando todas as seqüências presentes em uma amostra estiverem representadas pelo seqüenciamento. As curvas de regressão não-linear estão representadas em preto, com seus respectivos coeficientes de determinação (R^2). **(a)** *A. australis* – plataformas Ion Torrent (azul) e Illumina (vermelho). **(b)** *A. tropicalis* – plataformas Ion Torrent (azul) e Illumina (vermelho).

4.2 Viroma de lobo-marinho-sul-americano

O seqüenciamento proveniente da plataforma Ion Torrent gerou um total de 475.511 *reads* com um comprimento médio de 191 pb, os quais foram trimados a um número final de 282.732 *reads* após análise de qualidade pelo PRINSEQ e FASTQC. A montagem dos *reads* trimados, realizada através do MetaVelvet, resultou em 10.801 *contigs* (>100 pb). Os resultados do BLASTx revelaram seqüências com similaridade às seguintes famílias de vírus de eucariotos: *Parvoviridae* (11 *contigs*), *Anelloviridae* (5), *Picornaviridae* (10), *Picobirnaviridae* (5) e *Nimaviridae* (1). A média de tamanho dos *contigs* com similaridade aos vírus de eucariotos foi de 320 pb.

O seqüenciamento proveniente da plataforma Illumina gerou um total de 496.016 *paired-end reads*, com um comprimento médio de 149 pb. Estes *reads* tiveram os iniciadores trimados pelo programa Geneious, e nenhum *read* foi descartado após a análise de *scores* de qualidade. A montagem realizada pelo montador SPAdes resultou em 2.053 *contigs* (>100 pb). Os resultados do BLASTx revelaram seqüências com similaridade às seguintes famílias de vírus de eucariotos: *Parvoviridae* (3 *contigs*), *Anelloviridae* (3), *Picornaviridae* (5), *Picobirnaviridae* (3) e *Hepeviridae* (1), e outros vírus que infectam peixes, pequenos invertebrados e insetos (7). A média de tamanho dos *contigs* com similaridade aos vírus de eucariotos foi de 416 pb.

4.3 Viroma de lobo-marinho-subantártico

O seqüenciamento proveniente da plataforma Ion Torrent gerou um total de 784.917 *reads* com um comprimento médio de 184 pb, os quais foram

trimados a um número final de 288.611 *reads* após análise de qualidade pelo PRINSEQ e FASTQC. A montagem dos *reads* trimados pelo MetaVelvet resultou em 6.690 *contigs* (>100 pb). Os resultados do BLASTx revelaram seqüências com similaridade às seguintes famílias de vírus de eucariotos: *Parvoviridae* (24 *contigs*), *Anelloviridae* (2), *Picornaviridae* (19), *Reoviridae* (13), *Caliciviridae* (18), vírus de insetos (2) e um *hit* circovirus-like (1). A média de tamanho dos *contigs* com similaridade aos vírus de eucariotos foi de 280 pb.

O seqüenciamento proveniente da plataforma Illumina gerou um total de 1.253.988 *paired-end reads*, com um comprimento médio de 144 pb. Após a trimagem dos iniciadores destes *reads* pelo programa Geneious, nenhum *read* foi descartado pela análise de *scores* de qualidade. A montagem realizada pelo montador SPAdes resultou em 628 *contigs* (>100 pb). Os resultados do BLASTx revelaram seqüências com similaridade às seguintes famílias de vírus de eucariotos: *Parvoviridae* (9 *contigs*), *Anelloviridae* (1), *Picornaviridae* (3), *Caliciviridae* (3) e *Reoviridae* (1). A média de tamanho dos *contigs* com similaridade aos vírus de eucariotos foi de 464 pb.

Os *contigs* finais, resultantes da combinação das seqüências consenso de ambas as plataformas, podem ser visualizados na tabela abaixo.

TABELA 2 – Descrição dos *contigs*a) Lobo-marinho-sul-americano (*Arctocephalus australis*)

<i>Contig</i>	Número de acesso (GenBank)	Tamanho (pb)	Família/Subfamília ou Gênero	Genoma	Produto	Descrição do melhor <i>hit</i> (BLASTx)	Identidade de aminoácidos (%)	<i>E-value</i>
58	KR261062	1292	<i>Anelloviridae</i>	ssDNA	putative ORF1	ORF1 [Seal anellovirus 5] (KM262782)	35	5e-61
59	KR261063	480	<i>Anelloviridae</i>	ssDNA	putative ORF1	ORF1 [Seal anellovirus 5] (KM262782)	45	1e-14
62	KR816222	1080	<i>Anelloviridae</i>	ssDNA	putative ORF1	ORF1 [Torque teno sus virus 1a] (HM633252)	84	0.0
53	KR261066	616	<i>Parvoviridae</i> <i>Parvovirinae</i>	ssDNA	capsid protein	VP2 [Tusavirus 1] (KJ495710)	46	8e-46
54	KR261067	334	<i>Parvoviridae</i> <i>Parvovirinae</i>	ssDNA	putative capsid protein	capsid protein [Canine parvovirus 2a](HM042734)	50	2e-29
55	KR261068	460	<i>Parvoviridae</i> <i>Parvovirinae</i>	ssDNA	putative NS1	NS1 [Solwezi bufavirus] (LC011438)	43	1e-23
57	KR261070	237	<i>Parvoviridae</i> <i>Parvovirinae</i>	ssDNA	putative capsid protein	VP2 [Fox parvovirus] (KC692368)	46	3e-11
63	KR816220	344	<i>Parvoviridae</i> <i>Parvovirinae</i>	ssDNA	NS1	NS1 [Tusavirus 1] (KJ495710)	82	1e-65
29	KR106194	217	<i>Picobirnavirus</i>	dsRNA	RNA-dependent RNA polymerase	RNA dependent RNA polymerase [Human picobirnavirus] (AB517735)	52	3e-13
30	KR106195	968	<i>Picobirnavirus</i>	dsRNA	RNA-dependent RNA polymerase	RNA-dependent RNA polymerase [Fox picobirnavirus] (KC692366)	71	1e-169

31	KR106196	240	<i>Picobirnavirus</i>	dsRNA	RNA-dependent RNA polymerase	putative RNA-dependent RNA polymerase [Dromedary picobirnavirus] (KM573806)	77	3e-34
33	KR106198	293	<i>Picobirnavirus</i>	dsRNA	capsid protein	hypothetical protein [Human picobirnavirus] (GU968923)	35	1e-08
64	KR816216	330	<i>Picobirnavirus</i>	dsRNA	RNA-dependent RNA polymerase	putative RNA-dependent RNA polymerase [Dromedary picobirnavirus] (KM573806)	82	3e-61
34	KR106199	561	<i>Picornaviridae</i>	+ ssRNA	polyprotein	polyprotein [Hepatitis A virus] (FJ360731)	36	3e-15
35	KR106200	707	<i>Picornaviridae</i>	+ ssRNA	polyprotein	capsid protein [Hepatitis A virus] (AF365952)	37	1e-39
36	KR106201	519	<i>Picornaviridae</i>	+ ssRNA	polyprotein	putative 3C [Avian encephalomyelitis virus] (NP_653151)	39	2e-26
37	KR106202	285	<i>Picornaviridae</i>	+ ssRNA	polyprotein	polyprotein [Bat picornavirus] (KJ641684)	38	5e-12
65	KR816213	466	<i>Picornaviridae</i>	+ ssRNA	polyprotein	1B VP2 mature peptide [Hepatitis A virus] (NP_041008)	52	2e-50
67	KR816215	318	<i>Picornaviridae</i>	+ ssRNA	polyprotein	hypothetical protein [Avian encephalomyelitis virus] (AJ006950)	32	2e-09
73	KR827461	661	<i>Hepevirus-like</i>	+ ssRNA	polyprotein	nonstructural protein [Hepatitis E virus] (JQ026407)	27	4e-07

b) Lobo-marinho-subantártico (*Arctocephalus tropicalis*)

<i>Contig</i>	Número de acesso (GenBank)	Tamanho (pb)	Família/Subfamília ou Gênero	Genoma	Produto	Descrição do melhor <i>hit</i> (BLASTx)	Identidade de aminoácidos (%)	<i>E-value</i>
52	KR261065	347	<i>Anelloviridae</i>	ssDNA	putative ORF2	ORF2 [Torque teno zalophus virus 1] (NC_012126)	78	5e-18
72	KR816223	467	<i>Anelloviridae</i>	ssDNA	putative ORF2 and ORF1	ORF1 [Torque teno sus virus 1a] (HM633252)	88	4e-39
40	KR261071	1519	<i>Parvoviridae</i> <i>Parvovirinae</i>	ssDNA	capsid protein	VP2 [Tusavirus 1] (KJ495710)	39	1e-85
41	KR261072	1648	<i>Parvoviridae</i> <i>Parvovirinae</i>	ssDNA	NS1	NS1 [Miniopterus schreibersii parvovirus] (KC154061)	57	7e-131
42	KR261073	628	<i>Parvoviridae</i> <i>Parvovirinae</i>	ssDNA	NS1	nonstructural protein NS1 [Tumor virus X] (KJ631100)	44	2e-43
43	KR261074	565	<i>Parvoviridae</i> <i>Parvovirinae</i>	ssDNA	NS1	NS1 [Turkey parvovirus TP1-2012/HUN] (KF925531)	36	2e-13
44	KR261075	612	<i>Parvoviridae</i> <i>Parvovirinae</i>	ssDNA	capsid protein	putative VP1 [Tusavirus 1] (KJ495710)	39	2e-18
46	KR261077	349	<i>Parvoviridae</i> <i>Parvovirinae</i>	ssDNA	VP1	VP protein [Canine parvovirus](KM235293)	55	2e-26
47	KR261078	957	<i>Parvoviridae</i> <i>Parvovirinae</i>	ssDNA	NS1	non-structural protein 1 [Chipmunk parvovirus] (U86868)	37	1e-26

48	KR261079	301	<i>Parvoviridae</i> <i>Parvovirinae</i>	ssDNA	capsid protein	capsid protein [Canine parvovirus 2b] (JQ730016)	53	6e-25
68	KR816217	438	<i>Parvoviridae</i> <i>Parvovirinae</i>	ssDNA	capsid protein	putative VP1 [Tusavirus 1] (KJ495710)	42	1e-18
69	KR816218	322	<i>Parvoviridae</i> <i>Parvovirinae</i>	ssDNA	capsid protein	capsid protein VP2 [Mpulungu bufavirus] (NC_026815)	36	1e-07
70	KR816221	319	<i>Parvoviridae</i> <i>Parvovirinae</i>	ssDNA	NS1	NS1 [Miniopterus schreibersii parvovirus] (KC154061)	41	1e-14
61	KR337994	438	<i>Picornaviridae</i>	+ ssRNA	polyprotein	AEV polyprotein [Avian encephalomyelitis virus] (NC_003990)	34	4e-15
12	KR072975	1271	<i>Picornaviridae</i> <i>Sakobuvirus</i>	+ ssRNA	polyprotein	polyprotein [Feline sakobuvirus A] (NC_022802)	58	6e-126
13	KR072976	477	<i>Picornaviridae</i> <i>Sakobuvirus</i>	+ ssRNA	polyprotein	polyprotein [Kobuvirus SZAL6-KoV/2011/HUN] (KJ934637)	52	4e-12
14	KR072977	289	<i>Picornaviridae</i> <i>Sakobuvirus</i>	+ ssRNA	polyprotein	polyprotein [Feline sakobuvirus A] (NC_022802)	66	3e-22
15	KR072978	273	<i>Picornaviridae</i> <i>Sakobuvirus</i>	+ ssRNA	polyprotein	VP3 [Feline sakobuvirus A] (YP_008802588)	66	1e-34
16	KR072979	227	<i>Picornaviridae</i> <i>Sakobuvirus</i>	+ ssRNA	polyprotein	VP1 [Feline sakobuvirus A] (YP_008802588)	59	2e-12
18	KR072981	466	<i>Picornaviridae</i> <i>Sakobuvirus</i>	+ ssRNA	polyprotein	2C [Feline sakobuvirus A] (YP_008802588)	59	3e-58
20	KR072982	767	<i>Picornaviridae</i> <i>Sakobuvirus</i>	+ ssRNA	polyprotein	3D [Feline sakobuvirus A] (YP_008802588)	65	3e-117

22	KR072984	430	<i>Picornaviridae</i> <i>Sakobuvirus</i>	+ ssRNA	polyprotein	3D [Feline sakobuvirus A] (YP_008802588)	73	1e-67
23	KR072985	469	<i>Reoviridae</i> <i>Rotavirus</i>	dsRNA	NSP2	nonstructural protein 2 [Bovine rotavirus C] (AB874653)	69	3e-66
24	KR072986	412	<i>Reoviridae</i> <i>Rotavirus</i>	dsRNA	NSP3	nonstructural protein 3 [Bovine rotavirus C] (AB874654)	45	6e-33
25	KR072987	928	<i>Reoviridae</i> <i>Rotavirus</i>	dsRNA	VP1	VP1 [Bovine rotavirus C] (AB738412)	69	2e-137
26	KR072988	442	<i>Reoviridae</i> <i>Rotavirus</i>	dsRNA	VP3	VP3 [Human rotavirus C] (HQ185645)	51	5e-41
27	KR072989	357	<i>Reoviridae</i> <i>Rotavirus</i>	dsRNA	VP3	viral protein 3 [Bovine rotavirus C] (AB874621)	65	6e-46
28	KR072990	360	<i>Reoviridae</i> <i>Rotavirus</i>	dsRNA	VP7	outer capsid protein VP7 [Human rotavirus C] (JQ177070)	59	9e-42
01	KR072991	209	<i>Caliciviridae</i> <i>Sapovirus</i>	+ ssRNA	polyprotein	polyprotein [California sea lion sapovirus 1] (JN420370)	96	2e-36
02	KR072992	2932	<i>Caliciviridae</i> <i>Sapovirus</i>	+ ssRNA	polyprotein	polyprotein [California sea lion sapovirus 1] (JN420370)	98	0.0
06	KR072994	1400	<i>Caliciviridae</i> <i>Sapovirus</i>	+ ssRNA	polyprotein	polyprotein [California sea lion sapovirus 1] (JN420370)	98	0.0
07	KR072995	2408	<i>Caliciviridae</i> <i>Sapovirus</i>	+ ssRNA	polyprotein and VP2	polyprotein [California sea lion sapovirus 1] (JN420370)	96	0.0

4.4 Anelovírus

Seqüências de genomas de anelovírus foram encontradas em fezes de ambas as espécies de lobos-marinhos. Algumas seqüências provenientes da espécie *A. australis* apresentaram alta similaridade ao anelovírus de foca tipo 5. O percentual de identidade de aminoácidos entre o *contig* 58 (KR261062) e o anelovírus de foca tipo 5 foi de 35%, cobrindo 67% da região codificada pela ORF1 e com identidade nucleotídica (*pairwise identity*) de 41,1%. Outra seqüência (*contig* 52 – KR261065), desta vez proveniente da espécie *A. tropicalis*, apresentou maior similaridade ao *Torque teno zalophus virus*, com identidade de aminoácidos de 78% e cobertura de 69% da região codificada pela ORF2. Ambas as espécies de lobos-marinhos também apresentaram seqüências com maior similaridade ao anelovírus de suínos, o *Torque teno sus virus 1a*. O *contig* 62 (KR816222) apresentou identidade de aminoácidos de 84%, cobrindo 56% da região codificada pela ORF1 do *Torque teno sus virus 1a*, e com identidade nucleotídica (*pairwise identity*) de 73,8%.

As análises filogenéticas de seqüências parciais de regiões codificadas pela ORF1 de anelovírus obtidas da espécie *A. australis* mostraram os diferentes anelovírus agrupados em *clusters* distintos: um mais próximo dos anelovírus de foca, enquanto o outro é posicionado junto aos anelovírus de suínos (Figura 16).

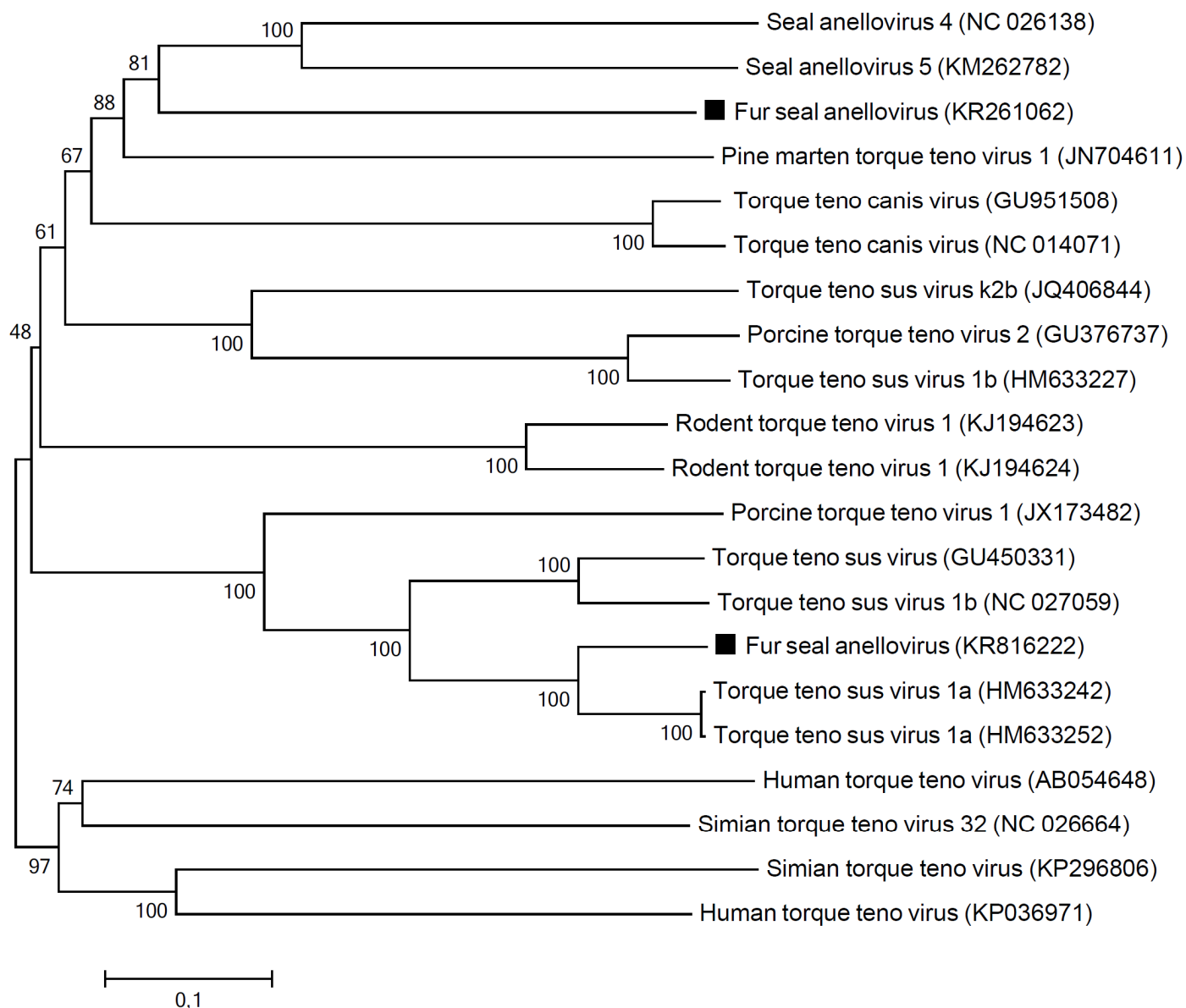


FIGURA 16 - Árvore filogenética construída por NJ utilizando 21 seqüências parciais preditas de aminoácidos (233 aa) da ORF1 de anelovírus. Os torque teno vírus humano e símio foram usados como grupos externos. As seqüências referentes a este estudo estão marcadas com quadrados pretos e os números de acesso ao GenBank estão entre parênteses.

4.5 Parvovirus

Seqüências de parvovirus foram detectadas em fezes das duas espécies de lobos-marinhos. Todos os *contigs* tiveram similaridade com parvovirus de mamíferos, membros da subfamília *Parvovirinae*, com identidade de aminoácidos da proteína NS1 que varia entre 36-82%. A análise filogenética com base nas seqüências dessa proteína, conservada entre os parvovirus, posicionou os parvovirus de lobos-marinhos entre representantes do gênero *Protoparvovirus*, ficando filogeneticamente distantes de outros parvovirus já isolados em pinípedes (Figura 17).

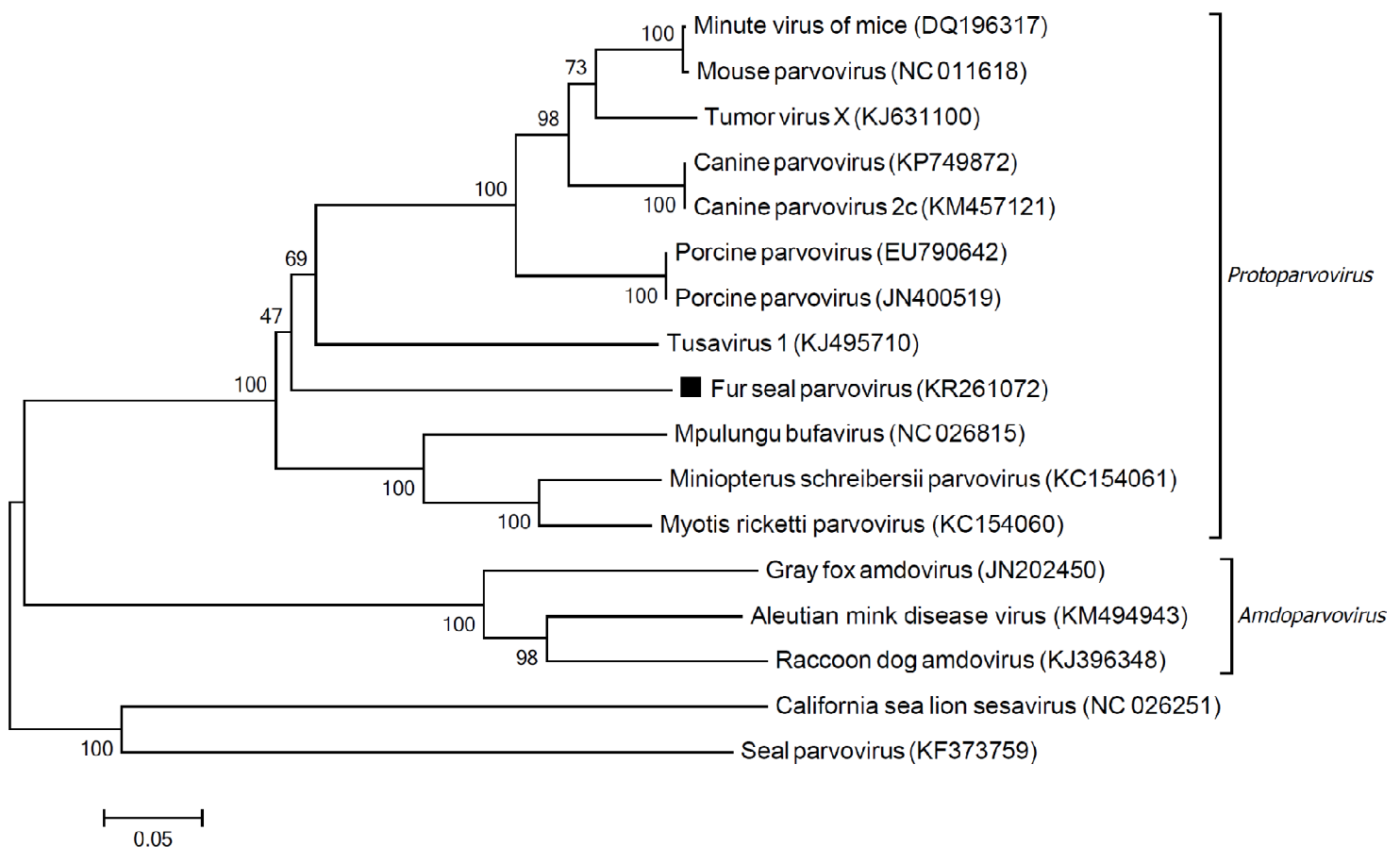


FIGURA 17 - Árvore filogenética construída por NJ utilizando 17 seqüências parciais preditas de aminoácidos (261 aa) da NS1 de parvovírus. Parvovírus de foca e sesavírus de lobos-marinhos da Califórnia foram usados como grupos externos. As seqüências referentes a este estudo estão marcadas com quadrados pretos e os números de acesso ao GenBank estão entre parênteses.

4.6 Picobirnavírus

Seqüências de picobirnavírus foram detectadas em fezes da espécie *A. australis*, apresentando maior similaridade com membros dos genogrupo I. Análises filogenéticas do gene RpRd (743 pb foram usados na análise, cerca de 44% do gene) corroboraram a classificação no genogrupo I (Figura 18), com uma identidade nucleotídica que varia de 60-68% entre outros vírus do mesmo grupo.

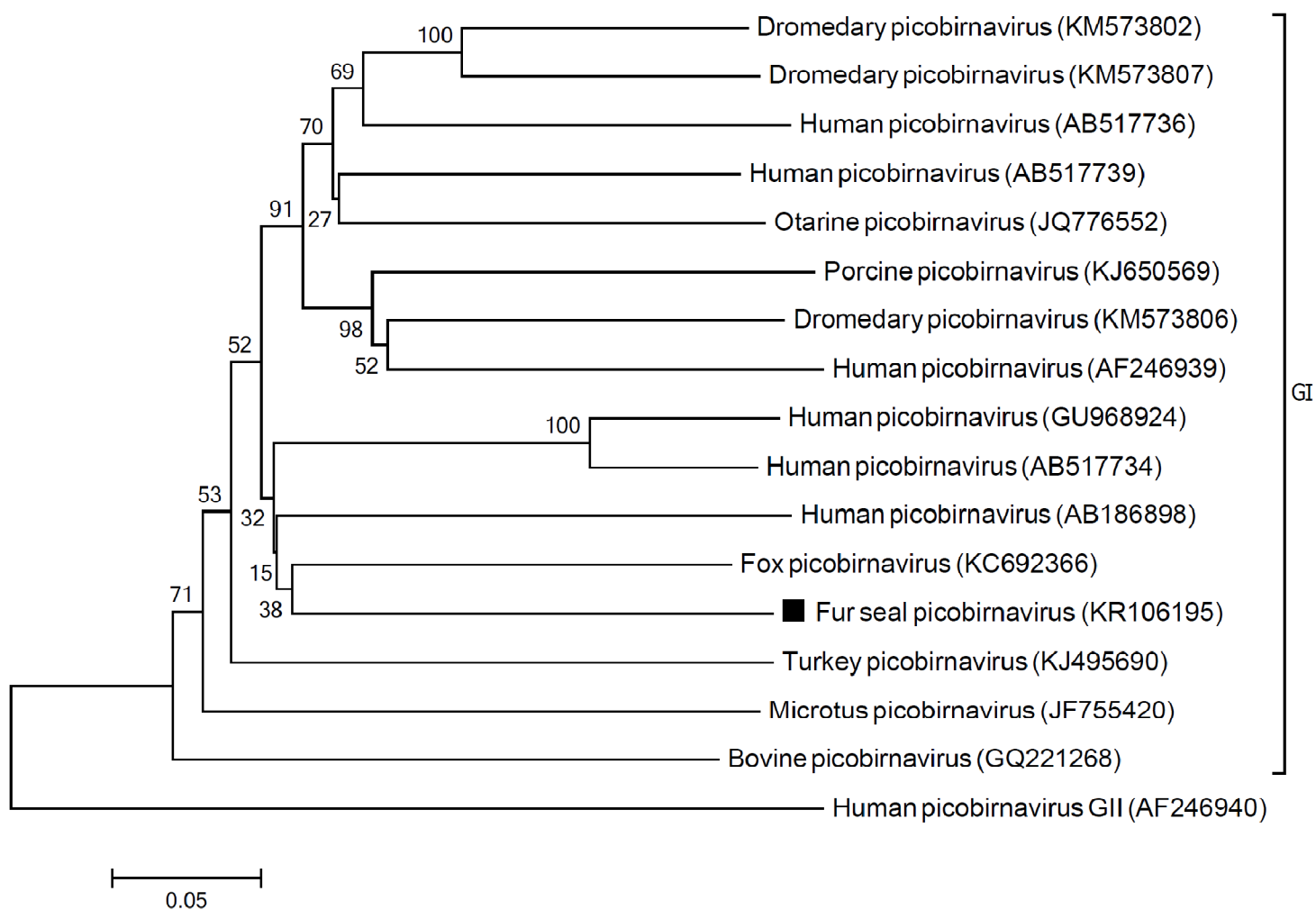


FIGURA 18 - Árvore filogenética construída por NJ utilizando 17 seqüências parciais de nucleotídeos (743 pb) do gene RpRd de picobirnavírus. Picobirnavírus humano do genogrupo II foi usado como grupo externo. As seqüências referentes a este estudo estão marcadas com quadrados pretos e os números de acesso ao GenBank estão entre parênteses.

4.7 Picornavírus

Seqüências de picornavírus mais próximas ao HAV e AEV foram detectadas em fezes das duas espécies de lobos-marinhos examinadas, com

uma identidade de aminoácidos entre 32-39% a ambos os gêneros, *Hepatovirus* e *Tremovirus*, que são filogeneticamente próximos. Uma das seqüências obtidas (*contig* 65 – KR816213) apresentou 52% de identidade de aminoácidos com a proteína VP2 de HAV. Análises filogenéticas foram realizadas com seqüências parciais das regiões P1 e P3 da poliproteína de picornavírus. A análise da região P1 mostrou o picornavírus de lobo-marinho formando um grupo monofilético com os gêneros *Hepatovirus* e *Tremovirus*, porém em um ramo separado (Figura 19). As análises da região P3 resultaram em uma árvore similar (Figura 20).

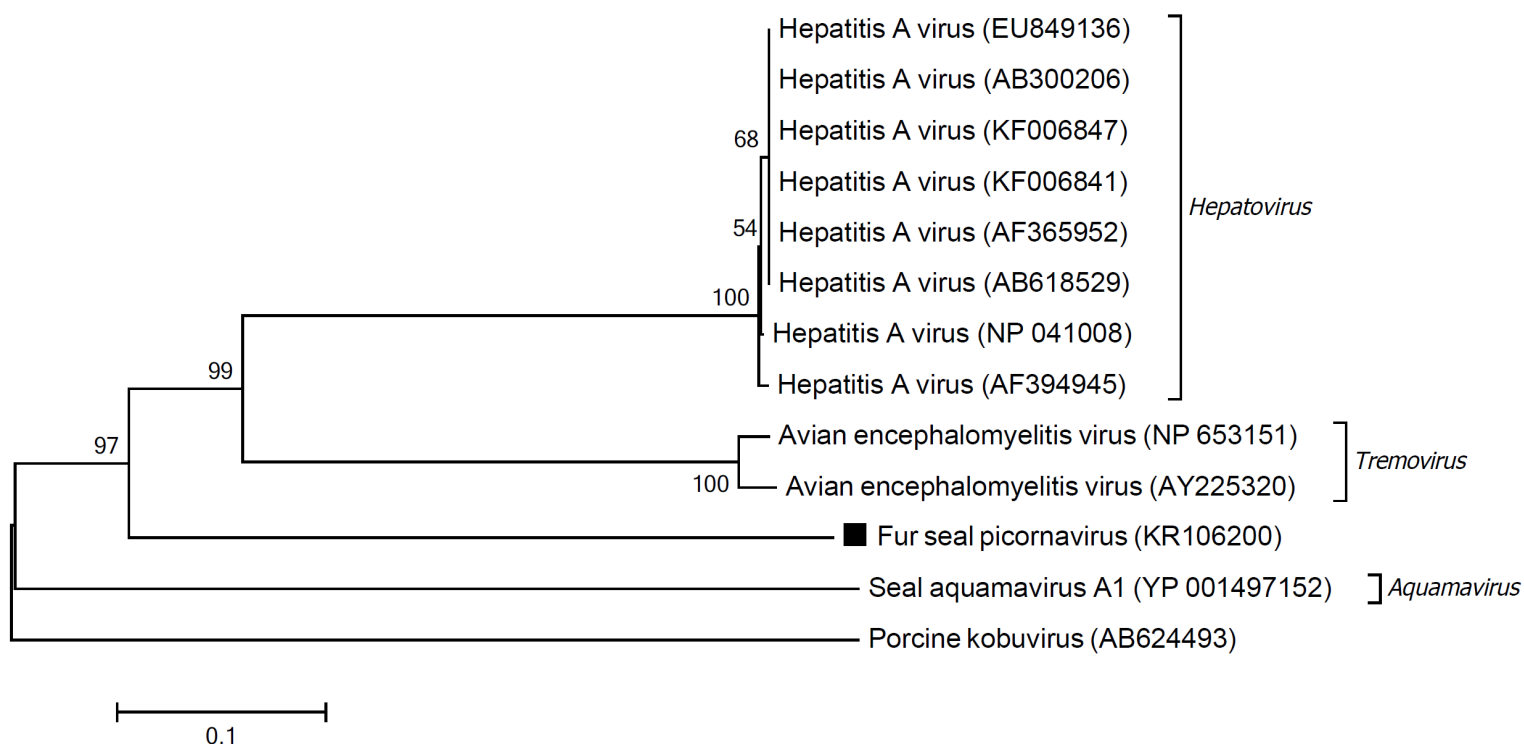


FIGURA 19 - Árvore filogenética construída por NJ utilizando 13 seqüências parciais preditas de aminoácidos (219 aa) da região P1 da poliproteína de picornavírus. Kobuvírus suíno foi usado como grupo externo. As seqüências

referentes a este estudo estão marcadas com quadrados pretos e os números de acesso ao GenBank estão entre parênteses.

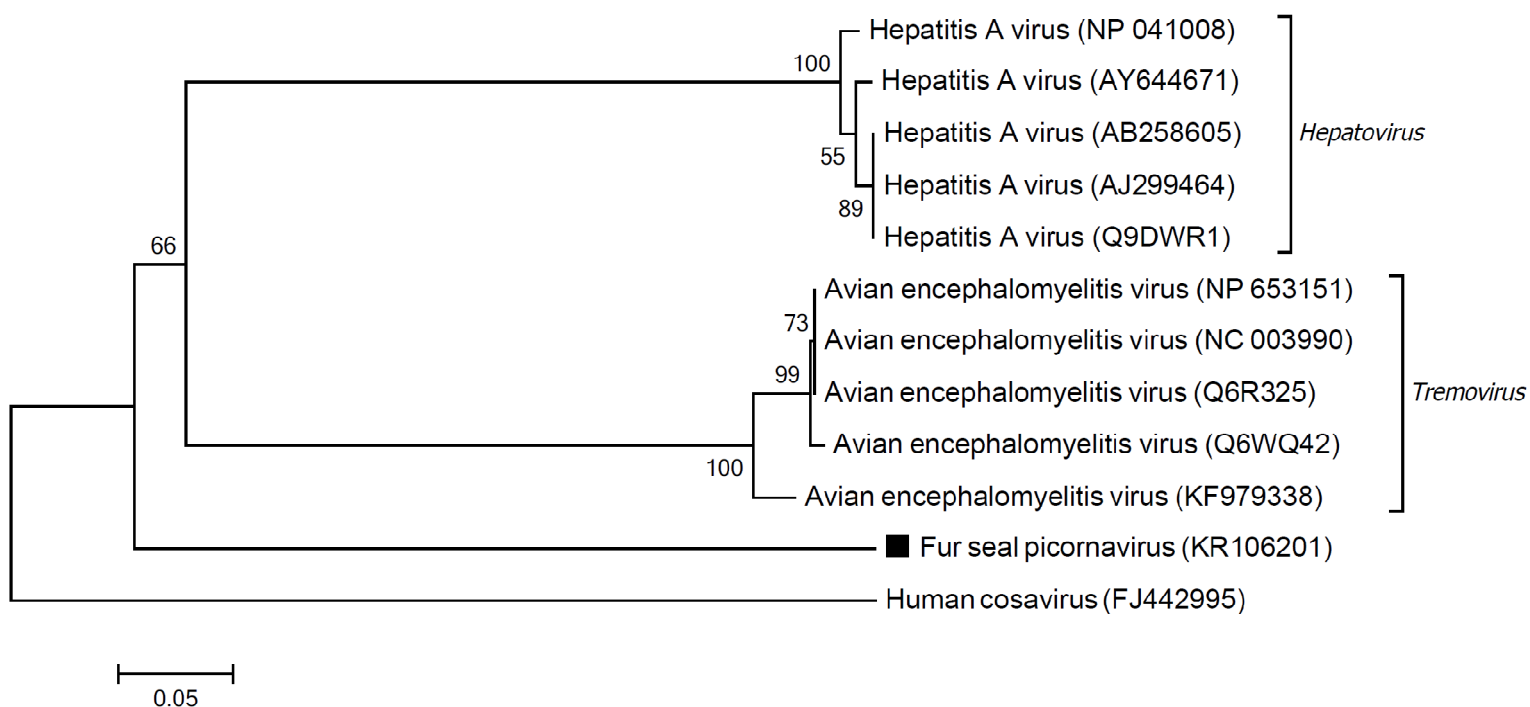


FIGURA 20 - Árvore filogenética construída por NJ utilizando 12 seqüências parciais preditas de aminoácidos (122 aa) da região P3 da poliproteína de picornavírus. Cosavírus humano foi usado como grupo externo. As seqüências referentes a este estudo estão marcadas com quadrados pretos e os números de acesso ao GenBank estão entre parênteses.

Outro picornavírus, distinto do que apresenta similaridade com HAV e AEV, foi identificado apenas na espécie *A. tropicalis*. Com exceção de uma seqüência (*contig* 13 – KR072976), que possui maior similaridade a um kobuvírus, todos os demais *contigs* apresentam maior identidade de

aminoácidos com o *Sakobuvirus felino A* (gênero *Sakobuvirus*), variando entre 58-73% e cobrindo 59% de toda poliproteína. Análises filogenéticas foram realizadas com seqüências parciais das regiões P2 (Figura 21) e P3 (Figura 22) e revelaram o picornavírus de *A. tropicalis* no mesmo *cluster* que o *Sakobuvirus felino A*.

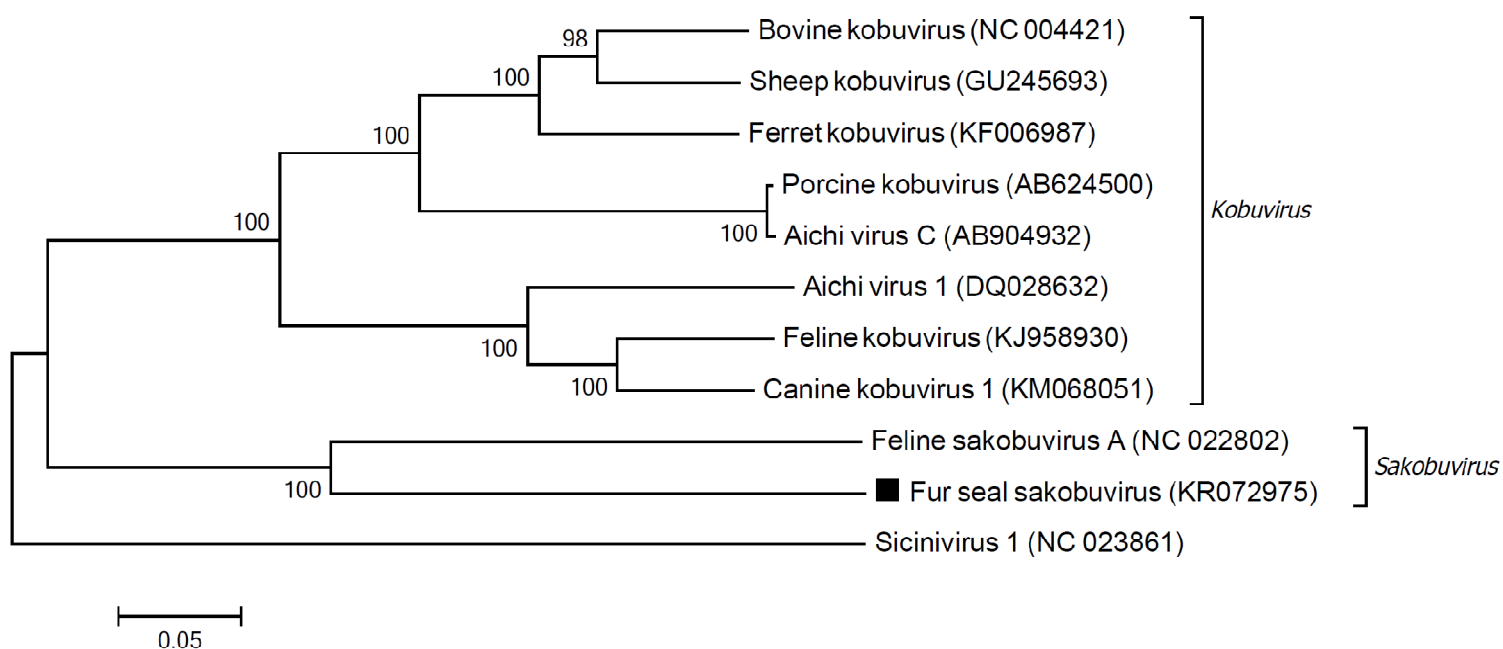


FIGURA 21 - Árvore filogenética construída por NJ utilizando 11 seqüências parciais preditas de aminoácidos (409 aa) da região P2 da poliproteína de picornavírus. Sinicivirus 1 foi usado como grupo externo. As seqüências referentes a este estudo estão marcadas com quadrados pretos e os números de acesso ao GenBank estão entre parênteses.

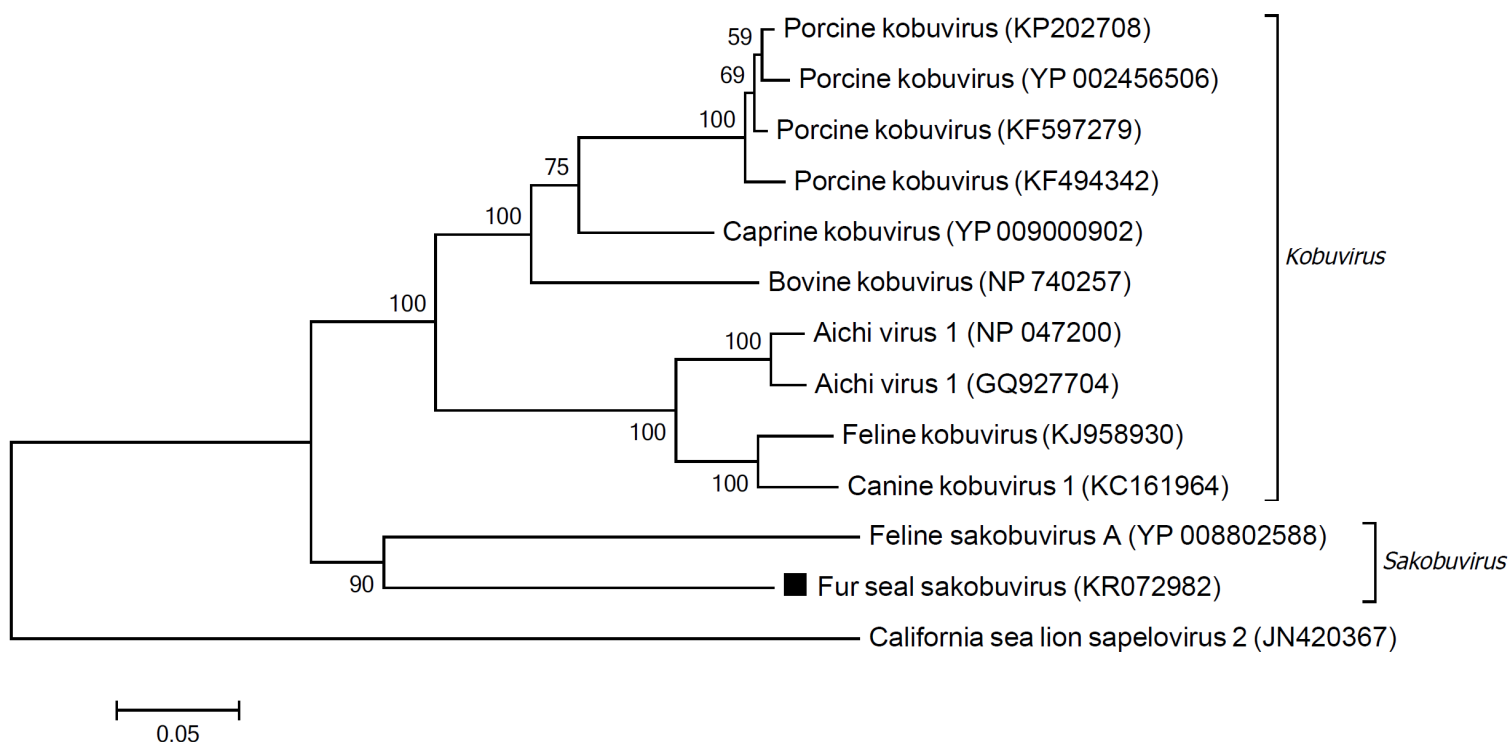


FIGURA 22 - Árvore filogenética construída por NJ utilizando 13 seqüências parciais preditas de aminoácidos (255 aa) da região 3D da poliproteína de picornavírus. Sapelovírus de lobo-marinho da Califórnia tipo 2 foi usado como grupo externo. As seqüências referentes a este estudo estão marcadas com quadrados pretos e os números de acesso ao GenBank estão entre parênteses.

4.8 Rotavírus

Seqüências de rotavírus foram detectadas em fezes da espécie *A. tropicalis*, apresentando identidade de aminoácidos entre 45-69% a proteínas do rotavírus do grupo C. Análises filogenéticas foram feitas com seqüências parciais com cobertura de 30% da proteína VP1, usada para análises do

gênero *Rotavirus*, e mostraram maior proximidade com membros do grupo C do que os demais grupos (Figura 23).

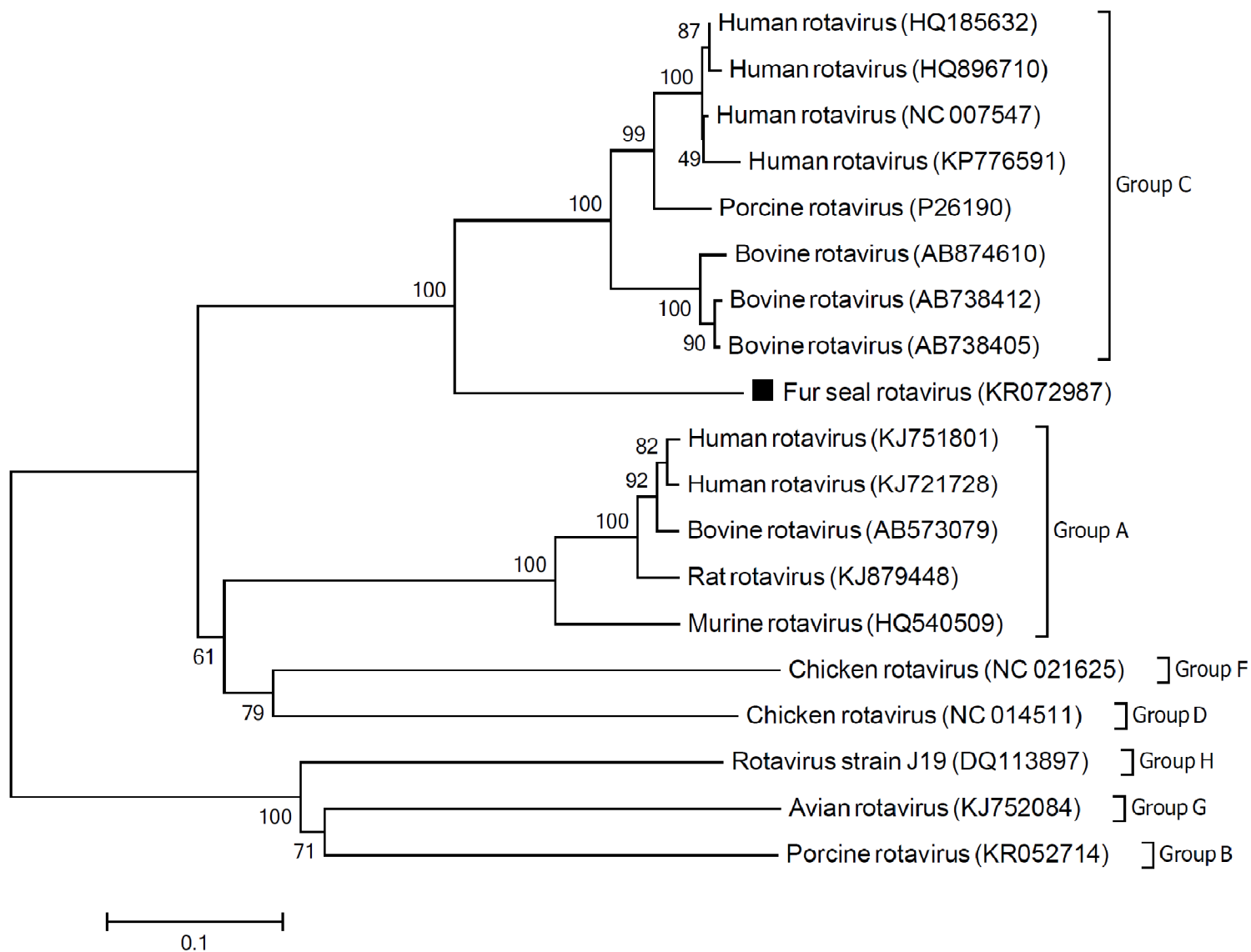


FIGURA 23 - Árvore filogenética construída por NJ utilizando 19 seqüências parciais preditas de aminoácidos (307 aa) da VP1 de rotavírus. Seqüências dos grupos B, G e H foram usadas como grupos externos. As seqüências referentes a este estudo estão marcadas com quadrados pretos e os números de acesso ao GenBank estão entre parênteses.

4.9 Sapovírus

Seqüências de sapovírus foram detectadas em fezes da espécie *A. tropicalis*. Os *contigs* apresentam 98% de identidade nucleotídica com o sapovírus de leão-marinho da Califórnia tipo 1 e cobrem 90% do genoma. Análises filogenéticas foram realizadas com o gene completo da VP1 (Figura 24) e quase completo da VP2 (Figura 25).

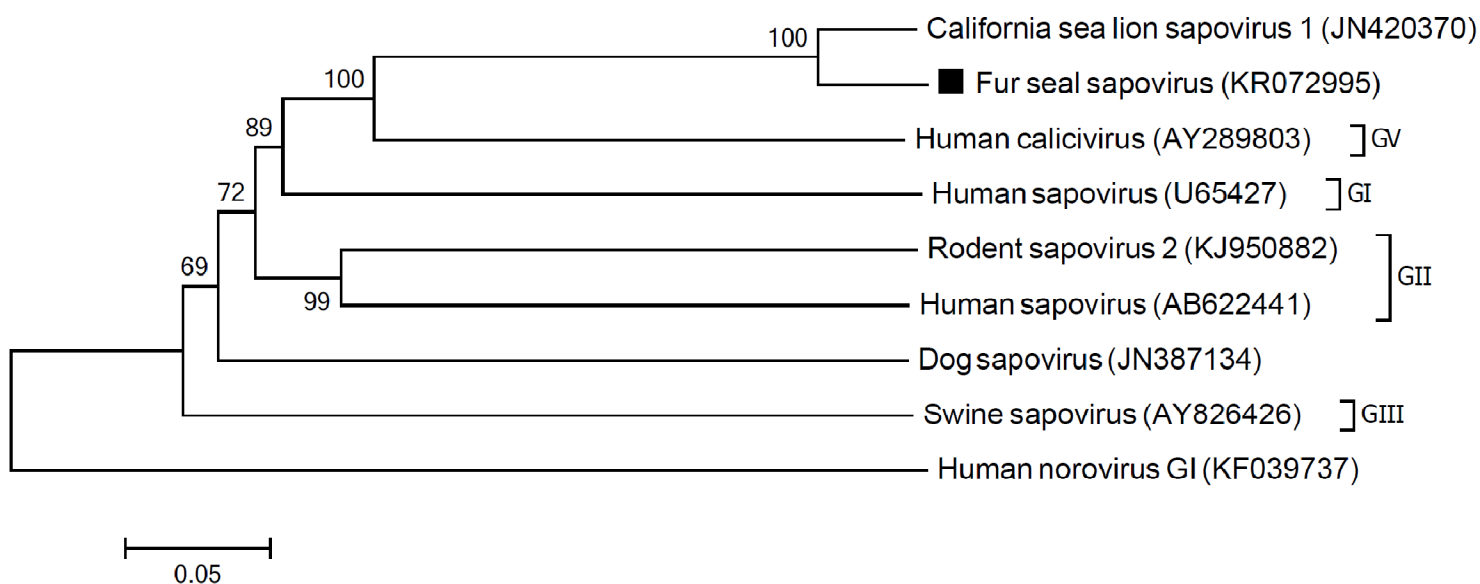


FIGURA 24 - Árvore filogenética construída por NJ utilizando nove seqüências de nucleotídeos do gene completo da VP1 de calicivírus. Norovírus humano foi usado como grupo externo. As seqüências referentes a este estudo estão marcadas com quadrados pretos e os números de acesso ao GenBank estão entre parênteses.

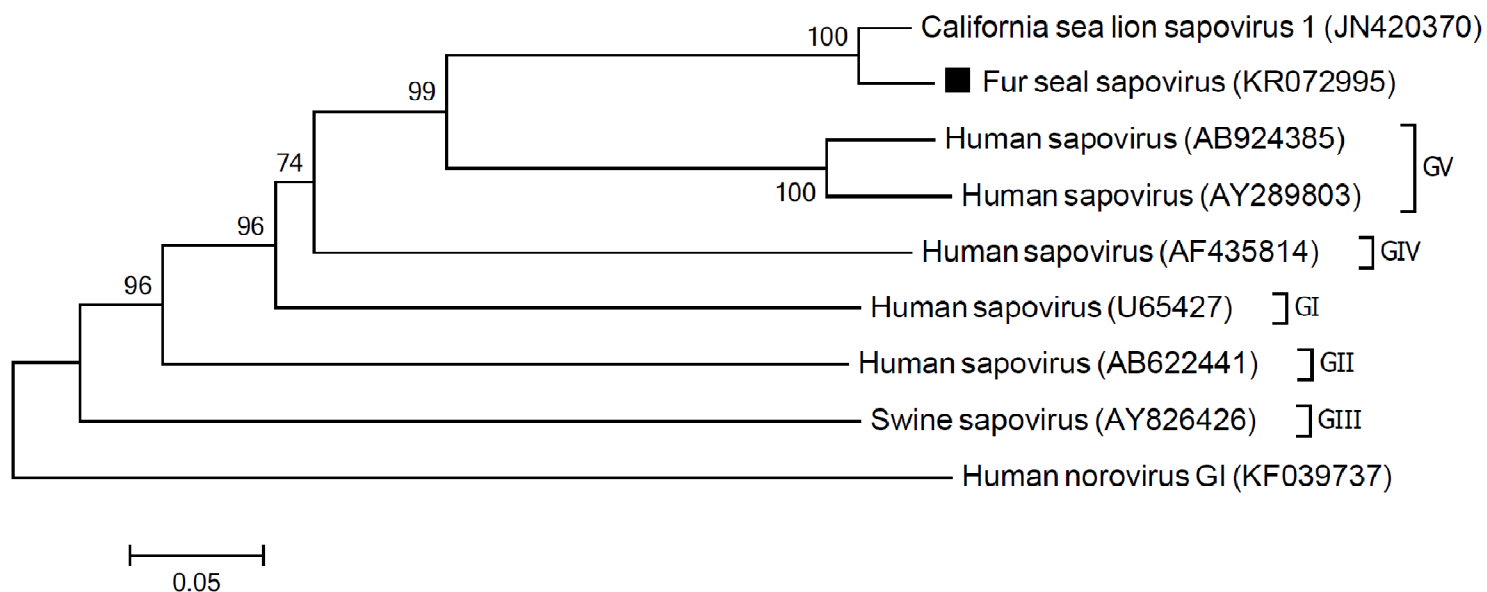


FIGURA 25 - Árvore filogenética construída por NJ utilizando nove seqüências de nucleotídeos do gene quase completo (489 pb) da VP2 de calicivírus. Norovírus humano foi usado como grupo externo. As seqüências referentes a este estudo estão marcadas com quadrados pretos e os números de acesso ao GenBank estão entre parênteses.

4.10 Hepevírus

Uma seqüência de 661 pb (*contig* 73 – KR827461) com uma baixa identidade de aminoácidos (27%) à poliproteína de hepevírus foi encontrada em fezes da espécie *A. australis*. Análises filogenéticas de seqüências parciais da poliproteína de hepevírus e hepevírus-*like* foram realizadas (Figura 26).

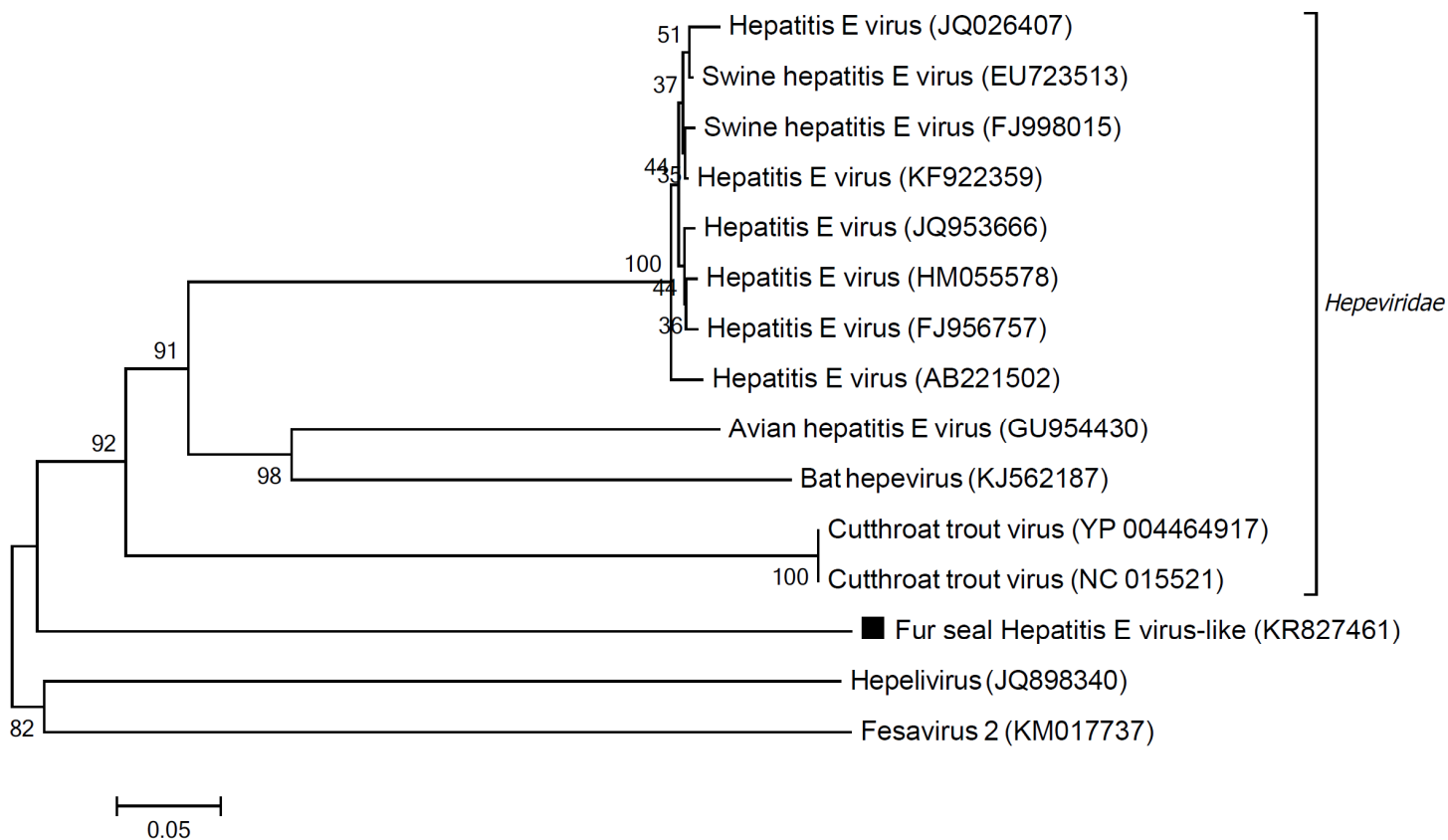


FIGURA 26 - Árvore filogenética construída por NJ utilizando 15 seqüências parciais preditas de aminoácidos (182 aa) da poliproteína de hepevírus. Hepelivírus e fesavírus 2 foram usados como grupos externos. As seqüências referentes a este estudo estão marcadas com quadrados pretos e os números de acesso ao GenBank estão entre parênteses.

5. DISCUSSÃO

O uso de duas plataformas de seqüenciamento, Ion Torrent e Illumina, para obtenção de seqüências virais em amostras fecais de lobos-marinhos que ocorrem na costa do Rio Grande do Sul mostrou que a fração do componente viral detectada nas duas espécies foi semelhante, independente da técnica de seqüenciamento utilizada. O uso das duas diferentes plataformas de seqüenciamento permitiu não somente a confirmação dos resultados obtidos separadamente, como também possibilitou uma maior cobertura dos genomas, resultando em *contigs* finais maiores. As seqüências de famílias virais detectadas por uma plataforma foram, com raras exceções, também detectadas pela outra, corroborando sua presença nas amostras analisadas.

Neste estudo, dois programas de montagem foram utilizados: MetaVelvet e SPAdes. MetaVelvet é um montador conservador que garante uma boa qualidade de seus *contigs*, e para atingir tal qualidade costuma usar uma pequena percentagem dos *reads* (VÁZQUEZ-CASTELLANOS *et al.*, 2014), e foi o montador de escolha para os *reads* provenientes do Ion Torrent. Já SPAdes é um montador que possui a vantagem de testar múltiplos *k-mers* na mesma montagem, resultando em um arquivo final com os *contigs* gerados.

SPAdes foi originalmente projetado para a plataforma Illumina e resultados melhores são obtidos quando se obtém *reads* de alta qualidade (BANKEVICH *et al.*, 2012). O programa SPAdes foi o de escolha para a montagem dos *reads* da plataforma Illumina pois possuem, em média, qualidade superior quando comparados aos da Ion Torrent - o que também foi constatado neste estudo (*Phred quality score* dos *reads*: Ion Torrent 62,4% Q30, Illumina 98% Q30). De uma forma geral, a montagem do Metavelvet dos *reads* do Ion Torrent resultou em *contigs* mais curtos, porém em maior número em relação à montagem dos *reads* do Illumina pelo SPAdes.

As curvas de rarefação geradas pelo servidor Metavir mostram que nenhum dos seqüenciamentos atingiu o platô, ou seja, nem todas as espécies presentes nas amostras processadas foram seqüenciadas. No entanto, é possível observar que o seqüenciamento da plataforma Illumina gerou uma curva com coeficiente angular menor em relação à plataforma Ion Torrent. Ou seja, o seqüenciamento Illumina ficou mais próximo de um platô, indicando uma cobertura maior dos *reads* seqüenciados quando comparado à plataforma Ion Torrent. Todavia, quando o número de diferentes *clusters* de seqüências é observado, nota-se que a plataforma Ion Torrent foi capaz de seqüenciar uma maior diversidade de seqüências quando comparado à plataforma Illumina. Sendo assim, observa-se que o seqüenciamento Illumina resultou em uma menor diversidade de seqüências, porém proporcionou uma maior cobertura dos *reads* seqüenciados. Já a plataforma Ion Torrent apresentou menor cobertura de *reads*, mas resultou em uma maior diversidade de seqüências. Isso, de fato, pôde ser observado quando os *contigs* provenientes de cada

plataforma foram analisados separadamente. De uma forma geral, a plataforma Ion Torrent resultou em diversos *contigs* que cobriram diferentes partes do genoma de cada espécie de vírus, porém com menor cobertura, enquanto os *contigs* provenientes da plataforma Illumina tiveram maior cobertura, mas concentraram-se a apenas uma ou poucas regiões do genoma de cada espécie de vírus.

5.1 Vírus encontrados

Os resultados aqui expostos mostram que, entre as seqüências obtidas a partir das amostras de fezes de ambas as espécies de lobos-marinhos, foram detectadas seqüências correspondentes a vírus entéricos, muitos deles conhecidos por causar doenças em mamíferos. A fração do componente viral detectada nas duas espécies foi semelhante, independente da técnica de seqüenciamento utilizada. Estas frações foram semelhantes às encontradas em outros estudos sobre o viroma fecal de morcegos e dromedários (WU *et al.*, 2012; HE *et al.*, 2013; WOO *et al.* 2014). Além disso, a baixa similaridade de alguns *contigs* aos vírus conhecidos até o presente pode representar a descoberta de novos vírus.

Seqüências de anelovírus foram detectadas em ambas as espécies de lobos-marinhos, com similaridade a anelovírus de outros pinípedes e de suínos. Dada a grande variabilidade entre as diferentes espécies de anelovírus, recomenda-se que as análises filogenéticas sejam feitas com seqüências completas da ORF1 (BIAGINI *et al.*, 2011). Com base na análise da ORF1, os critérios para classificação taxonômica dos anelovírus seguem os valores de

cut-off de >56% e >35% de divergência entre seqüências para gênero e espécie, respectivamente (BIAGINI *et al.*, 2011). Com base na identidade obtida pelo alinhamento aos pares das seqüências aqui encontradas, um dos *contigs* apresentou maior similaridade ao anelovírus de foca previamente descrito (BODEWES *et al.*, 2015). Entretanto, houve cerca de 60% de divergência entre essas seqüências, o que sugere que o vírus encontrado no presente trabalho faça parte de um novo gênero de anelovírus. Já o *contig* com maior similaridade ao anelovírus suíno apresentou uma divergência de 26%, indicando que o vírus aqui encontrado pertence ao mesmo gênero do *Torque teno sus virus 1a*, *lotatorquevirus*. Anelovírus já foram detectados em leões-marinhos e focas, e acredita-se que sua circulação seja freqüente entre pinípedes, sendo inclusive relacionados a eventos de mortalidade nestas populações (NG *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2011a; NG *et al.*, 2011; FAHSBENDER *et al.*, 2015).

Seqüências de parvovírus foram detectadas nas duas espécies de lobos-marinhos, com similaridades a diferentes membros da subfamília *Parvovirinae*. De acordo com os critérios de demarcação dos parvovírus, representantes do mesmo gênero devem compartilhar uma identidade de aminoácidos mínima de 30% de seqüências preditas do gene da NS1 (COTMORE *et al.*, 2014). Todas as seqüências deste estudo apresentaram identidade maior que 30% com os demais *Protoparvovirus*, sugerindo que identificamos uma nova espécie dentro desse gênero. Parvovírus já foram detectados em pinípedes (BUREK, *et al.*, 2005; BODEWES *et al.*, 2013) e

diferentes gêneros, como *Bocaparvovirus* e *Dependoparvovirus*, foram encontrados em leões-marinhos. (LI *et al.*, 2011a; PHAN *et al.*, 2015).

Potenciais novos vírus entéricos também foram detectados nas duas espécies de lobos-marinhos. Um picobirnavírus do genogrupo I foi detectado nas amostras do lobo-marinho-sul-americano. Este picobirnavírus é filogeneticamente distante do picobirnavírus otarino previamente encontrado em leões-marinhos da Califórnia (WOO *et al.*, 2012) e pode representar uma nova espécie do gênero.

Membros da família *Picornaviridae* foram identificados nas amostras de ambas as espécies de lobos-marinhos. Picornavírus já foram encontrados em mamíferos marinhos (KAPOOR *et al.*, 2008) e também foram detectados neste estudo. Um possível novo picornavírus foi encontrado nas duas espécies de lobos-marinhos examinadas, semelhante aos gêneros *Hepatovirus* e *Tremovirus*, que são filogeneticamente próximos. De acordo com os critérios de demarcação da família *Picornaviridae*, diferentes gêneros devem apresentar menos que 40%, 40% e 50% de identidade de aminoácidos das proteínas codificadas pelas regiões genômicas P1, P2 e P3 da poliproteína, respectivamente (PICORNAVIRUSES, 2015). Apesar de apenas seqüências parciais terem sido amplificadas, todas apresentaram valores abaixo deste *cut-off*, com a exceção de uma seqüência que apresentou identidade de 52% com outros gêneros da família *Picornaviridae*. No entanto, trata-se de uma seqüência da região da VP2, e, de acordo com outro estudo que comparou os genomas do HAV e AEV (MARVIL *et al.*, 1999), é esperada uma identidade maior nesta região quando diferentes gêneros da família são comparados.

Portanto, as análises dessas seqüências sugerem um novo gênero de *Picornaviridae* identificado em *A. australis* e *A. tropicalis*.

Outro picornavírus foi identificado em amostras do lobo-marinho-subantártico. As análises dessas seqüências revelam uma identidade de aminoácidos acima de 50% com o *Sakobuvirus felino A* em todas as regiões da poliproteína, o que indica que pertencem ao mesmo gênero (*Sakobuvirus*). Até então, o *Sakobuvirus felino A* era a única espécie representante desse gênero e este é o primeiro relato da presença de um sakobuvírus em outra espécie de animal diferente de felinos.

Seqüências de rotavírus filogenicamente relacionadas ao grupo C foram encontradas nas amostras do lobo-marinho-subantártico. Anticorpos contra o grupo A já foram detectados em leões e lobos-marinhos de Galápagos e seqüências de rotavírus relacionadas ao grupo B foram encontradas em leões-marinhos da Califórnia (CORIA-GALINDO *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2011a). Os resultados do presente estudo mostram pela primeira vez a circulação de rotavírus do grupo C na espécie *A. tropicalis* e indicam que rotavírus de outros grupos, além do A e B, podem circular entre pinípedes.

Calicivírus já foram isolados de mamíferos marinhos e recentemente uma nova espécie de sapovírus foi detectada em leões-marinhos da Califórnia (SMITH *et al.*, 1973; BUREK *et al.*, 2005; LI *et al.*, 2011a). Seqüências de um sapovírus quase idêntico (98% de identidade nucleotídica) ao Sapovírus de leão-marinho da Califórnia tipo 1 foram detectadas nas amostras de lobo-marinho-subantártico. Estes resultados mostram que o mesmo sapovírus

circula em populações de pinípedes nativas dos hemisférios norte e sul, sendo, portanto, amplamente distribuído entre esses animais.

Um vírus relacionado aos da família *Hepeviridae* foi encontrado em fezes do lobo-marinho-sul-americano, ainda que de baixa identidade de aminoácidos (<30%) com outros membros dessa família. Outros vírus com baixa similaridade aos hepevírus foram previamente detectados em amostras de esgoto e fezes de gato, denominados hepelivírus e fesavírus-2, respectivamente (NG *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2014). As análises filogenéticas revelaram maior proximidade do vírus de lobo-marinho com membros da *Hepeviridae* do que os hepelivírus e fesavírus-2, o que talvez represente um novo gênero da família. Este é o primeiro relato do qual se tem conhecimento de um hepevírus-*like* em pinípedes.

O contato de mamíferos marinhos com humanos e outros animais pode representar um risco de transmissão de patógenos e zoonoses (WALTZEK *et al.*, 2012). No caso dos lobos-marinhos encontrados nas praias do Rio Grande do Sul, não é raro encontrar cães em contato com as carcaças destes animais. Além disso, estes animais despertam a curiosidade de banhistas e habitantes do litoral que também podem se aproximar dos lobos-marinhos (CECLIMAR, 2015). Vírus cuja transmissão já foi reportada entre animais selvagens, de criação ou domésticos (GELBERT *et al.*, 1982; ALLISON *et al.*, 2012, 2013) foram identificados neste estudo, como parvovírus, calicivírus e hepevírus. Um caso histórico de transmissão inter-espécie ocorreu com o vírus de leões-marinhos de San Miguel - um calicivírus que infecta pinípedes. Este vírus é muito similar ao vírus do exantema vesicular de suínos,

que está erradicado desde 1956. Todavia, mesmo após a erradicação, suínos alimentados com restos de carcaças de pinípedes apresentaram os mesmos sinais clínicos do vírus extinto, uma vez que as carcaças estavam contaminadas com o vírus de San Miguel (GELBERT *et al.*, 1982).

Picornavírus, anelovírus e parvovírus foram detectados nas duas espécies de lobos-marinhos examinadas, e também em outras espécies de pinípedes do hemisfério norte (KAPOOR *et al.*, 2008; NG *et al.*, 2009, 2011; LI *et al.*, 2011a), indicando uma distribuição global de certas famílias de vírus em pinípedes. Neste estudo, rotavírus e sapovírus foram somente encontrados no lobo-marinho-subantártico, enquanto picobirnavírus e hepevírus-*like* foram detectados apenas no lobo-marinho-sul-americano. Os vírus detectados neste estudo representam espécies diferentes das que até então já foram encontradas em pinípedes. A única exceção trata-se do Sapovírus de leão-marinho da Califórnia tipo 1, que foi detectado no lobo-marinho-subantártico (LI *et al.*, 2011a). Um resultado interessante que mostra a circulação da mesma espécie de vírus em diferentes gêneros de pinípedes que por sua vez são de hemisférios diferentes e não entram em contato entre si.

O viroma de cada espécie analisada neste estudo pode ter sido influenciado por fatores como idade e dieta de cada animal (MINOT *et al.*, 2011; SACHSENRODER *et al.*, 2014). Com exceção de um espécime adulto, todos os demais lobos-marinhos utilizados neste estudo foram classificados como juvenis, que podem ser mais susceptíveis a infecções virais em relação aos indivíduos adultos. Além disso, vírus de insetos e crustáceos foram

encontrados em ambas as espécies de lobos-marinhos, o que pode refletir a dieta destes animais.

Embora as seqüências deste estudo não representem genomas completos, esta caracterização inicial permitiu identificar potenciais novas espécies de vírus e gêneros. Estes resultados contribuem para um maior entendimento de como infecções virais podem afetar as populações de lobos-marinhos e que riscos podem representar para a transmissão de doenças a outras espécies de animais.

6. CONCLUSÕES

As plataformas de seqüenciamento utilizadas foram capazes de detectar famílias virais de eucariotos, sendo que a maioria das famílias detectadas foram seqüenciadas por ambas.

Uma maior diversidade de seqüências foi obtida através do seqüenciamento do Ion Torrent, enquanto o seqüenciamento da plataforma Illumina apresentou scores mais elevados de qualidade.

Os *contigs* obtidos a partir da plataforma Ion Torrent tiveram, em média, um tamanho menor em relação aos *contigs* provenientes da plataforma Illumina.

Uma parte considerável dos *contigs* gerados deste estudo não apresentou similaridade com os bancos de dados de proteínas do NCBI disponíveis até o momento.

O viroma das duas espécies de lobos-marinhos analisadas (*A. australis* e *A. tropicalis*) foi predominado por bacteriófagos.

Vírus de eucariotos que infectam mamíferos das famílias *Anelloviridae*, *Parvoviridae*, *Picornaviridae*, *Picobirnaviridae*, *Reoviridae*, *Caliciviridae*, *Hepeviridae* foram encontrados em lobos-marinhos.

Anelovírus, parvovírus e um picornavírus semelhante ao HAV e AEV foram encontrados nas duas espécies de lobos-marinhos.

Rotavírus provavelmente pertencente ao grupo C, um novo membro do gênero *Sakobuvirus* e Sapovírus de leão-marinho da Califórnia tipo 1 foram detectados na espécie *A. tropicalis*.

Uma provável nova espécie de picobirnavírus e um vírus semelhante aos hepevírus foram encontrados na espécie *A. australis*.

7. REFERÊNCIAS

ALLANDER, T. et al. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 102, n. 36, p. 12891–12896. 2005.

ADAMS, M.J. et al. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses. **Archives of Virology**, v. 158, p. 2023–2030. 2013.

ALLISON, A. B., et al. Role of multiple hosts in the cross-species transmission and emergence of a pandemic parvovirus. **Journal of Virology**, v. 86, p. 865–872. 2012.

ALLISON, A. B., et al. Frequent cross-species transmission of parvoviruses among diverse carnivore hosts. **Journal of Virology**, v. 87, p. 2342–2347. 2013.

AMBROSE, H. E. & CLEWLEY, J. P. Virus discovery by sequence-independent genome amplification. **Reviews in Medical Virology**, v. 16, n. 6, p. 365–383. 2006.

ANGLY, F. et al. PHACCS, an online tool for estimating the structure and diversity of uncultured viral communities using metagenomic information. **BMC Bioinformatics**, v. 2, p. 6–41. 2005.

ARBIZA, J. et al. Uruguayan pinnipeds (*Arctocephalus australis* and *Otaria flavescens*): evidence of Influenza virus and *Mycobacterium pinnipedii* infections. **New Approaches to the Study of Marine Mammals**, c. 7, p. 151–182. 2012.

ATTOUI, H. et al. **Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**: Reoviridae. Elsevier: San Diego, CA, 2011, p. 541–637.

BALAYAN, M. S. Natural hosts of hepatitis A virus. **Vaccine**, v. 10, p. 27–31. 1992.

BANKEVICH, A., et al. SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. **Journal of Computational Biology**, v. 19, p. 455–477. 2012.

BATTS, W., et al. A novel member of the family Hepeviridae from cutthroat trout (*Oncorhynchus clarkii*). **Virus Research**, v. 158, p. 116–123. 2011.

BERGH, O. et al. High abundance of viruses found in aquatic environments. **Nature**, v. 10, n. 340(6233), p. 467-468. 1989.

BREITBART, M. et al. Metagenomic analyses of an uncultured viral community from human feces. **Journal of Bacteriology**, v. 185. p. 6220-6223. 2003.

BESTER, M. N. **Status, biology, and ecology of fur seals: Subantarctic fur seal, *Arctocephalus tropicalis*, at Gough Island (Tristan da Cunha Group). Proceedings of an International Symposium and Workshop, Cambridge, England, 23–27 April 1984. NOAA Tech Rep NMFS, v. 51, 1987, p. 57-60.**

BHATTACHARYA, R. et al. Detection of Genogroup I and II human picobirnaviruses showing small genomic RNA profile causing acute watery diarrhoea among children in Kolkata, India. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 7, p. 229–38. 2007.

BIAGINI, P. et al. **Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses: Anneloviridae.** Elsevier: San Diego, CA, 2011, p. 326-341.

BIHL, F. & NEGRO, F. Hepatitis E virus: A zoonosis adapting to humans. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, p. 817–821. 2010.

BODEWES, R. et al. Viral metagenomic analysis of feces of wild small carnivores. **Virology Journal**, v. 11, p. 89. 2014.

BODEWES, R. et al. 2015. Identification of DNA sequences that imply a novel gammaherpesvirus in seals. **Journal of General Virology**, v. 96, n. 5, p. 1109-1114. 2015.

van den BRAND, J. M. et al. Metagenomic Analysis of the Viral Flora of Pine Marten and European Badger Feces. **Journal of Virology**, v. 86, p. 2360–2365. 2012.

BREITBART, M. e ROHWER, F. Here a virus, there a virus, everywhere the same virus? **Trends in Microbiology**, v. 13, n. 6, p. 278-284. 2005.

de BRUYN, P. J. N. et al. Mass mortality of adult male subantarctic fur seals: Are alien mice the culprits? **PLoS One**, v. 3. 2008.

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

BZHALAVA, D. & DILLNER, J. Bioinformatics for Viral Metagenomics. **Journal of Data Mining in Genomics & Proteomics**, v. 4:134, d. 2013.

CAPRIOLI, A. et al. Enteropathogens associated with childhood diarrhea in Italy. **Pediatric Infectious Disease**, v. 15, n. 10, p. 876-883. 1996.

CARRUYO-NUÑEZ, G. M. et al. Porcine picobirnavirus infection in venezuelan farms. **Revista Científica**, v. 2, p. 125-131. 2014.

CECLIMAR. **Pinípedes**. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/ceclimar/ceram/fauna-marinha-e-costeira/lobo-marinho>>. Acesso em 20 de junho de 2015.

CHEN, K. & PACHTER, L. Bioinformatics for whole-genome shotgun sequencing of microbial communities. **PLoS Computational Biology**, v. 1, n. 2, p. 106-112. 2005.

CHIBA, S. et al. Sapporo Virus: History and Recent Findings. **Journal of Infectious Diseases**, v. 181, p. S303-S308. 2000.

CHEN, S. et al. Performance comparison between rapid sequencing platforms for ultra-low coverage sequencing strategy. **PLoS One**, v. 9, p. e92192. 2014.

CLARKE, I. N. et al. **Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses: Caliciviridae**. Elsevier: San Diego, CA, 2011, p. 977–986.

COCHLAN W. P. et al. Spatial distribution of viruses, bacteria, and chlorophyll a in neritic, oceanic, and estuarine environments. **Marine Ecology Progress Series**, v. 92, p. 77–87. 1993.

COMPEAU, P. E. C., et al. How to apply de Bruijn graphs to genome assembly. **Nature Biotechnology**, v. 29, p. 987–991. 2011.

CORIA-GALINDO, E. et al. Rotavirus infections in Galapagos sea lions. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 45, p. 722–728. 2009.

COTMORE S. F. et al. The family Parvoviridae. **Archives of Virology**, v. 159, p. 1239-1247. 2014.

DELMAS, B. **Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses: Picobirnaviridae**. Elsevier: San Diego, CA, 2011, p. 535-539.

DIERAUF, L. & GULLAND, F. M. D. **CRC Handbook of Marine Mammal Medicine: Health, Disease, and Rehabilitation**. Boca Raton: CRC Press, 2001. 1120 p.

DONALDSON, E. F. et al. Metagenomic analysis of the viromes of three North American bat species: viral diversity among different bat species that share a common habitat. **Journal of Virology**, v. 84, n. 24, p. 13004–13018. 2010.

ESONA, M. D., et al. Prevalence of group C rotavirus among children in Rhode Island, United States. **Journal of Clinical Virology**, v. 42, p. 221–224. 2008.

FAHSBENDER, E., et al. Development of a serological assay for the sea lion (*Zalophus californianus*) anellovirus, ZcAV. **Scientific Reports**, v. 5, p. 9637. 2015.

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

GABBAY, Y. B., et al. An outbreak of group C rotavirus gastroenteritis among children attending a day-care centre in Belém, Brazil. **Journal of Diarrhoeal Diseases and Research**, v. 17, p. 69–74. 1999.

GANESH, B. et al. Animal Picobirnavirus. **Virus disease**, v. 25, p. 223–238. 2014.

GELBERG, H. B., et al. Vesicular exanthema of swine and San Miguel Sea Lion Virus: experimental and field studies in otarid seals, feeding trials in swine. **Veterinary Pathology**, v. 19, p. 413–423. 1982.

GIORDANO, M. O. et al. Two instances of large genome profile picobirnavirus occurrence in Argentinian infants with diarrhea over a 26-year period (1977-2002). **Journal of Infection**, v. 56, p. 371–375. 2008.

GOLDSTEIN, T. et al. Isolation of a novel adenovirus from California sea lions *Zalophus californianus*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 9, n. 94(3), p. 243-248. 2011.

GOTELLI, N. J. & COLWELL, R. K. Quantifying biodiversity: Procedures and pitfalls in the measurement and comparison of species richness. **Ecology Letters**, v. 4, p. 379–391. 2001.

HANDELSMAN, J. et al. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. **Chemistry & Biology**, v. 5, p. R245-R249. 1998.

HANDELSMAN, J. Metagenomics: Application of Genomics to Uncultured Microorganisms. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 68, p. 4669-4685. 2004.

HAQSHENAS, G., et al. Genetic identification and characterization of a novel virus related to human hepatitis E virus from chickens with hepatitis-splenomegaly syndrome in the United States. **Journal of General Virology**, v. 82, p. 2449–2462. 2001.

HE, B., et al. Virome profiling of bats from myanmar by metagenomic analysis of tissue samples reveals more novel mammalian viruses. **PLoS One**, v. 8. 2013.

HOELZER, K. & PARRISH, C. R. The emergence of parvoviruses of carnivores. **Veterinary Research**, v. 41. 2010.

HURWITZ, B. L. & SULLIVAN, M. B. The Pacific Ocean virome (POV): a marine viral metagenomic dataset and associated protein clusters for quantitative viral ecology. **PLoS One**, v.8, n. 2, p. e57355. 2013.

IKEDA, Y. et al. Feline host range of Canine parvovirus: Recent emergence of new antigenic types in cats. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, p. 341–346. 2002.

ILLUMINA – Paired-end sequencing. Disponível em: <http://www.illumina.com/technology/next-generation-sequencing/paired-end-sequencing_assay.html> Acesso em: 20 de junho de 2015.

JIAO, N. et al. Natural and anthropogenic forcing on the dynamics of viroplankton in the Yangtze river estuary. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 86, p. 543-550. 2006.

KAPOOR, A., et al. A highly divergent picornavirus in a marine mammal. **Journal of Virology**, v. 82, p. 311–320. 2008.

KARLSSON, O. E. et al. The effect of preprocessing by sequence-independent, single-primer amplification (SISPA) on metagenomic detection of viruses. **Biosecurity and bioterrorism : biodefense strategy, practice, and science**, v. 11, n. 1, p. S227-234. 2013.

KATZ, H. et al. Pathological and Parasitological Findings in South American Fur Seal Pups (*Arctocephalus australis*) in Uruguay. **ISRN Zoology**, v. 2012, p. 1–7. 2012.

KERLEY, G.I. H. **Status, biology and ecology of fur seals: Arctocephalus tropicalis** on the Prince Edward Islands. Proceedings of an International Symposium and Workshop, Cambridge, England 23—27 April 1984. NOAA Tech Rep NMFS, v. 51. 1987, p. 61-64.

KHAMRIN, P. et al. Epidemiology of human and animal kobuviruses. **Virus Disease**, v. 25, p. 195-200. 2014.

KIM, Y., et al. Characterization of group C rotaviruses associated with diarrhea outbreaks in feeder pigs. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 1484–1488. 1999.

KIM, K. H., et al. Amplification of Uncultured Single-Stranded DNA Viruses from Rice Paddy Soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v.74, n. 19, p. 5975–5985. 2008.

KNOWLES N. J. et al. **Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses: Picornaviridae**. Elsevier: San Diego, CA, 2011, p. 855–880.

KUNIN, V. et al. A bioinformatician's guide to metagenomics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 72, n. 4, p. 557-578. 2008.

LECUIT, M. & ELOIT, M. The human virome: new tools and concepts. **Trends in Microbiology**, v. 21, n. 10, p. 510-515. 2013.

LI, L. et al. The fecal viral flora of california sea lions. **Journal of Virology**, v. 85, p. 9909–9917. 2011a.

LI, L. et al. Viruses in diarrhoeic dogs include novel kobuviruses and sapoviruses. **Journal of General Virology**, v. 92, p. 2534–2541. 2011b.

LIFE TECHNOLOGIES. Ion Torrent. Disponível em: <<http://www.lifetechnologies.com/br/en/home/brands/ion-torrent.html>> Acesso em: 20 de junho de 2015.

LOGARES, R. et al. Environmental microbiology through the lens of high-throughput DNA sequencing: synopsis of current platforms and bioinformatics approaches. **Journal of Microbiology Methods**, v. 91, n. 1, p. 106-113. 2012.

LOMAN, N. J. et al. Performance comparison of benchtop high-throughput sequencing platforms. **Nature Biotechnology**, v. 30, p. 434–439. 2012.

MALIK, Y. S. et al. Epidemiology, phylogeny, and evolution of emerging enteric picobirnaviruses of animal origin and their relationship to human strains. **Hindawi Publishing Corporation**. 2014.

MARTÍNEZ-GUINÓ L. et al. Evidence of Torque teno virus (TTV) vertical transmission in swine. **Theriogenology**, v. 71, p. 1390-1395. 2009.

MARVIL, P. et al. Avian encephalomyelitis virus is a picornavirus and is most closely related to hepatitis A virus. **Journal of General Virology**, v. 80, p. 653–662. 1999.

MATTHIJNSSENS, J. et al. VP6-sequence-based cutoff values as a criterion for rotavirus species demarcation. **Archives Virology**, v. 157, p. 1177–1182. 2012.

MAWATARI, T., et al. Detection of a bovine group C rotavirus from adult cows with diarrhea and reduced milk production. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 66, p. 887–890. 2004.

MENG, X. J. Recent advances in Hepatitis E virus. **Journal of Viral Hepatitis**, v. 17, p. 153–61. 2010.

MIDTHUN, K. & KAPIKIAN, A. Z. Rotavirus vaccines: an overview. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 9, n. 3, p. 423–434. 1996.

MINOT, S. et al. The human gut virome: inter-individual variation and dynamic response to diet. **Genome Research**, v. 21, n. 10. p. 1616-1625. 2011.

MOKILI, J. L. et al. Metagenomics and future perspectives in virus discovery. **Current Opinion in Virology**, v. 2, n. 1, p. 63-77. 2012.

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

NG, T. F. F. et al. Novel anellovirus discovered from a mortality event of captive California sea lions. **Journal of General Virology**, v. 90, p. 1256–1261. 2009.

NG, T. F. F. et al. Metagenomic identification of a novel anellovirus in Pacific harbor seal (*Phoca vitulina richardsii*) lung samples and its detection in samples from multiple years. **Journal of General Virology**, v. 92, p. 1318–1323. 2011.

NG, T. F. F., et al. High Variety of Known and New RNA and DNA Viruses of Diverse Origins in Untreated Sewage. **Journal of Virology**, v. 86, p. 12161–12175. 2012.

NG, T. F. F. et al. Feline fecal virome reveals novel and prevalent enteric viruses. **Veterinary Microbiology**, v. 171, p. 102–111. 2014.

NISHIZAWA, T. et al. A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology. **Biochemistry and Biophysics Research Community**, v. 241, p. 92–97. 1997.

OKAMOTO, H. History of discoveries and pathogenicity of TT viruses. **Current Topics on Microbiology and Immunology**, v. 331, p. 1–20. 2009.

OLIVEIRA, L. R. Caracterização dos padrões de ocorrência dos pinípedes (Carnivora: Pinnipedia) ocorrentes no Litoral do Rio Grande do Sul, Brasil, entre

1993 e 1999. **Dissertação de Mestrado em Biociências (Zoologia)**. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Porto Alegre, Brasil. 1999. 154p.

OLIVEIRA, A., et al. Occurrence of pinnipeds in Santa Catarina between 2000 and 2010. **Latin American Journal of Aquatic Mammals**, v. 9, p. 145-149. 2011.

OTTO, P. H. et al. Detection of avian rotaviruses of groups A, D, F and G in diseased chickens and turkeys from Europe and Bangladesh. **Veterinary Microbiology**, v. 156, p. 8-15. 2012

PICORNAVIRUSES – The Picornaviridae family. Disponível em: <<http://www.picornaviridae.com/>> Acesso em: 20 de junho de 2015.

PEREIRA, H.G. et al. A virus with a bisegmented double-stranded RNA genome in rat (*Oryzomys nigripes*) intestines. **Journal of General Virology**, v. 69, p. 2749-2754. 1988.

PHAN, T. G. et al. Sesavirus: prototype of a new parvovirus genus in feces of a sea lion. **Virus Genes**, v. 50, p.134–136. 2014.

PHRAP – Phred: Quality base calling. Disponível em: <<http://www.phrap.com/phred/>> Acesso em: 20 de junho de 2015.

PINEDO, M. C. Ocorrência de pinípedes na costa brasileira. **Gracia de Orla Série Zoologia**, v. 15, p. 37-48. 1990.

POPGEORGIEV, N. et al. Describing the silent human virome with an emphasis on giant viruses. **Intervirolgy**, v. 56, n. 6. p. 395-412. 2013.

PROCTOR, L. M. & FUHRMAN, J. D. Viral mortality of marine bacteria and cyanobacteria. **Nature**, v. 343, p. 60 – 62. 1990.

QUAIL, M. et al. A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion torrent, pacific biosciences and illumina MiSeq sequencers. **BMC Genomics**, v. 13, n. 1. 2012.

REYES, G. R. & KIM, J. P. Sequence-independent, single-primer amplification (SISPA) of complex DNA populations. **Molecular and Cellular Probes**, v. 5, n. 6, p. 473-481. 1991.

RIESENFELD, C.S. et al. Metagenomics: Genomic analysis of microbial communities. **Annual Review of Genetics**, v. 38, p. 525–552. 2004.

ROHWER, F. & EDWARDS, R. The Phage Proteomic Tree: a genome-based taxonomy for phage. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 16, p. 4529-4535. 2002.

ROUX, S. et al. Metavir 2: new tools for viral metagenome comparison and assembled virome analysis. **BMC Bioinformatics**, v. 15, n. 76. 2014.

SACHSENROEDER, J. et al. The general composition of the faecal virome of pigs depends on age, but not on feeding with a probiotic bacterium. **PLoS One.**, v. 9, n. 2 p. e88888. 2014.

SEAL CONSERVATION SOCIETY. **Subantarctic Fur Seal**. Disponível em: < <http://www.pinnipeds.org/seal-information/species-information-pages/sea-lions-and-fur-seals/subantarctic-fur-seal> > Acesso em 20 de junho de 2015.

SEDGHIZADEH, P. P. et al. Metagenomic investigation of microbes and viruses in patients with jaw osteonecrosis associated with bisphosphonate therapy. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology**, v. 114, n. 6, p. 764–770. 2012.

SCHLOSS, P. D. & HANDELSMAN, J. Biotechnological prospects from metagenomics. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, n. 3, p. 303-310. 2003.

SCHOLZ, M. B. et al. Next generation sequencing and bioinformatic bottlenecks: the current state of metagenomic data analysis. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, n. 1, p. 9-15. 2012.

SHAN, T. et al. Picornavirus Salivirus/Klassevirus in Children with Diarrhea, China. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, p. 1303–1305. 2010.

SHAN, T. et al. The fecal virome of pigs on a high-density farm. **Journal of Virology**, v. 85, n. 22, p.11697-11708. 2011.

SIMÕES-LOPES, P. C. et al. Nota sobre os Otariidae e Phocidae (Mammalia: Carnivora) da costa norte do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, Brasil. **Biociências**, v. 3, n,1, p.173-181. 1995.

SINGH J. et al. Metagenomics: Concept, methodology, ecological inference and recent advances. **Biotechnology Journal**, v. 4, n. 4, p. 480-494. 2009.

SIKORSKI, A., et al. Identification of a Novel Circular DNA Virus in New Zealand Fur Seal (*Arctocephalus forsteri*) Fecal Matter. **Genome Announcements**, v. 1, p. 2012–2013. 2013.

SMITH, A. W. et al. San Miguel sea lion virus isolation, preliminary characterization and relationship to vesicular exanthema of swine virus. **Nature**, v. 244, p. 108–10. 1973.

SMITH, D. B. et al. Consensus proposals for classification of the family *Hepeviridae*. **Journal of General Virology**, v. 5, n. 10, p. 2223–2232. 2014

SOMA, T. et al. Detection of Norovirus and Sapovirus from diarrheic dogs and cats in Japan. **Microbiology and Immunology**, v. 59, p. 123–128. 2015.

SRINIVASIAH, S. et al. Direct Assessment of Viral Diversity in Soils by Random PCR Amplification of Polymorphic DNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n.18, p. 5450–5457. 2013.

STANG, A. et al. Characterization of virus isolates by particle-associated nucleic acid PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 716–720. 2005.

STEIN, J. L. et al. Characterization of uncultivated prokaryotes: isolation and analysis of a 40-kilobase-pair genome fragment from a planktonic marine archaeon. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n. 3, p. 591–599. 1996.

STEINEL, A. et al. Parvovirus infections in wild carnivores. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 37, p. 594–607. 2001.

SUTTLE, C. A. The significance of viruses to mortality in aquatic microbial communities. **Microbial Ecology**, v. 28, n. 2, p. 237-243. 1994.

TIJSSEN, P. et al. **Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**: Parvoviridae. Elsevier: San Diego, CA, 2011, p. 405-425.

VAZ-FERREIRA, R. **Mammals in the seas**: *Arctocephalus australis* (Zimmermann), South American fur seal. FAO Fish Ser., Rome, 1982, p. 497-508.

VÁZQUEZ-CASTELLANOS, et al. Comparison of different assembly and annotation tools on analysis of simulated viral metagenomic communities in the gut. **BMC Genomics**, v. 15, n. 37. 2014.

VIRAL ZONE – Swiss Institute of Bioinformatics. Disponível em: < <http://viralzone.expasy.org/> > Acesso em 20 de junho de 2015.

WALTZEK, T. B. et al. Marine mammal zoonoses: a review of disease manifestations. **Zoonoses Public Health**, v. 59, p. 521–535. 2012.

WANG, Q. H. et al. Prevalence of noroviruses and sapoviruses in swine of various ages determined by reverse transcription-PCR and microwell hybridization assays. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p. 2057–2062. 2006.

WHITMAN, W. B. et al. Prokaryotes: The unseen majority. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 95, p. 6578–6583. 1998.

WILLIAMSON S. J. et al. Metagenomic exploration of viruses throughout the Indian Ocean. **PLoS One**, v. 7, n. 10, p. e42047. 2012.

WILSON, D. E. & REEDER, D. M. **Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference**. Baltimore: JHU Press, 2005. 2000 p.
WOESE, C. R. Bacterial evolution. **Microbiological Reviews**, v. 51, n. 2, p. 221-271. 1987.

WOMMACK, K. E. & COLWELL, R. R. Virioplankton: Viruses in aquatic ecosystems. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, p. 69–114. 2000.

WOMMACK, K. E. et al. VIROME: a standard operating procedure for analysis of viral metagenome sequences. **Standards in Genomic Sciences**, v. 6, n. 3, p. 427–439. 2012.

WOO, P. C. Y. et al. Complete Genome Sequence of a Novel Picobirnavirus, Otarine Picobirnavirus, Discovered in California Sea Lions. **Journal of Virology**, v. 86, p. 6377–6378. 2012.

WOO, P. C. Y., et al. Metagenomic analysis of viromes of dromedary camel fecal samples reveals large number and high diversity of circoviruses and picobirnaviruses. **Virology**, v. 473, p. 117–125. 2014.

WOOLEY, J. C., et al. A primer on metagenomics. **PLoS Computational Biology**, v. 6. 2010.

WU, Z., et al. Virome Analysis for identification of novel mammalian viruses in bat species from Chinese provinces. **Journal of Virology**, v. 86, p. 10999–11012. 2012.

ZHANG, W., et al. Faecal virome of cats in an animal shelter. **Journal of General Virology**, v. 95, p. 2553–2564. 2014.

8 ANEXOS

Artigo submetido à revista *Journal of General Virology*.

1 **Title:** Metagenomic analysis of the fecal viromes of Subantarctic and South American
2 fur seals

3 **Running title:** Fecal viromes of fur seals

4

5 Mariana Kluge¹, Fabrício S. Campos¹, Maurício Tavares², Derek B. de Amorim²,
6 Fernanda P. Valdez³, Adriana Giongo⁴, Paulo M. Roehe¹, Ana C. Franco^{1*}.

7 ¹ UFRGS (Federal University of Rio Grande do Sul) - Virology Laboratory, Department
8 of Microbiology, Immunology and Parasitology, 500 Sarmiento Leite St., 90050170,
9 Institute of Basic Health Sciences building, room 305, Porto Alegre, RS, Brazil.

10 ² CECLIMAR (Center for Coastal, Limnology and Marine Studies), UFRGS (Federal
11 University of Rio Grande do Sul), 976 Tramandaí Av., 95625000, Imbé, RS, Brazil.

12 ³ PUCRS (Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul), Genomic and Molecular
13 Biology Laboratory, 6681 Ipiranga Av., 90619900, building 12C, Porto Alegre, RS,
14 Brazil.

15 ⁴ PUCRS (Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul), IPR (Institute of
16 Petroleum and Natural Resources), 6681 Ipiranga Av., 90619900, building 96J, Porto
17 Alegre, RS, Brazil.

18

19 *corresponding author

20 Tel/Fax – 55 51 3308 3655

21 E-mail – anafranco.ufrgs@gmail.com

22

23 **Keywords:** fecal virome, fur seals, metagenomics

24 **Subject category:** Animal RNA and DNA viruses

25 **Word count summary:** 229

26 **Word count text:** 4978

27 **No. of figures:** 7

28 **No. of tables:** 1

29

30 **The GenBank accession numbers for the sequences derived in this study are:**
31 KR261062, KR261063, KR261065, KR816222, KR816223 (fur seal anelloviruses);
32 KR261066-KR261068, KR261070-KR261075, KR261077-KR261079, KR816217,
33 KR816218, KR816220, KR816221 (fur seal parvoviruses); KR106199-KR106202,
34 KR816213, KR816215, KR337994 (fur seal picornaviruses); KR072975-KR072979,

35 KR072981, KR072982, KR072984 (fur seal sakobuvirus); KR106194-KR106196,
36 KR106198, KR816216 (fur seal picobirnavirus); KR072985-KR072990 (fur seal
37 rotavirus), KR827461 (fur seal hepevirus); KR072991, KR072992, KR072994,
38 KR072995 (fur seal sapovirus).

39

40

41

42

43

44

45

46

47

48

49

50

51

52

53

54

55

56

57

58

59

60

61

62

63

64

65 **SUMMARY (ABSTRACT)**

66 The Brazilian South coast seasonally hosts numerous marine species, including fur
67 seals, observed particularly during winter months. Some animals are found dead or
68 weakened along the shore and can harbor in their microbiota potential pathogens. In
69 the present study, a metagenomic approach was performed to characterize the fecal
70 virome of fur seals found deceased along the coast of the state of Rio Grande do Sul.
71 Two fur seal species were examined: the South American fur seal (*Arctocephalus*
72 *australis*) and the Subantarctic fur seal (*Arctocephalus tropicalis*). Fecal samples from
73 10 specimens (*A. australis*, n= 5; *A. tropicalis*, n=5) were collected and viral particles
74 were purified, extracted and amplified with a random PCR. The products were
75 sequenced through Ion Torrent and Illumina platforms and assembled reads were
76 submitted to BLASTx searches. Both viromes were dominated by bacteriophages. A
77 number of potentially novel virus genomes were identified in both species. Sequences
78 of picobirnaviruses, picornaviruses and a hepatitis E like virus were identified in *A.*
79 *australis*. A rotavirus closely related to group C and a novel member of the *Sakobuvirus*
80 were found in *A. tropicalis*. In addition, *California sea lion sapovirus 1* and sequences
81 of putative members of the *Anellovirus* and *Parvovirus* genera were detected in both
82 species of fur seals. These findings shall contribute to a better understanding of the
83 complexity of the virome present in the intestinal microbiota of fur seals.

84

85

86

87

88

89

90

91

92

93

94

95

96

97 **INTRODUCTION**

98 Every year, hundreds of marine species arrive at the coast of Rio Grande do Sul, the
99 southernmost state in Brazil. Among these species, which include birds, turtles and
100 mammals, fur seals are regular visitors that can be observed near or on-shore. These
101 animals tend to come to this region particularly during winter months, driven by the
102 Malvinas current (Ferreira *et al.*, 2008; Moura & Siciliano, 2007; Pinedo, 1990).
103 Although some fur seals may reach the coast to rest, several are found dead or
104 debilitated along the shore. While natural selection processes play an important role on
105 those animals, the cause of their weakness or death cannot always be determined
106 (Oliveira *et al.*, 2011; Simões-Lopes, *et al.*, 1995). Only few studies regarding the
107 identification of pathogens that infect these populations and their roles as etiological
108 agents of diseases and as potential zoonotic agents have been conducted, especially
109 those concerned with viruses (Arbiza *et al.*, 2012; de Bruyn *et al.*, 2008; Katz *et al.*,
110 2012; Sikorski *et al.*, 2013; Waltzek *et al.*, 2012).

111 The virome of marine mammals has already been investigated (Li *et al.*, 2011a);
112 however, these studies have been restricted to species native to the northern
113 hemisphere. Little is known about the viruses that infect marine mammals limited to the
114 southern hemisphere and the effects of this geographical difference. Here, we
115 evaluated the viral diversity of two pinnipeds from the Otariidae family from the
116 southern hemisphere: the South American fur seal (*Arctocephalus australis*) and the
117 Subantarctic fur seal (*Arctocephalus tropicalis*). While the South American fur seal is
118 found along the Pacific and Atlantic coast of South America, the Subantarctic fur seal
119 has a broader range that extends from the South Atlantic to Indian ocean islands. The
120 South American fur seal is more frequently sighted in Rio Grande do Sul coast, mostly
121 juveniles, due to the proximity of its closest breeding colony, located in the neighboring
122 country of Uruguay. By contrast, the closest Subantarctic fur seals colonies are located
123 at more than 4,000 km away at the south Atlantic islands of Gough and Tristan da
124 Cunha (Pinedo, 1990; Vaz-Ferreira, 1982). Juveniles and adults specimens of
125 Subantarctic fur seals reach the Atlantic coast with the help of ocean currents, and it is
126 known that juveniles do not stay in the colonies during breeding seasons, while adults
127 can travel long distances after mating (Ferreira *et al.*, 2008; Riedman, 1990).

128 In order to identify the viruses that circulate among these distinct fur seal populations,
129 the aim of this study was to examine the fecal virome of two species of fur seals whose
130 cadavers were found along the shore of Rio Grande do Sul state.

131

132 RESULTS

133 Virome overview

134 A substantial proportion of the assembled reads detected in both fur seals species
135 have no significant similarity to any of the sequences deposited to date at GenBank.
136 About 70% of the assembled reads from the Ion Torrent platform had no significant
137 hits, whereas in Illumina NGS apparatus the sequences with no identified matches
138 reached 35%. The same divergence was observed with the number of bacterial hits,
139 however, Ion Torrent had the lowest number of hits (about 25%) when compared to
140 Illumina (about 60%).

141 The viral component detected in either of the sequencing platforms represented 4-5%
142 of total sequences, regardless of the fur seal species analyzed. Most of the viral hits
143 were from bacteriophages, in agreement with previous studies of bats and dromedary
144 fecal viromes (He *et al.*, 2013; Woo *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2012). Some of the contigs
145 from eukaryotic viruses displayed low similarity to currently known viruses and, as
146 such, may represent novel viruses. The Subantarctic fur seal was found to carry a
147 larger proportion of identifiable sequences of eukaryotic viruses (95 hits, corresponding
148 to 33% of total assembled reads assigned to viruses) when compared to the South
149 American fur seal (53 hits, corresponding to 11% of total assembled reads assigned to
150 viruses). The proportional taxonomic composition of the assembled reads is shown in
151 Fig. 2.

152 South American Fur Seal (*Arctocephalus australis*)

153 Ion Torrent sequencing generated a total of 475,511 reads with an average length of
154 191 bp which were trimmed to a final number of 282,732 reads. MetaVelvet *de novo*
155 assembly of trimmed reads resulted in 10,801 contigs (>100 bp). Illumina sequencing
156 generated a total of 496,016 paired-end reads (average length of 149 bp) which were
157 trimmed for primers and assembled *de novo* with St. Petersburg genome assembler
158 (SPAdes) into 2,053 contigs (>100 bp). BLASTx results from the Ion Torrent contigs
159 revealed sequences with similarity to the eukaryotic virus families *Parvoviridae* (11
160 contigs), *Anelloviridae* (5), *Picornaviridae* (10), *Picobirnaviridae* (5) and *Nimaviridae*
161 (1). Illumina contigs displayed similarity to genomes of members of the families
162 *Parvoviridae* (3), *Anelloviridae* (3), *Picornaviridae* (5), *Picobirnaviridae* (3) and
163 *Hepeviridae* (1), among other viruses that infect fish, small invertebrates and insects
164 (7). Contigs with significant BLASTx hits and their GenBank accession numbers are
165 shown in Table S1(a).

166 **Subantarctic Fur Seal (*Arctocephalus tropicalis*)**

167 Ion Torrent sequencing generated a total of 784,917 reads with an average length of
 168 184 bp which were trimmed into 288,611 reads. Trimmed reads were *de novo*
 169 assembled with MetaVelvet into 6,690 contigs (>100 bp). Illumina sequencing
 170 generated a total of 1,253,988 paired-end reads (average length of 144 bp) which were
 171 trimmed for primers and *de novo* assembled with SPAdes into 628 contigs (>100 bp).
 172 For Ion Torrent contigs, the eukaryotic virus families with significant similarity to results
 173 from BLASTx searches were *Parvoviridae* (24 contigs), *Anelloviridae* (2),
 174 *Picornaviridae* (19), *Reoviridae* (13), *Caliciviridae* (18), other insect viruses (2) and a
 175 circovirus-like hit (1). Illumina contigs had similarity with *Parvoviridae* (9), *Anelloviridae*
 176 (1), *Picornaviridae* (3), *Caliciviridae* (3) and *Reoviridae* (1). Contigs with significant
 177 BLASTx hits and their GenBank accession numbers are shown in Table S1(b).

178 **Anellovirus**

179 Anelloviruses are small, non-enveloped, circular ssDNA viruses belonging to the
 180 *Anelloviridae* family (Biagini *et al.*, 2011). Anellovirus genome sequences were
 181 detected in both fur seal species. Few sequences from the South American fur seal
 182 had the closest similarity to *Seal anellovirus 5*, with an amino acid identity ranging from
 183 35-45% and covering up to 65% of ORF1. Another sequence from the Subantarctic fur
 184 seal had the closest similarity to *Torque teno zalophus virus1* (TTZV), with 78% amino
 185 acid identity and covering 69% of ORF2 of TTZV. Both fur seal species had sequences
 186 with the closest similarity to *Torque teno sus virus 1a*, with an amino acid identity
 187 ranging from 84-88% and coverage of up to 56% of ORF1.

188 Due to the high divergence within anelloviruses, ORF1 sequences are the most
 189 indicated to phylogenetic analyses (Biagini *et al.*, 2011). Phylogenetic trees of partial
 190 ORF1 amino acid sequences obtained from South American fur seals showed that
 191 distinct anelloviruses grouped in different clusters: one most closely related to seal
 192 anelloviruses, whereas the other sequence was placed on the same clade as swine
 193 torque teno viruses (Fig. 3a).

194 **Parvovirus**

195 Parvoviruses are non-enveloped linear ssDNA viruses, members of the *Parvoviridae*
 196 family. In this study, both fur seals species had sequences more closely related to
 197 carnivore parvoviruses of the *Parvovirinae*, a subfamily that infects vertebrates and is
 198 currently divided into eight genera (Tijssen *et al.*, 2011). The amino acid identity of
 199 those sequences with members of the *Parvovirinae* ranged from 36-82%. Phylogenetic

200 analysis of partial NS1 sequences, conserved within parvoviruses, showed that the fur
201 seal parvovirus clustered with members of the *Protoparvovirus* genus, distant from
202 previously described pinniped parvoviruses (Fig. 3b).

203 **Picornavirus**

204 Picornaviruses are small, non-enveloped, positive sense ssRNA viruses of the
205 *Picornaviridae* family, which has, to date, 29 recognized genera, though often
206 increasing (Adams *et al.*, 2013; Knowles *et al.*, 2012; www.picornaviridae.com).
207 Picornavirus sequences more related to Hepatitis A (HAV) and Avian
208 encephalomyelitis viruses (AEV) were detected in both fur seal species examined. HAV
209 belongs to *Hepatovirus* and AEV to *Tremovirus*, which are closely related genera
210 (Marvil *et al.*, 1999). The sequences obtained here displayed between 32-39% of
211 amino acid identity to both *Hepatovirus* and *Tremovirus* members, and one sequence
212 shared 52% amino acid identity with HAV VP2. Phylogenetic analyses were based on
213 the picornavirus polyprotein functional regions: P1, which encodes for structural
214 proteins, and P2-P3, which encode for proteins involved in replication (Knowles *et al.*,
215 2011). The analysis of partial P1 sequences identified here showed the fur seal
216 picornavirus forming a monophyletic group with the *Hepatovirus* and *Tremovirus*
217 genera, but on a different branch (Fig. 4a). When partial sequences of P3 region were
218 analyzed they still shared the same root, with the fur seal picornavirus placed in a
219 similar way (Fig. 4b).

220 In addition to the above-mentioned picornaviruses, distinct members of this family were
221 found only in Subantarctic fur seals. With the exception of one sequence whose best
222 BLASTx hit had 52% of amino acid identity to a kobuvirus, all other contigs displayed
223 the highest amino acid identity to *Feline sakobuvirus A* (FSVA), which ranged from 58-
224 73% with a total coverage of 59% of its polyprotein. Phylogenetic analyses of partial P2
225 and P3 regions showed the fur seal picornavirus, temporarily named *Fur seal*
226 *sakobuvirus* (FSSV), clustered with FSVA, member of the *Sakobuvirus* genus (Fig. 4c
227 and Fig. 4d).

228 **Picobirnavirus**

229 Picobirnaviruses are small, non-enveloped, bisegmented dsRNA viruses of the
230 *Picobirnaviridae* family. These highly variable viruses are classified in a sole genus,
231 *Picobirnavirus*, which on its turn is divided into two genogroups (I and II), based on
232 sequence similarities of the RNA-dependent-RNA-polymerase gene (RdRp) (Delmas,
233 2011; Ganesh *et al.*, 2014). Sequences of picobirnavirus RdRps were detected in the

234 South American fur seal samples, having the highest similarity with members of
235 genogroup I, with an amino acid identity ranging from 35-82%. Phylogenetic analyses
236 of the partial RdRp gene (743 bp, which corresponds to 44% of the RdRp gene)
237 confirmed that the fur seal picobirnavirus identified here clustered with members of
238 genogroup I, with a nucleotide identity ranging from 60-68% (Fig. 5a).

239 **Rotavirus**

240 Rotaviruses are non-enveloped segmented dsRNA viruses from the *Reoviridae* family.
241 They belong to the *Rotavirus* genus and their genomes contain 11 segments. Based on
242 sequence and serological analyses of the structural protein VP6, there are seven
243 species, also known as groups, of rotaviruses (A-G), and recently a new group H has
244 been proposed (Matthijnssens *et al.*, 2012). Rotavirus sequences were detected in the
245 Subantarctic fur seal with an amino acid identity from 45-69% to group C rotaviruses.
246 The phylogenetic analysis, performed with a partial VP1 sequence, covering 30% of
247 the complete gene, confirmed closer relatedness to group C rotaviruses (Fig. 5b). The
248 VP1 gene, which encodes the RdRp, is well conserved within the genus and may be
249 also used for to differentiate rotavirus species (Attoui *et al.*, 2011; Ogden *et al.*, 2012).

250 **Hepevirus**

251 *Hepevirus* is the only genus of the *Hepeviridae* family, consisting of non-enveloped,
252 positive sense ssRNA viruses (Meng, 2010). In this study, a sequence of 661bp with
253 low amino acid identity (27%) to the polyprotein gene of hepeviruses was detected in
254 the South American fur seal. Phylogenetic analysis of partial sequences of the
255 polyprotein of hepeviruses and hepevirus-like viruses was performed (Fig. 6).

256 **Sapovirus**

257 The genus *Sapovirus* consists of non-enveloped, positive sense ssRNA viruses of the
258 *Caliciviridae* family. At present, five genogroups have been recognized based on VP1
259 sequence analyses (Clarke *et al.*, 2011). Sapovirus sequences were detected in the
260 Subantarctic fur seal samples and results include contigs covering over 90% of the
261 *California sea lion sapovirus 1* (CsISaV1) genome while sharing 98% nucleotide
262 sequence identity. Phylogenetic analysis of complete VP1 gene and nearly complete
263 VP2 are shown in Fig. 7(a) and Fig. 7(b).

264

265

266 **DISCUSSION**

267 This study has detected enteric viruses in the fecal samples of two species of fur seals
268 that occur in the coast of Rio Grande do Sul, South of Brazil. Such viruses are either
269 apathogenic or known to cause disease in mammals. Anelloviruses were detected in
270 both species of fur seals examined. Based on anelloviruses demarcation criteria, ORF1
271 sequences must have a divergence higher than 56 and 35% for genus and species,
272 respectively (Biagini *et al.*, 2011). The sequences with the highest similarity to seal
273 anelloviruses displayed a 60% divergence, suggesting that we found a new genus of
274 *Anelloviridae*. For the sequences with higher similarity to *Torque teno sus virus 1a*, the
275 divergence was of 36%, which may indicate a new species of the genus
276 *lotatorquevirus*. Anelloviruses, whose pathogenesis is still unknown, have been
277 associated to mortality events in seals and sea lions and virus-specific seroconversion
278 of seals has been demonstrated, suggesting that such animals are indeed susceptible
279 to a productive infection following natural contact with the virus (Fahsbender *et al.*,
280 2015; Li, *et al.*, 2011a; Ng *et al.*, 2009, 2011).

281 Parvovirus sequences were detected in the two species of fur seals. Members of a
282 same genus within the *Parvoviridae* should share at least 30% amino acid identity in
283 the predicted NS1 sequence, and less than 30% identity when compared to other
284 genera (Cotmore *et al.*, 2014). Although only partial sequences from NS1 were
285 detected in both species, all of them share more than 30% amino acid identity with
286 members of the *Protoparvovirus* genus, which was also shown by phylogenetic
287 analysis, suggesting a new species within the genus. Parvoviruses have been detected
288 in pinnipeds (Bodewes *et al.*, 2014; Burek, *et al.*, 2005), and members of different
289 genera, including bocaviruses, dependoviruses and a novel parvovirus named
290 *Sesavirus* have been detected in California sea lions (Li *et al.*, 2011a; Phan *et al.*,
291 2014). Parvoviruses cause infections that can manifest through a variety of illnesses
292 including leukopenia, myocarditis, gastroenteritis, as well as asymptotically, and
293 have been detected in healthy and debilitated pinnipeds (Burek, *et al.*, 2005; Hoelzer &
294 Parrish, 2010; Ikeda *et al.*, 2002; Phan *et al.*, 2014; Steinel *et al.*, 2001). Parvoviruses
295 are also known to be transmitted between wild and domestic species (Allison *et al.*,
296 2012, 2013).

297 Picornaviruses, which have been found in marine mammals (Kapoor *et al.*, 2008), have
298 also been detected in this study. Here, two distinct picornaviruses were detected: one
299 more similar to HAV and AEV and other similar to FSVA. According to the
300 *Picornaviridae* genus demarcation criteria, different genera should share less than

301 40%, 40% and 50% amino acid identity in P1, P2 and P3, respectively
302 (www.picornaviridae.com). Analyses of partial sequences of the polyprotein of the
303 picornavirus similar to HAV and AEV showed that the amino acids identities to
304 members of *Hepatovirus* and *Tremovirus* genera were below these cut-offs. The only
305 exception was one sequence that shared 52% amino acid identity with HAV VP2. A
306 higher identity in this region, however, can be expected within members of *Hepatovirus*
307 and *Tremovirus* according to previous studies (Marvil *et al.*, 1999). Based on these
308 values, a proposed novel picornavirus genus more closely related to HAV and AEV
309 was detected in both fur seal species.

310 In addition, a new putative species within the recently recognized genus *Sakobuvirus*
311 was identified in the Subantarctic fur seal, here named *Fur seal sakobuvirus* (FSSV).
312 These share an amino acid identity of at least 50% with *Feline sakobuvirus A* when
313 comparing all polyprotein coding regions, indicating that FSSV belongs to the same
314 genus. To date, FSSV was the sole member of the genus; the genome reported here
315 corresponds to the first description of a sakobuvirus in another animal species, which
316 was first found in cat feces (Ng *et al.*, 2014).

317 Other potential novel enteric virus was also identified. A genogroup I picobirnavirus
318 was detected in South American fur seals. This fur seal picobirnavirus is distinct from
319 the *Otarine picobirnavirus* previously found in California sea lions (Woo *et al.*, 2012)
320 and may represent a new species within the genus. Picobirnaviruses have been
321 detected both in asymptomatic and symptomatic animals, including humans, and an
322 etiologic association with diarrhea is not fully established. However, coinfections of
323 picobirnaviruses with other enteric viruses are not uncommon, can be opportunistic,
324 and may also have a synergistic effect (Bhattacharya *et al.*, 2007; Carruyo-Nuñez *et al.*
325 *et al.*, 2014; Giordano *et al.*, 2008; Malik *et al.*, 2014).

326 A rotavirus more closely related to group C was found in Subantarctic fur seals. Group
327 C rotaviruses have been associated with sporadic outbreaks in humans and other
328 animals such as pigs and bovines (Esona *et al.*, 2008; Gabbay *et al.*, 1999; Kim *et al.*,
329 1999; Mawatari *et al.*, 2004). Other studies have detected rotaviruses in marine
330 mammals: anti-group A rotavirus antibodies were first found in Galapagos sea lions
331 and fur seals (Coria-Galindo *et al.*, 2009) and RNA sequences from rotaviruses related
332 to lineage B were also detected in California sea lions (Li *et al.*, 2011a). Here, results
333 show that more groups of rotaviruses, other than groups A and B, can circulate in
334 marine mammals.

335 A hepatitis E like virus sequence was detected in South American fur seals. Hepatitis E
336 virus (HEV) is the main species in the genus *Hepevirus* and hepeviruses have been
337 detected in mammals and birds (Haqshenas *et al.*, 2001; Meng, 2010). HEVs can
338 cause asymptomatic infections to acute hepatitis and are known zoonotic agents (Bihl
339 & Negro, 2010). Recently, a new member of the *Hepeviridae* family was identified in
340 cutthroat trout, a fish that occurs in the Pacific ocean in North America (Batts *et al.*,
341 2011) and unclassified hepatitis E like virus sequences named hepelivirus and
342 fesavirus-2 were detected in untreated sewage and cat feces, respectively (Ng *et al.*,
343 2012; Zhang *et al.*, 2014). Phylogenetic analysis of the predicted partial polyprotein
344 sequences of the hepatitis E like virus identified here showed closer relatedness to
345 other members of the *Hepeviridae* family than to the unclassified hepelivirus and
346 fesavirus-2. Its lower amino acid identity (<30%) likely indicates a novel hepatitis E like
347 virus, which might be more taxonomically allocated to a new genus within the
348 *Hepeviridae* family.

349 A sapovirus was detected in samples from Subantarctic fur seals, which belongs to the
350 same sapovirus species (CsISaV1) that was previously detected in a California sea lion
351 with severe osteomyelitis and nephrolithiasis (Li *et al.*, 2011a). Subantarctic fur seals
352 are found in South Atlantic and Indian oceans and our data shows that the same
353 sapovirus species also circulates among fur seals from the southern hemisphere, in
354 addition to the ones that occur in the northern hemisphere. Caliciviruses have been
355 isolated from marine mammals and are known to cause vesicular lesions and diarrhea
356 in those animals (Burek *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 1973; Waltzek *et al.*, 2012).
357 Sapoviruses can cause gastroenteritis and have been associated with diarrhea in
358 animals (Li *et al.*, 2011b; Soma *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2006).

359 Knowledge on viruses in wildlife is still a barely explored field. Occasionally, viral
360 infections have been associated to epidemics in marine mammals, such as
361 anelloviruses infections (Ng *et al.*, 2009, 2011). Additionally, marine mammals may on
362 occasions be exposed to humans, farm animals or pets, which may represent a risk of
363 cross-species transmission of pathogens and zoonoses (Waltzek *et al.*, 2012). Such
364 risk of transmission to humans, for example, was reported with an avian influenza virus
365 isolated from harbor seals (Karlsson *et al.*, 2014). Besides, it is not uncommon to find
366 dogs in contact with carcasses of these animals found ashore, which may give rise to
367 emerging infectious diseases and transmission of known viruses, as already reported
368 with morbilliviruses (Kennedy *et al.*, 2000). An historical example of cross-species
369 transmission occurred with *San Miguel sea lion virus* that infects marine mammals.
370 This calicivirus is nearly identical to *Vesicular exanthema of swine virus*, eradicated in

371 swine since 1956, and was able to cause an identical disease in pigs fed with infected
372 carcasses of pinnipeds (Gelberg *et al.*, 1982). Sequences of viruses known to be
373 transmitted between wild, domestic and farm animals were detected in the present
374 study: parvoviruses, hepeviruses and caliciviruses.

375 Indisputably, factors such as diet, age and different geographical distributions factors
376 could have contributed to the virome profile of both fur seal species (Dierauf & Gulland,
377 2001). Based on their lengths and weight, most of the fur seals were classified as
378 juveniles - only one Subantarctic fur seal was an adult animal – and one can expect
379 that juvenil animals are more susceptible to viral infections than adults. Fur seals are
380 carnivores and can feed on a variety of preys. Subantarctic fur seals mostly feed on
381 fish and cephalopods whereas South American fur seals main diet consists of fish and
382 crustaceans (Bester, 1987; Kerley 1987; Vaz-Ferreira, 1982). Their diet could explain
383 the detection of eukaryotic viruses that do not infect mammals, such as shrimp.
384 Rotaviruses and sapoviruses were only detected in Subantarctic fur seals whereas
385 picobirnaviruses and a hepatitis E like virus were only found in South American fur
386 seals. Sequences of anelloviruses, parvoviruses and picornaviruses were detected in
387 both species of fur seals. These have also been reported in seals from the northern
388 hemisphere, indicating the widespread distributions of viruses of such families in
389 pinnipeds (Kapoor *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2011a; Ng *et al.*, 2009, 2011). Furthermore, the
390 occurrence of the same sapovirus species that infects California sea lions in
391 Subantarctic fur seals shows that viruses previously isolated in the North can also
392 circulate in the South, infecting pinniped populations over a large geographical range.

393 Although the nucleotide sequences reported in this study do not comprise full
394 genomes, this initial characterization has identified potential novel viruses and that may
395 be of interest for future studies. The findings presented here are expected to contribute
396 to the understanding of how viral infections in pinnipeds may impact the health of the
397 pinniped population and its potential as sources of viruses which may potentially infect
398 other animal species.

399

400 **METHODS**

401 **Sample collection**

402 Fecal samples from 10 specimens (*A. australis*, n= 5; *A. tropicalis*, n=5) were collected
403 directly from the intestines of deceased fur seals found along shores between August
404 2012 and September 2013 by the Center for Coastal, Limnology and Marine Studies

405 (CECLIMAR) team. Samples for each species were pooled and kept at -80°C until
406 processing. The location and information about the specimens are provided in Table 1
407 and Fig. 1.

408 **Viral particle purification and nucleic acid extraction**

409 Fecal samples were resuspended in Hank's balanced salt solution, vigorously vortexed
410 and then centrifuged at 2500 x g for 90 min at 4°C. The supernatant was again
411 centrifuged for 10 min at maximum speed and then filtered through a 0.45 µm syringe
412 filter (MF-Millipore). The viral particles were harvested and pelleted on a 25% sucrose
413 cushion by ultracentrifugation at 190000 x g for 4h at 4°C. The pellet was resuspended
414 in TE buffer and clarified by emulsifying with 1/1 (v/v) chloroform and centrifugation. In
415 order to remove nucleic acids not protected by the capsid, the purified samples were
416 treated with 100 U of DNase I (Roche) and 20 U of RNase (Invitrogen) at 37°C for 2h,
417 as similar to other studies (Donaldson *et al.*, 2010; Victoria *et al.*, 2009).

418 Viral genomes were extracted via commercial kits (PureLink® Viral RNA/DNA
419 Invitrogen for DNA extraction; RNeasy® Mini Kit Qiagen for RNA) and processed as
420 described by Allander *et al.* (2005) with minor modifications. Briefly, a complementary
421 strand of extracted DNA (5 µl) was synthesized using the Klenow fragment DNA
422 polymerase (New England Biolabs) and primer K-randoms (GAC CAT CTA GCG ACC
423 TCC ACM NN MNM) designed by Stang *et al.*, 2005. For the extracted RNA (10 µl), a
424 reverse transcription using the primer K-randoms was carried out prior the second
425 strand synthesis using Klenow fragment DNA polymerase.

426 **Library construction for metagenomic sequencing**

427 A random PCR was performed in a final volume of 50 µL, containing 5 µL of template,
428 0.8 µM of the fixed portion of primer K-randoms (GAC CAT CTA GCG ACC TCC AC),
429 0.2 mM of each dNTP, 1X PCR Buffer, 2.5 mM MgCl₂, and 1 U of *Taq* DNA
430 polymerase. Amplification conditions consisted of an initial denaturation cycle at 95°C
431 for 5 min, followed by 35 cycles for amplification (95°C for 1 min, 53°C for 1 min and
432 72°C for 1 min), and final extension at 72°C for 7 min. The products were visualized by
433 1% agarose gel electrophoresis, purified and processed for Ion Torrent (Life
434 Technologies, USA) using a 316 Ion chip, which was performed by the Genomic and
435 Molecular Biology Laboratory from the Pontifical Catholic University of Rio Grande do
436 Sul. The same process, including the random PCR, was repeated for Illumina MiSeq
437 platform sequencing using Kit v2 in the 300-cycles (2x150) format performed by

438 Fepagro Animal Health Institute of Veterinary Research Desidério Finamor (IPVDF),
439 Eldorado do Sul, Brazil.

440 **Bioinformatics**

441 Ion Torrent reads were trimmed using PRINSEQ (prinseq.sourceforge.net) and the
442 quality of the sequences was analyzed with FastQC
443 (www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/). Trimmed reads were assembled
444 *de novo* by using MetaVelvet v1.2.01 (metavelvet.dna.bio.keio.ac.jp) with a k-mer of
445 51. Illumina reads were trimmed for primers using Geneious 8.1.3 and *de novo*
446 assembled with St. Petersburg genome assembler (SPAdes) 3.5.0
447 (bioinf.spbau.ru/spades). The resulting contigs (>100bp) were submitted to BLASTx
448 search against the National Center for Biotechnology Information (NCBI,
449 www.ncbi.nlm.nih.gov) non-redundant database (nr) and its viral database by using an
450 E-value cutoff of 1e-05. The contigs were classified into eukaryotic viruses,
451 bacteriophages, bacterium, eukaryotes and unknown based on lowest E-value. Contigs
452 of eukaryotic viruses were used for sequence and phylogenetic analyses and
453 bacteriophage sequences were not further analyzed.

454 **Phylogenetic analysis**

455 Nucleotide or translated amino acid sequences from the contigs of anellovirus,
456 parvovirus, picornavirus, picobirnavirus, rotavirus, sapovirus and hepevirus-like were
457 aligned with MUSCLE (www.drive5.com/muscle) and phylogenetic trees were built
458 using MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013). Trees were constructed by the neighbor-joining
459 (NJ) method (Saitou & Nei, 1987) with a bootstrap of 1000 replicates, p-distance
460 model, and gaps were treated as pairwise deletion. The contig sequences from this
461 study were compared with other selected gene sequences available in the GenBank.

462

463 **ACKNOWLEDGEMENTS**

464

465 We would like to thank CECLIMAR for kindly providing the samples used in this study
466 and the laboratories from PUCRS and IPVDF for performing next-generation
467 sequencing. The research leading to these results has received funding from the
468 National Council for the Improvement of Higher Education (CAPES), the National
469 Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and the Study and
470 Project Funding Agency (FINEP) and was also supported by the Federal University of
471 Rio Grande do Sul (UFRGS) Supercomputing National Center (CESUP).

472

473 REFERENCES

- 474 **Adams, M.J., King, A.M.Q. & Carstens, E.B. (2013).** Ratification vote on taxonomic
475 proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Archives of Virology*
476 **158**, 2023–2030.
- 477 **Allander, T., Tammi, M. T., Eriksson, M., Bjerkner, A., Tiveljung-Lindell, A. &**
478 **Andersson, B. (2005).** Cloning of a human parvovirus by molecular screening of
479 respiratory tract samples. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 12891–12896.
- 480 **Allison, a. B., Harbison, C. E., Pagan, I., Stucker, K. M., Kaelber, J. T., Brown, J.**
481 **D., Ruder, M. G., Keel, M. K., Dubovi, E. J. & other authors. (2012).** Role of Multiple
482 Hosts in the Cross-Species Transmission and Emergence of a Pandemic Parvovirus. *J*
483 *Virology* **86**, 865–872.
- 484 **Allison, A. B., Kohler, D. J., Fox, K. a, Brown, J. D., Gerhold, R. W., Shearn-**
485 **Bochsler, V. I., Dubovi, E. J., Parrish, C. R. & Holmes, E. C. (2013).** Frequent Cross-
486 Species Transmission of Parvoviruses among Diverse Carnivore Hosts. *J Virology* **87**,
487 2342–2347.
- 488 **Arbiza, J., Blanc, A., Castro-ramos, M., Katz, H., León, A. P. De & Clara, M. (2012).**
489 Uruguayan Pinnipeds (*Arctocephalus australis* and *Otaria flavescens*): Evidence of
490 Influenza Virus and *Mycobacterium pinnipedii* Infections. *New Approaches to Study*
491 *Mar Mammals* **2** 151–182.
- 492 **Attoui, H., Mertens, P.P.C., Becnel, J., Belaganahalli, S., Bergoin, M., Brussaard,**
493 **C.P., Chappell, J.D., Ciarlet, M., del Vas, M., & other authors. (2011).** Reoviridae.
494 In *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the*
495 *International Committee on Taxonomy of Viruses*, pp. 541–637. Edited by King A. M.
496 Q., Adams M. J., Carstens E. B. & Lefkowitz E. J. San Diego, CA: Elsevier.
- 497 **Batts, W., Yun, S., Hedrick, R. & Winton, J. (2011).** A novel member of the family
498 Hepeviridae from cutthroat trout (*Oncorhynchus clarkii*). *Virus Res* **158**, 116–123.
- 499 **Bester, M. N. (1987).** Subantarctic fur seal, *Arctocephalus tropicalis*, at Gough Island
500 (Tristan da Cunha group). In *Status, biology, and ecology of fur seals: Proceedings of*
501 *an international symposium and workshop Cambridge, England: 23–27 April 1984*, pp.
502 57-60. Edited by J. P. Croxall & R. L. Gentry. Springfield, VA: NOAA Tech Rep NMFS
503 51.
- 504 **Bhattacharya, R., Sahoo, G. C., Nayak, M. K., Rajendran, K., Dutta, P., Mitra, U.,**
505 **Bhattacharya, M. K., Naik, T. N., Bhattacharya, S. K. & Krishnan, T. (2007).**
506 Detection of Genogroup I and II human picobirnaviruses showing small genomic RNA
507 profile causing acute watery diarrhoea among children in Kolkata, India. *Infect Genet*
508 *Evol* **7**, 229–38.
- 509 **Biagini, P., Bendinelli, M., Hino, S., Kakkola, L., Mankertz, A., Niel, C., Okamoto,**
510 **H., Raidal, S., Teo, C.G. & Todd, D. (2011).** Anelloviridae. In *Virus Taxonomy: Ninth*
511 *Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, pp. 326-341. Edited by:
512 King, A., Lefkowitz, E., Adams, M. J. & Carstens, E. B., San Diego, CA: Elsevier.
- 513 **Bihl, F. & Negro, F. (2010).** Hepatitis E virus: A zoonosis adapting to humans. *J*
514 *Antimicrob Chemother* **65**, 817–821.

- 515 **Bodewes, R., Ruiz-Gonzalez, A., Schapendonk, C. M., van den Brand, J. M.,**
 516 **Osterhaus, A. D. & Smits, S. L. (2014).** Viral metagenomic analysis of feces of wild
 517 small carnivores. *Virology* **11**, 89.
- 518 **de Bruyn, P. J. N., Bastos, a. D. S., Eadie, C., Tosh, C. a. & Bester, M. N. (2008).**
 519 Mass mortality of adult male subantarctic fur seals: Are alien mice the culprits? *PLoS*
 520 *One* **3**.
- 521 **Burek, K. a, Gulland, F. M. D., Sheffield, G., Beckmen, K. B., Keyes, E., Spraker, T.**
 522 **R., Smith, A. W., Skilling, D. E., Evermann, J. F. & other authors. (2005).** Infectious
 523 disease and the decline of Steller sea lions (*Eumetopias jubatus*) in Alaska, USA:
 524 insights from serologic data. *J Wildl Dis* **41**, 512–524.
- 525 **Carruyo-Nuñez, M. G., Alcalá-Aristiguieta, A. C., Liprandi-Fraire, F. & Ludert-**
 526 **Leon, E. J. (2014).** Porcine picobirnavirus infection in venezuelan farms. *Revista*
 527 *Científica* **2**, 125-131.
- 528 **Clarke, I.N., Estes, M.K., Green, K.Y., Hansman, G.S., Knowles, N.J., Koopmans,**
 529 **M.K., Matson, D.O., Meyers, G., Neill, J.D., & other authors. (2011).** Caliciviridae.
 530 In *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the*
 531 *International Committee on Taxonomy of Viruses*, pp. 977–986. Edited by King A. M.
 532 Q., Adams M. J., Carstens E. B. & Lefkowitz E. J. San Diego, CA: Elsevier
- 533 **Coria-Galindo, E., Rangel-Huerta, E., Verdugo-Rodríguez, A., Brousset, D.,**
 534 **Salazar, S. & Padilla-Noriega, L. (2009).** Rotavirus infections in Galapagos sea lions.
 535 *J Wildl Dis* **45**, 722–728.
- 536 **Cotmore S. F., Agbandje-McKenna M., Chiorini J. A., Mukha D. V., Pintel D. J., Qiu**
 537 **J., Soderlund-Venermo M., Tattersall P., Tijssen P., Gatherer D. & Davison A. J.**
 538 **(2014).** The family Parvoviridae. *Arch Virol* **159**, 1239-1247.
- 539 **Delmas, B. (2011).** Picobirnaviridae. In *Virus Taxonomy: Ninth Report of the*
 540 *International Committee on Taxonomy of Viruses*, pp. 535-539. Edited by: King, A.,
 541 Lefkowitz, E., Adams, M. J. & Carstens, E. B., San Diego, CA: Elsevier.
- 542 **Dierauf, L. & Gulland, F. M. D. (2001).** *CRC Handbook of Marine Mammal Medicine:*
 543 *Health, Disease, and Rehabilitation, Second Edition*, 2nd edn. Boca Raton, FL: CRC
 544 Press.
- 545 **Donaldson, E. F., Haskew, A. N., Gates, J. E., Huynh, J., Moore, C. J. & Frieman,**
 546 **M. B. (2010).** Metagenomic analysis of the viromes of three North American bat
 547 species: viral diversity among different bat species that share a common habitat. *J Virol*
 548 **84**, 13004–13018.
- 549 **Esona, M. D., Humphrey, C. D., Dennehy, P. H. & Jiang, B. (2008).** Prevalence of
 550 group C rotavirus among children in Rhode Island, United States. *J Clin Virol* **42**, 221–
 551 224.
- 552 **Fahsbender, E., Rosario, K., Cannon, J. P., Gulland, F., Dishaw, L. J. & Breitbart,**
 553 **M. (2015).** Development of a Serological Assay for the Sea Lion (*Zalophus*
 554 *californianus*) Anellovirus, ZcAV. *Sci Rep* **5**, 9637. Nature Publishing Group.
- 555 **Ferreira, J. M., De Oliveira, L. R., Wynen, L., Bester, M. N., Guinet, C., Moraes-**
 556 **Barros, N., Martins, F. M., Muelbert, M. M. C., Moreno, I. B. & other authors.**

- 557 (2008). Multiple origins of vagrant Subantarctic fur seals: A long journey to the Brazilian
558 coast detected by molecular markers. *Polar Biol* **31**, 303–308.
- 559 **Gabbay, Y. B., Jiang, B., Oliveira, C. S., Mascarenhas, J. D., Leite, J. P., Glass, R.**
560 **I. & Linhares, A. C. (1999).** An outbreak of group C rotavirus gastroenteritis among
561 children attending a day-care centre in Belém, Brazil. *J Diarrhoeal Dis Res* **17**, 69–74.
- 562 **Ganesh, B., Masachessi, G., & Mladenova, Z. (2014).** Animal Picobirnavirus. *Virus*
563 *disease* **25**, 223–238.
- 564 **Gelberg, H. B., Dieterich, R. A. & Lewis, R. M. (1982).** Vesicular Exanthema of Swine
565 and San Miguel Sea Lion Virus: Experimental and Field Studies in Otariid Seals,
566 Feeding Trials in Swine. *Vet Pathol* **19**, 413–423.
- 567 **Geraci, J. R. & Lounsbury, V. J. (1993).** *Marine Mammals Ashore: A Field Guide for*
568 *Strandings*. 1st edn. Galveston, TX: Texas A&M Sea Grant.
- 569 **Giordano, M. O., Masachessi, G., Martinez, L. C., Barril, P. A., Ferreyra, L. J., Isa,**
570 **M. B. & Nates, S. V. (2008).** Two instances of large genome profile picobirnavirus
571 occurrence in Argentinian infants with diarrhea over a 26-year period (1977-2002). *J*
572 *Infect* **56**, 371–5.
- 573 **Haqshenas, G., Shivaprasad, H. L., Woolcock, P. R., Read, D. H. & Meng, X. J.**
574 **(2001).** Genetic identification and characterization of a novel virus related to human
575 hepatitis E virus from chickens with hepatitis-splenomegaly syndrome in the United
576 States. *J Gen Virol* **82**, 2449–2462.
- 577 **He, B., Li, Z., Yang, F., Zheng, J., Feng, Y., Guo, H., Li, Y., Wang, Y., Su, N. & other**
578 **authors. (2013).** Virome Profiling of Bats from Myanmar by Metagenomic Analysis of
579 Tissue Samples Reveals More Novel Mammalian Viruses. *PLoS One* **8**.
- 580 **Hoelzer, K. & Parrish, C. R. (2010).** The emergence of parvoviruses of carnivores. *Vet*
581 *Res* **41**.
- 582 **Ikeda, Y., Nakamura, K., Miyazawa, T., Tohya, Y., Takahashi, E. & Mochizuki, M.**
583 **(2002).** Feline host range of Canine parvovirus: Recent emergence of new antigenic
584 types in cats. *Emerg Infect Dis* **8**, 341–346.
- 585 **Kapoor, A., Victoria, J., Simmonds, P., Wang, C., Shafer, R.W., Nims, R., Nielsen,**
586 **O. & Delwart, E. (2008).** A highly divergent picornavirus in a marine mammal. *J Virol*
587 **82**, 311-320.
- 588 **Karlsson, E. A., Ip, H. S., Hall, J. S., Yoon, S. W., Johnson, J., Beck, M. A., Webby,**
589 **R. J. & Schultz-Cherry, S. (2014).** Respiratory transmission of an avian H3N8
590 influenza virus isolated from a harbour seal. *Nat Commun* **5**, 4791.
- 591 **Katz, H., Morgades, D. & Castro-Ramos, M. (2012).** Pathological and Parasitological
592 Findings in South American Fur Seal Pups (*Arctocephalus australis*) in Uruguay. *ISRN*
593 *Zool* **2012**, 1–7.
- 594 **Kennedy, S., Kuiken, T., Jepson, P. D., Deaville, R., Forsyth, M., Barrett, T., van**
595 **de Bildt, M. W., Osterhaus, A. D., Eybatov, T. & other authors. (2000).** Mass die-Off
596 of Caspian seals caused by canine distemper virus. *Emerg Infect Dis* **6**, 637–9.

- 597 **Kerley, G. I. H. (1987)**. Subantarctic fur seal, *Arctocephalus tropicalis*, at Gough Island
598 (Tristan da Cunha group). In *Status, biology, and ecology of fur seals: Proceedings of*
599 *an international symposium and workshop Cambridge, England: 23–27 April 1984*, pp.
600 61–64. Edited by J. P. Croxall & R. L. Gentry. Springfield, VA: NOAA Tech Rep NMFS
601 51.
- 602 **Kim, Y., Chang, K. O., Straw, B. & Saif, L. J. (1999)**. Characterization of group C
603 rotaviruses associated with diarrhea outbreaks in feeder pigs. *J Clin Microbiol* **37**,
604 1484–1488.
- 605 **Knowles N. J., Hovi T., Hyypiä T., King A. M. Q., Lindberg A. M., Pallansch M. A.,**
606 **Palmenberg A. C., Simmonds P., Skern T. & other authors (2011)**. Picornaviridae.
607 In *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the*
608 *International Committee on Taxonomy of Viruses*, pp. 855–880 Edited by King A. M.
609 Q., Adams M. J., Carstens E. B. & Lefkowitz E. J. San Diego, CA: Elsevier.
- 610 **Li, L., Shan, T., Wang, C., Côté, C., Kolman, J., Onions, D., Gulland, F. M. D. &**
611 **Delwart, E. (2011a)**. The fecal viral flora of California sea lions. *J Virol* **85**, 9909–9917.
- 612 **Li, L., Pesavento, P. a., Shan, T., Leutenegger, C. M., Wang, C. & Delwart, E.**
613 **(2011b)**. Viruses in diarrhoeic dogs include novel kobuviruses and sapoviruses. *J Gen*
614 *Virology* **92**, 2534–2541.
- 615 **Malik, Y. S., Kumar, N., Sharma, K., Dhama, K., Shabbir, M. Z., Ganesh, B.,**
616 **Kobayashi, N. & Banyai, K. (2014)**. Epidemiology, Phylogeny, and Evolution of
617 Emerging Enteric Picobirnaviruses of Animal Origin and Their Relationship to Human
618 Strains **2014**. Hindawi Publishing Corporation.
- 619 **Marvil, P., Knowles, N. J., Mockett, A. P., Britton, P., Brown, T. D. & Cavanagh, D.**
620 **(1999)**. Avian encephalomyelitis virus is a picornavirus and is most closely related to
621 hepatitis A virus. *J Gen Virol* **80 (Pt 3)**, 653–62.
- 622 **Matthijnssens, J., Otto, P. H., Ciarlet, M., Desselberger, U., van Ranst, M. &**
623 **Johne, R. (2012)**. VP6-sequence-based cutoff values as a criterion for rotavirus
624 species demarcation. *Arch Virol* **157**, 1177–1182.
- 625 **Mawatari, T., Taneichi, A., Kawagoe, T., Hosokawa, M., Togashi, K. & Tsunemitsu,**
626 **H. (2004)**. Detection of a bovine group C rotavirus from adult cows with diarrhea and
627 reduced milk production. *J Vet Med Sci* **66**, 887–890.
- 628 **Meng, X. J. (2010)**. Recent advances in Hepatitis E virus. *J Viral Hepat* **17**, 153–61.
- 629 **Moura, J. F. & Siciliano, S. (2007)**. Straggler subantarctic fur seal (*Arctocephalus*
630 *tropicalis*) on the coast of Rio de Janeiro State, Brazil. *Lat Am J Aquat Mamm* **6**, 103–
631 107.
- 632 **Ng, T. F. F., Suedmeyer, W. K., Wheeler, E., Gulland, F. & Breitbart, M. (2009)**.
633 Novel anellovirus discovered from a mortality event of captive California sea lions. *J*
634 *Gen Virol* **90**, 1256–61.
- 635 **Ng, T. F. F., Wheeler, E., Greig, D., Waltzek, T. B., Gulland, F. & Breitbart, M.**
636 **(2011)**. Metagenomic identification of a novel anellovirus in Pacific harbor seal (*Phoca*

- 637 vitulina richardsii) lung samples and its detection in samples from multiple years. *J Gen*
638 *Virolog* **92**, 1318–1323.
- 639 **Ng, T. F. F., Marine, R., Wang, C., Simmonds, P., Kapusinszky, B., Bodhidatta, L.,**
640 **Oderinde, B. S., Wommack, K. E. & Delwart, E. (2012).** High Variety of Known and
641 New RNA and DNA Viruses of Diverse Origins in Untreated Sewage. *J Virol* **86**,
642 12161–12175.
- 643 **Ng, T. F. F., Mesquita, J. R., Nascimento, M. S. J., Kondov, N. O., Wong, W.,**
644 **Reuter, G., Knowles, N. J., Vega, E., Esona, M. D. & other authors. (2014).** Feline
645 fecal virome reveals novel and prevalent enteric viruses. *Vet Microbiol* **171**, 102–111.
- 646 **Ogden, K. M., Johne, R. & Patton, J. T. (2012).** Rotavirus RNA polymerases resolve
647 into two phylogenetically distinct classes that differ in their mechanism of template
648 recognition. *Virology* **431**, 50–57.
- 649 **Oliveira, A., Kolesnikovas, C.K.M., Serafini, P.P., Moreira, L.M.P., Pontalti, M.,**
650 **Simões-Lopes, P.C. & Barreto, A.S. (2011).** Occurrence of pinnipeds in Santa
651 Catarina between 2000 and 2010. *Latin American Journal of Aquatic Mammals* **9**, 145-
652 149.
- 653 **Phan, T. G., Gulland, F., Simeone, C., Deng, X. & Delwart, E. (2014).** Sesavirus:
654 prototype of a new parvovirus genus in feces of a sea lion. *Virus Genes* **50**, 134–136.
- 655 **Pinedo, M. C. (1990).** Ocorrência de pinípedes na costa brasileira. *Gracia de Orla*
656 *Série Zoologia*, **15**, 37-48.
- 657 **Riedman, M. (1990).** *The Pinnipeds: Seals, Sea Lions, and Walruses*. Berkeley, CA:
658 University of California Press.
- 659 **Saitou, N. & Nei, M. (1987).** The neighbor-joining method: a new method for
660 reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**, 406–25.
- 661 **Sikorski, A., Dayaram, A. & Varsani, A. (2013).** Identification of a Novel Circular DNA
662 Virus in New Zealand Fur Seal (*Arctocephalus forsteri*) Fecal Matter. *Genome Announc*
663 **1**, 2012–2013.
- 664 **Simões-Lopes, P. C., Drebmmer, C. J. & Ott, P. H. (1995).** Nota sobre os otariidae e
665 phocidae (mammalia: carnivora) da costa norte do Rio Grande do Sul e Santa catarina,
666 Brasil. *Biociências* **3**, 173-181.
- 667 **Smith, A. W., Akers, T. G., Madin, S. H. & Vedros, N. A. (1973).** San Miguel sea lion
668 virus isolation, preliminary characterization and relationship to vesicular exanthema of
669 swine virus. *Nature* **244**, 108–10.
- 670 **Soma, T., Nakagomi, O., Nakagomi, T. & Mochizuki, M. (2015).** Detection of
671 Norovirus and Sapovirus from diarrheic dogs and cats in Japan. *Microbiol Immunol* **59**,
672 123–128.
- 673 **Stang, A., Korn, K., Wildner, O. & Uberla, K. (2005).** Characterization of virus
674 isolates by particle-associated nucleic acid PCR. *J Clin Microbiol* **43**, 716–20.

- 675 **Steinel, a, Parrish, C. R., Bloom, M. E. & Truyen, U. (2001).** Parvovirus infections in
676 wild carnivores. *J Wildl Dis* **37**, 594–607.
- 677 **Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. & Kumar, S. (2013).** MEGA6:
678 Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* **30**, 2725–9.
- 679 **Tijssen, P., Agbandje-McKenna, M., Almendral, J.M., Bergoin, M., Flegel, T.W.,**
680 **Hedman, K., Kleinschmidt, J., Li, Y., Pintel, D.J. & Tattersall, P. (2011).**
681 Parvoviridae. In *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on*
682 *Taxonomy of Viruses*, pp. 405-425. Edited by: King, A., Lefkowitz, E., Adams, M. J. &
683 Carstens, E. B., San Diego, CA: Elsevier.
- 684 **Vaz-Ferreira, R. (1982).** *Arctocephalus australis* (Zimmermann), South American fur
685 seal. In: *Mammals in the seas*, pp. 497-508. Edited by: FAO Fish Ser., Rome, IT: FAO.
- 686 **Victoria, J. G., Kapoor, A., Li, L., Blinkova, O., Slikas, B., Wang, C., Naeem, A.,**
687 **Zaidi, S. & Delwart, E. (2009).** Metagenomic analyses of viruses in stool samples from
688 children with acute flaccid paralysis. *J Virol* **83**, 4642–4651.
- 689 **Waltzek, T. B., Cortés-Hinojosa, G., Wellehan, J. F. X. & Gray, G. C. (2012).** Marine
690 mammal zoonoses: a review of disease manifestations. *Zoonoses Public Health* **59**,
691 521–535.
- 692 **Wang, Q. H., Souza, M., Funk, J. a., Zhang, W. & Saif, L. J. (2006).** Prevalence of
693 noroviruses and sapoviruses in swine of various ages determined by reverse
694 transcription-PCR and microwell hybridization assays. *J Clin Microbiol* **44**, 2057–2062.
- 695 **Woo, P. C. Y., Lau, S. K. P., Bai, R., Teng, J. L. L., Lee, P., Martelli, P., Hui, S.-W. &**
696 **Yuen, K.-Y. (2012).** Complete Genome Sequence of a Novel Picobirnavirus, Otarine
697 Picobirnavirus, Discovered in California Sea Lions. *J Virol* **86**, 6377–6378.
- 698 **Woo, P. C. Y., Lau, S. K. P., Teng, J. L. L., Tsang, A. K. L., Joseph, M., Wong, E. Y.**
699 **M., Tang, Y., Sivakumar, S., Bai, R. & other authors. (2014).** Metagenomic analysis
700 of viromes of dromedary camel fecal samples reveals large number and high diversity
701 of circoviruses and picobirnaviruses **473**, 117–125.
- 702 **Wu, Z., Ren, X., Yang, L., Hu, Y., Yang, J., He, G., Zhang, J., Dong, J., Sun, L. &**
703 **other authors. (2012).** Virome Analysis for Identification of Novel Mammalian Viruses
704 in Bat Species from Chinese Provinces. *J Virol* **86**, 10999–11012.
- 705 **Zhang, W., Li, L., Deng, X., Kapusinszky, B., Pesavento, P. a. & Delwart, E. (2014).**
706 Faecal virome of cats in an animal shelter. *J Gen Virol* **95**, 2553–2564.
- 707
- 708
- 709
- 710
- 711
- 712

713 TABLES

Table 1 - Samples used in this study

Pool no.	No.	Species	Length (cm)	Weight (kg)	Sex	Carcass classification code*	Date of collection (dd/mm/yyyy)	Collection location
1	G1529	South American fur seal <i>Arctocephalus australis</i>	94.2	10.6	Male	2	02/08/2012	Osório, RS
1	G1560	South American fur seal <i>Arctocephalus australis</i>	92	9.5	Male	2	09/08/2012	Cidreira, RS
1	G1574	South American fur seal <i>Arctocephalus australis</i>	89.4	10.8	Male	2	16/08/2012	Imbé, RS
1	G1604	South American fur seal <i>Arctocephalus australis</i>	92	15.5	Male	2	31/08/2012	Capão da Canoa, RS
1	G1657	South American fur seal <i>Arctocephalus australis</i>	88	12	Male	2	11/09/2013	Imbé, RS
2	G1535	Subantarctic fur seal <i>Arctocephalus tropicalis</i>	91.9	8.4	Male	2	02/08/2012	Capão da Canoa, RS
2	G1537	Subantarctic fur seal <i>Arctocephalus tropicalis</i>	90.6	9	Male	2	02/08/2012	Capão da Canoa, RS
2	G1561	Subantarctic fur seal <i>Arctocephalus tropicalis</i>	91.9	8.8	Male	2	09/08/2012	Cidreira, RS
2	G1577	Subantarctic fur seal <i>Arctocephalus tropicalis</i>	80.5	7.1	Male	3	16/08/2012	Osório, RS
2	G1640	Subantarctic fur seal <i>Arctocephalus tropicalis</i>	157.5	40.9	Male	2	25/07/2013	Tramandaí, RS

714 *Code for carcass classification according to Geraci & Lounsbury (1993): freshly dead,
715 edible (**2**); and decomposed, but organs basically intact (**3**).

716

717 FIGURES

718 Fig. 1 - Map indicating the location of where the samples were collected along the
719 coast of the State of Rio Grande do Sul, Brazil (shaded).

720 Fig. 2(a) – Pie charts of assembled reads (>100bp) based on BLASTx best E-scores
721 (cutoff: 10e-05) against the GenBank non-redundant and viral databases.

722 Fig. 2(b) - Pie charts of assembled reads (>100bp) based on BLASTx best E-scores
723 (cutoff: 10e-05) against the GenBank non-redundant and viral databases and
724 taxonomic distribution of viruses for each species.

725 Fig. 3(a): Neighbor-joining phylogenetic tree based on 21 partial amino acid sequences
726 (233 aa) of ORF1 from anelloviruses. Human and simian torque teno viruses were
727 used as outgroup. The anellovirus sequences from South American fur seal identified
728 in this study are labeled with black squares. The GenBank accession numbers of the
729 viral sequences are shown in parentheses.

730 Fig. 3(b): Neighbor-joining phylogenetic tree based on 17 partial amino acid sequences
731 (261 aa) of NS1 protein from parvoviruses. *Seal parvovirus* and *California sea lion*
732 *sesavirus* were used as outgroup. The parvovirus sequence from Subantarctic fur seal
733 identified in this study is labeled with a black square. The GenBank accession numbers
734 of the viral sequences are shown in parentheses.

735 Fig. 4(a): Neighbor-joining phylogenetic tree based on 13 partial amino acid sequences
736 (219 aa) of P1 region of the polyprotein from picornaviruses. *Porcine kobuvirus* was
737 used as outgroup. The picornavirus sequence from South American fur seal identified
738 in this study is labeled with a black square. The GenBank accession numbers of the
739 viral sequences are shown in parentheses.

740 Fig. 4(b): Neighbor-joining phylogenetic tree based on 12 partial amino acid sequences
741 (122 aa) of P3 region of the polyprotein from picornaviruses. *Human cosavirus* was
742 used as outgroup. The picornavirus sequence from South American fur seal identified
743 in this study is labeled with a black square. The GenBank accession numbers of the
744 viral sequences are shown in parentheses.

745 Fig. 4(c): Neighbor-joining phylogenetic tree based on 11 partial amino acid sequences
746 (409 aa) of P2 region of the polyprotein from picornaviruses. *Sicinivirus 1* was used as
747 outgroup. The sakobuvirus sequence from Subantarctic fur seal identified in this study
748 is labeled with a black square. The GenBank accession numbers of the viral
749 sequences are shown in parentheses.

750 Fig. 4(d): Neighbor-joining phylogenetic tree based on 13 partial amino acid sequences
751 (255 aa) of 3D region of the polyprotein from picornaviruses. *California sea lion*
752 *sapelovirus 2* was used as outgroup. The sakobuvirus sequence from Subantarctic fur
753 seal identified in this study is labeled with a black square. The GenBank accession
754 numbers of the viral sequences are shown in parentheses.

755 Fig. 5(a): Neighbor-joining phylogenetic tree based on 17 partial nucleotide sequences
756 (743 bp) of RdRp gene from picobirnaviruses. Human picobirnavirus GII was used as
757 outgroup. The picobirnavirus sequence from South American fur seal identified in this
758 study is labeled with a black square. The GenBank accession numbers of the viral
759 sequences are shown in parentheses.

760 Fig. 5(b): Neighbor-joining phylogenetic tree based on 19 partial amino acid sequences
761 (307 aa) of RpRd (segment 1) from rotaviruses. Sequences of groups B, G and H were
762 used as outgroup. The rotavirus sequence from Subantarctic fur seal identified in this
763 study is labeled with a black square. The GenBank accession numbers of the viral
764 sequences are shown in parentheses.

765 Fig. 6: Neighbor-joining phylogenetic tree based on 15 partial amino acid sequences
766 (182 aa) of the polyprotein from hepeviruses. *Hepelivirus* and *Fesavirus 2* were used
767 as outgroup. The hepatitis E like virus sequence from South American fur seal
768 identified in this study is labeled with a black square. The GenBank accession numbers
769 of the viral sequences are shown in parentheses.

770 Fig. 7(a): Neighbor-joining phylogenetic tree based on 9 complete nucleotide
771 sequences of VP1 gene from caliciviruses. *Human norovirus* was used as outgroup.
772 The sapovirus sequence from Subantarctic fur seal identified in this study is labeled
773 with a black square. The GenBank accession numbers of the viral sequences are
774 shown in parentheses.

775 Fig. 7(b): Neighbor-joining phylogenetic tree based on 9 nearly-complete nucleotide
776 sequences of VP2 gene from caliciviruses. *Human norovirus* was used as outgroup.
777 The sapovirus sequence from Subantarctic fur seal identified in this study is labeled

778 with a black square. The GenBank accession numbers of the viral sequences are
779 shown in parentheses.

780

781

782

783

Fig. 1

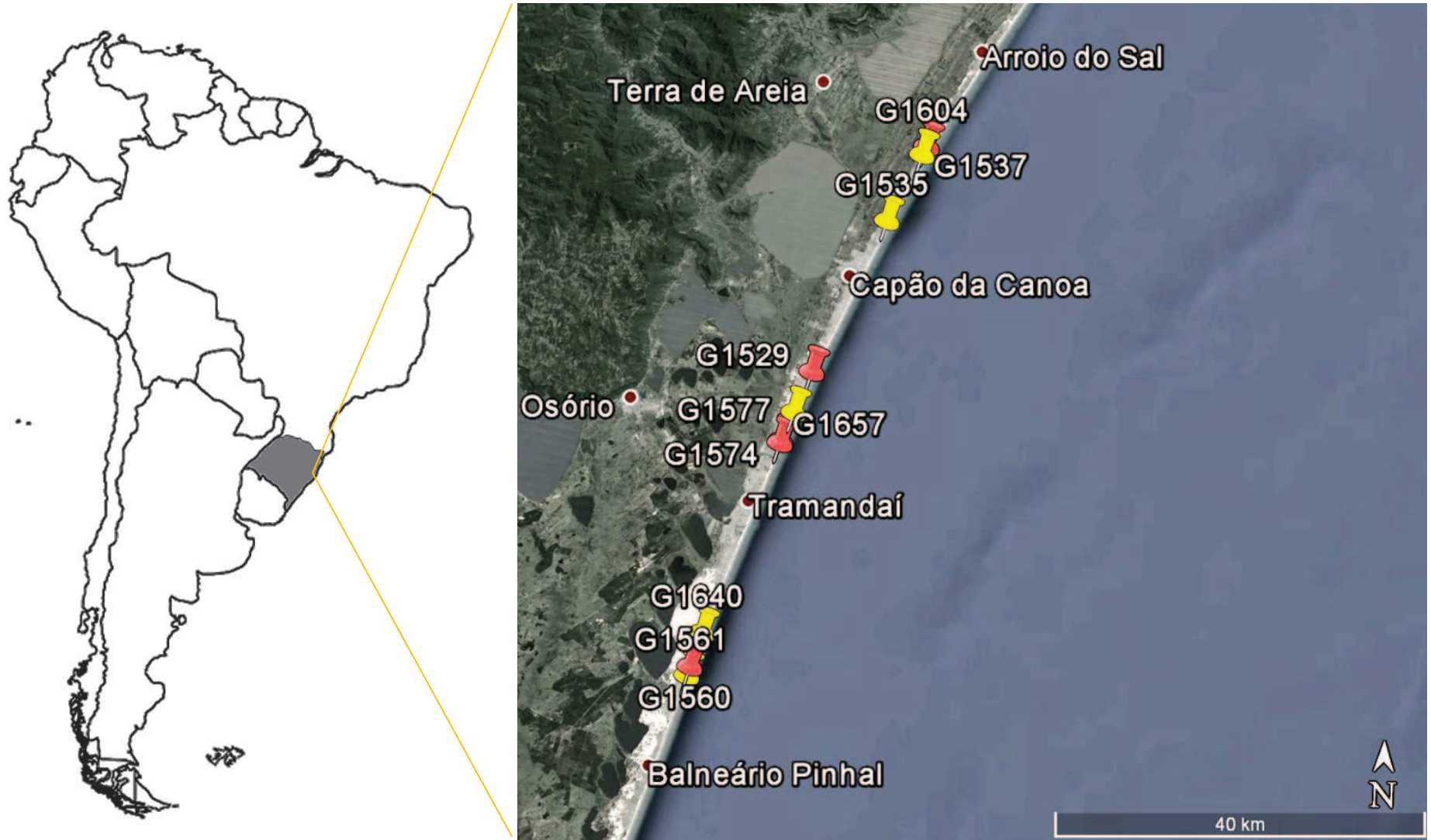
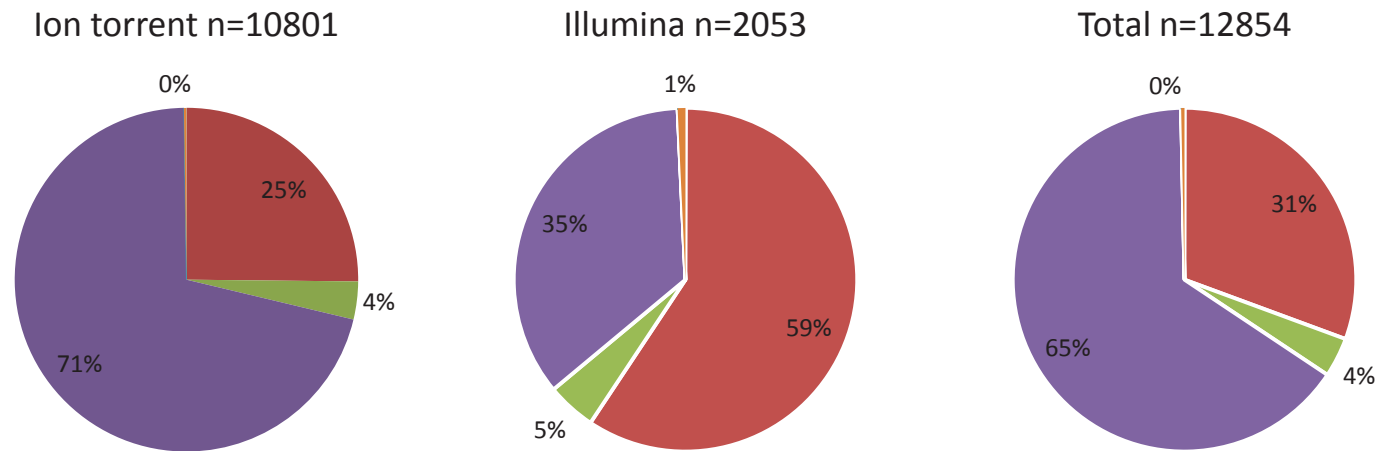
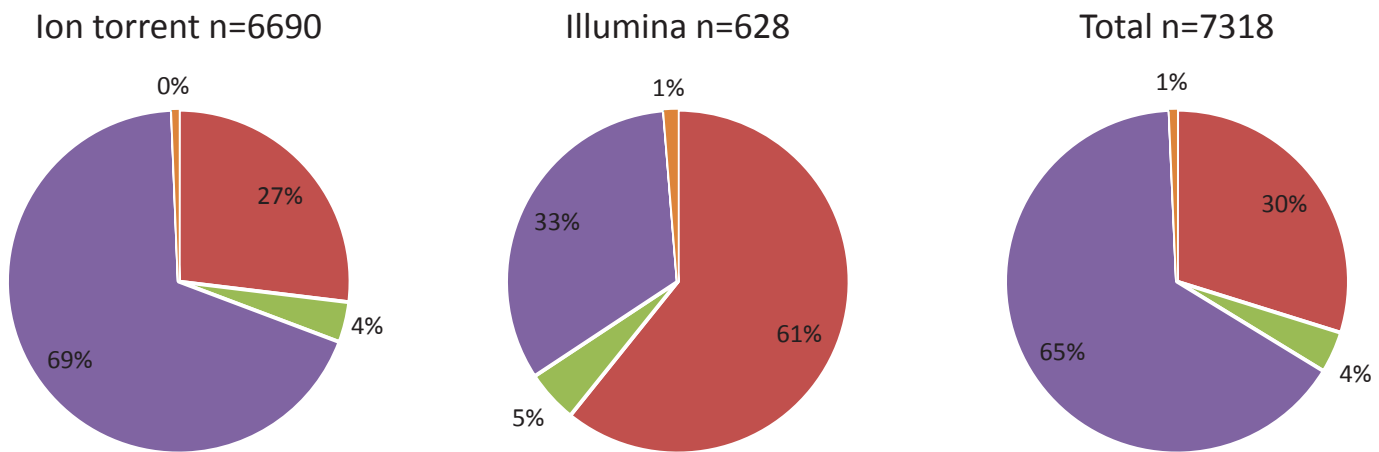


Fig. 2(a)

South American fur seal (*Arctocephalus australis*)



Subantarctic fur seal (*Arctocephalus tropicalis*)

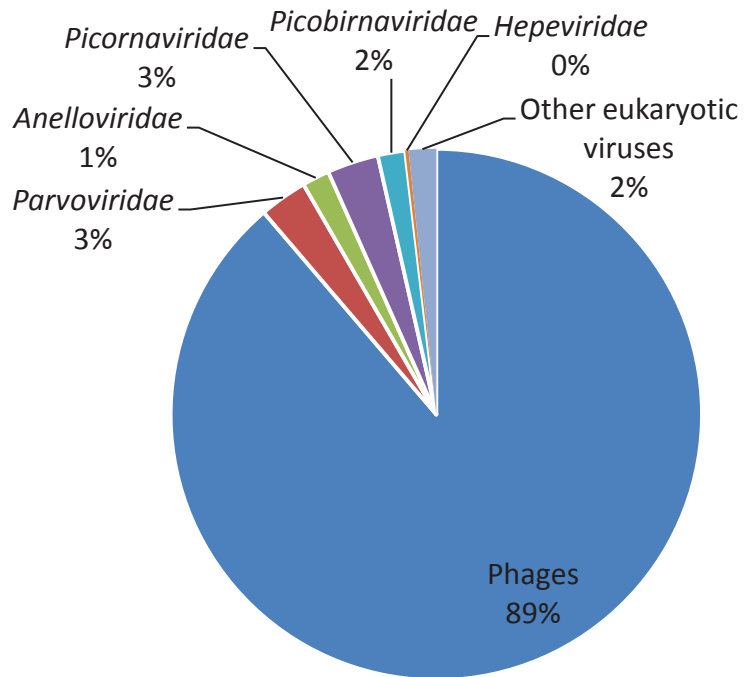


■ Viruses ■ Bacteria ■ Eukaryotes ■ Unknown

Fig. 2(b)

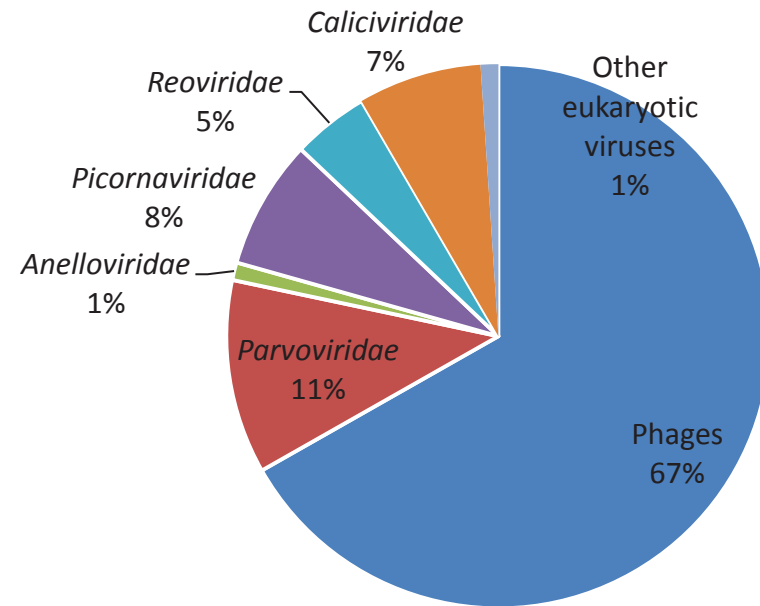
Arctocephalus australis

n=480



Arctocephalus tropicalis

n=287



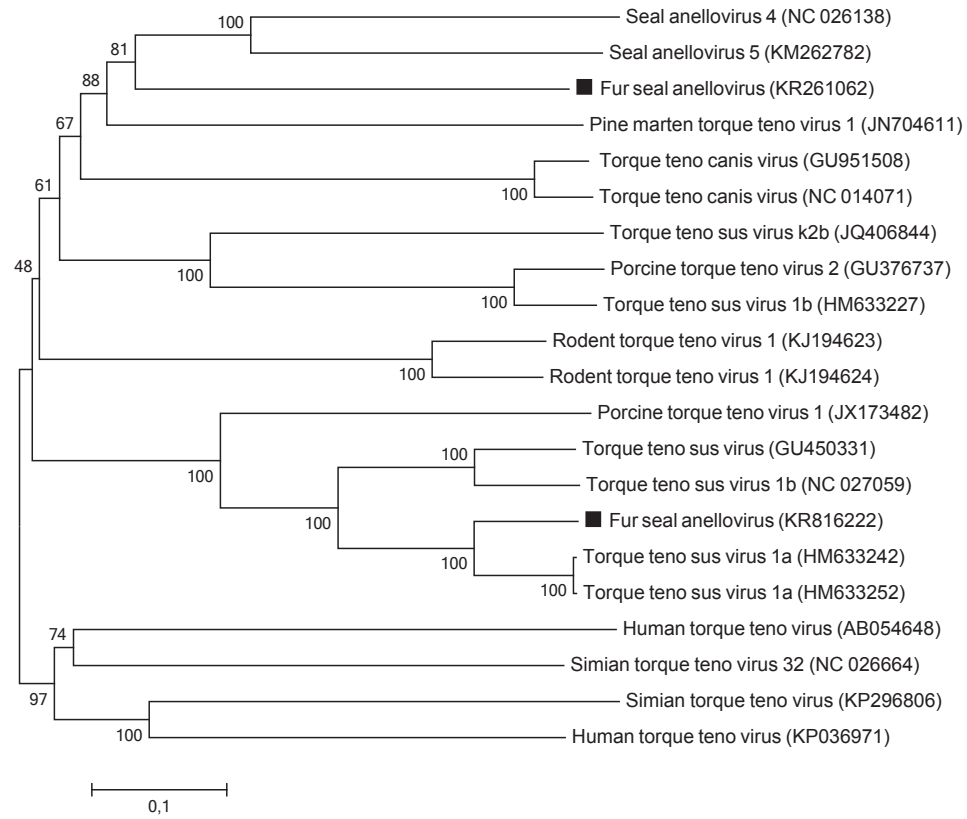


Fig. 3(a)

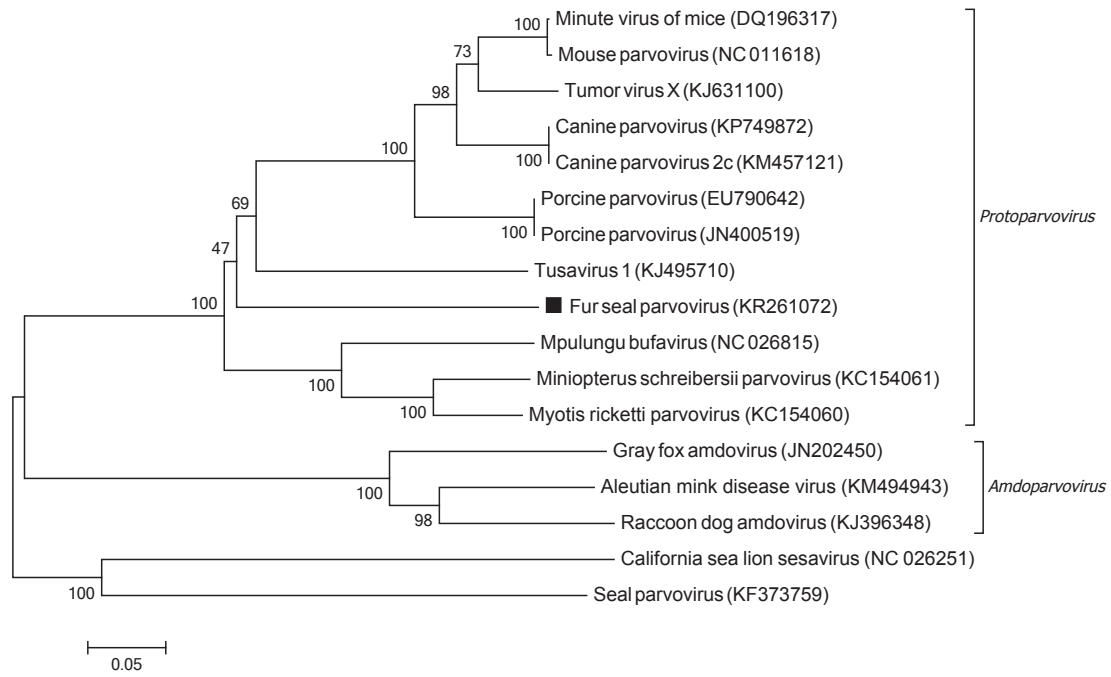


Fig. 3(b)

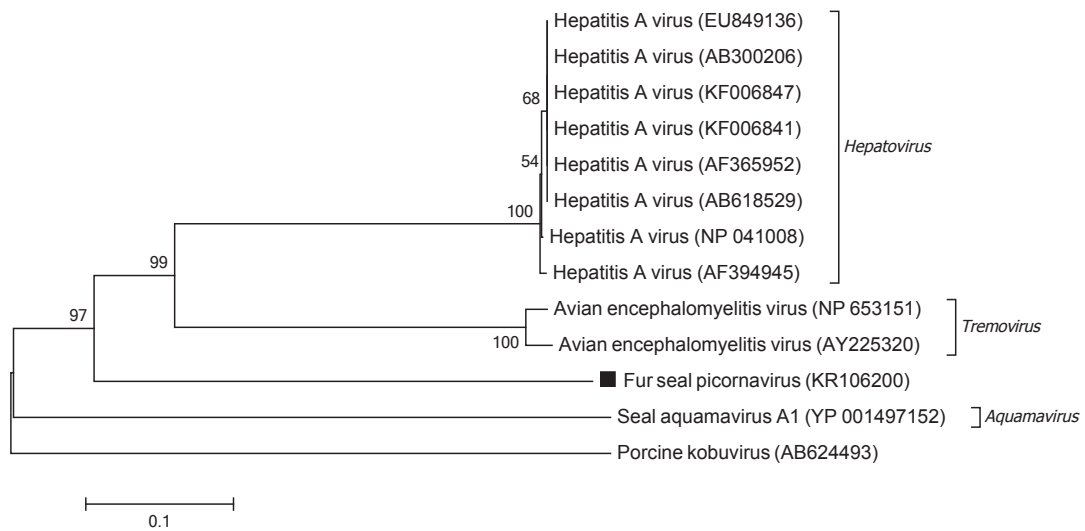


Fig. 4(a)

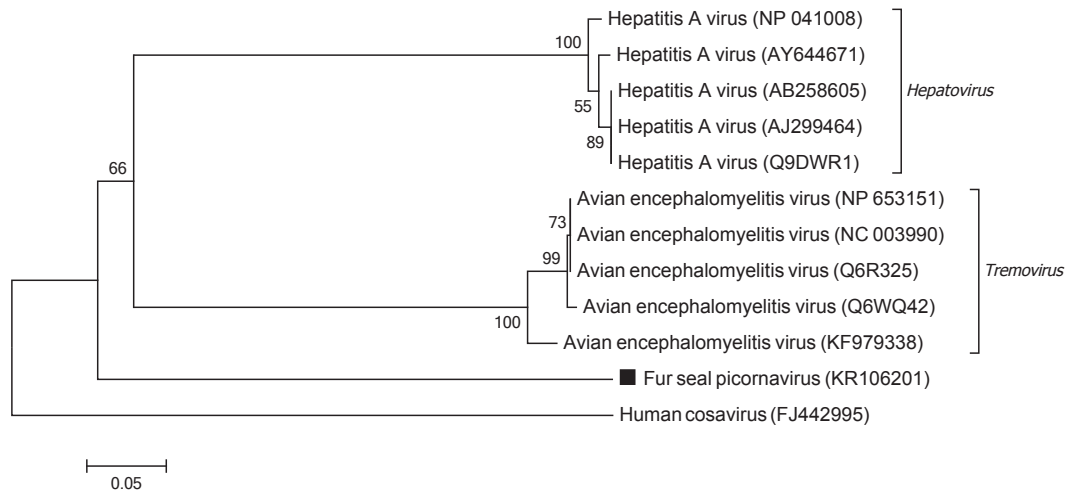


Fig. 4(b)

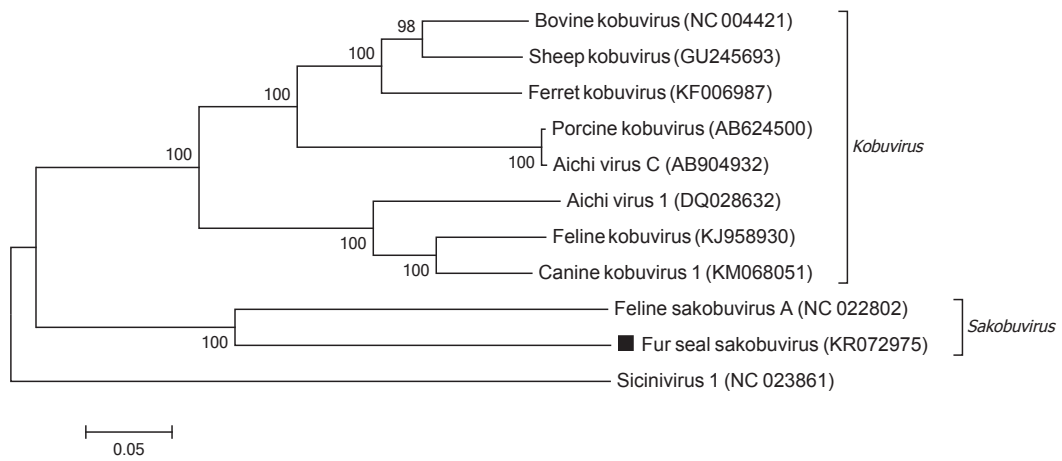


Fig. 4(c)

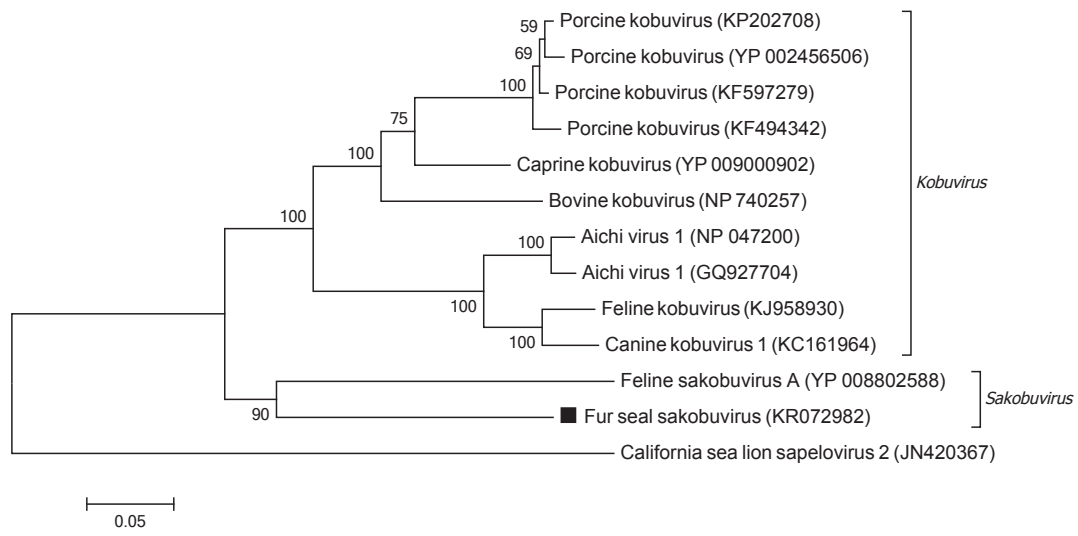


Fig. 4(d)

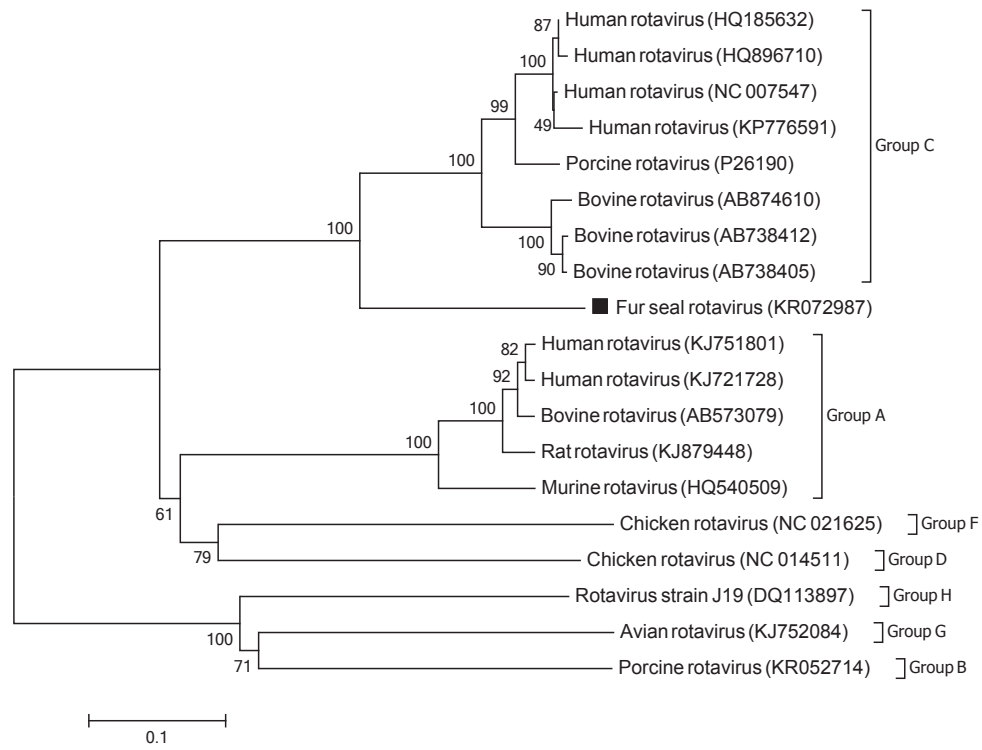


Fig. 5(b)

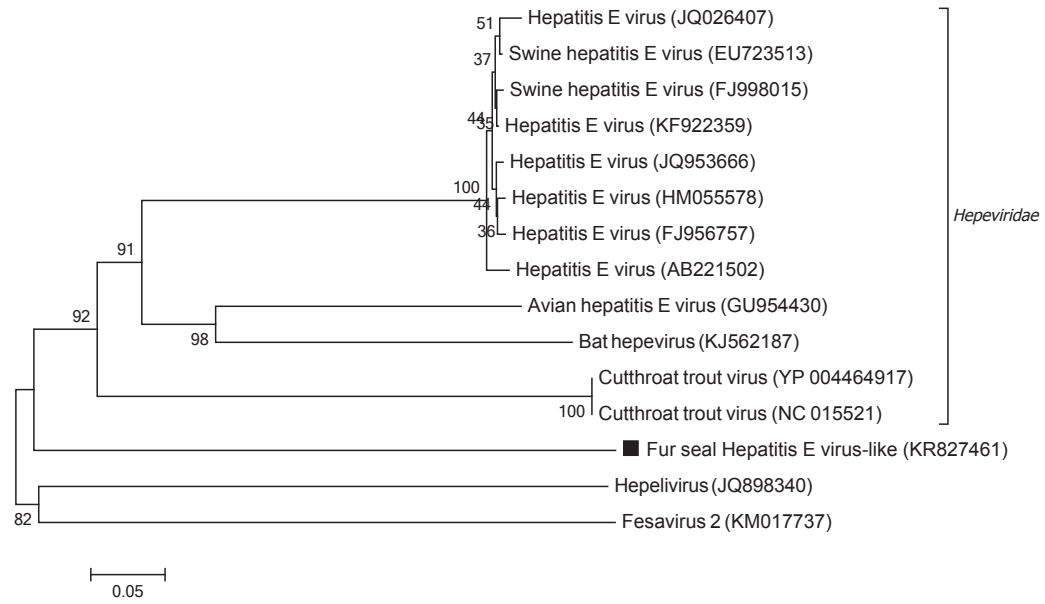


Fig. 6

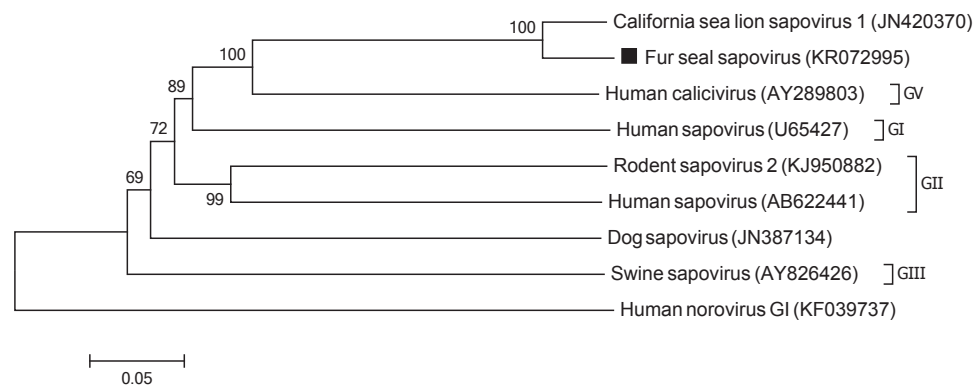


Fig. 7(a)

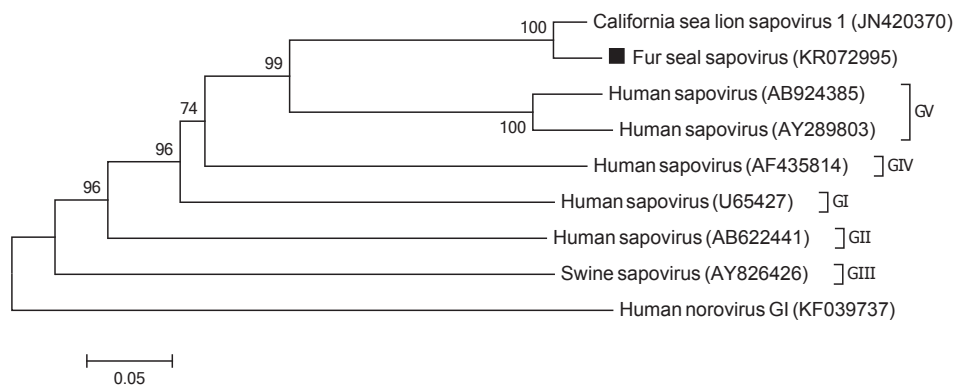


Fig. 7(b)

SUPPLEMENTARY TABLE

Table S1 - Contigs (>200bp) with significant BLASTx hits to known eukaryotic viruses

a) South American fur seal (*Arctocephalus australis*)

Contig ID	Accession number	Length (nt)	Family/Genus	Genome	Product	Best hit	Amino acid identity (%)	E-value
58	KR261062	1292	<i>Anelloviridae</i>	ssDNA	putative ORF1	ORF1 [Seal anellovirus 5] (KM262782)	35	5e-61
59	KR261063	480	<i>Anelloviridae</i>	ssDNA	putative ORF1	ORF1 [Seal anellovirus 5] (KM262782)	45	1e-14
62	KR816222	1080	<i>Anelloviridae</i>	ssDNA	putative ORF1	ORF1 [Torque teno sus virus 1a] (HM633252)	84	0.0
53	KR261066	616	<i>Parvoviridae</i> <i>Parvovirinae</i>	ssDNA	capsid protein	VP2 [Tusavirus 1] (KJ495710)	46	8e-46
54	KR261067	334	<i>Parvoviridae</i> <i>Parvovirinae</i>	ssDNA	putative capsid protein	capsid protein [Canine parvovirus 2a](HM042734)	50	2e-29
55	KR261068	460	<i>Parvoviridae</i> <i>Parvovirinae</i>	ssDNA	putative NS1	NS1 [Solwezi bufavirus] (LC011438)	43	1e-23
57	KR261070	237	<i>Parvoviridae</i> <i>Parvovirinae</i>	ssDNA	putative capsid protein	VP2 [Fox parvovirus] (KC692368)	46	3e-11
63	KR816220	344	<i>Parvoviridae</i> <i>Parvovirinae</i>	ssDNA	NS1	NS1 [Tusavirus 1] KJ495710)	82	1e-65
29	KR106194	217	<i>Picobirnavirus</i>	dsRNA	RNA-dependent RNA polymerase	RNA dependent RNA polymerase [Human picobirnavirus] (AB517735)	52	3e-13
30	KR106195	968	<i>Picobirnavirus</i>	dsRNA	RNA-dependent RNA polymerase	RNA-dependent RNA polymerase [Fox picobirnavirus] (KC692366)	71	1e-169
31	KR106196	240	<i>Picobirnavirus</i>	dsRNA	RNA-dependent RNA polymerase	putative RNA-dependent RNA polymerase [Dromedary picobirnavirus] (KM573806)	77	3e-34
33	KR106198	293	<i>Picobirnavirus</i>	dsRNA	capsid protein	hypothetical protein [Human picobirnavirus] (GU968923)	35	1e-08
64	KR816216	330	<i>Picobirnavirus</i>	dsRNA	RNA-dependent RNA polymerase	putative RNA-dependent RNA polymerase [Dromedary picobirnavirus] (KM573806)	82	3e-61
34	KR106199	561	<i>Picornaviridae</i>	+ ssRNA	polyprotein	polyprotein [Hepatitis A virus] (FJ360731)	36	3e-15
35	KR106200	707	<i>Picornaviridae</i>	+ ssRNA	polyprotein	capsid protein [Hepatitis A virus] (AF365952)	37	1e-39
36	KR106201	519	<i>Picornaviridae</i>	+ ssRNA	polyprotein	putative 3C [Avian encephalomyelitis virus] (NP_653151)	39	2e-26
37	KR106202	285	<i>Picornaviridae</i>	+ ssRNA	polyprotein	polyprotein [Bat picornavirus] (KJ641684)	38	5e-12
65	KR816213	466	<i>Picornaviridae</i>	+ ssRNA	polyprotein	1B VP2 mature peptide [Hepatitis A virus] (NP_041008)	52	2e-50
67	KR816215	318	<i>Picornaviridae</i>	+ ssRNA	polyprotein	hypothetical protein [Avian encephalomyelitis virus] (AJ006950)	32	2e-09
73	KR827461	661	<i>Hepevirus-like</i>	+ ssRNA	polyprotein	nonstructural protein [Hepatitis E virus] (JQ026407)	27	4e-07

b) Subantarctic fur seal (*Arctocephalus tropicalis*)

Contig ID	Accession number	Length (nt)	Family/Genus	Genome	Product	Best hit	Amino acid identity (%)	E-value
52	KR261065	347	<i>Anelloviridae</i>	ssDNA	putative ORF2	ORF2 [Torque teno zalophus virus 1] (NC_012126)	78	5e-18
72	KR816223	467	<i>Anelloviridae</i>	ssDNA	putative ORF2 and ORF1	ORF1 [Torque teno sus virus 1a] (HM633252)	88	4e-39
40	KR261071	1519	<i>Parvoviridae</i> <i>Parvovirinae</i>	ssDNA	capsid protein	VP2 [Tusavirus 1] (KJ495710)	39	1e-85
41	KR261072	1648	<i>Parvoviridae</i> <i>Parvovirinae</i>	ssDNA	NS1	NS1 [Miniopterus schreibersii parvovirus] (KC154061)	57	7e-131
42	KR261073	628	<i>Parvoviridae</i> <i>Parvovirinae</i>	ssDNA	NS1	nonstructural protein NS1 [Tumor virus X] (KJ631100)	44	2e-43
43	KR261074	565	<i>Parvoviridae</i> <i>Parvovirinae</i>	ssDNA	NS1	NS1 [Turkey parvovirus TP1-2012/HUN] (KF925531)	36	2e-13
44	KR261075	612	<i>Parvoviridae</i> <i>Parvovirinae</i>	ssDNA	capsid protein	putative VP1 [Tusavirus 1] (KJ495710)	39	2e-18
46	KR261077	349	<i>Parvoviridae</i> <i>Parvovirinae</i>	ssDNA	VP1	VP protein [Canine parvovirus] (KM235293)	55	2e-26
47	KR261078	957	<i>Parvoviridae</i> <i>Parvovirinae</i>	ssDNA	NS1	non-structural protein 1 [Chipmunk parvovirus] (U86868)	37	1e-26
48	KR261079	301	<i>Parvoviridae</i> <i>Parvovirinae</i>	ssDNA	capsid protein	capsid protein [Canine parvovirus 2b] (JQ730016)	53	6e-25
68	KR816217	438	<i>Parvoviridae</i> <i>Parvovirinae</i>	ssDNA	capsid protein	putative VP1 [Tusavirus 1] (KJ495710)	42	1e-18
69	KR816218	322	<i>Parvoviridae</i> <i>Parvovirinae</i>	ssDNA	capsid protein	capsid protein VP2 [Mpulungu bufavirus] (NC_026815)	36	1e-07
70	KR816221	319	<i>Parvoviridae</i> <i>Parvovirinae</i>	ssDNA	NS1	NS1 [Miniopterus schreibersii parvovirus] (KC154061)	41	1e-14
61	KR337994	438	<i>Picornaviridae</i>	+ ssRNA	polyprotein	AEV polyprotein [Avian encephalomyelitis virus] (NC_003990)	34	4e-15
12	KR072975	1271	<i>Picornaviridae</i> <i>Sakobuvirus</i>	+ ssRNA	polyprotein	polyprotein [Feline sakobuvirus A] (NC_022802)	58	6e-126
13	KR072976	477	<i>Picornaviridae</i> <i>Sakobuvirus</i>	+ ssRNA	polyprotein	polyprotein [Kobuvirus SZAL6-KoV/2011/HUN] (KJ934637)	52	4e-12
14	KR072977	289	<i>Picornaviridae</i> <i>Sakobuvirus</i>	+ ssRNA	polyprotein	polyprotein [Feline sakobuvirus A] (NC_022802)	66	3e-22
15	KR072978	273	<i>Picornaviridae</i> <i>Sakobuvirus</i>	+ ssRNA	polyprotein	VP3 [Feline sakobuvirus A] (YP_008802588)	66	1e-34
16	KR072979	227	<i>Picornaviridae</i> <i>Sakobuvirus</i>	+ ssRNA	polyprotein	VP1 [Feline sakobuvirus A] (YP_008802588)	59	2e-12
18	KR072981	466	<i>Picornaviridae</i> <i>Sakobuvirus</i>	+ ssRNA	polyprotein	2C [Feline sakobuvirus A] (YP_008802588)	59	3e-58
20	KR072982	767	<i>Picornaviridae</i> <i>Sakobuvirus</i>	+ ssRNA	polyprotein	3D [Feline sakobuvirus A] (YP_008802588)	65	3e-117

22	KR072984	430	<i>Picornaviridae Sakobuvirus</i>	+ ssRNA	polyprotein	3D [Feline sakobuvirus A] (YP_008802588)	73	1e-67
23	KR072985	469	<i>Reoviridae Rotavirus</i>	dsRNA	NSP2	nonstructural protein 2 [Bovine rotavirus C] (AB874653)	69	3e-66
24	KR072986	412	<i>Reoviridae Rotavirus</i>	dsRNA	NSP3	nonstructural protein 3 [Bovine rotavirus C] (AB874654)	45	6e-33
25	KR072987	928	<i>Reoviridae Rotavirus</i>	dsRNA	VP1	VP1 [Bovine rotavirus C] (AB738412)	69	2e-137
26	KR072988	442	<i>Reoviridae Rotavirus</i>	dsRNA	VP3	VP3 [Human rotavirus C] (HQ185645)	51	5e-41
27	KR072989	357	<i>Reoviridae Rotavirus</i>	dsRNA	VP3	viral protein 3 [Bovine rotavirus C] (AB874621)	65	6e-46
28	KR072990	360	<i>Reoviridae Rotavirus</i>	dsRNA	VP7	outer capsid protein VP7 [Human rotavirus C] (JQ177070)	59	9e-42
01	KR072991	209	<i>Caliciviridae Sapovirus</i>	+ ssRNA	polyprotein	polyprotein [California sea lion sapovirus 1] (JN420370)	96	2e-36
02	KR072992	2932	<i>Caliciviridae Sapovirus</i>	+ ssRNA	polyprotein	polyprotein [California sea lion sapovirus 1] (JN420370)	98	0.0
06	KR072994	1400	<i>Caliciviridae Sapovirus</i>	+ ssRNA	polyprotein	polyprotein [California sea lion sapovirus 1] (JN420370)	98	0.0
07	KR072995	2408	<i>Caliciviridae Sapovirus</i>	+ ssRNA	polyprotein and VP2	polyprotein [California sea lion sapovirus 1] (JN420370)	96	0.0