

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

**DETECÇÃO DE VÍRUS EM MORCEGOS NO BRASIL ATRAVÉS DO
SEQUENCIAMENTO DE ALTO DESEMPENHO**

FERNANDO FINOKETTI

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Cláudia Franco

Porto Alegre
Setembro/2018

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

**DETECÇÃO DE VÍRUS EM MORCEGOS NO BRASIL ATRAVÉS DO
SEQUENCIAMENTO DE ALTO DESEMPENHO**

Fernando Finoketti

Mestre em Microbiologia Agrícola e do
Ambiente

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola e do Ambiente da Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos
necessários à obtenção do título de Doutor em
Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Área de concentração: Virologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Cláudia Franco

Porto Alegre, Rio Grande do Sul - Brasil

Setembro/2018

CIP - Catalogação na Publicação

Finoketti, Fernando
Detecção de vírus em morcegos no Brasil através do
sequenciamento de alto desempenho / Fernando
Finoketti. -- 2019.
126 f.
Orientadora: Ana Cláudia Franco.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde,
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e
do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. Virologia. 2. Morcegos. 3. Sequenciamento de
alto desempenho. 4. Metagenômica. I. Franco, Ana
Cláudia, orient. II. Título.

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

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Jadir e Ilineta, e meu irmão Felipe, por todo amor, apoio e confiança, e que não mediram esforços para tornar esse sonho realidade, meu eterno amor e agradecimento.

A professora Ana Cláudia Franco, pela dedicação e paciência em me orientar, pelos ensinamentos compartilhados, e pela sua postura e entrega com a pesquisa e docência, sem deixar de ser uma ótima mãe, servindo de inspiração para seus alunos.

Ao professor Paulo Roehe, pela gestão e manutenção do laboratório, sempre instigando os alunos a desenvolverem uma pesquisa de qualidade e se envolverem com todos os assuntos técnicos e administrativos do laboratório.

A Dra. Helena Beatriz de Carvalho Ruthner Batista, pela confiança em mim depositada para o desenvolvimento deste projeto, e pelos sábios conselhos compartilhados desde a época da iniciação científica.

Ao Dr. Fabrício Souza Campos, pela amizade e ensinamentos desde o início da minha trajetória científica.

Aos amigos Aline Campos, André Zani e Raíssa Nunes, que estiveram presentes em todas as etapas desse projeto, pelo companheirismo, amizade e, principalmente por me aturarem nas saídas a campo.

Aos demais colegas do LabVir do ICBS/UFRGS, por todo respeito, apoio e parceria, durante esses anos de convívio.

Aos docentes do Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, por toda dedicação e gentileza no convívio dentro e fora da sala de aula.

A todos envolvidos nas coletas das amostras do Grupo de Estudos em Ecologia de Mamíferos e Educação Ambiental da Universidade Estadual de Maringá-PR e do Instituto Pasteur de São Paulo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) que financiou uma parte desse projeto, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq) pela concessão da bolsa.

DETECÇÃO DE VÍRUS EM MORCEGOS NO BRASIL ATRAVÉS DO SEQUENCIAMENTO DE ALTO DESEMPENHO

Autor: Fernando Finoketti

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Cláudia Franco

RESUMO

Os morcegos são reconhecidamente reservatórios de diversos vírus com potencial zoonótico, como o vírus da raiva e ebola. A grande diversidade ecológica, acrescida de alguns fatores fisiológicos, característicos desses animais, faz deles excelentes mecanismos de manutenção e dispersão de vírus na natureza. O crescente contato entre humanos e morcegos é uma preocupação para a saúde pública, aumentando o foco para a vigilância viral nesses animais. No Brasil, poucos estudos buscaram acessar a diversidade viral em morcegos, dificultando o trabalho de vigilância, uma vez que não são conhecidos os vírus circulantes nesses animais. Assim, o presente estudo visa acessar a diversidade viral em amostras de morcegos através do sequenciamento de alto desempenho. Foram utilizadas amostras de *swab* anal, *swab* oral e pulmão, de diferentes espécies e localidades. Após as análises dos resultados, foram identificados fragmentos de *Adenovirus*, *Papillomavirus* e *Parvovirus*, bem como dois genomas completos de duas novas espécies de *Anellovirus* e uma nova espécie de *Circovirus*. As análises filgenéticas demonstraram que um dos fragmentos de *Adenovirus* possui similaridade com o adenovírus humano tipo C, associado a doenças respiratórias. Os resultados encontrados contribuem para aumentar o conhecimento da diversidade viral, bem como reforça a importância de uma vigilância não apenas para raiva, demonstrando a possibilidade da presença de outros vírus com potencial zoonótico.

¹Tese de Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (124p.) Setembro, 2018.

DETECTION OF VIRUSES IN BRAZILLIAN BATS THROUGH HIGH THROUGHPUT SEQUENCING ¹

Author: Fernando Finoketti

Advisor: Prof. Dr. Ana Cláudia Franco

ABSTRACT

Bats are recognized as reservoirs of several viruses with zoonotic potential, such as rabies virus and ebola. The large ecological diversity, added to fisiological characteristics, typical from bats, makes them excellent mechanisms of maintenance and dispersion of viruses in nature. The increasing contact between humans and bats is a concern for public health, reinforcing the importance for viral surveillance in these animals. In Brazil, few studies have sought to access viral diversity in bats, making surveillance difficult, since the circulating viruses in these animals are still unknown. Thus, the present study aims to access viral diversity in bat samples through high throughput sequencing. Samples of different origins, species and regions were used. Following the analysis of the results, fragments of *Adenovirus*, *Papillomavirus* and *Parvovirus* were identified, as well as two complete genomes of two new species, one *Anellovirus* and one species of *Circovirus*. The phylogenetic analyzes demonstrated that one of the fragments of *Adenovirus* has similarity with the human adenovirus type C, associated to respiratory diseases. The results described here contribute to the knowledge of viral diversity, as well as reinforce the importance of surveillance not only for rabies, as long as they demonstrate the presence of other viruses with zoonotic potential in Brazilian bats.

¹Doctoral Dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (124 p.) Sptember, 2018.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo Geral	3
2.2 Objetivos Específicos	3
3 REVISÃO DA LITERATURA	4
3.1 Aspectos biológicos e ecológicos dos morcegos	4
3.2 Conceitos básicos de metagenômica	7
3.3 A relação entre vírus e morcegos	9
4 MATERIAIS E MÉTODOS	14
4.1 Swab anal e orofaríngeo	14
4.1.1 Coleta das amostras	14
4.1.2 Purificação das partículas virais	15
4.1.3 Extração de ácidos nucleicos	16
4.1.4 Enriquecimento de genomas virais	17
4.2 Amostras de pulmão	18
4.2.1 Coleta de amostras	18
4.2.2 Purificação das partículas virais	18
4.2.3 Extração de ácidos nucleicos	20
4.2.4 Enriquecimento de genomas virais	20
4.3 Sequenciamento de alto desempenho	20
4.4 Montagem e identificação de contigs	21
4.5 Análises filogenéticas	22
4.6 Biossegurança	23
5 RESULTADOS	24
5.1 Swab anal de <i>Artibeus lituratus</i>	27
5.2 Swab orofaríngeo de <i>Artibeus lituratus</i>	29
5.3 wab anal de <i>Sturnira lilium</i>	34
5.4 Swab orofaríngeo de <i>Sturnira lilium</i>	35
5.5 Pulmão de <i>Molossus molossus</i>	36
5.6 Pulmão de <i>Glossophaga soricina</i>	49
5.7 Pulmão de <i>Artibeus lituratus</i>	50
6 DISCUSSÃO	51
6.1 Metodologias empregadas	51
6.2 Panorama geral dos resultados	54
6.3 Fragmentos virais detectados	55
6.3.1 <i>Adenoviridae</i>	55
6.3.2 <i>Anelloviridae</i>	59
6.3.3 <i>Circoviridae</i>	61
6.3.4 <i>Papillomaviridae</i>	63
6.3.5 <i>Parvoviridae</i>	65
7 CONCLUSÃO	67
8 REFERÊNCIAS	68
9 APÊNDICES	81
9.1 Sequências geradas	81
9.2 Artigo submetido à <i>Archives of virology</i>	89
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	x
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	viii

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1: Diversidade dos <i>pools</i> sequenciados expressos em porcentagem e analisados no <i>software taxonomer</i>	24
Tabela 2: Números totais de reads e contigs.....	25
Tabela 3: Resumo dos <i>contigs</i> virais identificados no trabalho.....	26
Tabela 4: Resumo dos <i>contigs</i> de papilomavírus identificados em pulmão de <i>Glossophaga soricina</i>	50

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Localização do Parque Ingá.....	14
Figura 2: Resumo do fluxograma do processamento dos <i>swabs</i>	16
Figura 3: Resumo do fluxograma do processamento dos pulmões.....	19
Figura 4: Resumo do fluxograma do processamento das <i>reads</i> e análises dos <i>contigs</i>	22
Figura 5: Árvore filogenética do <i>Artibeus lituratus papillomavirus</i>	28
Figura 6: Árvore filogenética do <i>Artibeus lituratus adenovirus</i>	30
Figura 7: Árvore filogenética da NS1 do <i>Artibeus lituratus parvovirus</i>	32
Figura 8: Árvore filogenética da proteína do capsídeo do <i>Artibeus lituratus parvovirus</i>	33
Figura 9: Árvore filogenética do <i>Sturnira lilium adenovirus</i>	35
Figura 10: Representação do genoma completo do <i>Torque teno virus Molossus molossus 1</i>	37
Figura 11: Representação do genoma completo do <i>Torque teno virus Molossus molossus 2</i>	38
Figura 12: Árvore filogenética da sequência de nt do gene da ORF1 de membros da família <i>Anelloviridae</i>	40
Figura 13: Árvore filogenética da sequência de aa do gene da ORF1 de membros da família <i>Anelloviridae</i>	41
Figura 14: Matriz de identidade dos <i>Anelovirus</i>	42
Figura 15: Representação do genoma completo do <i>Molossus molossus circovirus</i>	43
Figura 16: Representação da Rep do <i>Molossus molossus circovirus</i>	44
Figura 17: Árvore filogenética do genoma completo de membros da família <i>Circoviridae</i>	45
Figura 18: Árvore filogenética da sequência de nt do gene da proteína Rep de membros da família <i>Circoviridae</i>	46
Figura 19: Árvore filogenética da sequência de aa da proteína Rep de membros da família <i>Circoviridae</i>	48
Figura 20: Matriz de identidade dos <i>Circovirus</i>	49
Figura 21: Árvore filogenética do gênero <i>Mastadenovirus</i>	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AdV	Adenovírus
AIAdV	<i>A. lituratus adenovirus</i>
AIPrV	<i>A. lituratus parvovirus</i>
AIPV	<i>A. lituratus papillomavirus</i>
AL P	Pulmão de <i>A. lituratus</i>
BatAdv	Adevonírus de morcegos
CAdv	Adenovírus canino
Cap	Proteína do capsídeo
CoV	Coronavírus
CV	<i>Circovirus</i>
EBOV	Ebola vírus
GS P	Pulmão de <i>Glossophaga soricina</i>
HAdv	Adenovírus humano
HeV	Hendra vírus
ICTV	Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus
MERS-CoV	Coronavírus da Síndrome respiratória do Oriente Médio
MmCv	<i>Molossus molossus circovirus</i>
MM P	Pulmão de <i>Molossus molossus</i>
NiV	Nipah vírus
NS1	Proteína não-estrutural 1
PrV	Parvovírus
PV	Papilomavírus
RABV	Vírus da raiva
SAAL	Swab anal de <i>Artibeus lituratus</i>
SARS-CoV	Coronavírus da síndrome respiratória aguda grave
SASL	Swab anal de <i>Sturnira liliun</i>
SIAdV	<i>Sturnira liliun adenovirus</i>
SOAL	Swab orofaríngeo de <i>A. lituratus</i>
SOSL	Swab orofaríngeo de <i>S. liliun</i> ;
TTGsV	<i>Torque teno G. soricina virus</i>
TTVMm	<i>Torque teno virus Molossus molossus</i>

1. INTRODUÇÃO

Os morcegos são mamíferos pertencentes a ordem *Chiroptera* com adaptações morfológicas e fisiológicas que permitem o voo. Tais características facilitaram a ampla distribuição desses animais pelo mundo. Eles apresentam funções ecológicas importantes para a manutenção dos ecossistemas, como dispersão de sementes, polinização de flores e controle de insetos (Calisher et al., 2006). Apesar do destacado papel dos morcegos no equilíbrio ecológico, a importância destes mamíferos como fonte de infecção de diferentes agentes infecciosos, principalmente vírus, representa uma preocupação em saúde pública. Os primeiros trabalhos que descreveram a interação entre morcegos e vírus tiveram como principal foco o vírus da raiva (RABV) e outros lissavírus relacionados (Baer & Lentz, 1991). A raiva é uma zoonose fatal de distribuição mundial e os morcegos se mantêm como principais reservatórios do RABV, porém sabe-se que estes mamíferos podem albergar outros vírus. Até o momento mais de 200 espécies de vírus foram identificadas em diversas espécies de morcegos em todo o mundo (Moratelli & Calisher, 2015).

Além do RABV, outros vírus agentes causadores de doenças importantes para humanos e animais já foram isolados ou detectados em morcegos. Como por exemplo, os membros da família *Coronaviridae*, que podem causar a síndrome respiratória aguda grave (SARS) e a síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS) em seres humanos. Os morcegos são reconhecidos como reservatórios dos vírus causadores de ambas as síndromes, e o RNA desses vírus já foi detectado por RT-PCR nesses animais (Poon et al., 2005; Memish et al., 2013). Em 2016, SARS CoV-like e MERS CoV-like foram detectados em amostras de fezes de diferentes espécies de morcegos na Coreia do Sul (Kim et al., 2016), e outros coronavírus sem associação à doença foram detectados em diferentes espécies de morcegos em Cingapura e Canadá (Misra et al., 2009; Mendenhall et al., 2016). Além desses, já foram detectados em morcegos filovírus, alfavírus, flavivírus, herpesvirus e bunivírus, no entanto a real importância destes animais como reservatórios e/ou transmissores destes vírus ainda é desconhecida (Leroy et al., 2005; Calisher et al., 2006;).

No Brasil, cerca de 30% (aproximadamente 140) das espécies de

mamíferos são de morcegos, que estão amplamente distribuídas pelo território nacional (Fenton & Simmons, 2015). Os estudos realizados no Brasil descrevem a presença de sete linhagens distintas do RABV presente em aproximadamente 30% das diferentes espécies de morcegos relatadas no país (Oliveira et al., 2010; Sodré et al., 2010). Além disso, diferentes coronavírus já foram identificados em amostras de conteúdo entérico e fezes de 6 espécies de morcegos oriundas de distintas localidades (Brandão et al., 2008; Lima et al., 2013a; Asano et al., 2016). Ainda, foram identificados em amostras brasileiras de morcegos dois novos poliomavírus (de Sales Lima et al., 2015a), novos vírus com ssDNA circular (de Sales Lima, et al., 2015b), um novo anelovírus (Cibulski, et al. 2014) e um adenovírus (Lima et al., 2013b).

Em sua maioria, os estudos mencionados anteriormente utilizaram técnicas para identificação específica de determinada espécie, gênero ou família de vírus. Assim, a verdadeira diversidade viral em amostras de morcegos é subestimada. Uma melhor abordagem desta diversidade pode ser realizada através da metagenômica, ferramenta mais abrangente para a detecção do genoma de agentes infecciosos conhecidos ou não, em amostras clínicas ou ambientais. Através da metagenômica, novos vírus pertencentes a diversos gêneros foram identificados, como por exemplo, membros dos gêneros *Astrovirus* (Chu et al., 2008; Zhu et al., 2009), *Herpesvirus* (Molnár et al., 2008; Sano, 2015; Zheng et al., 2016a), *Lyssavirus* (Loza–Rubio et al., 2005; Hayman et al., 2011), e *Polyomavirus* (Kobayashi et al., 2015). Porém, poucos estudos utilizaram o sequenciamento de alto desempenho como ferramenta para a identificação de genomas em amostras de morcegos no Brasil. (de Sales Lima et al., 2015a; Simas, 2015)

Dessa forma, a diversidade viral em amostras de morcegos é ainda pouco conhecida, o que dificulta a adoção de estratégias de combate a viroses emergentes. É necessário um esforço maior na detecção e identificação de agentes infecciosos nestes animais silvestres, para correlacionar vírus emergentes potenciais causadores de infecções zoonóticas e seus respectivos reservatórios. Assim, será possível contribuir para a adoção de medidas necessárias para a identificação, monitoramento, prevenção, controle e redução de risco de possíveis surtos relacionados a essas espécies.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Amplificar o conhecimento acerca da diversidade viral em amostras biológicas de morcegos utilizando o sequenciamento de alto desempenho.

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Análise comparativa das sequencias virais obtidas com sequencias depositadas em bancos de dados.

2.2.2 Análises filogenéticas com base no alinhamento dos *contigs* gerados e banco de dados.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Aspectos biológicos e ecológicos dos morcegos.

Atualmente existem mais de 1300 espécies de morcegos já identificadas. Estes animais, pertencentes a ordem *Chiroptera*, formam a segunda maior ordem em número de diversidade de espécies dentro da classe *Mammalia*, sendo superada apenas pelos roedores (Ordem *Rodentia*). Essa diversidade de espécies é agrupada em 21 famílias, distribuídas em duas subordens: *Yinpterochiroptera* (Pteropodiformes) e *Yangochiroptera* (Vespertilioniformes). A subordem *Yinpterochiroptera* é formada pela família *Pteropodidae* (antiga subordem *Megachiroptera*) e a superfamília *Rhinolophoidea* (formada pelas famílias *Rhinolophidae*, *Hipposideridae*, *Rhinonycteridae*, *Rhinopomatidae*, *Megadermatidae* e *Craseonycteridae*); enquanto que a subordem *Yangochiroptera* é formada por 3 superfamílias: *Noctilionoidea* (famílias *Mystacinidae*, *Furipteridae*, *Noctilionidae*, *Thyropteridae*, *Mormoopidae*, e *Phyllostomidae*), *Emballonuroidea* (famílias *Emballonuridae*, *Nycteridae* e *Myzopodidae*) e *Vespertilionoidea* (famílias *Molossidae*, *Vespertilionidae*, *Miniopteridae*, *Natalidae* e *Cistugidae*) (Amadoret al., 2016; Sotero-Caio et al., 2017).

A grande característica que agrupa e distingue os morcegos de outros mamíferos é a capacidade de voar. Essa singularidade contribuiu para que os morcegos ocupem quase a totalidade do espaço terrestre, com exceção das regiões polares e algumas ilhas oceânicas. Também, a evolução para o voo pode ter influenciado alguns aspectos da evolução do sistema imune inato desses animais. Estudos genéticos demonstraram que, mesmo em espécies distantes evolutivamente, existe uma seleção positiva de genes relacionados ao reparo e controle da transcrição do DNA, gerando hipóteses de que os morcegos podem controlar a replicação viral de forma diferente de outros mamíferos. Além disso, a alta taxa metabólica e o aumento da temperatura corporal semelhante a uma resposta febril durante o voo dificultam a replicação de agentes infecciosos sensíveis a temperatura (O'Shea et al. 2014, Brook & Dobson, 2015).

A grande diversidade de espécies reflete uma ampla variedade de características biológicas e ecológicas, tornando os morcegos peças fundamentais de diferentes ecossistemas. Essa importância se dá principalmente por meio da

diversidade de alimentação desses animais que, diferente da presunção popular de que os morcegos se alimentam apenas de sangue, possuem hábitos distintos, variando entre insetívoros, nectarívoros, frutívoros, carnívoros e hematófagos. Dessa forma, os morcegos auxiliam no reflorestamento através da polinização de diversas espécies de plantas, e/ou da dispersão de sementes; no controle de insetos, que muitas vezes são nocivos aos seres humanos ou pragas para a produção agrícola; e seu guano, por ser rico em nitrogênio, pode ser utilizado como um fertilizante natural (Maas et al., 2015).

Embora os hábitos alimentares não estejam relacionados com a diversidade de patógenos presentes nos morcegos, eles estão relacionados com a possibilidade de transmissão desses agentes para outros animais. Apenas as três espécies hematófagas (*Desmodus rotundus*, *Diphylla ecaudata* e *Diaemus youngi*) transmitem vírus diretamente através da sua alimentação, devido ao contato da sua saliva com o sangue do animal. Por outro lado, as espécies frutívoras estão relacionadas com uma transmissão indireta, através de restos de frutos contaminados com salivas e/ou urina consumidos por outros animais. Além disso, a busca por alimento pode intensificar o contato desses animais com seres humanos, podendo ocasionar um contato acidental e a transmissão direta de patógenos. (Neuweiler, 2000; Serra-Cobo & López-Roig, 2016).

A maioria das espécies de morcegos possui hábitos noturnos, fazendo com que esses animais procurem abrigo da claridade durante o dia. Esses abrigos podem ser em troncos ocos de árvores, cavernas, fendas de rochas, folhas grandes de plantas, e construções feitas pelo homem (como pontes, minas, casas abandonadas, forro de edificações, caixa de ar condicionado, celeiros, estrebarias, etc). As colônias formadas nesses abrigos podem conter de dezenas até milhares de indivíduos podendo, inclusive, abrigar diferentes espécies. Essa superlotação de abrigos somada a hábitos sócias, como lambeduras, relações mútuas e mordidas durante a cópula, facilitam a transmissão de microrganismos entre eles, aumentando a capacidade de manutenção de agentes infecciosos no ambiente. Da mesma forma, a ocupação de abrigos construídos por humanos aumenta o risco de infecções zoonóticas de forma direta ou indireta. Na maioria das vezes, a falta de informações sobre esses animais acaba gerando uma forma equivocada de manuseio de colônias ou indivíduos em edificações ocupadas. Na tentativa de eliminar a presença desses indesejáveis

inquilinos, muitas pessoas tentam capturá-los ou espantá-los sem os devidos equipamentos de proteção, sujeitando-se a mordidas ou contato com urina e fezes. Da mesma forma, animais de estimação podem entrar em contato com essas fontes de infecções e posteriormente transmitir para seres humanos (Serra-Cobo & López-Roig, 2016).

Os morcegos, em sua maioria, são animais de pequeno porte e apresentam uma vida longa em relação a outros mamíferos de tamanho semelhante, como ratos e musaranhos. A longevidade desses animais pode variar drasticamente entre as espécies, como por exemplo, em *Pipistrellus khulii*, *Rhinolophus ferrumequinum* e *Myotis brandtii*, com relatos de espécimes vivendo 8, 17 e 41 anos, respectivamente. Dessa forma, a longa expectativa de vida somada a possibilidade de desenvolvimento de infecções persistentes favorece a manutenção de vírus nesses animais (Wilkinson & South 2002; Podlutzky et al., 2005).

Dependendo do hábitat em que a espécie de morcego está inserido, pode haver variações sazonais de temperatura e disponibilidade de recursos. Por isso, diferentes estratégias são utilizadas para a manutenção da espécie no ambiente. Os morcegos podem utilizar a migração sazonal, a hibernação ou o torpor diário, para enfrentar essas adversidades. A primeira estratégia permite a busca de fontes de alimento em outras localidades, bem como temperaturas mais próximas das ideais para a espécie. Com isso, os vírus podem ser carregados e transmitidos para outros indivíduos ou espécies em regiões geográficas distantes. As outras duas estratégias têm por objetivo o gasto mínimo de energia, diminuindo o metabolismo e consequentemente baixando a temperatura corporal. A hibernação consiste em longos períodos da manutenção desse estado basal reduzido do metabolismo, enquanto que no torpor diário o animal alterna períodos de atividade com períodos de conservação de energia, variando entre horas e dias. Dessa forma, o sistema imune dessas espécies sofre uma leve imunossupressão, o que facilita o desenvolvimento de infecções persistentes (Calisher et al., 2006; Allocati et al., 2016). Todas essas características fazem dos morcegos importantes objetos de estudo para a compreensão da dinâmica de manutenção e dispersão de vírus com potencial zoonótico no ambiente.

3.2 Conceitos básicos de metagenômica.

O termo “metagenoma” surgiu em 1998, quando Handelsman (1998) e colaboradores descreveram a importância dos microrganismos do solo como fontes de novos compostos naturais através dos genomas presentes na amostra. Dessa forma, a metagenômica é definida como sendo uma análise funcional de uma comunidade microbiana com base nos genomas dos microrganismos detectados na amostra. Esse novo conceito abriu caminhos para a prospecção de novos microrganismos que não são cultiváveis em condições laboratoriais (Sleator et al., 2008). Duas abordagens distintas podem ser realizadas: a metagenômica estrutural, na qual o foco principal é estudar a composição populacional e sua dinâmica em um ecossistema específico (Handelsman, 2005; Tringe et al., 2005); e a metagenômica funcional, que visa identificar genes que codificam uma função de interesse, que envolve a geração de bibliotecas de expressão com milhares de clones metagenômicos seguidos por triagens baseadas em atividade (Vieites et al., 2009; Schmeisser et al., 2007). É importante salientar que a utilização do termo “metagenômica” na análise de fragmentos de genes que funcionam como marcadores, como por exemplo, o gene que codifica a subunidade 16S do RNA ribossomal, apesar de ser amplamente utilizada, está equivocada. Neste tipo de análise se avalia um gene marcador presente no genoma das bactérias e não o genoma completo dos microrganismos (Alves et al., 2018).

Os primeiros estudos metagenômicos envolviam a tecnologia de sequenciamentos de Sanger, e necessitavam a clonagem dos fragmentos de ácidos nucléicos extraídos da amostra (Schloss & Handelsman, 2003; Riesenfeld et al., 2004). Com isso, aumentava o tempo total de execução do protocolo por incluir passos que dispendem um trabalho e um tempo maior. Mesmo assim, a quantidade de novos genes e microrganismos descobertos com essa técnica revolucionou a microbiologia (Venter et al., 2004). Com o avanço das tecnologias de sequenciamento, atualmente o passo da clonagem já não é mais necessário. O sequenciamento de alto desempenho, quando comparado ao método de Sanger, gera um volume de dados muito superior, em menos tempo e com um custo relativamente menor (Kircher & Kelso, 2010).

Os vírus apresentam uma grande diversidade na natureza, organização e

sequencia nucleotídica de seu genoma, nas proteínas codificadas, nos mecanismos de replicação e nas interações com hospedeiros, o que permite estarem presentes em todos os ambientes. Apesar dessa ubiquidade, as pesquisas iniciais focavam em vírus causadores de doenças em humanos, em animais domésticos e de criação, e em plantas, principalmente quando perdas econômicas estão envolvidas. Com o desenvolvimento das metodologias de metagenômica os virologistas ganharam uma ferramenta para explorar a diversidade viral em qualquer ambiente. Dessa forma, passaram a prospectar genomas virais em ambientes marinhos, terrestres e animais selvagens também, podendo elucidar ainda mais a ecologia e evolução viral (Roossinck, 2015).

O primeiro estudo a explorar o viroma (metagenoma viral) foi realizado em ambiente marinho, com foco em bacteriófagos (Breitbart et al., 2002). Com o passar dos anos, outras amostras demonstraram-se fontes valiosas para a detecção de novos vírus, como por exemplo em animais silvestres (Shi et al., 2016; Berto et al., 2018; Williams et al., 2018) e invertebrados (Webster et al., 2015; Tokarzet al., 2018, Roberts et al., 2018). Porém, os vírus não possuem um gene marcador presente em todas as famílias virais, e necessitam de uma estratégia diferenciada para acessar a diversidade genômica. A estratégia mais utilizada é a amplificação randômica do material genético, que apresenta a amplificação de genomas do hospedeiro e de outros microrganismos como um viés. Dessa maneira é necessário isolar apenas as partículas virais presentes na amostra para obter-se um resultado de qualidade (Conceição-Neto et al., 2015; Temmam et al., 2015; Kluge et al., 2016).

A partir do sequenciamento de alto desempenho é gerada uma grande quantidade de dados, denominados de *reads*, que nada mais são do que sequencias curtas de DNA (entre 100 – 500 pares de bases dependendo da plataforma utilizada). As *reads* representam os genomas extraídos e amplificados, e necessitam de uma análise detalhada para a correta identificação dos diferentes genomas presentes na amostra. O primeiro passo da análise consiste na avaliação da qualidade das *reads*. Para isso é utilizado o *Phred score* (Q) que estima a probabilidade de erro de cada base de nucleotídeos. Por exemplo, Q = 20 significa que a probabilidade dos nucleotídeos estarem corretos é de 99 %. Após a análise da qualidade é feita a trimagem, que consiste em selecionar as *reads* pela sua qualidade (ex.: Q > 20) e remover os *primers* e adaptadores utilizados para a realização do sequenciamento.

Após essa limpeza é feita a montagem dos *contigs* (sequências maiores geradas a partir da ligação de duas ou mais *reads*). O passo final da análise é a identificação dos *contigs*, realizando a classificação taxonômica, predição de fases abertas de leitura (ORF, do inglês *open reading frames*), anotação de genes e análises filgenéticas (Hurwitz et al., 2016).

A correta classificação dos genomas encontrados através da análise do viroma é um grande desafio, primeiro pela detecção de vírus ainda sem nenhum correspondente nos bancos de dados, e segundo pelos critérios de classificação do Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV, do inglês *International Committee on Taxonomy of Viruses*). Muitos vírus descobertos possuem apenas seu genoma conhecido e os critérios utilizados antigamente exigiam informações substanciais sobre a variedade de hospedeiro, o ciclo de replicação e a estrutura e propriedades das partículas de vírus. Contudo, as sequências dos genomas fornecem vários critérios que podem ser utilizados para a classificação taxonômica, como por exemplo relações evolutivas, organização geral do genoma (conteúdo e ordem dos genes, prováveis proteínas codificadas, presença de sequências repetidas, características da expressão genômica, estratégia de replicação do genoma, presença ou ausência de *motifs*), podendo ser usadas como fonte na classificação em gênero e espécie (Simmonds et al., 2017).

3.3 A relação entre vírus e morcegos

As características evolutivas e ecológicas fazem dos morcegos importantes fontes de estudos de detecção de vírus. Mais de 200 vírus de 28 famílias foram isolados ou detectados em 37 gêneros de morcegos distintos, muitos deles relacionados a doenças infecciosas emergentes com potencial de cruzar as barreiras de espécies e infectar outros animais (Calisher et al., 2006; Hayman et al., 2013; Moratelli & Calisher 2015; Allocati et al., 2016). No entanto, a grande maioria destes vírus não estão relacionados com patologias nos morcegos. Assim, estes animais exercem um papel importante na dinâmica dos vírus no ambiente atuando como reservatórios e possíveis fontes de infecções de outros animais (O'Shea et al., 2014).

Os principais vírus associados a patologias em humanos que tem origem em morcegos possuem o material genético composto por RNA. O primeiro vírus

associado a morcegos foi o vírus da raiva (RABV, do inglês *Rabies lyssavirus*). Este vírus pertence a ordem *Mononegavirales*, família *Lyssavirus*, que compreende 16 espécies (existem duas espécies relacionadas a *Lyssavirus* mas ainda sem classificação) de vírus envelopados com genoma composto por uma fita simples de RNA (ssRNA, do inglês *single-strand RNA*) de polaridade negativa. Destas, 14 já foram detectadas em diferentes espécies de morcegos e estudos filogenéticos sugerem que todas têm origem em morcegos (Badrane & Tordo, 2001; Kuzmin et al., 2010; Banyard et al., 2011). O RABV é o principal representante da família, e é responsável pela morte de aproximadamente 59.000 pessoas por ano, no qual 95 % dos casos ocorrem na África e Ásia. A principal fonte de infecção é mordida de cães (WHO, 2018), no entanto, em países onde a raiva em carnívoros é controlada através da vacinação, os morcegos destacam-se como as principais fontes de infecção, na maioria das vezes por mordidas acidentais devido à falta de informação sobre a manipulação e os riscos que estes animais apresentam (Begeman et al., 2018).

Outros dois membros da ordem *Mononegavirales* apresentam uma alta patogenicidade para humanos e tem origem em morcegos: Hendra vírus (HeV) e Nipah vírus (NiV). Também são vírus envelopados com genoma composto por ssRNA de polaridade negativa. Atualmente são os únicos vírus zoonóticos altamente patogênicos dentro da família *Paramyxoviridae*. O primeiro caso de HeV data de 1994, quando duas pessoas que tiveram contato com cavalos doentes desenvolveram uma doença respiratória, levando ao óbito de um dos pacientes (Murray et al., 1995). Já a descoberta do NiV data de 1998, após um surto de encefalites em humanos após contatos com suínos doentes (Chua et al., 2000). Vários estudos demonstraram a presença do vírus, ou anticorpos contra os vírus, em morcegos de diferentes espécies, sendo a maioria do gênero *Pteropus*. Diferente dos *Lyssavirus*, HeV e NiV apresentam uma distribuição limitada a parte da África, Ásia e Oceania. A transmissão para humanos ocorre de maneira direta através do contato com morcegos ou, como na maioria dos casos, de forma indireta através do contato com animais de criação infectados ou por ingestão de alimentos contaminados com urina ou saliva (Enchéry & Horvat, 2017).

Ainda dentro da ordem *Mononegavirales* encontrar-se o vírus Ebola (EBOV), pertencente à família *Filoviridae*, gênero *Ebolavirus*. São vírus envelopados com genoma composto por ssRNA de polaridade negativa e atualmente são

reconhecidas cinco espécies virais que apresentam uma taxa de mortalidade entre 25 % e 90 % conforme a espécie. Os primeiros relatos de EBOV datam de 1976, e desde então esse vírus é responsável por vários surtos de febre hemorrágica ocorridos na África Central. Os primeiros indícios de morcegos como reservatórios de EBOV foram demonstrados em 2005 com a detecção de RNA viral em morcegos saudáveis, e atualmente diversas espécies são consideradas reservatórios do vírus. (Hassanin et al., 2016). Porém, uma ligação direta entre os surtos e a infecção por morcegos ainda não foi elucidada. Em Dezembro de 2013 iniciou-se um surto que atingiu vários países da África Ocidental, o qual acredita-se que teve como caso inicial uma criança que brincava numa árvore aonde havia uma colônia de *Mops condylurus*, espécie a qual já foi demonstrada sobreviver a infecções experimentais de EBOV (Swanepoel, 1996; Saéz, 2015).

Além dos membros da ordem *Mononegavirales*, dois membros da ordem *Nidovirales* representam uma ameaça para humanos, são eles: coronavírus da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV) e coronavírus da síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV). Ambos pertencem à família *Coronaviridae*, subfamília *Coronavirinae*, gênero *Betacoronavirus*. São vírus envelopados e apresentam o genoma composto por ssRNA de polaridade positiva. O SARS-CoV foi o agente responsável pelo surto da síndrome respiratória aguda grave (SARS) ocorrido em 2002-2003, a primeira pandemia humana do século XXI com aproximadamente 8000 casos dos quais 800 resultaram em mortes em todo o mundo (Chinese, 2004). Descoberto em 2012, o MERS-CoV infectou mais de 2.000 pessoas apresentando uma taxa de mortalidade de aproximadamente 35% (Zaki et al., 2012; WHO, 2018;). Acredita-se que os morcegos tenham papel fundamental na ecologia destes vírus. Já foi demonstrado que o SARS-CoV apresenta os morcegos como reservatórios, e ambos vem co-evoluindo há muito tempo, sugerindo que o SARS-CoV tenha origem em morcegos (Hu et al., 2018). Já a origem do MERS-CoV ainda não está elucidada, mas acredita-se que o vírus tenha sido originado em morcegos e transmitidos para humanos após vários eventos de quebra da barreira de espécies, infectando dromedários (Letko, 2018). Com esses achados, a detecção de coronavírus em morcegos foi impulsionada, e diversos coronavírus relacionados com SARS-CoV e MERS-CoV foram detectados em diversas espécies de morcegos e em diferentes países (Hu et al., 2018)

Outros vírus com potencial zoonótico já foram identificados em morcegos, porém seu papel na dinâmica viral ainda permanece desconhecido. Como o caso dos novos vírus influenza H17N10, descoberto em *Sturnira lilium* na Guatemala, e H18N11 em *Artibeus planirostris* no Peru (Tong et al., 2012; Tong et al., 2013). Contudo, ainda não se sabe o potencial de rearranjo destas linhagens com outras já conhecidas e nem o papel dos morcegos na evolução desses vírus (Kuchipudi & Nissly, 2018).

Com o desenvolvimento das técnicas aplicadas à metagenômica uma grande quantidade de novos vírus vem sendo identificados em morcegos. Em 2010 Donaldson e colaboradores desenvolveram um projeto abrangendo sete espécies de morcegos e diferentes tipos de amostras (urina, fezes e *swab* oral). Nesse estudo foram detectados coronavírus, dois novos bacteriófagos e herpesvírus, além de diversos vírus relacionados a plantas e insetos (Donaldson et al., 2010). Em 2013, Baker e colaboradores coletaram urina da espécie *Eidolon helvum* de duas colônias em Gana. Com a análise de metagenômica puderam identificar membros de diferentes famílias virais: *Adenoviridae*, *Herpesviridae*, *Parvoviridae*, *Picornaviridae*, *Polyomaviridae* e *Papillomaviridae*. Porém, o achado mais interessante desse estudo foi a descoberta de um poxvírus relacionado ao vírus do molusco contagioso, que infecta humanos causando uma doença dermatológica (Baker et al., 2013). Em 2016, Kim e colaboradores realizaram um estudo metagenômico de diferentes espécies de morcegos na Coreia. Os pesquisadores detectaram diversos coronavírus relacionados ao SARS-CoV e MERS-CoV, além de um rotavírus do grupo H, reforçando a necessidade de vigilância desses animais (Kim et al., 2016). Recentemente, foram detectados membros das famílias *Adenoviridae*, *Coronaviridae*, *Herpesviridae*, *Parvoviridae*, *Papillomaviridae*, *Phenuiviridae*, e *Picornaviridae*, além de uma nova espécie da família *Circoviridae*, em morcegos do gênero *Neoromicia* na África do Sul (Geldenhuis et al., 2018).

No Brasil, estima-se a ocorrência de aproximadamente 180 espécies de morcegos. Os estudos desenvolvidos até o momento visaram a detecção de agentes virais específicos através de reações em cadeia da polimerase (PCR) e suas variações, específicas para determinados vírus. Além disso, o principal foco é o RABV, sendo o único vírus abrangido por um sistema de vigilância (Ribeiro et al., 2018). Os coronavírus também já foram objetos de estudo em morcegos brasileiros. Estes vírus já foram detectados em *Desmodus rotundus* (Brandão et al., 2008), em *Molossus*

molossus e *Tadarida brasiliensis* (Lima et al., 2013a), em membros das famílias *Molossidae* e *Phyllostomidae* (Asano et al., 2016) e em *Artibeus lituratus*, *Carollia perspicillata*, *Eumops glaucinus*, *Glossophaga soricina*, *Molossus rufus*, *Myotis nigricans*, *Myotis riparius* e *Sturnira lilium* (Goés et al., 2016). Esses dados demonstram uma grande variedade genômica entre as amostras e sugerem uma possível transmissão entre as espécies. Adicionalmente, um adenovírus, detectado em *D. rotundus*, formou um clado monofilético quando comparado a outras sequências de adenovírus de morcegos, podendo se tratar, assim, de uma nova espécie (Lima et al., 2013b). Dois genomas completos de *Polyomavírus* também foram detectados em *Tadarida brasiliensis*. As análises do genoma concluíram que se tratavam de duas espécies distintas infectando a mesma espécie, contribuindo para uma melhor compreensão da evolução desses vírus (de Sales Lima et al., 2015a). Ainda, novas espécies de *Anellovirus* e *Circovirus* foram detectadas em amostras de morcegos insetívoros (Cibulski et al., 2014; de Sales Lima et al., 2015b). Por fim, recentemente foi comprovada a infecção natural de morcegos por hantavírus (Sabino-Santos Jr et al., 2018). Até o presente, apenas um estudo buscou elucidar o viroma de morcegos no Brasil. Em 2015, Simas e colaboradores realizaram um estudo metagenômico em amostras de *swabs* anal e traqueal de *T. brasiliensis*. A diversidade viral encontrada foi elevada, porém, os autores não realizaram uma conferência manual adequada, podendo assim ter gerado um viés nas análises (Simas, 2015).

É indiscutível a importância dos morcegos na ecologia de diversas famílias virais. Até o momento, os dados presentes no Brasil não refletem a verdadeira diversidade viral, uma vez que a maioria dos trabalhos buscou vírus específicos. É importante conhecer os possíveis vírus com potencial zoonótico nesses animais bem como compreender a dinâmica da relação entre morcegos e outras espécies animais, incluindo humanos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

A metodologia empregada no desenvolvimento do trabalho será dividida conforme o tipo de amostra utilizada para facilitar a compreensão das diferenças entre as abordagens utilizadas no decorrer do projeto. Além das diferenças nas amostras utilizadas, o protocolo de purificação das partículas virais e de enriquecimento do genoma isolado foram ajustados com a finalidade de otimizar os resultados obtidos.

4.1 Swab anal e orofaríngeo

4.1.1 Coleta das amostras

As amostras de swab anal e orofaríngeo utilizadas nesse estudo foram coletadas pelo Grupo de Estudos em Ecologia de Mamíferos e Educação Ambiental da Universidade Estadual de Maringá – PR, e cedidas pelo Instituto Pasteur de São Paulo. Foram utilizados 69 espécimes de *Artibeus lituratus* e 24 espécimes de *Sturnira lilium*, capturados em um fragmento da Mata Atlântica no Parque do Ingá, na área urbana da cidade de Maringá – PR (Figura 1).

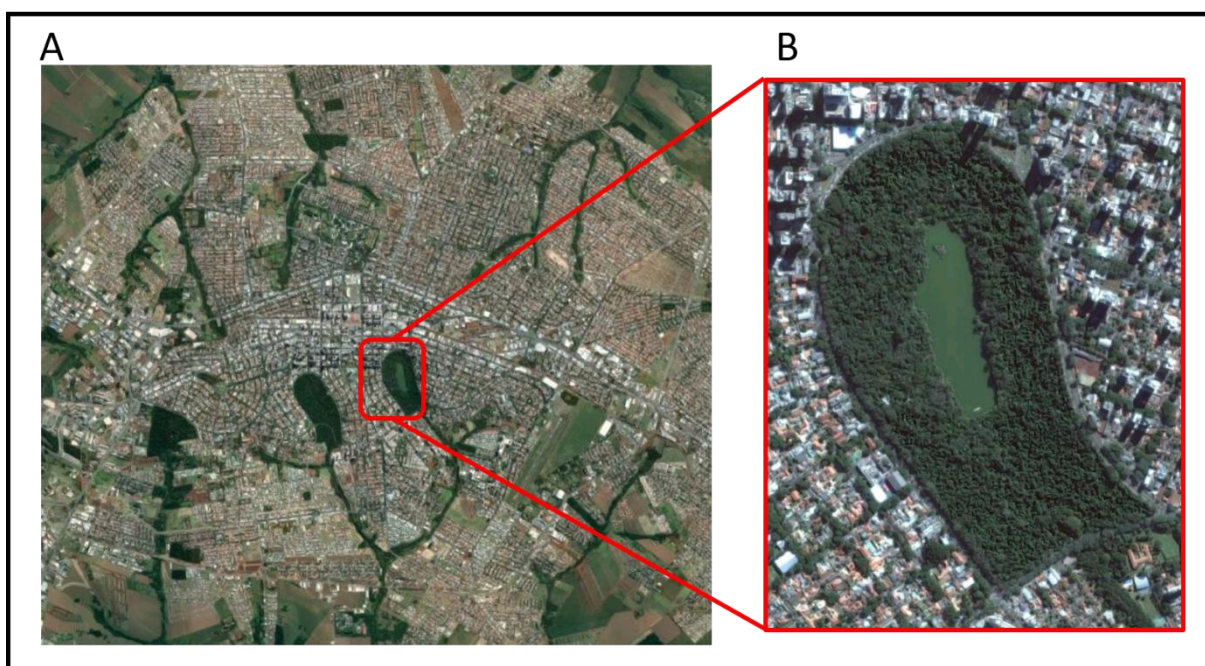


Figura 1 Localização do Parque Ingá. Panorama geral da localização do Parque Ingá na área urbana da cidade de Maringá-PR (A); e ampliação da localização do Parque Ingá em meio a área urbanizada (B).

Para a captura dos espécimes foram utilizadas cinco redes de nylon (mist-nest), com, ao menos, 30 metros de distância uma das outras (Greenhall & Paradiso, 1968). Os animais capturados foram contidos manualmente com luvas de raspa de couro, e a coleta dos dados biométricos e dos *swabs* orofaríngeos e anal de cada indivíduo foi realizada. A identificação taxonômica foi realizada conforme critérios de Vizotto e Taddei (1973), Jones e Carter (1976) e Gregorin e Taddei (2002). Os *swabs* foram armazenados em frascos contendo 2 mL de Meio Essencial Mínimo com 200 U/mL de penicilina (Sigma-Aldrich) e 200 µg/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich) e armazenados sob refrigeração a -80°C até o momento do processamento. Os espécimes ficaram acondicionados em sacos de algodão até a tomada de dados e coleta dos *swabs* e posteriormente foram libertados.

O período das coletas foi de setembro de 2015 a março de 2016 e estas foram realizadas sob licença permanente para coleta de material biológico do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio (número: 17869-3, data da emissão: 14/09/2012) e certificação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Maringá (número^o 1697070515, data de emissão: 12/05/2015).

4.1.2 Purificação das partículas virais

As amostras foram processadas em *pools* de acordo com a espécie e o tipo da amostra coletada, originando 4 *pools*: *swab* anal de *Artibeus lituratus*; *swab* orofaríngeo de *Artibeus lituratus*; *swab* anal de *Sturnira lilium*; e *swab* orofaríngeo de *Sturnira lilium*. Para a confecção dos *pools* foi utilizado 1 mL de cada amostra coletada, e para a sequência do protocolo foram utilizados 20 mL de cada *pool*.

Para o isolamento do material genético viral encapsidado, as amostras seguiram algumas etapas de purificação segundo Kluge e colaboradores, com algumas alterações (Kluge et al., 2016). No primeiro passo as amostras foram homogeneizadas através de agitação em vórtex por 3 min, seguido de uma centrifugação a 2.500 x g por 5 min à 4°C. O sobrenadante foi submetido a um segundo passo de clarificação por centrifugação a 12.000 x g por 14 min. Em seguida o sobrenadante foi filtrado em um filtro de seringa 0.45 µm (MF-Millipore) para selecionar os vírus presentes na amostra pelo seu tamanho. O filtrado foi

ultracentrifugado em colchão de sacarose 25% a 190.000 x g por 4h a 4°C. Os pellets contendo os vírus precipitados foram ressuspensos em 500 µL de TE [10 mM Tris (Invitrogen) pH 7,4; 1 mM EDTA (Invitrogen) pH 8,0]. Ao volume final foi adicionado clorofórmio 1% em mesma proporção e homogeneizado por inversão durante 30 min. Os tubos foram centrifugados a 12.000 x g por 5 min e o sobrenadante transferido para novos tubos, desprezando-se a fase orgânica. O volume final foi completado com TE [10 mM Tris (Invitrogen) pH 7.4; 1 mM EDTA (Invitrogen) pH 8.0] para 500 µL e tratado com 20 U de RNase (Invitrogen) e 100 U de DNase I (Roche) por 1h a 37°C para a degradação de ácidos nucleicos desprovidos de capsídeo. Por fim, a amostra foi armazenada em ultrafreezer a -80°C até a extração dos ácidos nucleicos. Um resumo do fluxograma do processamento das amostras de swab anal e orofaríngeo pode ser visualizado na Figura 2.

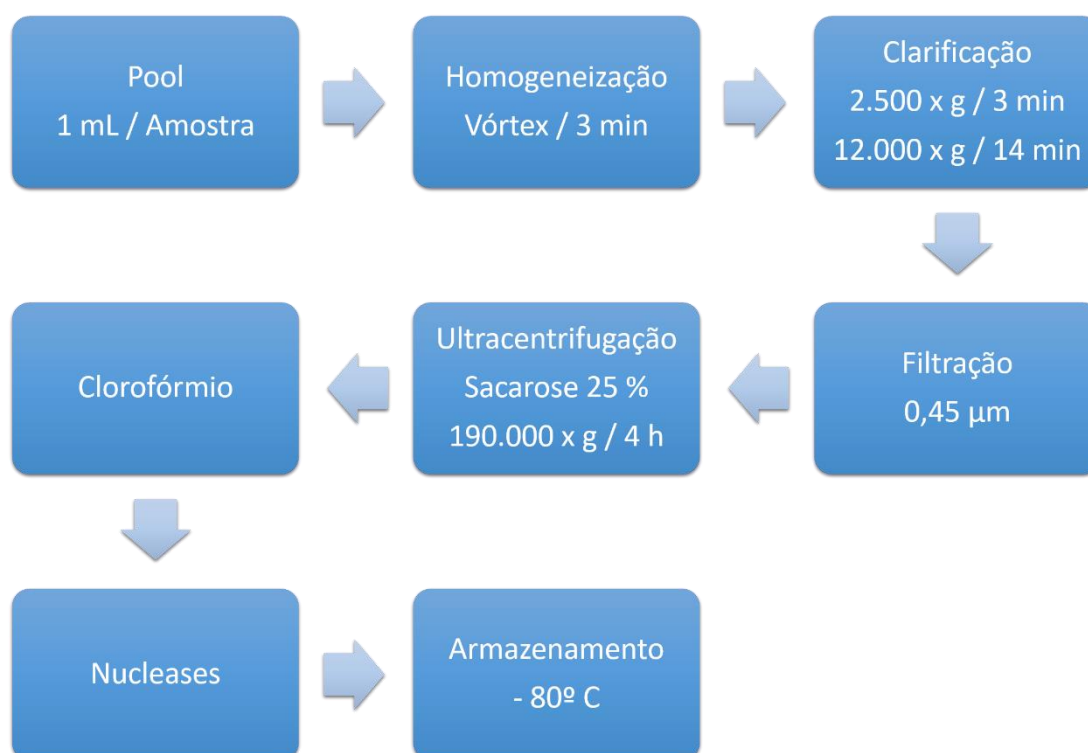


Figura 2: Resumo do fluxograma do processamento dos swabs.

4.1.3 Extração de ácidos nucleicos

A extração de DNA foi realizada a partir de uma alíquota de 200 µL de cada *pool* processado através de protocolo usando fenol (Sambrook & Russell, 2001). Os

ácidos nucleicos isolados serão precipitados com etanol absoluto, ressuspensos em 20 μ TE [10 mM Tris (Invitrogen) pH 7,4; 1 mM EDTA (Invitrogen) pH 8,0] e armazenados em ultrafreezer a -80°C até o enriquecimento.

A extração de RNA foi realizada a partir de uma alíquota de 200 μ l de cada amostra através de protocolo usando Trizol® (Sambrook & Russell, 2001). Os ácidos nucleicos isolados foram precipitados com isopropanol absoluto, ressuspensos em 20 μ l H₂O tratada com DEPC e armazenados em ultrafreezer a -80°C até o enriquecimento.

4.1.4 Enriquecimento de genomas virais

Para o enriquecimento dos ácidos nucleicos virais presentes nas amostras foi realizada uma amplificação randômica utilizando o fragmento Klenow da DNA polimerase 1 de *Escherichia coli* e *primers* K-randoms (GAC CAT CTA GCG ACC TCC ACM NN MNM), descrito por Stang (2005). Para o processamento do DNA extraído a reação de Klenow foi realizada em duas etapas seguindo as seguintes condições: 5 μ L de DNA extraído, 2 μ L *primers* K-randoms (20 μ M), 1 μ L dNTP (10 mM), 2,5 μ L de tampão Klenow (10X) e 14,5 μ L água ultra-pura foram incubados a 94°C por 2 min e colocados sobre o gelo por 5 min; em seguida, foi adicionado 1 U da enzima Klenow (New England Biolabs) e a reação foi incubada por 1h a 37°C e colocados sobre o gelo por 5 min; novamente foi adicionado 1 U da enzima Klenow (New England Biolabs) e a reação foi incubada por 1h a 37°C, seguida de inativação a 75° C por 10 min. Para o processamento do RNA total extraído, foi realizada a síntese de cDNA por transcrição reversa sob as seguintes condições: 6 μ L de RNA total extraído, 4 μ L *primers* K-randoms (20 μ M) e 2 μ L dNTP (10 mM) que foram incubados a 65°C por 5 min e mantidos sobre o gelo; em seguida, foram adicionados 4 μ L de tampão RT (10X), 2 μ L DTT (0,1 M), 40 U RNaseOUT (Invitrogen) e incubados por 2 min a 37°C; após foram adicionadas 20 U da enzima transcriptase reversa M-MLV (Invitrogen) e as amostras incubadas em uma sequência de 10 min a 25°C, 37 min a 50°C, 15 min a 70° C e 5 min em gelo. Por fim, foi adicionada 10 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.

4.2 Amostras de pulmão

4.2.1 Coleta de amostras

Foi coletado o pulmão de 6 espécimes de *Artibeus lituratus*, 6 espécimes de *Glossophaga soricina* e 20 espécimes de *Molossus molossus*, provenientes da Seção de Diagnóstico de Raiva do laboratório de virologia do Instituto Pasteur, recebidas do período de abril a julho de 2015. Foi elaborado um calendário de coleta no período descrito, no qual a coleta de amostras foi realizada em semanas alternadas no qual os espécimes mencionados acima foram submetidos à necropsia. A identificação dessas espécies foi realizada através de PCR e sequenciamento parcial do gene do citocromo C do DNA mitocondrial (Folmer et al., 1994). As amostras foram armazenadas em microtubos de 1,5 µL livres de RNAase e DNAase e mantidas em freezer -80°C até o processamento.

4.2.2 Purificação das partículas virais

As amostras foram processadas em de acordo com a espécie, dando origem a 3 *pools*. Para a confecção dos *pools* foi utilizado aproximadamente 100 mg de cada órgão coletado, gerando um volume final aproximado de 600 mg de pulmão de *Artibeus lituratus*, 600 mg de pulmão de *Glossophaga soricina* e 2 gramas de pulmão de *Molossus molossus*.

Para o isolamento apenas do material genético encapsidado as amostras seguiram um protocolo de purificação baseado em Kluge e colaboradores (2016), e Conceição-Neto e colaboradores (2015). Para a homogeneização as amostras foram fragmentadas com o auxílio de uma lâmina de bisturi e posteriormente maceradas em cadinho de porcelana contendo areia estéril e um volume de 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) na mesma proporção peso/volume de cada amostra. Após, o macerado foi transferido para um falcon contendo *beads* de vidro e um volume de 10 x de solução de Hank's,

em seguida o conteúdo foi misturado vigorosamente e após centrifugado a 2.500 x g por 5 min à 4°C. O sobrenadante foi submetido a um segundo passo de clarificação por centrifugação a 12.000 x g por 14 min. Após, o sobrenadante foi filtrado em um filtro de seringa 0.45 µm (MF-Millipore) para selecionar os vírus presentes na amostra pelo seu tamanho. Em seguida o filtrado foi ultracentrifugado em colchão de sacarose 25% a 120.000 x g por 2h a 4°C. Os pellets contendo os vírus precipitados foram ressuspensos em 500 µL de TE [10 mM Tris (Invitrogen) pH 7.4; 1 mM EDTA (Invitrogen) pH 8.0]. A amostra foi tratada com 20 U de RNase (Invitrogen) e 100 U de DNase I (Roche) por 1h a 37°C para a degradação de ácidos nucleicos desprotegidos pela ausência do capsídeo e as enzimas foram inativadas a 75°C por 10 min. Por fim, a amostra foi armazenada em ultrafreezer -80°C até a extração dos ácidos nucleicos. Um resumo do fluxograma do processamento das amostras de pulmão pode ser visualizado na Figura 3.

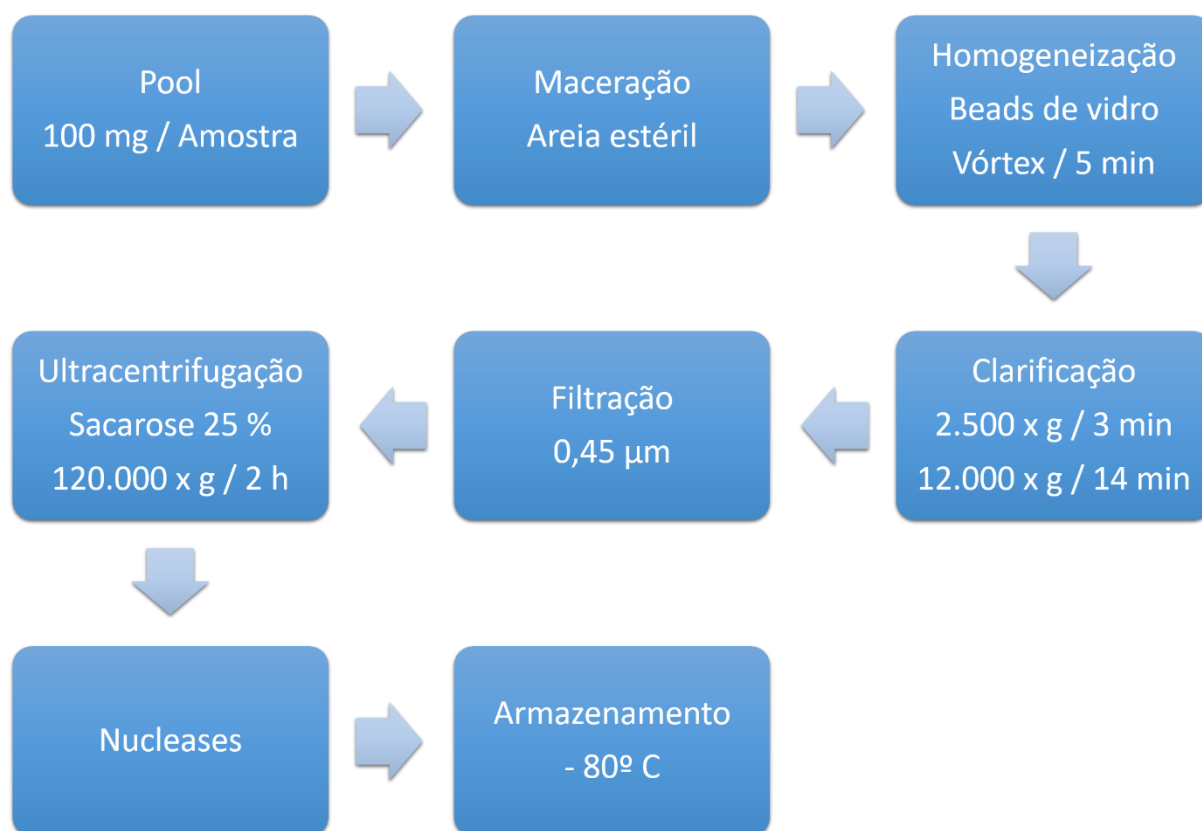


Figura 3: Resumo do fluxograma do processamento dos pulmões

4.2.3 Extração de ácidos nucleicos

A extração de ácidos nucleicos dos *pools* processados das amostras de pulmão seguiu o mesmo protocolo utilizado para a extração das amostras de *swab* anal e orofaríngeo.

4.2.4 Enriquecimento de genomas virais

Para o enriquecimento dos ácidos nucleicos virais presentes nas amostras foi realizada uma amplificação randômica utilizando a enzima phi29 DNA polimerase (Invitrogen) (Berthet et al., 2016). Para o processamento do DNA foram utilizados os seguintes passos: um volume total de 10 μ L, sendo 2 μ L do material extraído e 8 μ L de H₂O ultrapura, foi incubado a 95°C por 5 min e em seguida mantido em banho de gelo. Após, foram adicionados 0,5 μ L de BSA 10 X, 2,5 μ L de tampão 10 X, 0,5 μ L de DDT (0,1 M), 1,5 μ L de primers randômicos exo-resistentes (500 μ M), 2,5 μ L de dNTP (10 mM), 20 U da enzima phi29 DNA polimerase e H₂O ultrapura para completar um volume final de 25 μ L, e a reação foi incubada a 30°C por 18 h; por fim foi feita a inativação da enzima a 65°C por 10 min. Para o processamento das amostras de RNA foi necessário um passo anterior para a produção de uma fita de DNA complementar (cDNA). O cDNA foi sintetizado com a enzima SuperScriptIII (Invitrogen) seguindo o seguinte protocolo: aproximadamente 1 μ g de RNA extraído foi adicionado a 10 μ L de mix de reação RT 2X e 2 μ L de mix de enzima RT, com uma adição de H₂O tratada com DEPC até um volume final de 20 μ L; o mix foi incubado a 25°C por 10 min, seguidos de incubação a 50°C por 30 min e a 85°C por 5 min. Foram então adicionados 2U de RNase H e a reação foi incubada por 37°C por 20 min. Em seguida ao cDNA por fim, foi adicionada 10 U da enzima Klenow (New England Biolabs) para sintetizar uma fita dupla de DNA. Em seguida, a amostra foi enriquecida randomicamente com a enzima phi29 seguindo o protocolo descrito para as amostras de DNA.

4.3 Sequenciamento de alto desempenho

Foram enviados para o sequenciamento um *pool* com 70 ng dos

amplificados a partir do DNA e cDNA de cada amostra, numa concentração de 2,5 ng/μl, quantificado com Qubit™ (Thermo Fisher Scientific) com razão de absorvância A260/A280 entre 1,8 e 2,0, medida em NanoDrop™ (Thermo Fisher Scientific). As bibliotecas genômicas foram preparadas com o kit Nextera XT (2x150pb) conforme descrições do fabricante. O sequenciamento foi realizado em plataforma Illumina MiSeq®. O preparo das bibliotecas e o sequenciamento foram realizados por profissionais capacitados do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor.

4.4 Montagem e identificação de *contigs*

A qualidade das *reads* obtidas foi avaliada através do *software* Fastqc (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) e as *reads* foram trimadas através do *software* PRINSEQ (prinseq.sourceforge.net). As *reads* selecionadas foram classificadas através do *taxonomer* (<https://www.taxonomer.com>). A partir das *reads*, os *contigs* foram montados utilizando o *software* *St. Petersburg genome assembler* (SPAdes) 3.10.1 (<http://cab.spbu.ru/software/spades/>). Os *contigs* maiores que 100 pb foram submetidos à ferramenta BLASTx contra o banco de dados de proteínas virais através do *software* *Blas2GO* (<https://www.blast2go.com/>). Os *contigs* identificados como virais pelo *software* foram submetidos a uma conferência manual utilizando-se o BLASTn e BLASTx contra o banco de dados não-redundante de sequências de nucleotídeos e de proteínas, respectivamente, do NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Com os resultados, os *contigs* que apresentaram uma cobertura parcial com genomas virais foram trimados manualmente para conservar apenas as regiões com similaridade a estes. Após, os *contigs* virais identificados foram agrupados por famílias e submetidos ao *software* *PRICE genome assembler* (<http://derisilab.ucsf.edu/software/price>) na tentativa de alongar as extremidades das sequências e de formar *contigs* maiores. Por fim, os *contigs* que apresentaram similaridade com diferentes proteínas virais foram submetidos ao *software* *ORFinder* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) e as regiões confirmadas como sendo genes virais foram anotadas. Um resumo do fluxograma do processamento das *reads* e das análises dos *contigs* pode ser visualizado na Figura 4.

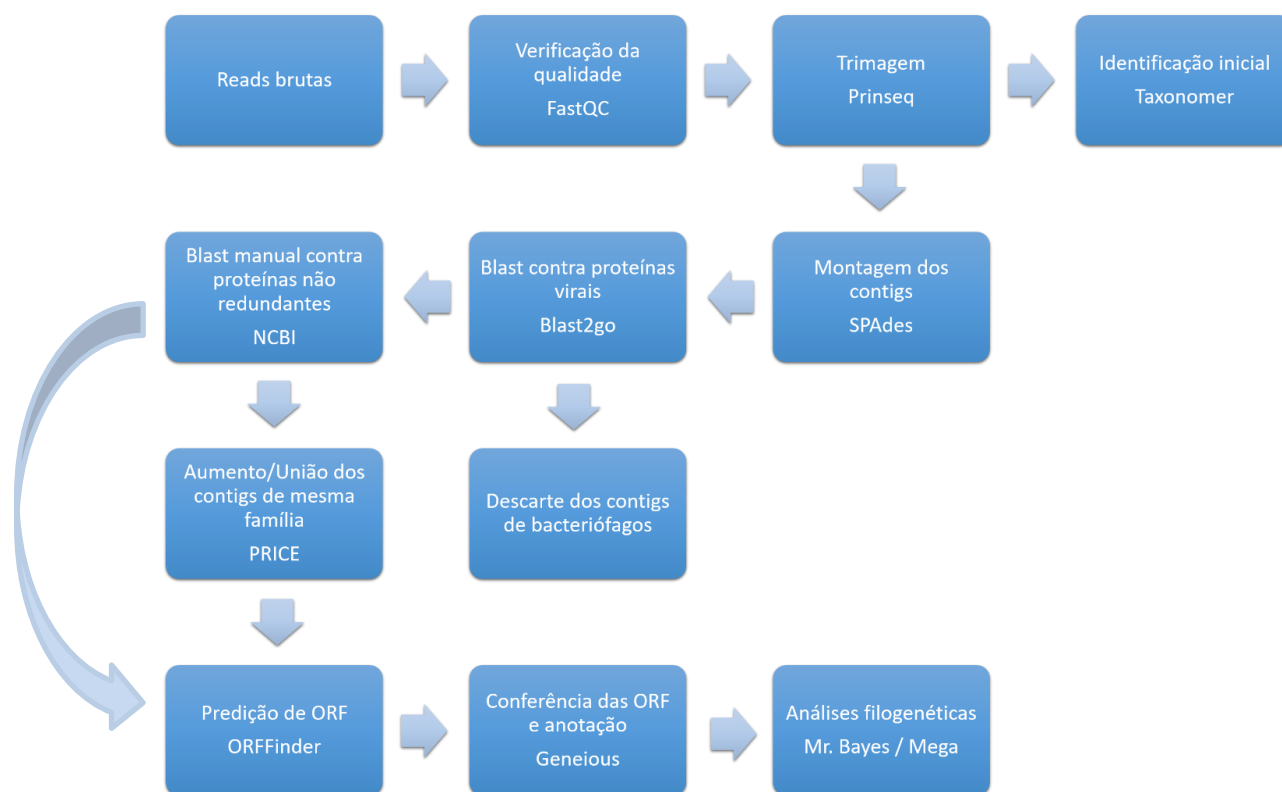


Figura 4: Resumo do fluxograma do processamento das *reads* e análises dos *contigs*. Em cada passo está identificado o *software* utilizado nas análises.

4.5 Análises filogenéticas

Os *contigs* obtidos foram submetidos a alinhamentos com amostras de representantes das famílias virais obtidas do GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) para uma melhor caracterização de gênero. Para genomas e genes completos, os alinhamentos foram realizados com as sequências de nucleotídeos e com as sequências de aminoácidos transcritas a partir destas. Para genes parciais foi realizado o alinhamento apenas das sequências de aminoácidos transcritas. Os alinhamentos foram realizados através do *plugin* ClustalW presente no software Geneious 9.1.3 (<https://www.geneious.com/>). As árvores filogenéticas foram reconstruídas utilizando os softwares MrBayes 3.2.6 (<http://mrbayes.sourceforge.net/>) ou MEGA 6 (<http://www.megasoftware.net/>) utilizando os modelos evolucionários e de substituição preditos pelo *software* *jModelTest* (<https://github.com/ddarriba/jmodeltest2>), em caso de alinhamento de nucleotídeos, e ProtTest 3.4.2 (<https://github.com/ddarriba/prottest3>), em caso de

alinhamento de aminoácidos. As matrizes de identidades foram geradas através do *software Sequence Demarcation Tool Version 1.2* (<http://web.cbio.uct.ac.za/~brejnev/>)

4.6 Biossegurança

Toda a manipulação das amostras foi realizada em fluxos laminares de biossegurança de nível 2, por pessoas treinadas utilizando equipamentos de proteção individual, e os resíduos gerados descartados de maneira adequada seguindo protocolos de biossegurança.

Para evitar possíveis contaminações, as técnicas foram realizadas com a utilização de material estéril, estocado separadamente de materiais de uso geral, pipetador exclusivo para técnicas de enriquecimento e ponteiras com filtro. Também, o preparo de mix para as reações de enriquecimento foram realizados em cabine de biossegurança livre de ácidos nucléicos.

5. RESULTADOS

Um resumo da diversidade das reads obtido pela análise no *software taxonomer* (<https://www.taxonomer.com/>) pode ser visualizado na Tabela 1. Para a montagem dos *contigs* as *reads* foram selecionadas por sua qualidade ($Q \geq 20$). Após a montagem, os *contigs* foram identificados através do *blastx* e *blastn*. O número total de *reads*, de *contigs*, de *contigs* virais e de *contigs* de bacteriófagos podem ser visualizados na Tabela 2. Para as análises subsequentes foram utilizados apenas os *contigs* virais de eucariotos, e a Tabela 3 apresenta um resumo da identidade destes. Os resultados serão aprofundados separadamente conforme os *pools* processados e enviados para o sequenciamento. Todas as sequências obtidas nesse trabalho encontram-se no Apêndice 1.

Tabela 1: Diversidade das *reads* dos *pools* sequenciados expressos em porcentagem e analisados no *software taxonomer*.

Amostra	Número de <i>reads</i> (%)					
	Virais totais / Fagos	Desconhecidas	Bacterianas	Humanas	Fúngicas	Ambíguas
SAAL	0,3 / 0,1	52,2	45,5	1,9	-	0,1
SOAL	1,7 / 1,5	59,1	26,8	12	-	0,4
SASL	0,4 / 0,1	56,9	38,7	-	0,5	3,5
SOSL	0,7 / 0,1	47,5	45,2	6,4	-	0,2
MM P	8,5 / 2,2	54,9	0,2	0,3	-	36,1
GS P	26,8 / 0,2	40,4	15,4	2,6	-	14,8
AL P	7,6 / 4,3	58,7	1,2	6,5	-	26

Todos os resultados estão em forma de porcentagem. SAAL: *swab* anal de *Artibeus lituratus*; SOAL: *swab* orofaríngeo de *A. lituratus*; SASL: *swab* anal de *Sturnira lilium*; SOSL: *swab* orofaríngeo de *S. lilium*; MM P: pulmão de *Molossus molossus*; GS P: pulmão de *Glossophaga soricina*; AL P: pulmão de *A. lituratus*.

Tabela 2: Números totais de *reads* e *contigs*.

Amostra	SAAL	SOAL	SASL	SOSL	MM P	GS P	AL P
Nº de <i>reads</i>	152.788	277.218	539.804	375.482	1.492.822	2.198.982	2.357.908
Conteúdo GC	45,6 %	51,0%	51,9%	52,1%	46,3%	42,9%	44,0%
Nº <i>reads</i> ≥ Q20	146.065	266.683	517.672	360.087	1.340.55	2.038.456	2.176.349
Nº de <i>contigs</i>	2.839	426	1855	4287	602	3010	3.090
Nº de <i>contigs</i> virais	444	426	186	444	132	238	44
Nº de <i>contigs</i> de bacteriófagos	443	423	185	444	128	230	44

SAAL: swab anal de *Artibeus lituratus*; SOAL: swab orofaríngeo de *A. lituratus*; SASL: swab anal de *Sturnira lilium*; SOSL: swab orofaríngeo de *S. lilium*; MM P: pulmão de *Molossus molossus*; GS P: pulmão de *Glossophaga soricina*; AL P: pulmão de *A. lituratus*.


Identificação do <i>contig</i>	Amostra	Tamanho (nt)	Proteína (número de acesso no Genbank)	Identidade
<i>A. lituratus papillomavirus</i>	SAAL	549	L1 (AHJ81407)	68,9 %
<i>A. lituratus adenovírus</i>	SOAL	312	Proteína terminal do DNA (YP009272543)	71,2 %
<i>A. lituratus parvovirus NS1</i>	SOAL	1170	Proteína não-estrutural 1 (YP_009328889)	70,9 %
<i>A. lituratus parvovirus Cap</i>	SOAL	858	Proteína do capsídeo (YP_009328890)	80,0 %
<i>S. liliium adenovírus</i>	SASL	177	L4 (AFS50339)	98 %
<i>Torque teno virus M. molossus 1</i>	MM P	2.387	Genoma completo	
<i>Torque teno virus M. molossus 2</i>	MM P	2.305	Genoma completo	
<i>M. Molossus circovirus</i>	MM P	1.878	Genoma completo	
<i>Torque teno Glossophaga soricina virus ORF1-1</i>	GS P	1.512	ORF1 (YP_009058944)	
<i>Torque teno Glossophaga soricina virus ORF1-2</i>	GS P	1.149	ORF1 (YP_009058944)	
Papiloma GS 1	GS P	462	L2 (AVX45652)	79,8 %
Papiloma GS 2	GS P	243	E2 (AVX45651)	66,7 %
Papiloma GS 3	GS P	231	E7 (AVX45649)	100 %
Papiloma GS 4	GS P	207	E1 (AVX45650)	84,1 %
Papiloma GS 5	GS P	132	E2 (AVX45651)	100 %

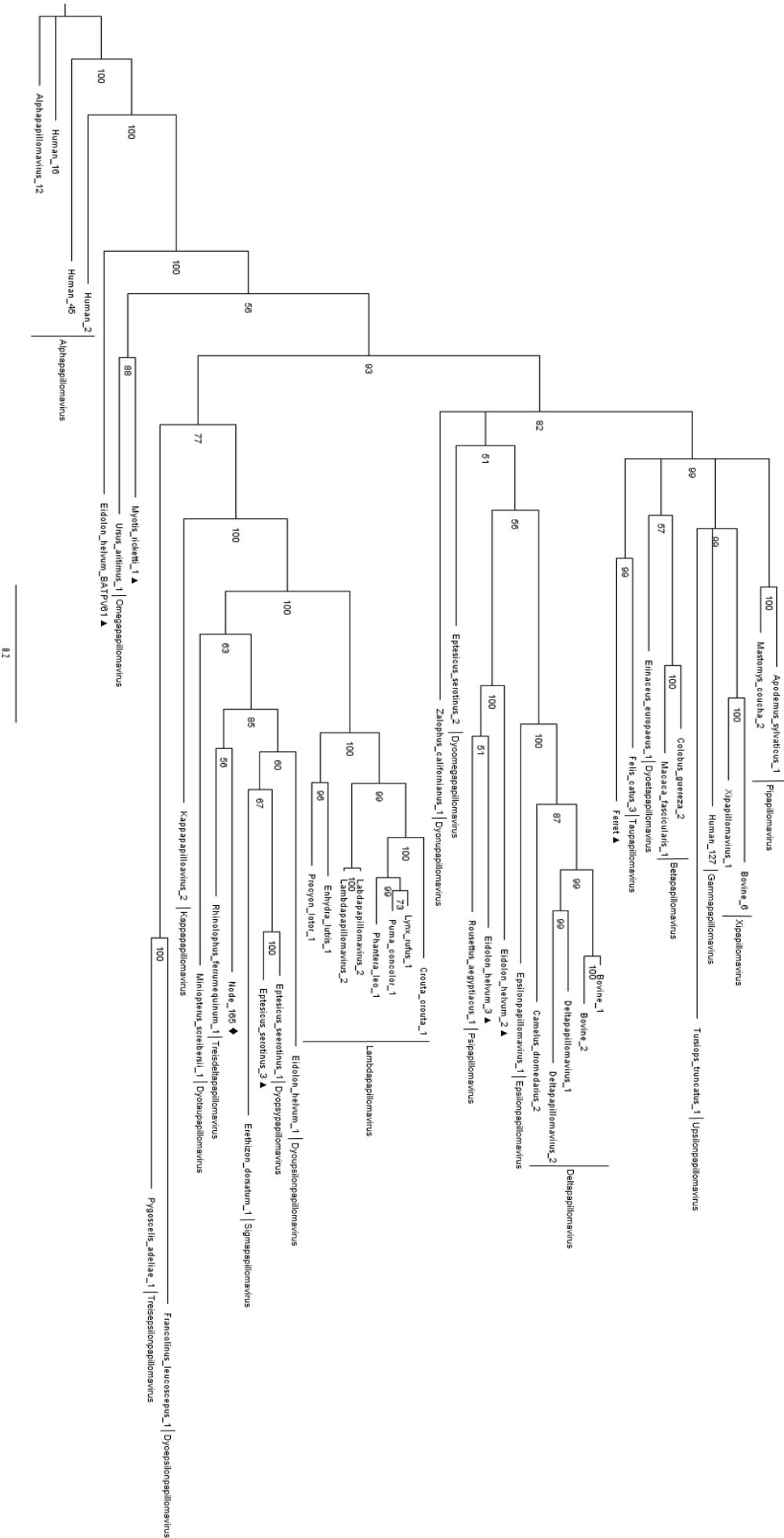
Tabela 3: Resumo dos *contigs* virais identificados no trabalho.

SAAL: swab anal de *Artibeus lituratus*; SOAL: swab orofaríngeo de *A. lituratus*; SASL: swab anal de *Sturnira liliium*; SOSL: swab orofaríngeo de *S. liliium*; MM P: pulmão de *Molossus molossus*; GS P: pulmão de *Glossophaga soricina*; AL P: pulmão de *A. lituratus*.

5.1 Swab anal de *Artibeus lituratus*

No *pool* de *swab* anal de *Artibeus lituratus* (SAAL) foi identificado apenas um *contig* similar a vírus, excluídas as sequências de bacteriófagos. Este fragmento apresentou um tamanho de 549 pares de bases (pb) e 68,9 % de identidade com a proteína L1 do papilomavírus da espécie de morcego *Rhinolophus ferrumequinum* (RferPV1) (número de acesso no Genbank: AHJ81407). Dessa forma, o fragmento foi denominado de *A. lituratus papillomavirus* (AIPV). Na tentativa de identificação mais precisa, foi realizada uma reconstrução filogenética baseada na sequência de aminoácidos (aa) deste fragmento utilizando 46 sequências parciais da proteína L1 de diferentes espécies de papilomavírus (Figura 5). Tal análise confirmou que AIPV e RferPV1 são filogeneticamente relacionados, pois os dois formaram um cluster distinto dos demais membros da família *Papillomaviridae*.

 Figura 5: Árvore filogenética do *Artibeus lituratus papillomavirus*. Árvore reconstruída baseada na sequência parcial de aminoácidos da proteína L1 dos membros da família *Papillomaviridae*. As espécies as quais já possuem uma classificação a nível de gênero apresentam o nome do gênero. O fragmento identificado neste estudo está representado com \blacklozenge . As espécies as quais não apresentam a classificação a nível de gênero estão demarcadas com \blacktriangle . A árvore filogenética foi construída utilizando a inferência Bayesiana com a matriz de substituição LG, com distribuição gamma e parte dos sítios invariáveis, como predito pelo ProtTest. O número de gerações foi de 1.000.000 e foram usadas 2 cadeias.



5.2 Swab orofaríngeo de *Artibeus lituratus*

Após a análise detalhada do *pool* de swab orofaríngeo de *A. lituratus* (SOAL) foram encontrados 3 contigs virais com similaridade diferente de famílias de bacteriófagos. Um destes fragmentos, com tamanho de 312 pb, foi denominado de *Artibeus lituratus adenovirus* (AIAdV) por apresentar 71,2 % de identidade com a proteína terminal do DNA do adenovirus de equino (número de acesso do Genbank: YP_009272543). Para a confirmação do resultado, foi realizada uma reconstrução filogenética baseada na sequência de aa do fragmento utilizando 33 sequências parciais da proteína terminal do DNA de diferentes espécies de adenovirus (Figura 6). A análise confirmou que o AIAdV é mais um representante do gênero *Mastadenovirus*.

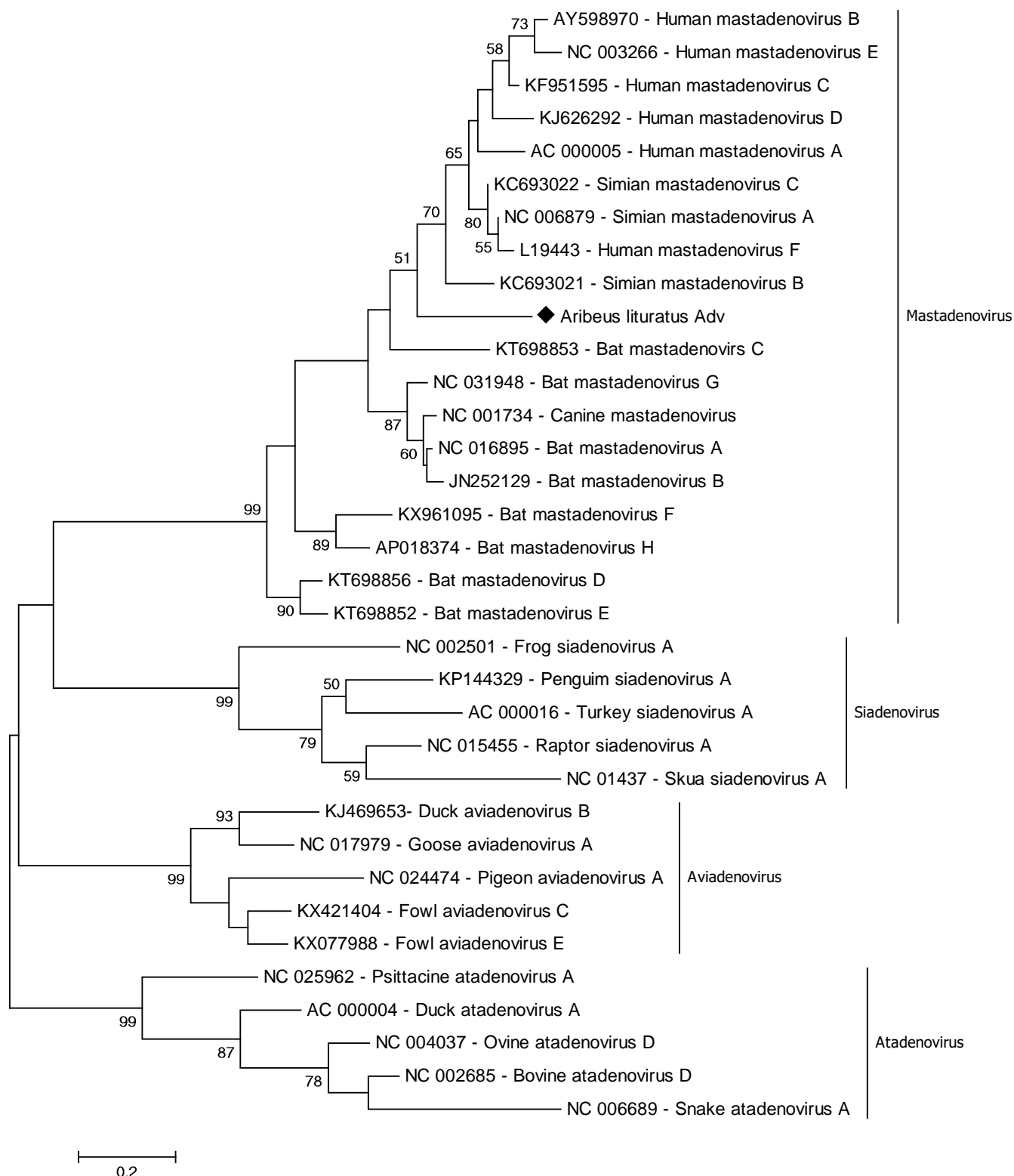

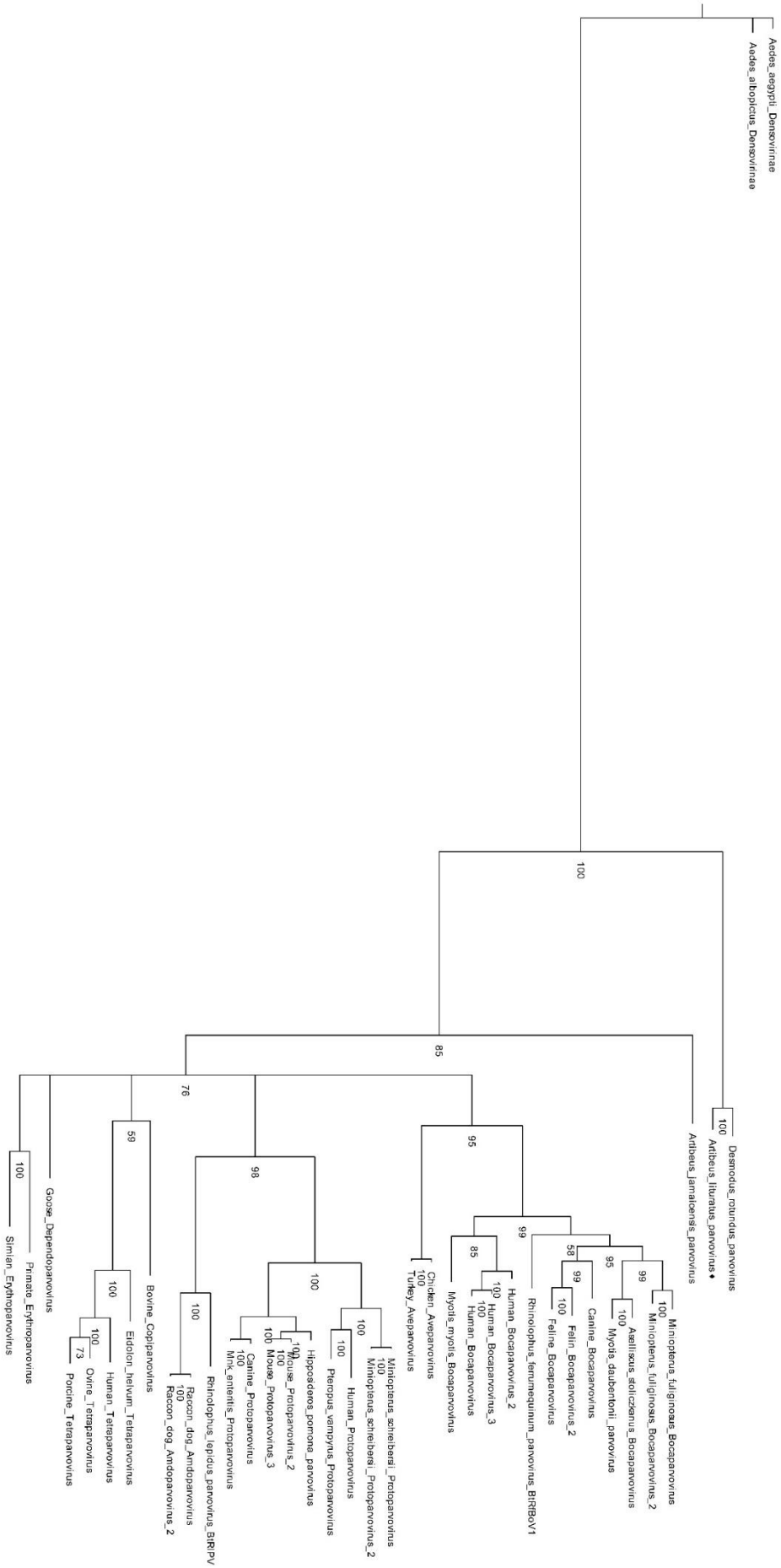
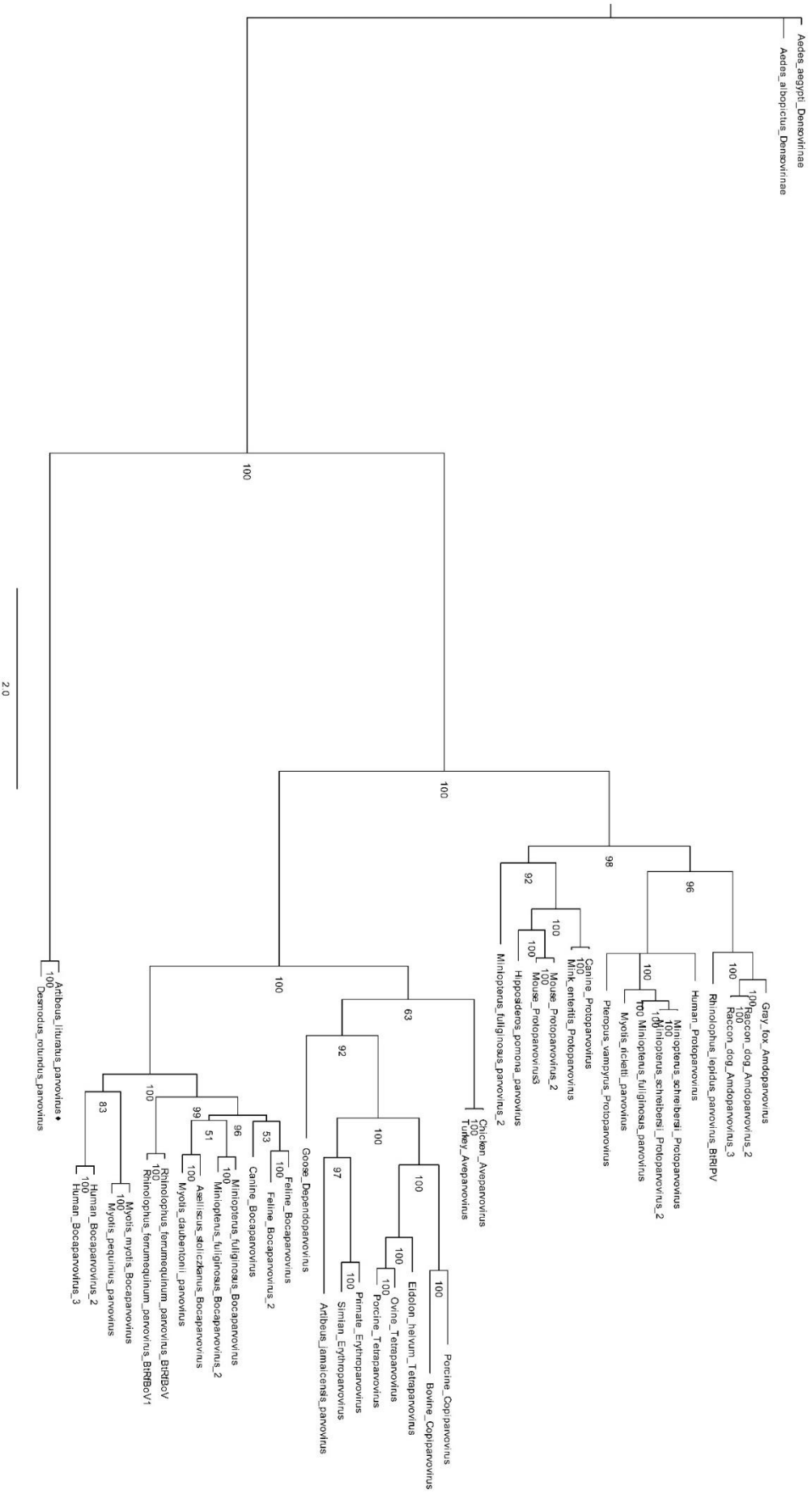



Figura 6: Árvore filogenética do *Artibeus lituratus* adenovirus. Árvore reconstruída baseada na sequência parcial de aminoácidos da proteína terminal do DNA dos membros da família *Adenoviridae*. As espécies as quais já possuem uma classificação a nível de gênero apresentam o nome do gênero. O fragmento identificado neste estudo está representado com ◆. A árvore filogenética foi construída utilizando a máxima verossimilhança com a matriz de substituição JTT como predito pelo ProtTest, e 1000 repetições.

Além do fragmento de adenovírus, foram identificados outros dois fragmentos, ambos com similaridade ao parvovírus da espécie de morcego *Desmodus rotundus* (DrPrV-1). O primeiro fragmento possui um tamanho de 1170 nt e uma identidade de 70,9 % com a proteína não-estrutural 1 (NS1) do DrPrV-1 (número de acesso do Genbank: YP_009328889); o segundo, possui um tamanho de 858 nt e identidade de 80,0 % com a proteína do capsídeo do DrPrV-1. Os fragmentos foram denominados de *A. lituratus parvovirus NS1* (AIPrV-NS1) e *A. lituratus parvovirus Cap* (AIPrV-Cap), respectivamente. Na intenção de concatenar/aumentar o tamanho dos fragmentos obtidos, ambos foram submetidos à análise pelo software *Price*, o que resultou num fragmento único de DNA. Contudo, foi realizada a reconstrução filogenética baseada na sequência de aminoácidos (aa) dos fragmentos separados, utilizando 39 sequências parciais da NS1 (Figura 7) e 44 sequências parciais da proteína do capsídeo (Figura 8) de diferentes espécies de parvovírus. Em ambas as análises, as sequências do AIPrV e DrPrV-1 agruparam-se no mesmo *cluster* e separadamente dos outros membros da família *Parvoviridae*. Porém, a identificação do gênero não foi possível.

 Figura 7: Árvore filogenética da NS1 do *Artibeus lituratus parvovirus*. Árvore reconstruída baseada na sequência parcial de aminoácidos da proteína NS1 dos membros da sub-família *Parvovirinae*. As espécies as quais já possuem uma classificação a nível de gênero apresentam o nome do gênero. O fragmento identificado neste estudo está representado com ♦. Os membros da subfamília *Densovirinae* foram utilizados como outgroup. A árvore filogenética foi construída utilizando a inferência Bayesiana com a matriz de substituição RtREV e distribuição gamma, como predito pelo ProtTest. O número de gerações foi de 1.000.000 e foram usadas 2 cadeias.





 Figura 8: Árvore filogenética da proteína do capsídeo do *Artibeus lituratus parvovirus*. Árvore reconstruída baseada na sequência parcial de aminoácidos da proteína do capsídeo dos membros da sub-família *Parvovirinae*. As espécies as quais já possuem uma classificação a nível de gênero apresentam o nome do gênero. O fragmento identificado neste estudo está representado com ♦. Os membros da subfamília *Densovirinae* foram utilizados como outgroup. A árvore filogenética foi construída utilizando a inferência Bayesiana com a matriz de substituição LG, distribuição gamma e com a frequência de aminoácidos empírica, como predito pelo ProtTest. O número de gerações foi de 1.000.000 e foram usadas 2 cadeias.

5.3 Swab anal de *Sturnira lilium*

Assim como no *pool* de SAAL, apenas um *contig* viral foi classificado, excluídos bacteriófagos. Possuindo 177 pb e 98 % de identidade com a proteína L4 do adenovírus humano C (número de acesso do Genbank: AFS50339) foi denominado de *Sturnira lilium adenovirus* (SIAdV). Com a sequência traduzida foi realizada a análise filogenética utilizando 25 sequências parciais da proteína terminal do DNA de diferentes espécies de adenovírus (Figura 9). A filogenia confirmou que o SIAdV é mais um representante do gênero *Mastadenovirus*.

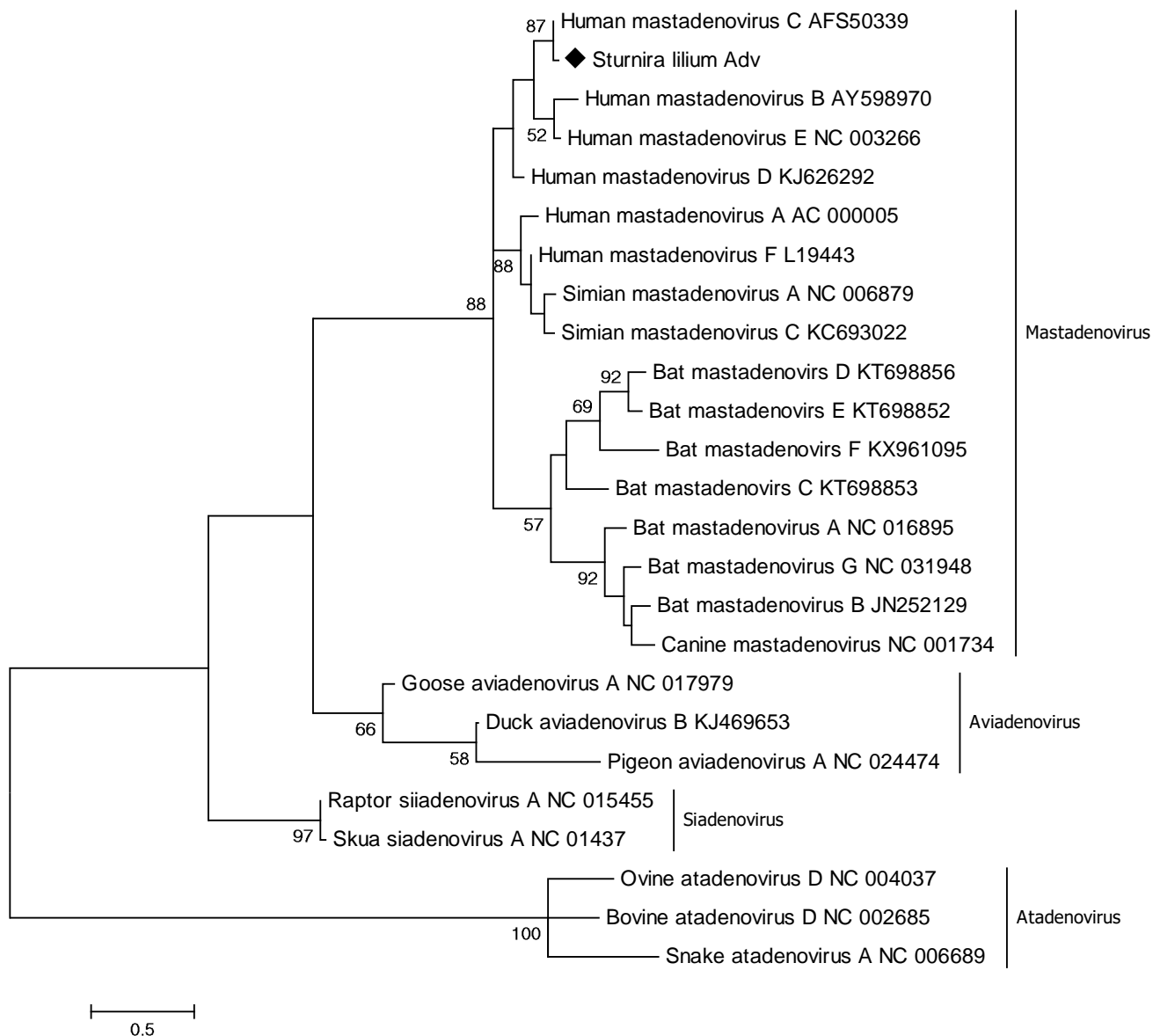


Figura 9: Árvore filogenética do *Sturnira lilium adenovirus*. Árvore reconstruída baseada na sequência parcial de aminoácidos da proteína L4 dos membros da família *Adenoviridae*. As espécies as quais já possuem uma classificação a nível de gênero apresentam o nome do gênero. O fragmento identificado neste estudo está representado com ♦. A árvore filogenética foi construída utilizando a máxima verossimilhança com a matriz de substituição JTT como predito pelo ProtTest, e 1000 repetições.

5.4 Swab orofaríngeo de *Sturnira lilium*

Todos os 444 *contigs* originados da montagem das *reads* do sequenciamento do *pool* de *swab* orofaríngeo de *S. lilium* (SOSL) obtiveram similaridade com sequências de bacteriófagos.

5.5 Pulmão de *Molossus molossus*

A partir do sequenciamento do *pool* de pulmão de *Molossus molossus* 4 *contigs* apresentaram similaridade com vírus de eucariotos. Destes quatro, 3 obtiveram identidade com torque teno vírus com tamanhos de 1.233 nt, 1.242 nt e 1.254 nt. Utilizado o *software Price*, dois genomas completos de torque teno vírus. O primeiro, denominado de *Torque teno virus Molossus molossus 1* (TTVMm-1), apresenta um tamanho de 2.387 nt, com um conteúdo de GC de 44,3 %, onde foram identificadas apenas duas fases de leituras abertas (do inglês, *open reading frame*, ORF) (Figura 10). A ORF1 está posicionada do nucleotídeo 640 até 2280, totalizando 1.641 nt, enquanto que a ORF2 posicionada do nucleotídeo 515 até 757, totalizando 243 nt. Além disso, estas duas ORFs sobrepõem-se em 118 nt compreendendo o início da ORF1 e o final da ORF2.

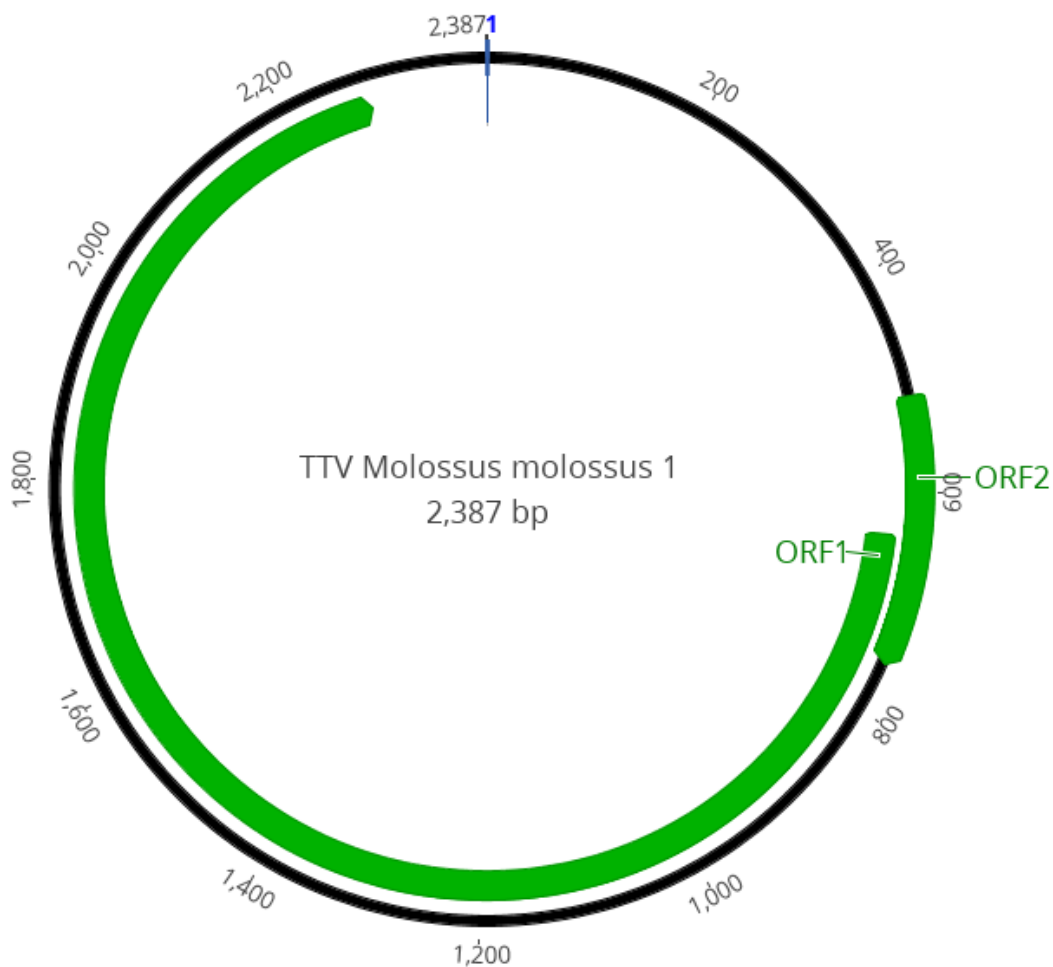


Figura 10: Representação do genoma completo do *Torque teno virus Molossus molossus 1*. Representação criada a partir da anotação do genoma realizada no software *Geneious*, dando destaque para a demarcação das ORFs em verde.

O segundo, denominado de *Torque teno virus Molossus molossus 2* (TTVMm-2), apresenta um tamanho de 2.305 nt, com um conteúdo de GC de 41,7 %, onde foram identificadas três ORFs (Figura 11). A ORF1 está posicionada do nucleotídeo 427 até 2.016, totalizando 1.590 nt; já a ORF2, está posicionada do nucleotídeo 257 até 553, totalizando 297 nt; por fim, a ORF 3 está posicionada do nucleotídeo 1.520 até 2.023, totalizando 504 nt. Além disso, as ORF1 e 2 sobrepõem-se em 127 nt, compreendendo o início da ORF1 e o final da ORF2, enquanto que as ORF 1 e 3 sobrepõem-se em 497 nt, compreendendo o final da ORF1 e aproximadamente a totalidade da ORF3.

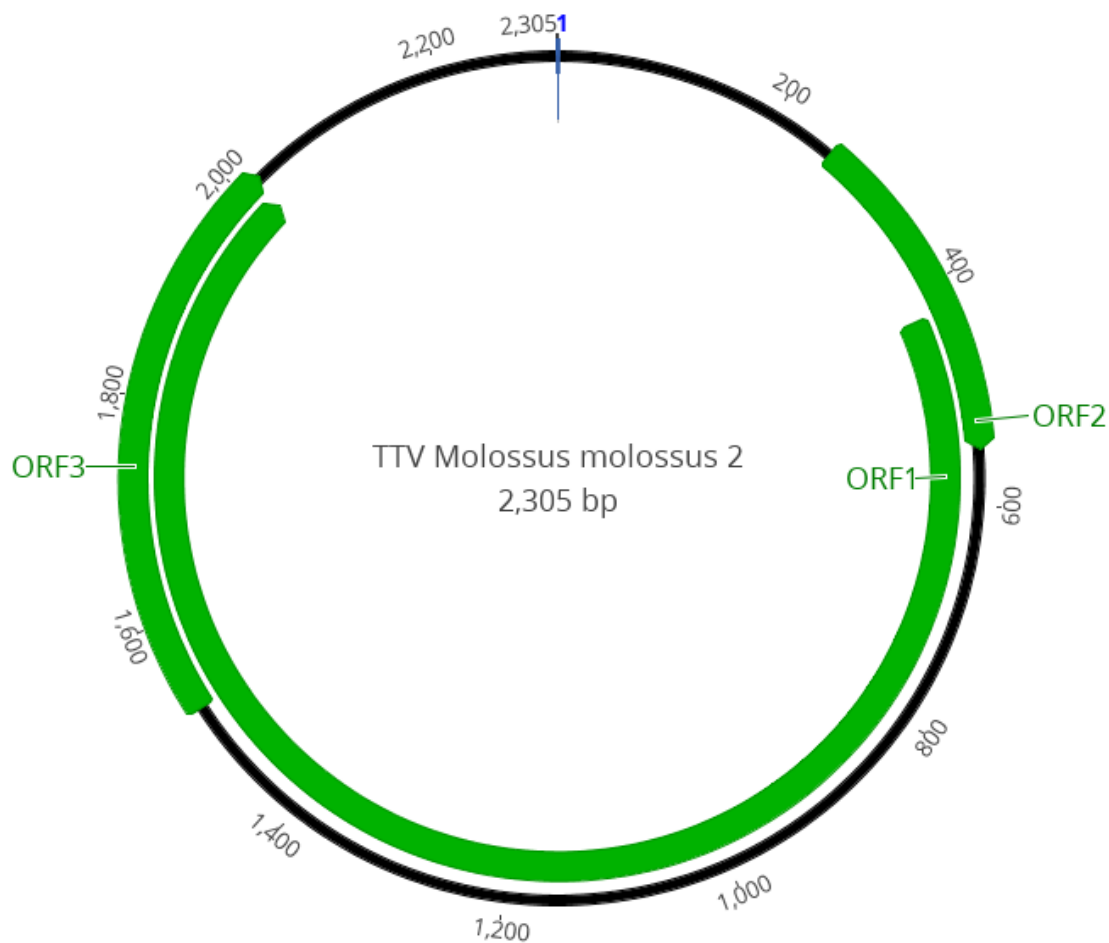



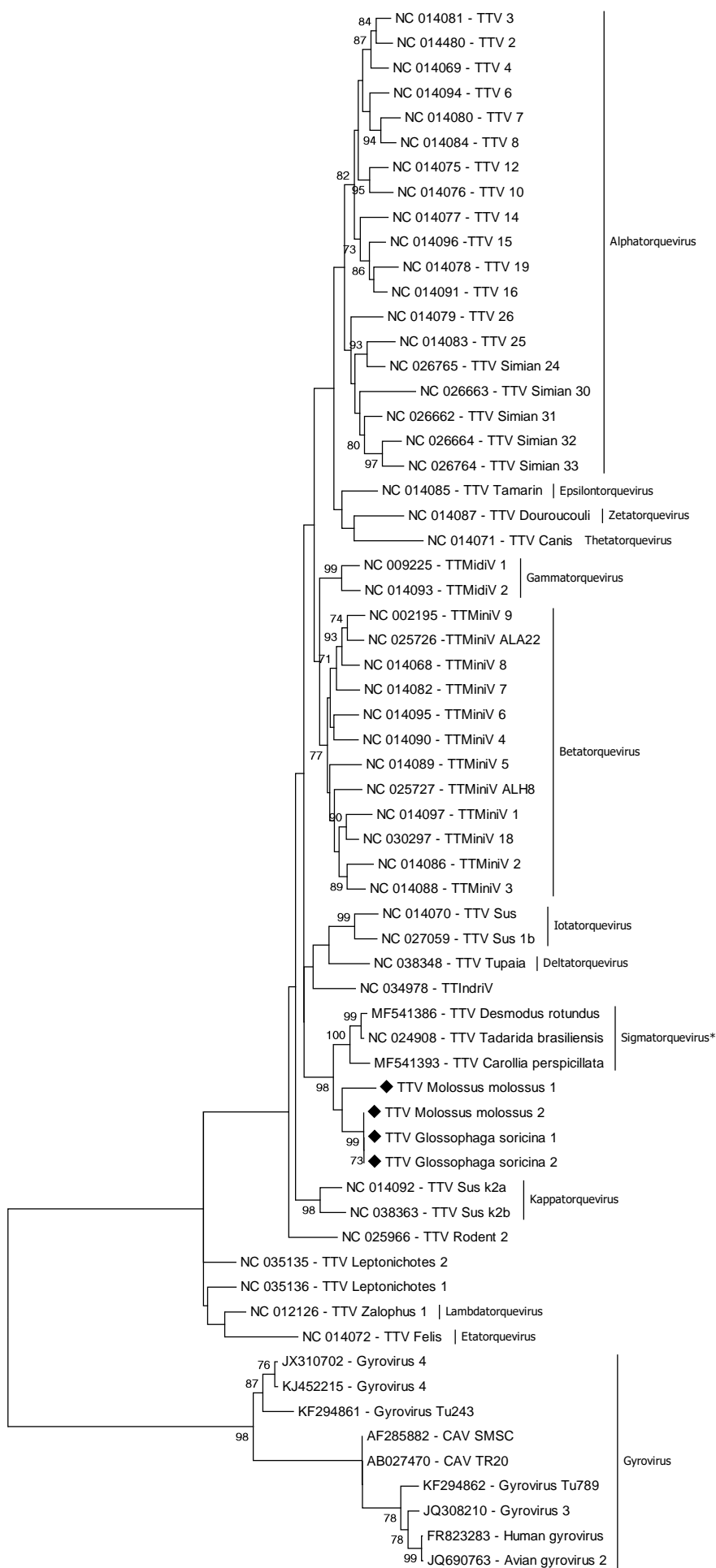
Figura 11: Representação do genoma completo do *Torque teno virus Molossus molossus 2*. Representação criada a partir da anotação do genoma realizada no *software* Geneious, dando destaque para a demarcação das ORFs em verde.

Para uma melhor identificação de gênero foram construídas duas árvores filogenéticas utilizando sequências disponíveis no GenBank: a primeira, baseada na sequência de nt da ORF1 (Figura 12); e a segunda baseada na sequência de aa da ORF1 (Figura 13). Nas análises foram utilizadas 59 sequências do gene da ORF1 de representantes de diferentes gêneros da família *Anelloviridae* além das sequências obtidas da amostra de pulmão de *Glossophaga soricina* (ver no subitem 5.6). Nas duas árvores filogenéticas os genomas completos identificados em *M. molossus* formaram um cluster juntamente com o *Torque teno Tadarida brasiliensis virus* (número de acesso do GenBank: NC_024908) e com as amostras de pulmão de *G. soricina*, na árvore da ORF1. Também, o clado das amostras desse estudo se

aproximou de outras amostras de morcegos, recentemente sugeridas como membros de um novo gênero denominado de *Sigmatorquevirus* (de Souza et al., 2018).

A matriz de identidade demonstrou que as sequências da ORF 1 de *Torque teno G. soricina virus* (TTGsV) 1 e 2 tem uma elevada identidade com a sequência de TTMmoV-2, 98,68 e 97,14 %, respectivamente. Já o TTMmoV-1 apresenta uma identidade de aproximadamente 52 % com as outras três sequências desse estudo (Figura 14). Também, foi demonstrada uma similaridade de mais de 90 % entre o TT-TbV e o *Torque teno Desmodus rotundus virus*, classificando-os como isolados de uma espécie viral detectados em espécies diferentes de morcegos.

 Figura 12: Árvore filogenética da sequência de nt do gene da ORF1 de membros da família *Anelloviridae*. Árvore reconstruída baseada na sequência de nucleotídeos do gene da ORF1 de membros da família *Anelloviridae*. Os gêneros já identificados aparecem destacados. Os genes da ORF1 dos diferentes anelovírus identificados nesse estudo estão representados com ♦. A árvore filogenética foi construída utilizando a máxima verossimilhança com a matriz de substituição JC como predito pelo jModelTest, e 1000 repetições. *novo gênero sugerido em 2018.



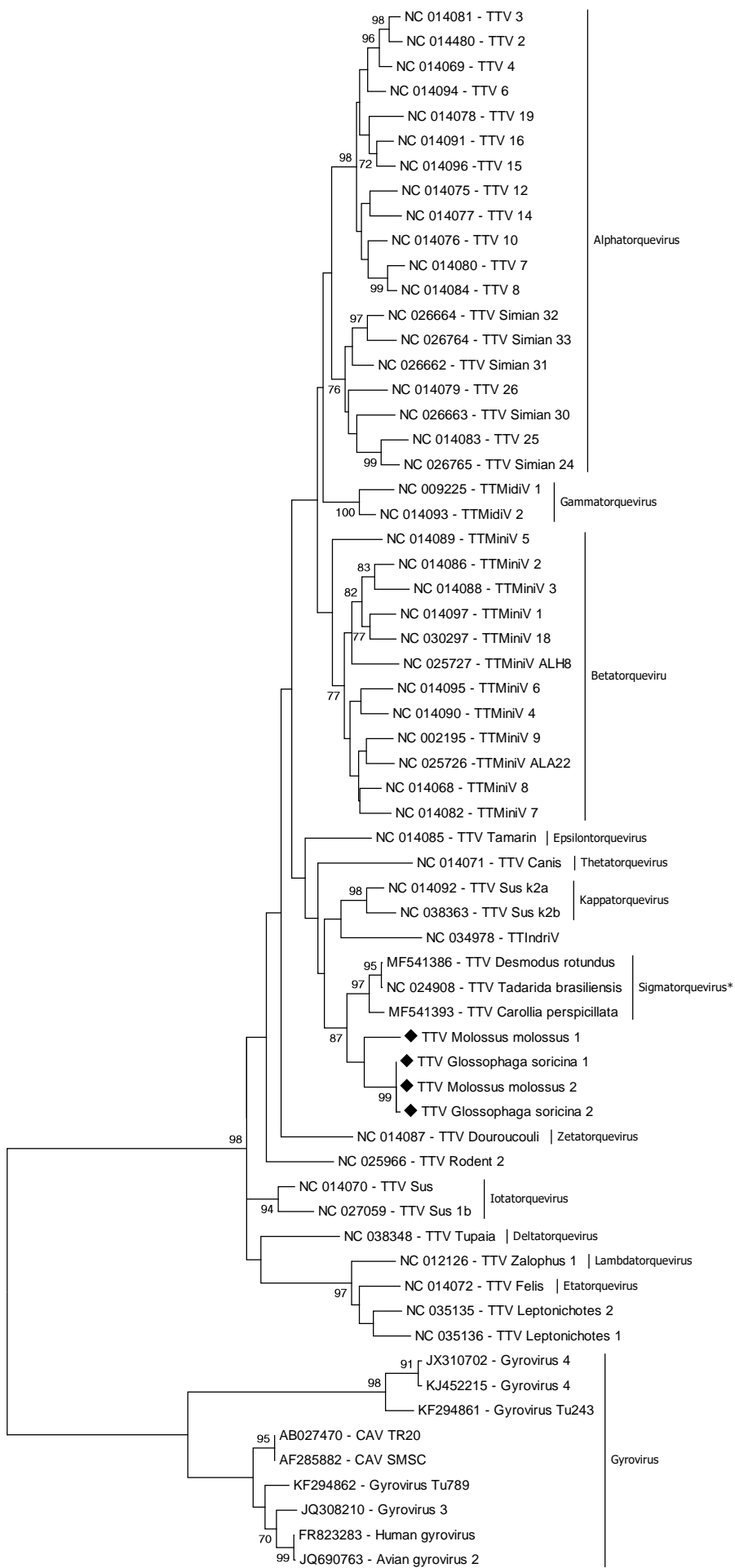


Figura 13: Árvore filogenética da sequência de aa do gene da ORF1 de membros da família *Anelloviridae*. Árvore reconstruída baseada na sequência de aminoácidos do gene da ORF1 de membros da família *Anelloviridae*. Os gêneros já identificados aparecem destacados. Os genes da ORF dos diferentes anelovírus identificados nesse estudo estão representados com ♦. A árvore filogenética foi construída utilizando a máxima verossimilhança com a matriz de substituição JTT como predito pelo ProtTest, e 1000 repetições. *novo gênero sugerido em 2018.

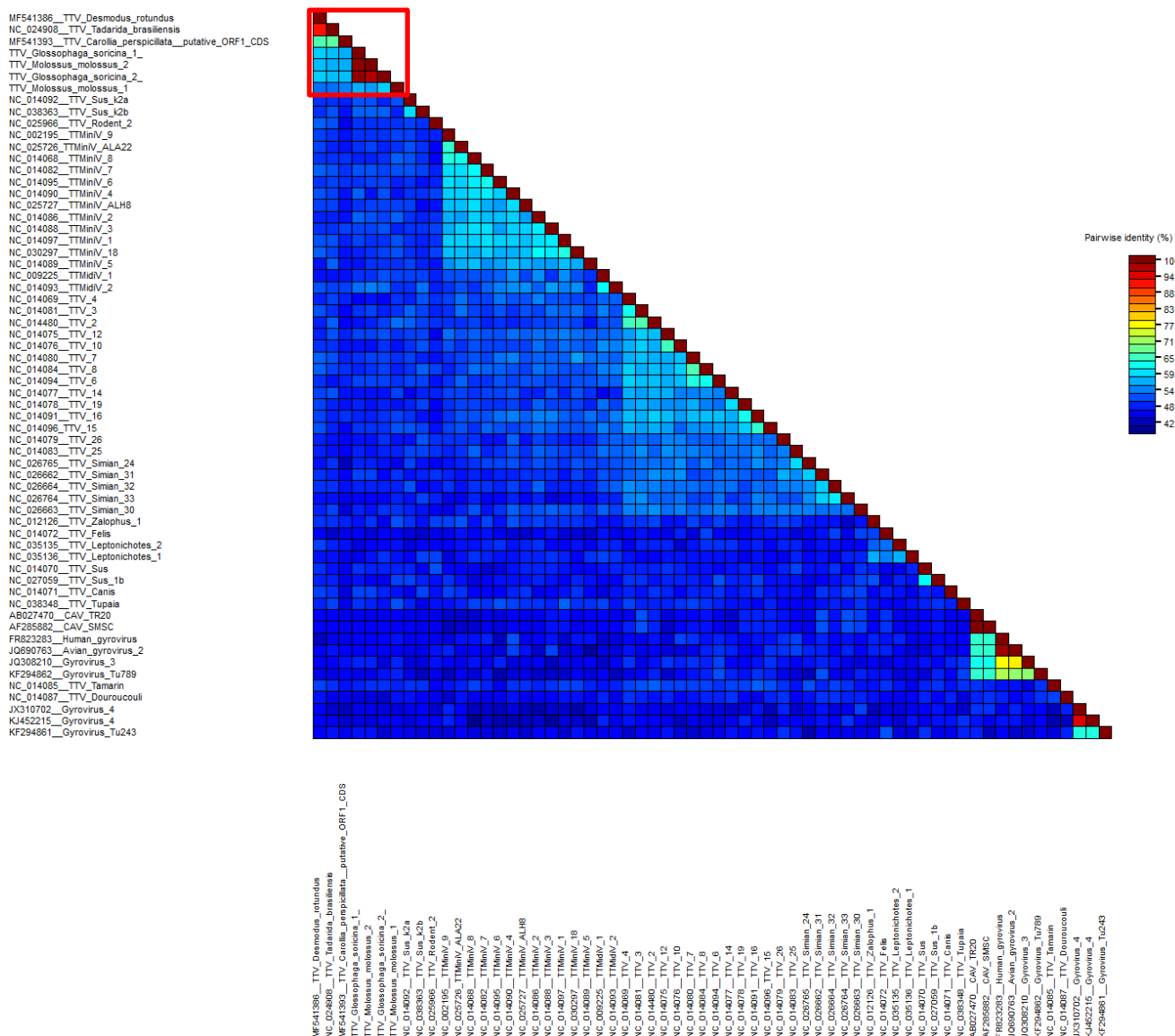


Figura 14: Matriz de identidade dos *Anelovirus*. Matriz gerada através do alinhamento de sequências da ORF1 da família *Anelloviridae*. O retângulo vermelho destaca a identidade entre as seqüências de TTV de morcegos.

O quarto *contig* apresentou um tamanho de 1.814 nt e similaridade com espécies da família *Circoviridae*. Através do *software Price*, foi possível montar um genoma completo, denominado de *Molossus molossus circovirus* MmCv, com tamanho de 1.878 nt e conteúdo de GC de 42,5 %, no qual foram identificadas duas ORFs (Figura 15). A ORF1 está posicionada do nucleotídeo 900 até 1.804, no sentido

anti-senso, totalizando 975 nt, e codifica a proteína de replicação (Rep), enquanto que a ORF2 posicionada do nucleotídeo 908 até 1.534 no sentido senso, totalizando 627 nt que codifica a proteína do capsídeo (Cap). O *motif* de nove nucleotídeos (TAGTATTAC), que representa a origem de replicação do vírus, está posicionado do nucleotídeo 1773 ao 1781, dentro do *steam loop*, localizado entre os nucleotídeos 1758 e 1795.

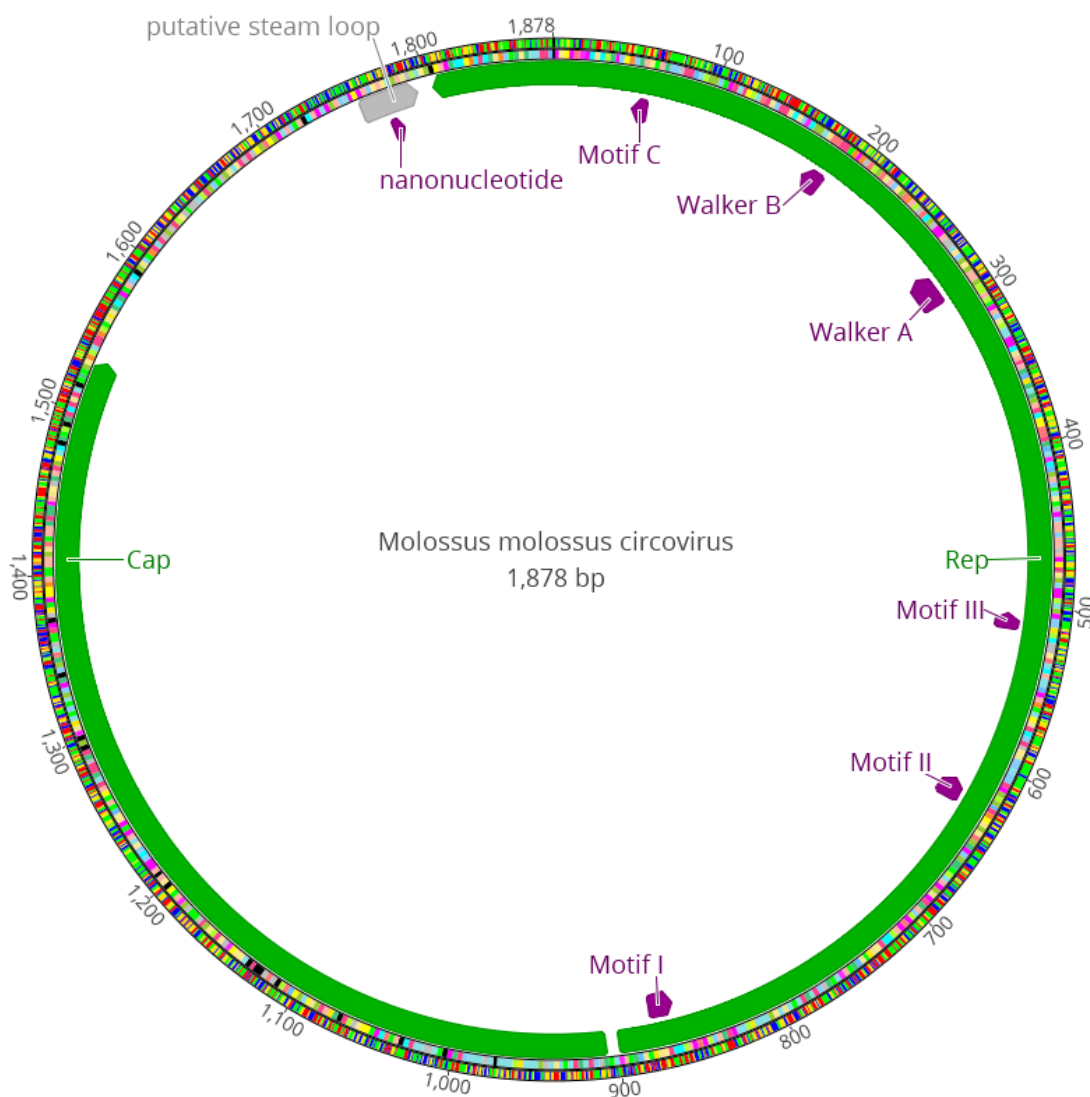


Figura 15: Representação do genoma completo do *Molossus molossus circovirus*. Representação criada a partir da anotação do genoma realizada no *software* Geneious, dando destaque para a demarcação das ORFs em verde; dos *motif* em roxo; e do *steam loop* em cinza.

Além da anotação do *motif* nanonucleotídico, foram anotados também 6

motifs dentro da Rep com funções importantes para a replicação dos *Circovirus*. Três deles são relacionados com a replicação por círculo rolante (RCR): *Motif I*, *Motif II* e *Motif III*. Os restantes estão relacionados com a superfamília 3 das helicases (SF3): *Walker A*, *Walker B* e *Motif C* (Figura 16).

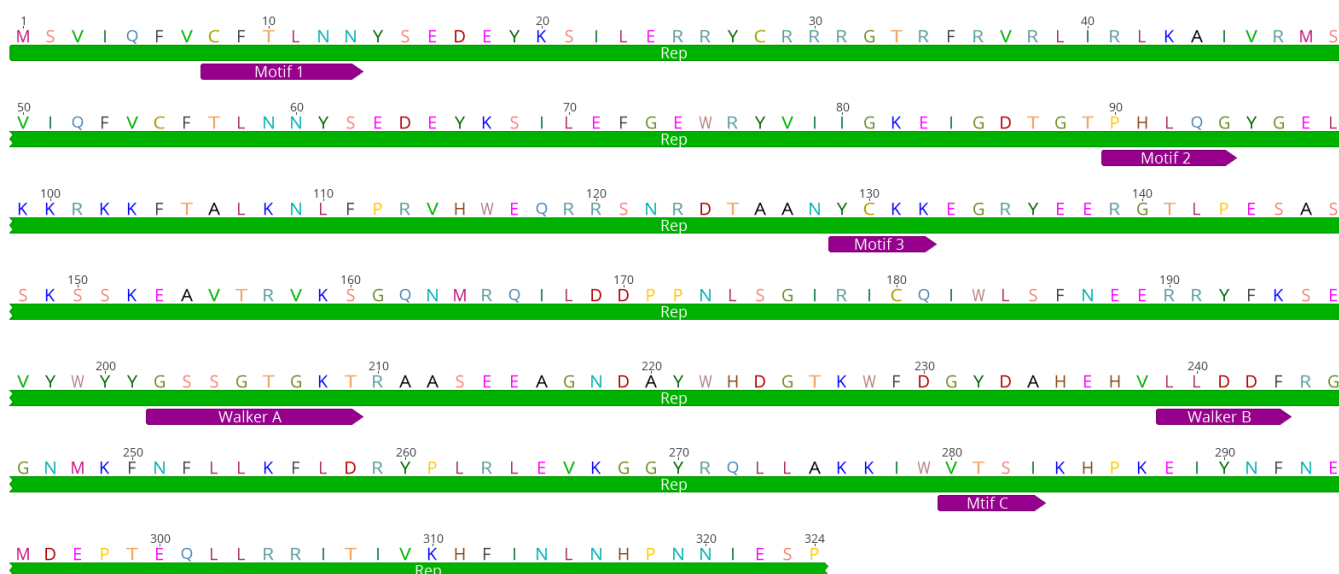
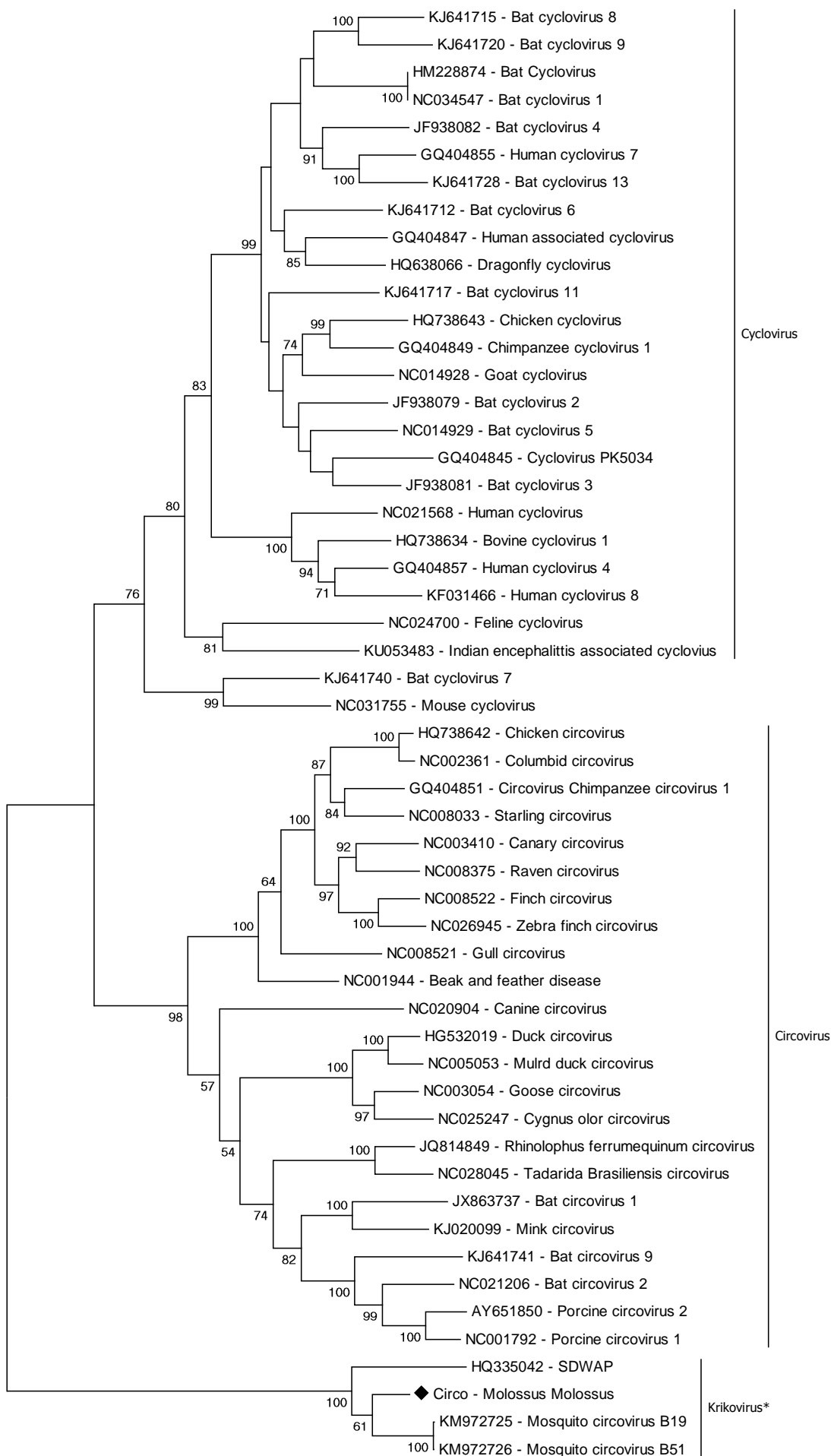
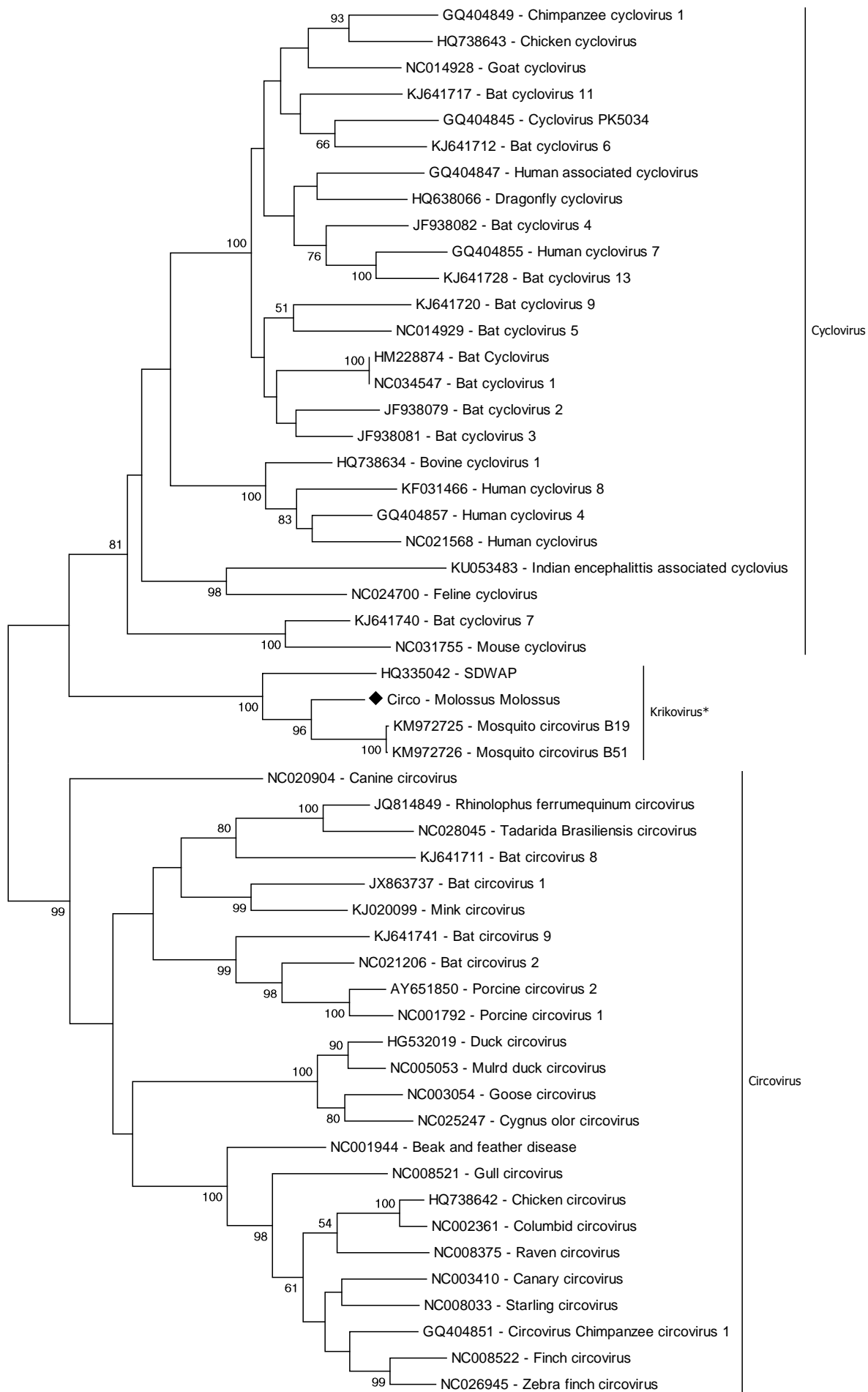



Figura 16: Representação da Rep do *Molossus molossus circovirus*. Representação criada a partir da anotação do genoma realizada no *software* Geneious, dando destaque para a demarcação dos 6 *motif* em roxo


Foram reconstruídas 3 árvores filogenéticas: a primeira baseada no genoma completo dos circovírus (Figura 17); a segunda, na sequência de nucleotídeos da Rep (Figura 18); e a terceira, na sequência de aminoácidos da Rep (Figura 19). Nas três árvores geradas a sequência do MmCv foi comparada com outras 52 sequências disponíveis no GenBank. O resultado demonstrou que o MmCv formou um cluster separado dos gêneros reconhecidos *Circovirus* e *Cyclovirus*. Esse cluster, além do MmCv, possui membros de um novo gênero sugerido. Dessa forma, os indícios apontam para a classificação do MmCv como membro do gênero proposto *Krikovirus* (Garigliany et al., 2015).

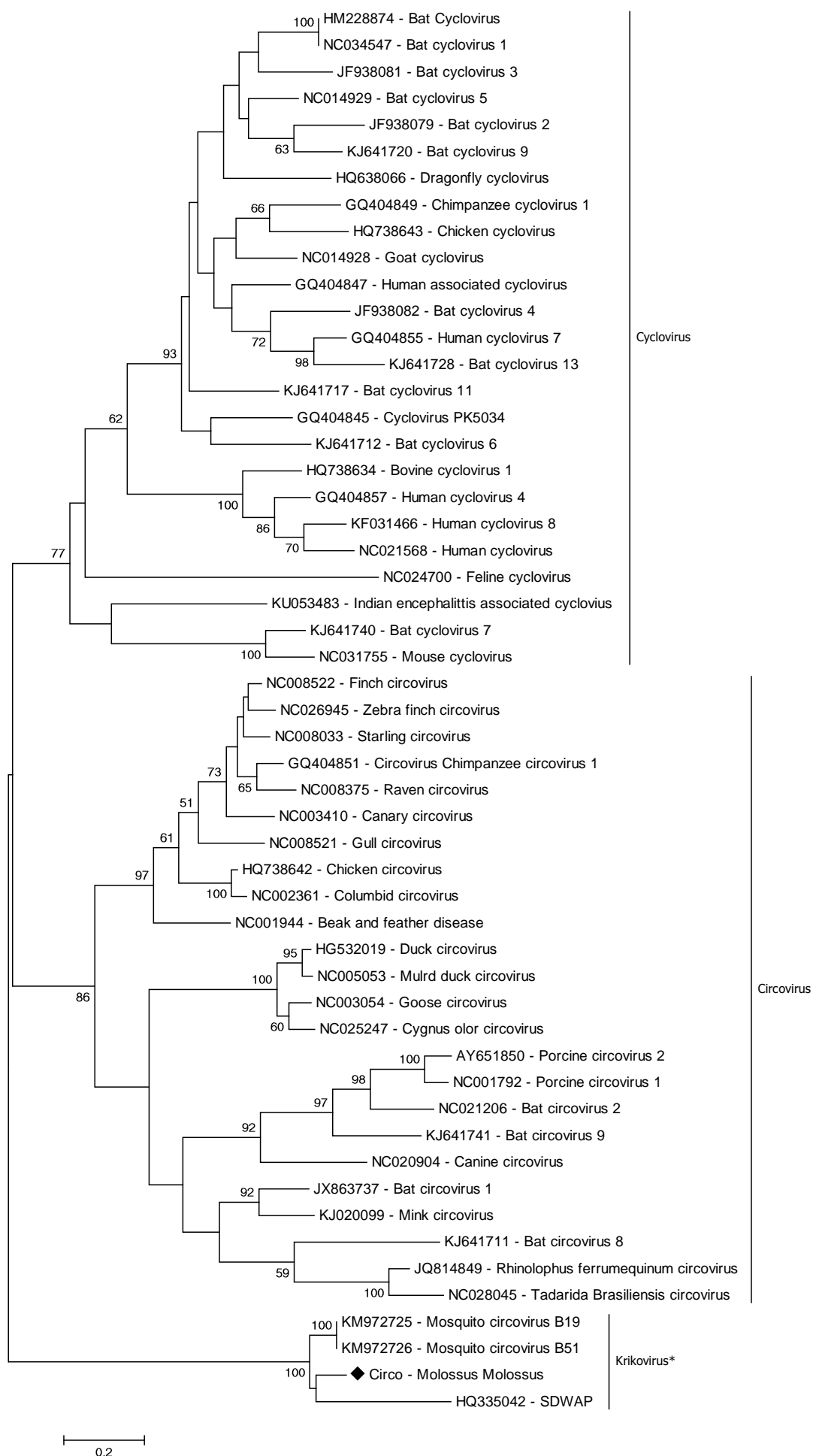
Figura 17: Árvore filogenética do genoma completo de membros da família *Circoviridae*. Árvore reconstruída baseada na sequência de nucleotídeos de genomas completos de membros da família *Circoviridae*. Os gêneros já identificados aparecem destacados. O genoma completo identificado neste estudo está representado com ♦. A árvore filogenética foi construída utilizando a máxima verossimilhança com a matriz de substituição JC como predito pelo jModelTest, e 1000 repetições. *gênero proposto em 2015.





 Figura 18: Árvore filogenética da sequência de nt da proteína Rep de membros da família *Circoviridae*. Árvore reconstruída baseada na sequência de nucleotídeos do gene da proteína Rep de membros da família *Circoviridae*. Os gêneros já identificados aparecem destacados. A sequência identificada neste estudo está representada com ♦. A árvore filogenética foi construída utilizando a máxima verossimilhança com a matriz de substituição JC como predito pelo jModelTest, e 1000 repetições. *gênero proposto em 2015

 Figura 19: Árvore filogenética da sequência de aa da proteína Rep de membros da família *Circoviridae*. Árvore reconstruída baseada na sequência de aminoácidos transcrita do gene da proteína Rep de membros da família *Circoviridae*. Os gêneros já identificados aparecem destacados. A sequência identificada neste estudo está representada com ♦. A árvore filogenética foi construída utilizando a máxima verossimilhança com a matriz de substituição JTT como predito pelo ProtTest, e 500 repetições. *gênero proposto em 2015



A matriz de identidade demonstrou que o MmCV apresenta uma identidade inferior a 80 % com outros genomas de CV já descritos, representando uma nova espécie viral (Figura 20).

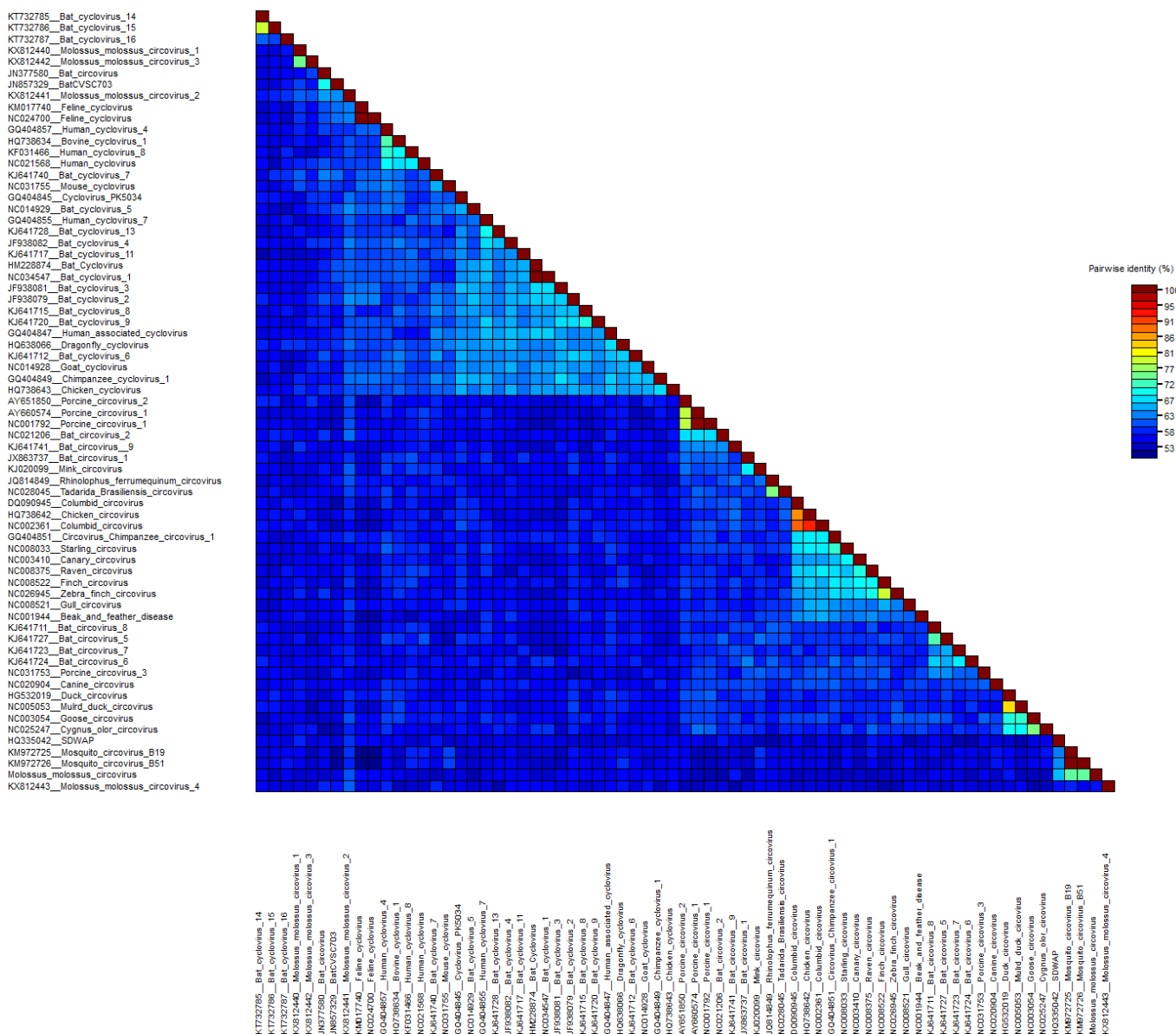


Figura 20: Matriz de identidade dos *Circovirus*. Matriz gerada através do alinhamento de seqüências da ORF1 da família *Circovirus*.

5.6 Pulmão de *Glossophaga soricina*

O sequenciamento do *pool* de pulmão de *Glossophaga soricina* resultou em oito *contigs* similares a vírus distintos de bacteriófagos. Destes oito, seis obtiveram identidade com papilomavírus, apresentando tamanho entre 132 e 270 nt. Com a

finalidade de aumentar e/ou unir esses fragmentos foi utilizado o *software Price*, resultando em 5 *contigs* com tamanho entre 132 e 462 nt. Os *contigs* apresentaram similaridade com diferentes proteínas do *Bos taurus papillomavirus* (Tabela 4), e, devido ao tamanho dos mesmos, não foi realizada a análise filogenética.

Tabela 4: Resumo dos contigs de papilomavírus identificados em pulmão de *Glossophaga soricina*.

Identificação do contig	Tamanho (nt)	Proteína (número de acesso no Genbank)	Identidade
Papiloma GS 1	462	L2 (AVX45652)	79,8 %
Papiloma GS 2	243	E2 (AVX45651)	66,7 %
Papiloma GS 3	231	E7 (AVX45649)	100 %
Papiloma GS 4	207	E1 (AVX45650)	84,1 %
Papiloma GS 5	132	E2 (AVX45651)	100 %

Os outros dois contigs identificados em *G. soricina* apresentaram similaridade com a ORF1 do *Torque teno Tadarida brasiliensis virus* (número de acesso do GenBank: YP_009058944). O primeiro fragmento, denominado de *Torque teno Glossophaga soricina virus* ORF1-1, possui um tamanho de 1.512 nt e um conteúdo de GC de 39,9 %; o segundo, denominado de *Torque teno Glossophaga soricina virus* ORF1-2, possui um tamanho de 1.149 nt e um conteúdo de GC de 37,7 %. A partir destas sequências, foram reconstruídas duas árvores filogenéticas, uma baseada na sequência de nt (Figura 12) e a outra na sequência de aa (Figura 13) da ORF1 de anelovírus. As amostras se agruparam juntamente com as sequências identificadas em morcegos. Também, a matrix de identidade demonstra que as sequências detectadas em *G. soricina* são da mesma espécie que a TTMmoV-2 (Figura 14).

5.7 Pulmão de *Artibeus lituratus*

Bem como na amostra de SOSL, o *pool* de *swab* orofaríngeo de *A. lituratus* não apresentou nenhum *contig* com similaridade a vírus de eucariotos;

6. DISCUSSÃO

6.1 Metodologias empregadas

No presente trabalho foram utilizadas diferentes abordagens para a detecção de genomas virais em amostras biológicas de morcegos. Protocolos utilizados em outros estudos foram discutidos, analisados e adaptados conforme a disponibilidade de recursos e tipo de amostra (Conceição-Neto et al., 2015; et al.; Temmam, 2015; Kluge et al., 2106).

Num primeiro momento foi elaborado um protocolo adaptando as técnicas utilizadas por Kluge e colaboradores (2016). Para isso, foram utilizadas as amostras de *swab* anal e orofaríngeo das espécies de morcegos *Artibeus lituratus* e *Sturnira lilium*, capturadas e cedidas pelo Grupo de Estudos em Ecologia de Mamíferos e Educação Ambiental da Universidade Estadual de Maringá-PR. Um fluxograma da metodologia utilizada para essas amostras pode ser visto na sessão de materiais e métodos (Figura 2, pg. 16).

Devido à instabilidade dos vírus em condições ambientes, a conservação das amostras coletas para a aplicação das metodologias utilizadas é um ponto determinante para um bom desempenho na recuperação de genomas virais. Uma conservação imprópria pode submeter os vírus presentes nas amostras a condições de temperatura e pH capazes de desestabilizar o capsídeo viral. Dessa forma, o material genético viral fica exposto aos diferentes passos utilizados que visam remover das amostras todo os ácidos nucléicos desprotegidos de capsídeos. Com isso, uma grande parte dos genomas virais pode ser degradada quando as amostras sofrem um tratamento com nucleases, diminuindo a diversidade viral original.

Durante as coletas dos *swabs*, esses foram acondicionados em Meio Essencial Mínimo, visando a manutenção do pH e diminuindo a desestabilização do capsídeo. Além disso, as amostras foram armazenadas sob refrigeração (4° C) durante o trajeto percorrido do local de coleta até a chegada no laboratório, onde foram acondicionadas em ultrafreezer a – 80° C. Também, as amostras foram mantidas sob gelo durante o seu processamento e centrifugadas em centrífugas refrigeradas sempre que possível, diminuindo os efeitos advindos de variações de temperatura. Dessa forma, as amostras foram bem acondicionadas, minimizando possíveis perdas

de genomas virais.

Outro desafio que pode ser encontrado durante a realização da análise do viroma é a competição do sequenciamento entre os genomas virais e genomas de células hospedeiras ou outros microrganismos. Como as amostras são enriquecidas de maneira randômica, serão gerados fragmentos de qualquer genoma presente nas mesmas. Assim, para evitar ao máximo a contaminação com ácidos nucléicos não-virais, diferentes medidas foram adotadas considerando as características específicas dos vírus, como o seu tamanho e proteção proteica do genoma (capsídeo). A filtração foi a primeira medida adotada com o objetivo de selecionar os vírus pelo seu tamanho, porém alguns vírus tem a capacidade de aglomeração de suas partículas fazendo com que fiquem retidos no filtro utilizado. Por isso, a amostra foi submetida a uma homogeneização seguida de clarificação. A homogeneização faz com que as partículas aglomeradas, ou ligadas a substâncias orgânicas, fiquem suspensas na solução. Por sua vez, a clarificação faz com que grandes partículas precipitem, gerando uma menor saturação dos poros da membrana do filtro. O filtrado originado foi submetido a um segundo passo de seleção de vírus pelo tamanho, a ultracentrifugação em colchão de sacarose. Nessa etapa a amostra foi submetida a uma centrifugação em alta velocidade em um colchão de sacarose com concentração de 25%, onde apenas partículas extremamente pequenas passariam pela sacarose. Com os procedimentos adotados, em teoria, o resultante da ultracentrifugação é um *pellet* composto apenas por vírus e fragmentos de ácidos nucléicos. Por segurança, os pellets ressuspensos foram tratados com clorofórmio visando a lise de membranas lipídicas e a separação de contaminantes orgânicos. Assim, a estrutura do capsídeo viral, por ter origem proteica, não seria afetada, permitindo a recuperação de ácidos nucléicos protegidos ou não por capsídeo. Para degradar os possíveis fragmentos de genomas não-virais, foi realizado um tratamento com nucleases no sobrenadante oriundo do tratamento com clorofórmio. Dessa maneira, os genomas protegidos pelos capsídeos não foram degradados.

A amplificação randômica foi utilizada para aumentar a concentração do material genético viral extraído da amostra. Apesar de poder amplificar ácidos nucléicos contaminantes, esse passo é fundamental para obter-se a quantidade necessária de material para a realização do sequenciamento de alto desempenho. Nesse passo a escolha da polimerase é fundamental para o resultado final. As

amostras de *swabs* foram amplificadas com o fragmento Klenow da DNA polimerase 1 de *Escherichia coli* (Kluge et al., 2106). O enriquecimento a partir da Klenow gerou quantidades próximas aos limites mínimos para a realização do sequenciamento.

Após a análises dos resultados obtidos com a metodologia empregada no processamento das amostras de *swabs*, algumas mudanças foram realizadas na tentativa de ampliar a diversidade viral encontrada. Tais alterações visaram a manutenção de uma quantidade maior do genoma viral em detrimento de um genoma mais purificado. Um fluxograma da metodologia utilizada para essas amostras pode ser visto na sessão de materiais e métodos (Figura 3, pg. 19).

Os cuidados para evitar a desestabilização de partículas virais foram mantidos. Assim como com os *swabs*, as amostras de pulmão foram armazenadas de maneira adequada. Após o recebimento do animal para o diagnóstico de raiva, foi realizada a coleta dos órgãos. Após a identificação, as amostras foram acondicionadas em ultrafreezer a -80° C. Também, as amostras foram mantidas sob gelo durante os passos da purificação de genomas virais sempre que possível, incluindo a utilização de centrifugas refrigeradas.

Por se tratar de uma amostra mais consistentes do que as de *swabs*, a primeira alteração aplicada foi na homogeneização. Ao invés de uma única agitação em vórtex, os fragmentos de pulmão foram fragmentados com o auxílio de uma lâmina de bisturi e posteriormente macerados com pistilos em cadinhos contendo areia estéril. Por fim, o macerado foi agitado vigorosamente em vórtex com esferas de vidro, completando o processo de homogeneização. Devido à grande quantidade de partículas suspensas no homogeneizado, a clarificação também foi alterada. Foi adicionado um passo de centrifugação extra em uma velocidade maior. Com isso, a grande maioria dos restos do tecido e células precipitou, deixando o sobrenadante mais limpo para a etapa de filtração. O passo da filtração foi mantido o mesmo, porém notou-se uma dificuldade maior das amostras passarem pelo filtro devido a detritos celulares.

Outra modificação empregada na purificação das partículas virais foi na etapa da ultracentrifugação. Nas amostras de pulmão a velocidade e o tempo de centrifugação foram reduzidos. Tais mediadas foram adotados pois Temmam e colaboradores (2015) demonstraram que a quantidade de microrganismos e ácidos nucleicos exógenos purificados com as condições de centrifugação aplicada nas

amostras amostras de pulmão não possuíam uma diferença significativa em relação a um tempo e velocidade mais elevados como os aplicados nas amostras de swab. Além disso, tempo e velocidade altas podem favorecer a passagens de contaminantes pelo colchão de sacarose. Da mesma maneira, foi demonstrado que o tratamento com clorofórmio pode causar uma desestabilização em vírus envelopados devido a remoção do envelope (Conceição-Neto et al., 2015). Assim, a incubação com nucleases após o tratamento com clorofórmio poderia degradar os genomas dos vírus desestabilizados pela remoção do envelope. Com isso, o passo de purificação com clorofórmio foi removido do processamento das amostras de pulmão.

O passo de enriquecimento também foi um alvo para a tentativa de otimizar os resultados. Para tentar aumentar a quantidade de final de ácidos nucleicos foi utilizada a enzima phi29 DNA polimerase, a qual apresenta uma fidelidade maior e uma quantidade de DNA inicial necessária menor, quando comparada com a Klenow. Ao final do processo, a amplificação com a phi29 produziu uma quantidade maior de amplicons.

6.2 Panorama geral dos resultados

Os dois protocolos foram capazes de detectar vírus de diferentes famílias. No entanto, a porcentagem de *reads* virais encontradas nos *pools* de pulmão é maior quando comparada aos *pools* de swab (Tabela 1, pg. 24). Porém, essa diferença na quantidade de *reads* não interferiu na diversidade dos *contigs*. Enquanto que nos *pools* de *swab* foram identificados *contigs* com similaridade a adenovírus, papilomavírus e parvovírus, nas amostras de pulmão foram identificados *contigs* com similaridade a anelovírus, circovírus e papilomavírus. Contudo, nota-se uma diferença entre o tamanho final dos *contigs*, que foram maiores nas amostras de pulmão. Também, apenas na amostra de pulmão de *Molossus molossus*, foi possível identificar 3 genomas completos de novas espécies virais. Apesar de *contigs* maiores e uma quantidade maior de *reads* virais obtidas, a phi29 DNA polimerase introduziu o viés de preferência por genomas circulares.

É importante salientar que a quantidade de *reads* virais pode estar subestimada devido a alimentação dos bancos de dados. Com a utilização das técnicas de sequenciamento de alto desempenho, que são independentes do cultivo

de microrganismos, uma vasta quantidade de genomas desconhecidos pode ser acessada. Dessa maneira, um número expressivo de *reads* acaba não sendo identificadas por falta de fragmentos similares disponíveis para comparação. Dessa forma, as *reads* declaradas como não identificadas pelo *taxonomer* (em torno de 50% das *reads* de cada amostra) poderão ter similaridade com genomas virais conforme o banco de dados for sendo alimentado com novas sequências.

Apesar de identificar uma grande diversidade de contigs virais, os dois protocolos utilizados não foram capazes de eliminar por completo o viés da presença de ácidos nucleicos de outros microrganismos. Contudo, os *pools* de pulmão apresentaram uma menor quantidade em comparação aos *pools* de *swabs*. Dessa forma, o protocolo utilizado nas amostras de pulmão mostrou-se mais eficaz em selecionar e amplificar os genomas virais do que o protocolo utilizado nas amostras de *swab*. Todavia, é importante salientar que a natureza da amostra pode interferir na quantidade inicial de vírus e bactérias em cada *pool*.

Por fim, nenhum fragmento de genoma de vírus RNA foi identificado nas análises. Entre os prováveis motivos para esse resultado estão a conservação das amostras, uma vez que os vírus de genoma de RNA são, na maioria das vezes, menos resistentes no ambiente do que vírus de genoma de DNA.

6.3 Fragmentos virais detectados

Nesse tópico serão discutidos a natureza e as estratégias de classificação dos *contigs* similares a vírus encontrados neste trabalho. Para facilitar a compreensão a discussão será dividida conforme a família viral para a qual o fragmento apresenta similaridade, organizado em ordem alfabética.

6.3.1 *Adenoviridae*

Os membros desta família são vírus não envelopados, com simetria do capsídeo icosaédrica e um diâmetro variando entre 70 e 90 nm. O genoma é composto por uma única cópia de DNA dupla fita (dsDNA, do inglês *double strand DNA*) linear, com tamanho variando entre 26.163 e 48.395 pares de bases (pb) e conteúdo de GC entre 33,6 e 66,9 %. Na extremidade 5' de cada fita do genoma existe uma proteína

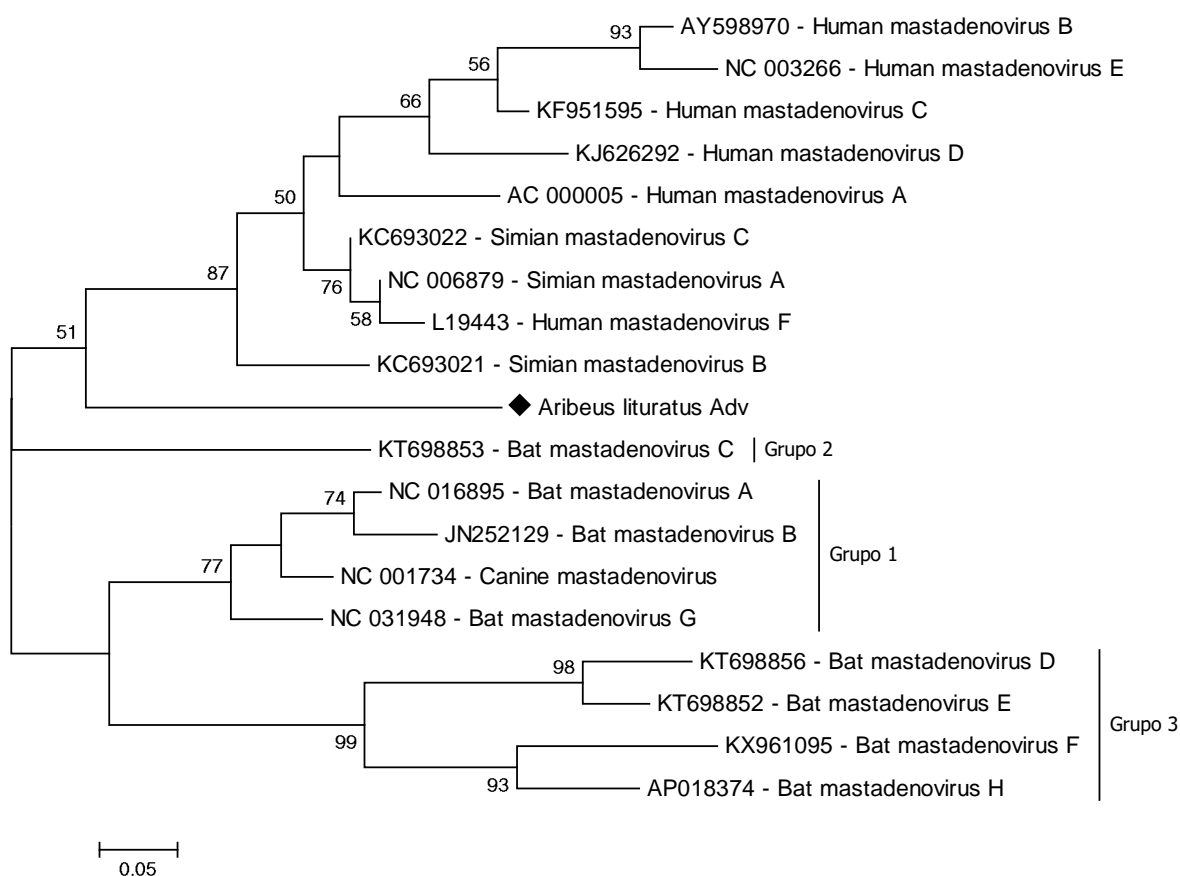
ligada covalentemente denominada de proteína terminal do DNA São subdivididos em 5 gêneros: *Mastadenovirus*, cujos representantes infectam somente mamíferos; *Aviadenovirus*, infectam somente aves; *Atadenovirus*, podem infectar mamíferos, aves ou répteis; *Siadenovirus*, podem infectar aves ou anfíbios; e *Ichtadenovirus* infectam peixes. A demarcação de espécies é baseada na distância evolutiva, refletida por distâncias filogenéticas em árvores reconstruídas com base no gene da DNA polimerase (*pol*) (ICTV, 2018).


No presente trabalho foram detectados dois fragmentos de adenovírus e, apesar de não totalmente inesperado, essa é a primeira descrição de adenovírus nessas duas espécies de morcegos. Atualmente, são reconhecidas 7 espécies de adenovírus de morcegos (do inglês BatAdv: *Bat adenovirus*) pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (de inglês ICTV: *International Committee on Taxonomy of Viruses*), demonstrando uma distribuição mundial desse vírus e amplo espectro de espécies hospedeiras (Kohl et al., 2012; Li et al., 2012; Tan et al., 2016; Hackenbrack et al., 2017; Tan et al., 2017). Além destas, uma nova espécie foi proposta em 2017 (Ogawa et al., 2017).

Embora os adenovírus já tenham sido identificados em morcegos brasileiros (Lima et al., 2013b), o estudo anterior amplificou um fragmento de DNA de um gene diferente ao amplificado neste, impossibilitando qualquer comparação entre eles. Da mesma forma, uma comparação dos fragmentos entre si não é possível porque representam regiões diferentes do genoma. Assim, foram realizadas análises filogenéticas separadas para cada fragmento.

O primeiro destes fragmentos, denominado de *A. lituratus adenovirus* (AlAdV), foi detectado em *swab* orofaríngeo de *A. lituratus* e apresenta um tamanho de 312 pb e 71,2 % de identidade com a proteína terminal do DNA do adenovírus de equino (número de acesso do Genbank: YP_009272543). A análise comparou a sequência traduzida a partir do fragmento, utilizando 104 aminoácidos (aa), com 32 sequências de diferentes espécies de adenovírus, incluindo as 7 espécies de BatAdv reconhecidas pelo ICTV e a amostra recentemente proposta (Ogawa et al., 2017). Como era esperado, a amostra foi agrupada com membros do gênero *Mastadenovirus* (Figura 6, pg. 30), que possuem especificidade para mamíferos podendo causar infecções respiratórias, conjuntivite, gastroenterite, cistite e meningoencefalite (Shen et al., 2019). Uma análise detalhada apenas do gênero *Mastadenovirus* demonstrou

a formação de três clusters de amostras de BatAdV separados (Figura 21) semelhante a demonstrada por Ogawa e colaboradores (2017) que utilizaram genomas completos para a reconstrução da árvore filogenética. No Grupo 1 agruparam as espécies de BatAdV A, B e G, juntamente com o adenovírus canino; no grupo 2 a espécies BatAdV C; e no grupo três as espécies BatAdV D, E, F e H, juntamente com a recentemente proposta BatAdV H. De maneira interessante, o AIAdV formou um grupo distinto, aproximando-se dos adenovírus de primatas. Apesar da classificação de adenovírus utilizar como base o gene *pol*, a análise filogenética do fragmento obtido dá indícios de se tratar de uma nova espécie de BatAdV, distante dos 3 grupos formados pelas espécies de BatAdV atualmente reconhecidas pelo ICTV. Tais indícios são reforçados quando é feita a comparação entre a análise filogenética realizada com a análise do genoma completo feita por Ogawa e colaboradores (2017). Assim como a relação próxima entre alguns adenovirus de caninos e de morcegos indica uma possível transmissão interespecífica (Kohl et al., 2012), a formação de um cluster monofilético entre o AIAdV e os AdV de primatas indica um potencial risco zoonótico deste vírus.



 Figura 21: Árvore filogenética do gênero *Mastadenovirus*. Árvore reconstruída baseada na sequência parcial de aminoácidos da proteína terminal do DNA dos membros do gênero *Mastadenovirus*. As espécies as quais já possuem uma classificação a nível de gênero apresentam o nome do gênero. O fragmento identificado neste estudo está representado com ♦. A árvore filogenética foi construída utilizando a máxima verossimilhança com a matriz de substituição JTT como predito pelo ProtTest, e 1000 repetições.

O segundo, em *swab* anal de *S. liliium*, apresenta um tamanho de 177 pb e 98 % de identidade com a proteína L4 do adenovírus humano C (HAdV-C) (número de acesso do Genbank: AFS50339), o qual pode causar infecções respiratórias e persistir em latência nas células linfóides podendo ser observada presença de vírus infeccioso nas fezes (Dhingra et al. 2019). A análise deste fragmento, denominado de *S. liliium adenovirus* (SIAdV), comparou um total de 59 aminoácidos (aa) com 24 sequências de diferentes espécies de adenovírus, incluindo as 7 espécies de BatAdV reconhecidas pelo ICTV. A grande identidade com HAdV-C (98 %) ficou visível na árvore filogenética, e, apesar do pequeno tamanho do fragmento, o SIAdv pode ser uma espécie de adenovírus humano do subgrupo C (Figura 9, pg. 35). Vários estudos demonstraram a presença do HAdV-C em amostras de água (Bibby & Peccia 2013; Barrios et al., 2016; Staggemeier et al., 2017), o que levou a reflexão sobre uma possível contaminação da amostra. Porém, as medidas de biosseguranças adotadas e o fato de todos pools de *swabs* serem processados ao mesmo tempo e pelo mesmo manipulador torna praticamente remota essa hipótese. Assim, uma possível teoria para a presença de HAdV nessa amostra é a ingestão acidental através da alimentação ou ingestão de água, uma vez que as infecções por AdV podem ser causadas pelo consumo de água ou inalação de aerossóis contaminados (Jiang, 2006). Além disso, a ocorrência de AdV em fezes pode estar relacionada com a alta frequência deste vírus no ambiente (Barardi et al., 2012). Uma segunda hipótese para a presença de HAdV na amostra seria a transmissão interespecífica. Essa hipótese contraria a alta especificidade dos adenovírus com sua espécie hospedeira (Chen et al., 2011). Contudo, estudos já sugeriram a possibilidade dos AdV cruzarem a barreira específica. Por exemplo, anticorpos contra AdV de primatas não-humanos foram detectados em humanos (Xiang et al., 2006). Ainda, um surto de AdV em macacos em uma instalação de pesquisa na Califórnia ocasionou a transmissão do vírus para um pesquisador, e posteriormente ocorreu a transmissão do pesquisador para um de seus familiares (Chen et al., 2011).

As infecções por AdV são assintomáticas ou resultam em doenças brandas, com algumas exceções. Em cães, infecções pelo adenovírus canino 1 (CAAdV-1) pode causar hepatite, enquanto que infecções com o CAAdV-2 podem resultar em doenças respiratórias (Wong et al., 2017). Já em humanos, as doenças causadas por AdV incluem problemas respiratórios (Lewis et al., 2009), conjuntivite (Walsh et al., 2009), hepatite (Saad et al., 1997), miocardite (Treacy et al., 2010) e gastroenterite (Jones et al., 2007). Além disso, foi relatado a ocorrência de uma pneumonia fatal devido a infecção por adenovírus da espécie *Human mastadenovirus B* (Yatsyshina et al., 2016). Apesar do HAdV-C estar relacionado com infecções do trato respiratório (Santos & Soares 2015), ele pode ser detectado nas fezes, provavelmente pela ingestão de secreções do trato respiratório, uma vez que eles não replicam no trato gastrointestinal (Lenaerts et al., 2008). Dessa forma, foi possível detectar AdV em ambos os *swabs*, orofaríngeo e anal, reforçando o potencial de transmissão desses vírus via ingestão oral ou de aerossóis de material fecal de morcegos (Benkő et al., 2014).

6.3.2 *Anelloviridae*

Os membros desta família são vírus não envelopados com diâmetro em torno de 30 nm. O genoma é composto por uma única cópia de DNA fita simples (ssDNA, do inglês *single strand DNA*) circular, com tamanho variando entre 2.000 e 3.900 pb aproximadamente, com um conteúdo de GC em torno de 36 a 60 %. Possui duas principais ORFs parcialmente sobrepostas, ORF1 e ORF2, com as funções das proteínas codificadas ainda não bem estabelecidas, mas indícios apontam que a ORF1 codifica proteínas associadas à replicação e ao capsídeo (ICTV, 2018).

Atualmente, os anelovírus são classificados em 12 gêneros e aproximadamente 68 espécies. Recentemente, foi proposta a criação de dois novos gêneros *Omegatorquevirus* e *Sigmatorquevirus* (de Souza et al., 2018). Os critérios de demarcação de gênero e espécie são baseados na sequência de nucleotídeos da ORF1. Dessa forma, vírus com identidade de até 46 % são considerados de gêneros distintos, enquanto que vírus com identidade entre 46 e 65 % são considerados de espécies diferentes (ICTV, 2018). Possuem uma ampla distribuição pelo planeta (Bendinelli et al., 2001) e já foram identificados em diferentes espécies incluindo

primatas não-humanos, cães, gatos, porcos, mosquitos e humanos (Okamoto et al., 2002; Cancela et al., 2016). Disseminados principalmente por transmissão fecal-oral e saliva (Ali et al., 2002; Maggi et al., 2003; Nishiyama et al., 2014), os anelovírus são associados a hepatites, doenças respiratórias, cânceres e desordens hematológicas e autoimunes, com prevalência em humanos variando entre 5 e 90 % (Spandole et al., 2015).

O primeiro membro dessa família foi detectado em pacientes com hepatite pós-transfusional em 1997 (Nishizawa et al., 1997), porém, apenas em 2014 foi relatada a primeira sequência desses vírus em morcegos (Cibulski et al., 2014). Denominado de *Torque teno Tadarida brasiliensis virus* (TT-TbV), por ser detectado na espécie *T. brasiliensis*, formou um clado único na análise filogenética com outros anelovírus, indicando se tratar de uma possível nova espécie (Cibulski et al., 2014). Em 2018, de Souza e colaboradores identificaram dois novos genomas de anelovírus nas espécies de morcegos *Carollia perspicillata* e *Desmodus rotundus*. Na reconstrução filogenética estes dois novos vírus formaram um clado monofilético único com o TT-TbV, e os autores sugeriram a classificação de um novo gênero para esse clado, o *Sigmatorquevirus* (de Souza et al., 2018).

Neste estudo foram identificados 2 genomas completos de anelovírus em pulmões de *Molossus molossus* e duas sequências completas da ORF1 em pulmão de *Glossophaga soricina*. A análise da matriz de identidade demonstrou que as sequências da ORF 1 de *Torque teno G. soricina virus* (TTGsV) 1 e 2 tem uma elevada identidade com a sequência de *Torque teno M. molossus virus* (TTMmoV) 2, 98,68 e 97,14 %, respectivamente (Figura 14, pg. 42). Dessa forma, as três sequências podem ser classificadas como isolados da mesma espécie. Já o TTMmoV-1 apresenta uma identidade de aproximadamente 52 % com as outras três sequências desse estudo. Dessa forma, são propostas duas novas espécies de anelovírus, o *Torque teno bat virus – 1* (TTBatV-1), representado pelo isolado TTMmoV-1, e o *Torque teno bat virus – 2* (TTBatV-2), representado pelos outros três isolados. Além disso, a análise a matriz de identidade permitiu classificar as amostras juntamente com as descritas por de Souza e colaboradores, no novo gênero proposto *Sigmatorquevirus* (de Souza et al., 2018). Essas conclusões podem ser visualizadas nas árvores filogenéticas reconstruídas através da sequência de nt (Figura 12, pg. 40) e de aa (Figura 13, pg. 41) da ORF1.

Embora ainda tenham poucos estudos que detectaram anelovírus em morcegos, os achados aqui descritos apontam para uma ampla distribuição destes microrganismos nas espécies de morcegos. Além disso os fragmentos detectados foram divididos em duas espécies: TTBatV-1 em *M. molossus* e TTBatV-2 em *M. molossus* e *G. soricina*. Também, foi demonstrada uma similaridade de mais de 90 % entre o TT-TbV e o *Torque teno Desmodus rotundus virus*, classificando-os como isolados de uma espécie, sendo detectados em espécies de morcegos diferentes. Esses achados demonstram a ampla variedade de espécies de morcegos associadas a anelovírus e que a mesma espécie viral pode ser detectada em diferentes espécies hospedeiras.

6.3.3 *Circoviridae*

Os membros desta família são vírus não envelopados, com simetria do capsídeo icosaédrica (observado apenas membros do gênero *Circovirus*) e um diâmetro entre 15 e 25 nm. O genoma é composto por uma única cópia de ssDNA circular, com tamanho variando entre 1.700 e 2.100 pb aproximadamente com um conteúdo de GC em torno de 35 a 60 %. Possui uma organização ambisenso, com duas ORFs que codificam a proteína associada a replicação (Rep), e a proteína do capsídeo (Cap), localizadas em fitas diferentes na forma replicativa de dsDNA. A origem de replicação é conservada entre os membros dessa família e é marcada por *motif* composto por 9 nucleotídeos. A Rep apresenta três domínios catalíticos conservados importantes para a replicação por círculo rolante (RCR); *motif I*, *motif II* e *motif III*. Além destes domínios, a Rep apresenta um domínio característicos das helicases da superfamília 3 (SF3), dividido em três *motifs*: *Walker A*, *Walker B* e *motif C* (Rosario et al., 2017).

Atualmente apresenta 74 espécies divididas em dois gêneros: *Circovirus* e *Cyclovirus*, porém, em 2015, Garigliany e colaboradores (2015) sugeriram a criação de um novo gênero previamente denominado de *Krikovirus*. Destas espécies, aproximadamente 1/3 estão relacionadas a morcegos, sendo 8 espécies de *Circovirus* e 16 espécies de *Cyclovirus* (ICTV, 2018). Essa rápida expansão dos membros desta família, principalmente em morcegos, se dá ao uso de técnicas envolvendo o sequenciamento de alto desempenho (He et al., 2013; Wu et al., 2016; Han et al.,

2017; Hu et al. 2017). Por isso, é essencial uma caracterização criteriosa dos novos membros encontrados. A demarcação de espécies dentro de cada gênero é baseada na matriz de identidade do alinhamento do genoma completo, com um de corte de 80 % de identidade. Para a demarcação de gênero, além da reconstrução filogenética, a sequência do *steam loop* que contém a sequência nanonucleotídica responsável pela origem da replicação pode ser utilizada (Garigliany et al., 2015). A anotação dos *motif* presentes na Rep, citados anteriormente, se fazem necessárias para uma melhor classificação dos novos circovírus, uma vez que podem apresentar variações conforme o gênero (Rosario et al., 2017).

Diversos circovírus (CV) são relacionados com patologias em diferentes espécies de animais. Por exemplo, os CVs de suínos, PCV-2 e PCV-3 são responsáveis por síndromes severas que causam perdas econômicas significativas (Meng, 2013; Palinski et al., 2017); a doença do bico e da pena dos psitacídeos, muitas vezes fatal, também é causada por CVs (Latimer et al., 1991). Apesar dos CVs estarem amplamente disseminados em diferentes espécies de morcegos, como *Rhinolophus sinicus*, *R. Affinis*, *R. ferrumequinum*, *R. pusillus*, *Pleotus auritus*, *Myotis ricketti*, *M. fimbriatus*, *M. pequinus*, *Tadarida brasiliensis*, *Vespertilio sinensi*, *Hipposideros armiger* e em diferentes regiões do planeta (Ge et al., 2011; He et al., 2013; de Sales Lima, 2015a; Han et al., 2017; Hu et al., 2017;), nenhuma associação com patologia foi sugerida.

No presente trabalho foi detectado o genoma completo de um circovírus em pulmão de *M. molossus*, denominado de *M. molossus circovirus* (MmoCV). A matriz de identidade demonstrou que o MmoCV apresenta uma identidade inferior a 80 % com outros genomas de CV já descritos, representando uma nova espécie (Figura 20, pg. 49). É possível classificar o MmoCV dentro do gênero proposto *Krikovirus*, uma vez que formam um clado monofilético com as amostras desse gênero (Figura 17, pg. 45). Além disso, foi demonstrada a presença do *motif* de 9 nucleotídeos que representam a origem de replicação, presentes dentro da estrutura do *steam loop*, conservado entre os membros da família *Circoviridae* (Figura 15, pg. 43). Por fim, foi demonstrada a presença dos 3 *motifs* da RCR e os três *motifs* ligados a SF3, confirmando a classificação proposta (Figura 16, pg. 44).

O MmoCV mostrou uma semelhança maior com dois CV detectados em mosquitos. Dessa forma, três hipóteses são propostas: a primeira, que, devido aos

hábitos insetívoros, os morcegos infectarem-se através da alimentação com o vírus originário do mosquito; a segunda, que os mosquitos analisados por Garigliany e colaboradores (2015) continham no seu trato gastrointestinal sangue de morcegos contaminados com CV; a terceira, que os mosquitos, através da alimentação em morcegos tenham ingerido CV o qual foi capaz de replicar-se no novo hospedeiro. As três hipóteses necessitam de mais estudos para determinar a relação exata entre esses CV, contudo, os resultados mostram a importância de uma vigilância de arboviroses em morcego, uma vez que um ciclo de transmissão entre morcego via vetores artrópodes já foi demonstrada em laboratório (Kading & Schountz, 2016).

6.3.4 *Papillomaviridae*

Os membros desta família são vírus não envelopados, com simetria do capsídeo icosaédrica e um diâmetro aproximado de 55 nm. O genoma é composto por uma única cópia de dsDNA circular. O tamanho do genoma completo pode variar entre 6.800 e 8.400 nucleotídeos (nt) aproximadamente com um conteúdo de GC em torno de 40 a 60 %. Atualmente são reconhecidos 52 gêneros de papilomavírus (PV) com a classificação baseada na sequência de nt da ORF da proteína L1 base no gene (van Doorslaer et al., 2018). Em morcegos, 9 espécies de PV já tiveram seu genoma completamente sequenciado: *Rousettus aegyptiacus papillomavirus type 1* (RaPV1) (Rector et al., 2006); *Myotis ricketti papillomavirus* (MrPV-1) e *M. schreibersii papillomavirus type 1* (MsPV-1) (Wu et al., 2012); *Miniopterus schreibersii papillomavirus type 2* (MscPV2) (Tse et al., 2012); *Eidolon helvum papillomavirus 1* (EhelPV1), *Eidolon helvum papillomavirus 2* (EhelPV2), *Eidolon helvum papillomavirus 3* (EhelPV3) e *Rhinolophus ferrumequinum papillomavirus 1* (RferPV1) (García-Pérez et al., 2014); e *M. molossus papillomavirus 1* (MmoPV1) (Salmier et al., 2017).

Os PV infectam principalmente células epiteliais de mamíferos, porém estes vírus já foram detectados em pássaros, tartarugas e répteis sugerindo uma provável suscetibilidade à infecção de todos os amniotas (Bravo et al. 2010). A maioria das infecções por PV são assintomáticas, porém, algumas espécies são capazes de induzirem a transformação de células originando tumores; em humanos, são responsáveis por aproximadamente 1/3 dos cânceres associados a infecções (Zur

Hausen, 2009). Além disso, as lesões neoplásicas malignas já foram associadas a outros PV de animais, incluindo morcegos (Rector et al. 2006).

No presente estudo, sequências de PV foram detectadas em *swab* anal de *A. lituratus* e em pulmão de *G. soricina*. A sequência detectada em *swab* de *A. lituratus* possui 183 aa e identidade de 68,9 % com a proteína do RferPV1. Apesar de ser um fragmento pequeno, como apresenta identidade com a proteína utilizada como critério de demarcação de espécies, foi realizada a reconstrução da árvore filogenética. Apesar de formar um clado separado dos demais PV, devido ao tamanho do seu fragmento, não é possível classificar o *A. lituratus papillomavirus* (AIPV) quanto ao gênero (Figura 5, pg. 28). Por outro lado, a amostra de pulmão de *G. soricina* apresentou 5 sequências de diferentes proteínas com identidade ao papilomavírus de bovino (Tabela 4, pg. 50). Devido ao fato de serem amostras de tamanho pequeno e nenhuma apresentar identidade com a proteína L1, usada para a classificação, não foram reconstruídas árvores filogenéticas através desses fragmentos. Além disso, alguns fragmentos apresentaram 100 % de identidade com as amostras de PV bovino, indicando que as sequências encontradas pertencem a essa espécie.

A presença de PV em *swab* anal e orofaríngeo já foi demonstrada em diferentes espécies de morcegos (Tse et al. 2012; Wu et al., 2012; García-Pérez et al., 2014; Wang et al., 2015), porém, foi a primeira detecção de PV em *A. lituratus* e em morcegos brasileiros. Contudo, um fragmento maior seria necessário para assegurar que se trata de uma nova espécie. Foi constatada também, a presença de PV pela primeira vez na espécie *G. soricina*. Contudo, os diferentes fragmentos detectados tiveram identidades diferentes com PV de bovinos (entre 66 e 100%) gerando dúvida quanto à origem destes. Devido as medidas de biossegurança adotadas uma contaminação durante a manipulação é improvável. A replicação de PV já foi demonstrada em tumores pulmonares, indicando que a presença destes vírus pode ocorrer no pulmão (de Oliveira et al., 2018). Apesar da transmissão entre espécies raramente ocorrer, a alta diversidade genômica dos PV, associada às características ecológicas dos morcegos podem intensificar a dispersão e aumentar a chance de transmissão interespecífica destes agentes.

6.3.5 Parvoviridae

Os membros desta família são vírus não envelopados, com simetria do capsídeo icosaédrica e um diâmetro entre de 21 e 26 nm. O genoma é composto por uma única cópia de ssDNA linear não-segmentado. O tamanho do genoma completo pode variar entre 4.000 e 6.000 nucleotídeos (nt) aproximadamente com um conteúdo de GC em torno de 40 a 55 %. Duas ORFs são codificadas: ORF1, codifica proteínas não estruturais (NS, do inglês *non-structural*) responsáveis pela atividade de replicase; e a ORF2, que codifica as proteínas do capsídeo (Cap). A classificação se dá através da análise da sequência da NS1 e são considerados de espécies diferentes membros que compartilham identidade menor que 85 % (ICTV, 2018).

Atualmente os parvovírus (PrV) são divididos em duas subfamílias: *Densovirinae*, que infecta invertebrados, e *Parvovirinae*, que infectam vertebrados. A subfamília *Parvovirinae* é dividida em 8 gêneros: *Dependoparvovirus*, *Copiparvovirus*, *Bocaparvovirus*, *Amndoparvovirus*, *Aveparvovirus*, *Protoparvovirus*, *Tetraparvovirus* e, *Erythroparvovirus*. Recentemente dois novos gêneros foram propostos: *Marinoparvovirus* (Phan et al., 2015) e *Chapparvovirus* (Yang et al., 2016), mas ainda sem a aceitação do ICTV (ICTV, 2018). Em diferentes espécies de morcegos, têm sido descritos em amostras de fezes e sangue com distribuição em todo planeta (Canuti et al., 2011; Ge et al., 2012; Kemenesi et al., 2015; Lau et al., 2016; Yinde et al., 2018). Apesar destes vírus estarem relacionados com doenças em humanos (Brown, 2010; Phan et al., 2012), até o momento nenhum PrV foi associado com patologias em morcegos.

Dois fragmentos de PrV foram detectados no *poll* de *swab* orofaríngeo de *A. lituratus*, relacionados com a proteína NS1 e Cap, respectivamente, do *Desmodus rotundus parvovirus* (DrPV-1), vírus detectados em morcegos brasileiros. A união desses fragmentos através do *software* *Price* demonstra que ambos fragmentos são de apenas uma espécie, denominada inicialmente de *A. lituratus parvovirus* (AIPrV). As análises filogenéticas dos dois fragmentos revelaram que, apesar de relacionados evolutivamente, as amostras de *A. lituratus* e *D. rotundus* formam clados separados (Figura 7, pg. 32 Figura 8, pg. 33). Apesar de já ter sido detectado em *A. lituratus*, o *A. jamaicensis Bat Parvovirus 1* (Aj-BtPV-1) está distante filogeneticamente do AIPrV. A aproximação entre amostras virais de *A. lituratus* e *D. rotundus* não é uma novidade.

Inicialmente as linhagens do vírus da raiva (RABV, do inglês *rabies lyssavirus*) destas duas espécies foram estritamente relacionadas (Shoji et al., 2004). Recentemente, foi demonstrado um possível estabelecimento de uma linhagem do RABV em *A. lituratus* (Fahl et al., 2012). Por fim, a identificação de um PV de morcego relacionado com um vírus associado à diarreia aguda em crianças (Phan et al., 2012) reforça a importância da vigilância e estudos mais aprofundados sobre o potencial risco de transmissão entre morcegos e humanos.

7. CONCLUSÃO

Os achados aqui descritos demonstram a ampla variedade viral presente em morcegos. As três novas espécies com seus genomas completos sequenciados fortalecem a importância de estudos de diversidade viral em morcegos utilizando técnicas de detecção randômicas e sem a necessidade de isolamento viral. As análises filogenéticas demonstraram que mesmo os fragmentos virais menores podem ser de novas espécies virais. Apesar da maioria dos vírus descritos em morcegos com alta patogenicidade a humanos tem seu genoma composto por RNA, foi detectada, nesse estudo, uma sequência com alta identidade com adenovírus humano tipo C. Com isso, os resultados reforçam a importância de uma vigilância maior sobre os vírus circulantes nesses animais para avaliar possíveis doenças infecciosas emergentes.

8. REFERÊNCIAS

- Ali S, Fevery J, Peerlinck K, Verslype C, Schelstraete R, Gyselinck F, Emonds MP, Vermeylen J, Yap SH. 2002. TTV infection and its relation to serum transaminases in apparently healthy blood donors and in patients with clotting disorders who have been investigated previously for hepatitis C virus and GBV-C/HGV infection in Belgium. *J Med Virol.* 66(4):561-6. doi:10.1002/jmv.2181.abs
- Allocati N, Petrucci AG, Di Giovanni P, Masulli M, Di Ilio C, De Laurenzi V. 2016. Bat–man disease transmission: zoonotic pathogens from wildlife reservoirs to human populations. *Cell Death Discov.* 2(May), 16048. doi:10.1038/cddiscovery.2016.48
- Alves LDF, Westmann CA, Lovate GL, Siqueira GMV, Borelli TC, Guazzaroni ME. 2018. Metagenomic approaches for understanding new concepts in microbial science. *Int. J. Genomics* 2018. doi:10.1155/2018/2312987
- Amador LI, Moyers Arévalo RL, Almeida FC, Catalano SA, Giannini NP. 2018. Bat Systematics in the Light of Unconstrained Analyses of a Comprehensive Molecular Supermatrix. *J. Mamm. Evol.* 25(1), 37–70. doi:10.1007/s10914-016-9363-8
- Asano KM, Hora AS, Scheffer KC, Fahl WO, Iamamoto K, Mori E, Brandão PE. 2016. Alphacoronavirus in urban *Molossidae* and *Phyllostomidae* bats, Brazil. *Virol. J.* 13(1), 1–5. doi:10.1186/s12985-016-0569-4
- Badrane H, Tordo N. 2001. Host switching in Lyssavirus history from the Chiroptera to the Carnivora orders. *J. Virol.* 75(17):8096±104. doi: 10.1128/JVI.75.17.8096-8104.
- Baer G. M. & Lentz T. L. 1991. Rabies pathogenesis to the central nervous system. Em: Baer G.M. (Ed.) **The Natural History of Rabies**. 2nd edn. Boca Raton: RCR Press, pp.105-120.
- Baker KS, Leggett RM, Bexfield NH, Alston M, Daly G, Todd S, Tachedjian M, Holmes CE, Crameri S, Wang LF, Heeney JL, Suu-Ire R, Kellam P, Cunningham AA, Wood JL, Caccamo M, Murcia PR. 2013 Metagenomic study of the viruses of African straw-coloured fruit bats: detection of a chiropteran poxvirus and isolation of a novel adenovirus. *Virology* 5;441(2):95-106. doi: 10.1016/j.virol.2013.03.014
- Banyard AC, Hayman D, Johnson N, McElhinney L, Fooks AR. 2011. Bats and lyssaviruses. *Adv Virus Res.* 79:239-89. doi: 10.1016/B978-0-12-387040-7.00012-3
- Barardi CRM, Viancelli A, Rigotto C, Correa AA, Moresco V, Souza DSM, ElMahdy MEI, Fongaro G, Pilotto MR, Nascimento MA. 2012. Monitoring viruses in environmental samples. *Intern J Environ Sci Eng.* 3. 62-67.
- Barrios JC, Russomando G, Espinola, EE. 2016. Diversidad de adenovirus detectados en niños menores de 5 años hospitalizados por infección respiratoria aguda baja en Paraguay, 2010-2013. *Pediatr. (Asunción)* vol.43, n.2, pp.115-122. doi:10.18004/ped.2016.agosto.115-122.
- Begeman L, GeurtsvanKessel C, Finke S, Freuling CM, Koopmans M, Müller T, Ruigrok TJH, Kuiken T. 2018. Comparative pathogenesis of rabies in bats and carnivores, and implications for spillover to humans. *Lancet Infect. Dis.* 18(4), e147–e159. doi:10.1016/S1473-3099(17)30574-1

- Bendinelli M1, Pistello M, Maggi F, Fornai C, Freer G, Vatteroni ML. 2001 Molecular properties, biology, and clinical implications of TT virus, a recently identified widespread infectious agent of humans. *Clin Microbiol Rev.* 14(1):98-113. doi: 10.1128/CMR.14.1.98-113.2001
- Benkő M, Harrach B, Kremer EJ. 2014. Do nonhuman primate or bat adenoviruses pose a risk for human health? *Future Microbiol.* 9(3):269-72. doi:10.2217/fmb.13.170.
- Berthet N, Descorps-Declère S, Nkili-Meyong AA, Nakouné E, Gessain A7,8, Manuguerra JC, Kazanji M. 2016. Improved assembly procedure of viral RNA genomes amplified with Phi29 polymerase from new generation sequencing data. *Biol Res.* 7,49(1):39. doi:10.1186/s40659-016-0099-y.
- Berto A, Anh PH, Carrique-Mas JJ, Simmonds P, Van Cuong N, Tue NT, Van Dung N, Woolhouse ME, Smith I, Marsh GA, Bryant JE, Thwaites GE, Baker S, Rabaa MA, on behalf of the VIZIONS consortium. 2018. Detection of potentially novel paramyxovirus and coronavirus viral RNA in bats and rats in the Mekong Delta region of southern Viet Nam. *Zoonoses Publ Health,* 65:30-42. doi:10.1111/zph.12362
- Bibby K, Peccia J. 2013. Identification of viral pathogen diversity in sewage sludge by metagenome analysis. *Environ Sci Technol.* 19;47(4):1945-51. doi: 10.1021/es305181x
- Brandão PE, Scheffer K, Villarreal LY, Achkar S, Oliveira RdeN, Fahl Wde O, Castilho JG, Kotait I, Richtzenhain LJ. Richtzenhain LJ. 2008. A coronavirus detected in the vampire bat *Desmodus rotundus*. *Brazilian J. Infect. Dis.* 12(6), 466–468. doi:10.1590/S1413-8
- Bravo IG, de Sanjosé S, Gottschling M. 2010. The clinical importance of understanding the evolution of papillomaviruses. *Trends Microbiol.* 18(10):432-8. doi: 10.1016/j.tim.2010.07.008.
- Breitbart M, Salamon P, Andresen B, Mahaffy JM, Segall AM, Mead D, Azam F, Rohwer F:2002. Genomic analysis of uncultured marine viral communities. *Proc Natl Acad Sci,* 99:14250-14255. doi:10.1073/pnas.202488399
- Brook CE, Dobson AP. 2015. Bats as “special” reservoirs for emerging zoonotic pathogens. *Trends Microbiol.* 23(3), 172–180. doi:10.1016/j.tim.2014.12.004
- Brown KE. The expanding range of parvoviruses which infect humans. *Rev Med Virol.* 20(4):231-44. doi:10.1002/rmv.648.
- Calisher CH, Childs JE, Field HE, Holmes KV, Schountz T. 2006 Bats: Important reservoir hosts of emerging viruses. *Clin. Microbiol. Rev.* 19(3), 531–545. doi:10.1128/CMR.00017-06
- Cancela F, Ramos N, Mirazo S, Mainardi V, Gerona S, Arbiza J. 2016. Detection and molecular characterization of Torque Teno Virus (TTV) in Uruguay. *Infect Genet Evol.* 44:501-506. doi:10.1016/j.meegid.2016.08.007
- Canuti M, Eis-Huebinger AM, Deijs M, de Vries M, Drexler JF, Oppong SK, Müller MA, Klose SM, Wellinghausen N, Cottontail VM, Kalko EK, Drosten C, van der Hoek L. 2011. Two novel parvoviruses in frugivorous New and Old World bats. *PLoS One.* 2011;6(12):e29140. doi:10.1371/journal.pone.0029140
- Chen EC, Yagi S, Kelly KR, Mendoza SP, Maninger N, Rosenthal A, Spinner A, Bales KL, Schnurr DP, Lerche NW, Chiu CY. Chiu CY. 2011. Cross-species transmission of a novel adenovirus associated with a fulminant pneumonia outbreak in a new world monkey colony. *PLoS Pathog.* 7(7). doi:10.1371/journal.ppat.1002155

- Chinese SMEC. 2004. Molecular evolution of the SARS coronavirus during the course of the SARS epidemic in China. *Science* 303, 1666–1669. doi:10.1126/science.1092002
- Chu DKW, Poon LLM, Guan Y, Peiris JSM. 2008. Novel Astroviruses in Insectivorous Bats. *J. Virol.* 82(18), 9107–9114. doi:10.1128/JVI.00857-08
- Chua K, Bellini W, Rota P, Harcourt B, Tamin A, Lam S, Ksiazek TG, Rollin PE, Zaki SR, Shieh W, Goldsmith CS, Gubler DJ, Roehrig JT, Eaton B, Gould AR, Olson J, Field H, Daniels P, Ling AE, Peters CJ, Anderson LJ, Mahy BW. 2000. Nipah virus: a recently emerging deadly paramyxovirus. *Science*, 288(May), 1432–1435.
- Cibulski SP, Teixeira TF, de Sales Lima FE, do Santos HF, Franco AC, Roehe PM. 2014. A Novel Anelloviridae Species Detected in *Tadarida brasiliensis* Bats: First Sequence of a Chiropteran Anellovirus. *Genome Announc.* 2(5), e01028-14-e01028-14. doi:10.1128/genomeA.01028-14
- Conceição-Neto N, Zeller M, Lefrère H, De Bruyn P, Beller L, Deboutte W, Yinda CK, Lavigne R, Maes P, Van Ranst M, Heylen E, Matthijnsens J. 2015. Modular approach to customise sample preparation procedures for viral metagenomics: a reproducible protocol for virome analysis. *Sci. Rep.* 5(November), 16532. doi:10.1038/srep16532
- de Oliveira THA, do Amaral CM, de França São Marcos B, Nascimento KCG, de Miranda Rios AC, Quixabeira DCA, Muniz MTC, Silva Neto JDC, de Freitas AC.. 2018. Presence and activity of HPV in primary lung cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 0(0), 0. doi:10.1007/s00432-018-2748-8
- de Sales Lima FE, Cibulski SP, Witt AA, Franco AC, Roehe PM. 2015a. Genomic characterization of two novel polyomaviruses in Brazilian insectivorous bats. *Arch. Virol.* 160(7), 1831–1836. doi:10.1007/s00705-015-2447-6
- de Sales Lima FE, Cibulski SP, Dos Santos HF, Teixeira TF, Varela APM, Roehe PM, Delwart E, Franco AC 2015b. Genomic characterization of novel circular ssDNA viruses from insectivorous bats in Southern Brazil. *PLoS ONE*, 10(2), 1–11. doi:10.1371/journal.pone.0118070
- de Souza WM, Fumagalli MJ, de Araujo J, Sabino-Santos G, Maia FGM, Romeiro MF, de Souza WM, Fumagalli MJ, de Araujo J, Sabino-Santos G Jr, Maia FGM, Romeiro MF, Modha S, Nardi MS, Queiroz LH, Durigon EL, Nunes MRT, Murcia PR, Figueiredo LTM. Figueiredo LTM. 2018. Discovery of novel anelloviruses in small mammals expands the host range and diversity of the Anelloviridae. *Virology*, 514(July 2017), 9–17. doi:10.1016/j.virol.2017.11.001
- Dhingra A, Hage E, Ganzenmueller T, Böttcher S, Hofmann J, Hamprecht K, Obermeier P, Rath B, Hausmann F, Dobner T, Heim A. 2019. Molecular Evolution of Human Adenovirus (HAdV) Species C. *Sci. Rep.* 31;9(1):1039. doi: 10.1038/s41598-018-37249-4
- Donaldson EF, Haskew AN, Gates JE, Huynh J, Moore CJ, Frieman MB. 2010. Metagenomic Analysis of the Viromes of Three North American Bat Species: Viral Diversity among Different Bat Species That Share a Common Habitat. *J. Virol.* 84(24), 13004–13018. doi:10.1128/JVI.01255-10
- Drexler JF, Gloza-Rausch F, Glende J, Corman VM, Muth D, Goettsche M, Seebens A, Niedrig M, Pfefferle S, Yordanov S, Zhelyazkov L, Hermanns U, Vallo P, Lukashev A, Müller MA, Deng H, Herrler G, Drosten C. 2010. Genomic characterization of severe acute respiratory syndrome-related coronavirus in European bats and classification of coronaviruses based on partial RNA-

- dependent RNA polymerase gene sequences. *J Virol.* 84(21):11336-49. doi: 10.1128/JVI.00650-10.
- Enchéry F, Horvat B. 2017. Understanding the interaction between henipaviruses and their natural host, fruit bats: Paving the way toward control of highly lethal infection in humans. *Int. Rev. Immunol.*, 36(2), 108–121. doi:10.1080/08830185.2016.1255883
- Fahl WO, Carnieli P Jr, Castilho JG, Carrieri ML, Kotait I, Iamamoto K, Oliveira RN, Brandão PE. 2012. *Desmodus rotundus* and *Artibeus spp.* bats might present distinct rabies virus lineages. *Braz J Infect Dis.* 16(6):545-51. doi:10.1016/j.bjid.2012.07.002.
- Fenton M. B. & Simmons N.B. 2015. **Bats: A World of Science and Mystery.** University of Chicago Press, 240p.
- Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol Mar Biol Biotechnol.* 3(5):294-9.
- García-Perez R, Ibáñez C, Godínez JM, Aréchiga N, Garin I, Pérez-Suárez G, de Paz O, Juste J, Echevarría JE, Bravo IG. 2014. Novel papillomaviruses in free-ranging Iberian bats: No virus-host co-evolution, no strict host specificity, and hints for recombination. *Genome Biol. Evol.* 6(1), 94–104. doi:10.1093/gbe/evt211
- Garigliany MM, Börstler J, Jöst H, Badusche M, Desmecht D, Schmidt-Chanasit J, Cadar D. 2015. Characterization of a novel circo-like virus in aedes vexans mosquitoes from germany: Evidence for a new genus within the family circoviridae. *J. Gen. Virol.* 96(4), 915–920. doi:10.1099/vir.0.000036
- Ge X, Li Y, Yang X, Zhang H, Zhou P, Zhang Y, Shi Z. 2012. Metagenomic Analysis of Viruses from Bat Fecal Samples Reveals Many Novel Viruses in Insectivorous Bats in China. *J. Virol.* 86(8), 4620–4630. doi:10.1128/JVI.06671-11
- Geldenhuys M, Mortlock M, Weyer J, Bezuidt O, Seemark ECJ, Kearney T, Gleasner C, Erkkila TH, Cui H, Markotter W. 2018. A metagenomic viral discovery approach identifies potential zoonotic and novel mammalian viruses in Neoromicia bats within South Africa. *PLoS ONE*, 13(3), 1–27. doi:10.1371/journal.pone.0194527
- Góes LGB, Campos ACdeA, Carvalho Cde, Ambar G, Queiroz LH, Cruz-Neto AP, Munir M, Durigon EL. 2016. Genetic diversity of bats coronaviruses in the Atlantic Forest hotspot biome, Brazil. *Infect. Genet. Evol.* 44, 510–513. doi:10.1016/j.meegid.2016.07.034
- Greenhall GG, Paradiso JL. 1968 BaLs and hal handing. Washington, U.S. Dep. In: Fish and Wildlife Service. Bureau 01' Sport Fisheries and Wildlife 45p.
- Gregorin R, Taddei VA. 2002 Chave artificial para identificação de molossídeos brasileiros (*Mammalia, Chiroptera*). *Mastozoologia Neotropical*, vol. 1, no. 9, p. 13-32.
- Hackenbrack N, Rogers MB, Ashley RE, Keel MK, Kubiski SV, Bryan JA, Ghedin E, Holmes EC, Hafenstein SL, Allison AB. 2017. Evolution and Cryo-electron Microscopy Capsid Structure of a North American Bat Adenovirus and Its Relationship to Other Mastadenoviruses. *J. Virol.* 91(2), e01504-16. doi:10.1128/JVI.01504-16
- Han HJ, Wen HL, Zhao L, Liu JW, Luo LM, Zhou CM, Qin XR, Zhu YL, Liu MM, Qi R, Li WQ, Yu H, Yu XJ. 2017. Novel coronaviruses, astroviruses, adenoviruses

- and circoviruses in insectivorous bats from northern China. *Zoonoses Public Health*. 64(8), 636–646. doi:10.1111/zph.12358
- Handelsman J, Rondon MR, Brady SF, Clardy J, Goodman RM 1998 Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chem Biol.*, 5(10), 245–249.
- Handelsman J. 2005. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiol Mol Biol Rev.*, vol. 69, no. 1, pp. 195–195. aoi:10.1128/MMBR.68.4.669-685.2004
- Hassanin A, Nesi N, Marin J, Kadjo B, Pourrut X, Leroy É, Gembu GC, Musaba Akawa P, Ngoagouni C, Nakouné E, Ruedi M, Tshikung D, Pongombo Shongo C Bonillo C. 2016. Comparative phylogeography of African fruit bats (*Chiroptera, Pteropodidae*) provide new insights into the outbreak of Ebola virus disease in West Africa, 2014–2016. *Comptes Rendus - Biol.* 339(11–12), 517–528. doi:10.1016/j.crv.2016.09.005
- Hayman DT, Banyard AC, Wakeley PR, Harkess G, Marston D, Wood JL, Cunningham AA, Fooks AR. 2011 A universal real-time assay for the detection of Lyssaviruses. *J Virol Methods.* 177(1):87-93. doi:10.1016/j.jviromet.2011.07.002.
- Hayman DTS, Bowen RA, Cryan PM, Mccracken GF, O’Shea TJ, Peel AJ, Gilbert A, Webb CT, Wood JLN. 2013. Ecology of Zoonotic Infectious Diseases in Bats: Current Knowledge and Future Directions. *Zoonoses Public Health.* 60(1), 2–21. doi:10.1111/zph.12000
- He B, Li Z, Yang F, Zheng J, Feng Y, Guo H, Li Y, Wang Y, Su N, Zhang F, Fan Q, Tu C. 2013. Virome Profiling of Bats from Myanmar by Metagenomic Analysis of Tissue Samples Reveals More Novel Mammalian Viruses. *PLoS ONE*, 8(4). doi:10.1371/journal.pone.0061950
- Hu D, Zhu C, Wang Y, Ai L, Yang L, Ye F, Ding C, Chen J, He B, Zhu J, Qian H, Xu W, Feng Y, Tan W, Wang C. 2017. Virome analysis for identification of novel mammalian viruses in bats from Southeast China. *Sci. Rep.* 7(1), 1–12. doi:10.1038/s41598-017-11384-w
- Hu D, Zhu C, Ai L, He T, Wang Y, Ye F, Yang L, Ding C, Zhu X, Lv R, Zhu J, Hassan B, Feng Y, Tan W, Wang C. 2018. Genomic characterization and infectivity of a novel SARS-like coronavirus in Chinese bats. *Emerg. Microbes Infect.* 7(1), 154. Doi:10.1038/s41426-018-0155-5
- Hurwitz BL, U’Ren JM, Youens-Clark K. 2016) Computational prospecting the great viral unknown. *FEMS Microbiol. Lett.* 363(10), 1–12. doi:10.1093/femsle/fnw077
- ICTV - International Committee on Taxonomy of Viruses 2018. ICTV Online Report. Disponível em <https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/> Acessado em Agosto de 2018.
- Jiang SC. 2006. Human adenoviruses in water: occurrence and health implications: a critical review. *Environ Sci Technol.* 1;40(23):7132-40.
- Jones JK, Carter DC. 1976 Annotated checklist, with keys to subfamilies and genera. In BABER, R.J., JONES JR, JK. and CARTER, DC. (Eds.). *Biology of bats of the new world family Phyllostomidae, part I.* Lubbock: Museum Texas
- Jones MS 2nd, Harrach B, Ganac RD, Gozum MM, Dela Cruz WP, Riedel B, Pan C, Delwart EL, Schnurr DP. 2007. New adenovirus species found in a patient presenting with gastroenteritis. *J Virol*81(11):5978-84. doi:10.1128/JVI.02650-06

- Kading RC, Schountz T. 2016. Flavivirus infections of bats: Potential role in zika virus ecology. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 95(5), 993–996. doi:10.4269/ajtmh.16-0625
- Kemenesi G, Dallos B, Görföl T, Estók P, Boldogh S, Kurucz K, Oldal M, Marton S, Bányai K, Jakab F. 2015. Genetic diversity and recombination within bufaviruses: Detection of a novel strain in Hungarian bats. *Infect. Genet. Evol.* 33, 288–292. doi:10.1016/j.meegid.2015.05.017
- Kim HK, Yoon SW, Kim DJ, Koo BS, Noh JY, Kim JH, Choi YG, Na W, Chang KT, Song D, Jeong DG. 2016. Detection of Severe Acute Respiratory Syndrome-Like, Middle East Respiratory Syndrome-Like Bat Coronaviruses and Group H Rotavirus in Faeces of Korean Bats. *Transbound. Emerg. Dis.* 63(4), 365–372. doi:10.1111/tbed.12515
- Kircher M, Kelso J. 2010. High-throughput DNA sequencing - concepts and limitations. *BioEssays*, vol. 32, no. 6, pp. 524–536. doi:10.1002/bies.200900181
- Kluge M, Campos FS, Tavares M, de Amorim DB, Valdez FP, Giongo A, Roehe PM, Franco AC. 2016. Metagenomic Survey of Viral Diversity Obtained from Feces of Subantarctic and South American Fur Seals. *PloS One*, 11(3), e0151921. doi:10.1371/journal.pone.0151921
- Kobayashi S, Sasaki M, Nakao R, Setiyono A, Handharyani E, Orba Y, Rahmadani I, Taha S, Adiani S, Subangkit M, Nakamura I, Kimura T, Sawa H. 2015. Detection of novel polyomaviruses in fruit bats in Indonesia. *Arch Virol.* 160(4):1075-82. doi: 10.1007/s00705-015-2349-7.
- Kohl C, Vidovszky MZ, Muhldorfer K, Dabrowski PW, Radonic A, Nitsche A, Wibbelt G, Kurth A, Harrach B. 2012. Genome Analysis of Bat Adenovirus 2: Indications of Interspecies Transmission. *J. Virol.* 86(3), 1888–1892. doi:10.1128/JVI.05974-11
- Kuchipudi S, Nissly R. 2018. Novel Flu Viruses in Bats and Cattle: “Pushing the Envelope” of Influenza Infection. *Vet. Sci.* 5(3), 71. doi:/10.3390/vetsci5030071
- Kuzmin IV, Mayer AE, Niezgodna M, Markotter W, Agwanda B, Breiman RF, Rupprecht CE. 2010. Shimoni bat virus, a new representative of the Lyssavirus genus. *Virus Res.* 149(2):197-210. doi:10.1016/j.virusres.2010.01.018
- Latimer KS, Rakich PM, Steffens WL, Kircher IM, Ritchie BW, Niagro FD, Lukert PD. 1991. A novel DNA virus associated with feather inclusions in psittacine beak and feather disease. *Vet Pathol.* 28(4):300-4. doi:10.1177/030098589102800406
- Lau SK, Woo PC, Li KS, Huang Y, Tsoi HW, Wong BH, Wong SS, Leung SY, Chan KH, Yuen KY. 2005. Severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in Chinese horseshoe bats. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:14040–14045. doi:10.1073/pnas.0506735102
- Lau SKP, Ahmed SS, Yeung HC, Li KSM, Fan RYY, Cheng TYC, Cai JP, Wang M, Zheng BJ, Wong SS, Woo PC, Yuen KY. 2016. Identification and interspecies transmission of a novel bocaparvovirus among different bat species in China. *J. Gen. Virol.* 97(12), 3345–3358. doi:10.1099/jgv.0.000645
- Lenaerts L1, De Clercq E, Naesens L. 2008. Clinical features and treatment of adenovirus infections. *Rev Med Virol.* 18(6):357-74. doi:10.1002/rmv.589.
- Leroy EM, Kumulungui B, Pourrut X, Rouquet P, Hassanin A, Yaba P, Délicat A, Paweska JT, Gonzalez JP, Swanepoel R. 2005. Fruit bats as reservoirs of Ebola virus. *Nature* 438 575–576. doi:10.1038/438575a

- Letko M, Miazgowiec K, McMinn R, Seifert SN, Sola I, Enjuanes L, Carmody A, van Doremalen N, Munster V. 2018. Adaptive Evolution of MERS-CoV to Species Variation in DPP4. *Cell Rep.* 24(7), 1730–1737. doi:10.1016/j.celrep.2018.07.045
- Lewis PF, Schmidt MA, Lu X, Erdman DD, Campbell M, Thomas A, Cieslak PR, Grenz LD, Tsaknardis L, Gleaves C, Kendall B, Gilbert D. 2009. A community-based outbreak of severe respiratory illness caused by human adenovirus serotype 14. *J Infect Dis* 199(10):1427-34. doi:10.1086/598521.
- Li Y, Ge X, Zhang H, Zhou P, Zhu Y, Zhang Y, Yuan J, Wang LF, Shi Z. 2010. Host Range, Prevalence, and Genetic Diversity of Adenoviruses in Bats. *J. Virol.*, 84(8), 3889–3897. doi:10.1128/JVI.02497-09
- Lima FEDS, Campos FS, Kunert Filho HC, Batista HBDCR, Carnielli Júnior P, Cibulski SP, Spilki FR, Roehe PM, Franco AC 2013a. Detection of Alphacoronavirus in velvety free-tailed bats (*Molossus molossus*) and Brazilian free-tailed bats (*Tadarida brasiliensis*) from urban area of Southern Brazil. *Virus Genes*, 47(1), 164–167. doi:10.1007/s11262-013-0899-x
- Lima FEDS, Cibulski SP, Elesbao F, Carnieli Junior P, Batista HBDCR, Roehe PM, Franco AC. 2013b. First detection of adenovirus in the vampire bat (*Desmodus rotundus*) in Brazil. *Virus Genes*, 47(2), 378–381. doi:10.1007/s11262-013-0947-6
- Loza-Rubio E, Rojas-Anaya E, Banda-Ruíz VM, Nadin-Davis SA, Cortez-García B. 2005. Detection of multiple strains of rabies virus RNA using primers designed to target Mexican vampire bat variants. *Epidemiol Infect.* 133(5):927-34. doi: 10.1017/S095026880500405X
- Maas B, Karp DS, Bumrungsri S, Darras K, Gonthier D, Huang JCC, Lindell CA, Maine JJ, Mestre L, Michel NL, Morrison EB, Perfecto I, Philpott SM, Şekercioğlu ÇH, Silva RM, Taylor PJ, Tscharntke T, Van Bael SA, Whelan CJ, Williams-Guillén K. 2016. Bird and bat predation services in tropical forests and agroforestry landscapes. *Biol. Rev.* 91(4), 1081–1101. doi:10.1111/brv.12211
- Maeda K, Hondo E, Terakawa J, Kiso Y, Nakaichi N, Endoh D, Sakai K, Morikawa S, Mizutani, T. 2008. Isolation of novel adenovirus from fruit bat (*Pteropus dasymallus yayeyamae*). *Emerg. Infect. Dis.* 14(2), 347–349. doi:10.3201/eid1402.070932
- Maggi F, Pifferi M, Fornai C, Andreoli E, Tempestini E, Vatteroni M, Presciuttini S, Marchi S, Pietrobelli A, Boner A, Pistello M, Bendinelli M. 2003. TT virus in the nasal secretions of children with acute respiratory diseases: relations to viremia and disease severity. *J Virol.* 77(4):2418-25.
- Memish ZA, Mishra N, Olival K J, Fagbo SF, Kapoor V, Epstein JH, Alhakeem R, Durosinloun A, Al Asmari M, Islam A, Kapoor A, Briese T, Daszak P, Al Rabeeah AA Lipkin WI. 2013. Middle East respiratory syndrome coronavirus in Bats, Saudi Arabia. *Emerg. Infect. Dis.* 19(11), 1819–1823. doi:10.3201/eid1911.131172
- Mendenhall IH, Borthwick S, Neves ES, Low D, Linster M, Liang B, Skiles M, Jayakumar J, Han H, Gunalan V, Lee BPY, Okahara K, Wang LF, Maurer-Stroh S, Su YCF, Smith GJD. 2017. Identification of a Lineage D Betacoronavirus in Cave Nectar Bats (*Eonycteris spelaea*) in Singapore and an Overview of Lineage D Reservoir Ecology in SE Asian Bats. *Transbound. Emerg. Dis.* 64(6), 1790–1800. doi:10.1111/tbed.12568

- Meng XJ. 2013. Porcine circovirus type 2 (PCV2): pathogenesis and interaction with the immune system. *Annu Rev Anim Biosci.* 1:43-64. doi:10.1146/annurev-animal-031412-103720.
- Misra V, Dumonceaux T, Dubois J, Willis C, Nadin-Davis S, Severini A, Wandeler A, Lindsay R, Artsob H. 2009. Detection of polyoma and corona viruses in bats of Canada. *J. Gen. Virol.* 90(8), 2015–2022. doi:10.1099/vir.0.010694-0
- Molnár V, Jánoska M, Harrach B, Glávits R, Pálmai N, Rigó D, Sós E, Liptovszky M. 2008. Detection of a novel bat gammaherpesvirus in Hungary. *Acta Vet. Hung.* 56(4), 529–538. doi:10.1556/AVet.56.2008.4.10
- Moratelli R, Calisher CH. 2015. Bats and zoonotic viruses: Can we confidently link bats with emerging deadly viruses? *Mem. Inst. Oswaldo Cruz,* 110(1), 1–22. doi:10.1590/0074-02760150048
- Murray K, Rogers R, Selvey L, Selleck P, Hyatt A, Gould A, Gleeson L, Hooper P, Westbury H. 1995. A novel morbillivirus pneumonia of horses and its transmission to humans. *Emerg. Infect. Dis.* 1(1), 31–33. doi:10.3201/eid0101.950107
- Neuweiler, G. **The biology of the bats.** Oxford University Press: Oxford, 2000
- Nishiyama S, Dutia BM, Stewart JP, Meredith AL, Shaw DJ, Simmonds P, Sharp CP. 2014. Identification of novel anelloviruses with broad diversity in UK rodents. *J Gen Virol.* 95(Pt 7):1544-53. doi:10.1099/vir.0.065219-0
- Nishizawa T, Okamoto H, Konishi K, Yoshizawa H, Miyakawa Y, Mayumi M. 1997. A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Biochem Biophys Res Commun.* 8;241(1):92-7. doi:10.1006/bbrc.1997.7765
- Ogawa H, Kajihara M, Nao N, Shigeno A, Fujikura D, Hang'Ombe BM, Mweene AS, Mutemwa A, Squarre D, Yamada M, Higashi H, Sawa H, Takada A. 2017. Characterization of a novel bat adenovirus isolated from straw-colored fruit bat (*Eidolon helvum*). *Viruses,* 9(12), 1–16. doi:10.3390/v9120371
- Okamoto H, Takahashi M, Nishizawa T, Tawara A, Fukai K, Muramatsu U, Naito Y, Yoshikawa A. 2002. Genomic characterization of TT viruses (TTVs) in pigs, cats and dogs and their relatedness with species-specific TTVs in primates and tupaias. *J Gen Virol.* 83(Pt 6):1291-7. doi:10.1099/0022-1317-83-6-1291
- Oliveira RdeN, de Souza SP, Lobo RS, Castilho JG, Macedo CI, Carnieli P Jr, Fahl WO, Achkar SM, Scheffer KC, Kotait I, Carrieri ML, Brandão PE. 2010. Rabies virus in insectivorous bats: implications of the diversity of the nucleoprotein and glycoprotein genes for molecular epidemiology. *Virology.* 30;405(2):352-60. doi:10.1016/j.virol.2010.05.030.
- O'Shea TJ, Cryan PM, Cunningham AA, Fooks AR, Hayman DTS, Luis AD, Peel AJ, Plowright RK, Wood JLN 2014. Bat flight and zoonotic viruses. *Emerg Infect Dis* 20: 741-745. doi:10.3201/eid2005.130539.
- Palinski R, Piñeyro P, Shang P, Yuan F, Guo R, Fang Y, Byers E, Hause BM. 2016. A Novel Porcine Circovirus Distantly Related to Known Circoviruses Is Associated with Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome and Reproductive Failure. *J Virol.* 16;91(1) doi:10.1128/JVI.01879-16
- Phan TG, Vo NP, Bonkougou IJ, Kapoor A, Barro N, O'Ryan M, Kapusinszky B, Wang C, Delwart E. 2012. Acute diarrhea in West African children: diverse enteric viruses and a novel parvovirus genus. *J Virol.* 86(20):11024-30. doi:10.1128/JVI.01427-12

- Phan TG, Gulland F, Simeone C, Deng X, Delwart E. 2015. Sesavirus: prototype of a new parvovirus genus in feces of a sea lion. *Virus Genes*, 50(1), 134–136. doi:10.1007/s11262-014-1123-3
- Podlutzky AJ, Khritankov AM, Ovodov ND, Austad SN 2005. A new field record for bat longevity. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 60: 1366-1368.
- Poon LL, Chu DK, Chan KH, Wong OK, Ellis TM, Leung YH, Lau SK, Woo PC, Suen KY, Yuen KY, Guan Y, Peiris JS. 2005. Identification of a novel coronavirus in bats. *J Virol*. 79(4):2001-9. doi:10.1128/JVI.79.4.2001-2009.2005
- Rector A, Mostmans S, Van Doorslaer K, McKnight CA, Maes RK, Wise AG, Kiupel M, Van Ranst M. 2006. Genetic characterization of the first chiropteran papillomavirus, isolated from a basosquamous carcinoma in an Egyptian fruit bat: The *Rousettus aegyptiacus* papillomavirus type 1. *Vet. Microbiol.* 117(2–4), 267–275. doi:10.1016/j.vetmic.2006.06.010
- Ribeiro J, Staudacher C, Martins CM, Ullmann LS, Ferreira F, Araujo JP, Biondo AW. 2018. Bat rabies surveillance and risk factors for rabies spillover in an urban area of Southern Brazil. *BMC Vet. Res.*, 14(1), 1–8. doi:10.1186/s12917-018-1485-1
- Riesenfeld CS, Schloss PD, Handelsman J. 2004. Metagenomics: genomic analysis of microbial communities. *Annu Rev Genet.* 38:525-52. doi:10.1146/annurev.genet.38.072902.091216.
- Roberts JMK, Anderson DL, Durr PA. 2018. Metagenomic analysis of Varroa-free Australian honey bees (*Apis mellifera*) shows a diverse Picornavirales virome. *J Gen Virol*, 99:818-826 <http://dx.doi.org/10.1099/jgv.0.001073>.
- Roossinck MJ. 2015. Move over, bacteria! Viruses make their mark as mutualistic microbial symbionts. *J. Virol.* 89, 6532–6535. doi:10.1128/JVI.02974-14
- Rosario K, Breitbart M, Harrach B, Segalés J, Delwart E, Biagini P, Varsani, A. 2017. Revisiting the taxonomy of the family Circoviridae: establishment of the genus Cyclovirus and removal of the genus Gyrovirus. *Arch. Virol.* 162(5), 1447–1463. doi:10.1007/s00705-017-3247-y
- Saad RS, Demetris AJ, Lee RG, Kusne S, Randhawa PS. 1997. Adenovirus hepatitis in the adult allograft liver. *Transplantation* 64:1483–1485.
- Sabino-Santos G, Maia FGM, Martins RB, Gagliardi TB, De Souza WM, Muylaert RL, Luna LKS, Melo DM, Cardoso RS, Barbosa NDS, Pontelli MC, Mamani-Zapana PR, Vieira TM, Melo NM, Jonsson CB, Goodin D, Salazar-Bravo J, daSilva LLP, Arruda E, Figueiredo LTM. 2018. Natural infection of Neotropical bats with hantavirus in Brazil. *Sci. Rep.* 8(1), 1–8. doi:10.1038/s41598-018-27442-w
- Saéz AM, Weiss S, Nowak K, Lapeyre V, Zimmermann F, Dux A, Kühl HS, Kaba M, Regnaut S, Merkel K, Sachse A, Thiesen U, Villányi L, Boesch C, Dabrowski PW, Radonić A, Nitsche A, Leendertz SAJ, Petterson S, Becker S, Krähling V, Couacy-Hymann E, Akoua-Koffi C, Weber N, Schaade L, Fahr J, Borchert M, Gogarten JF, Calvignac-Spencer S, Leendertz FH. 2015. Investigating the zoonotic origin of the West African Ebola epidemic. *EMBO Mol Med* 7: 17-23. doi:10.15252/emmm.201404792.
- Salmier A, Tirera S, De Thoisy B, Franc A, Darcissac E, Donato D, Bouchier C, Lacoste V, Lavergne A. 2017. Virome analysis of two sympatric bat species (*Desmodus rotundus* and *Molossus molossus*) in French Guiana. *PLoS ONE*, 12(11), 1–25. doi:10.1371/journal.pone.0186943

- Sambrook J, Russell DW. 2001 *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sano K, Okazaki S, Taniguchi S, Masangkay JS, Puentespina R Jr, Eres E, Cosico E, Quibod N, Kondo T, Shimoda H, Hatta Y, Mitomo S, Oba M, Katayama Y, Sassa Y, Furuya T, Nagai M, Une Y, Maeda K, Kyuwa S, Yoshikawa Y, Akashi H, Omatsu T, Mizutani T. 2015. Detection of a novel herpesvirus from bats in the Philippines. *Virus Genes*. 51(1):136-9. doi:10.1007/s11262-015-1197-6. Epub 2015 May 9.
- Schloss PD, Handelsman J. 2003. Biotechnological prospects from metagenomics. *Curr Opin Biotechnol*. 2003 Jun;14(3):303-10.
- Schmeisser C, Steel H, Streit WR. 2007. Metagenomics, biotechnology with non-culturable microbes. *Appl Microbiol Biotechnol*. vol. 75, no. 5, pp. 955–962, 2007. doi:10.1007/s00253-007-0945-5
- Serra-Cobo J, López-Roig M. 2016. Bats and emerging infections: an ecological and virological puzzle. *Adv Exp Med Biol*. doi 10.1007/5584_2016_131
- Shen CF, Wang SM, Wang JR, Hu YS, Ho TS, Liu CC. 2019. Comparative study of clinical and epidemiological characteristics of major pediatric adenovirus epidemics in southern Taiwan. *BMC Infect. Dis.* 1;19(1):681. doi: 10.1186/s12879-019-4305-8.
- Shi M, Lin XD, Tian JH, Chen LJ, Chen X, Li CX, Qin XC, Li J, Cao JP, Eden JS, Buchmann J, Wang W, Xu J, Holmes EC, Zhang YZ. 2016. Redefining the invertebrate RNA virosphere. *Nature*, 540 539. doi:10.1038/nature20167.
- Shoji Y, Kobayashi Y, Sato G, Ito T, Miura Y, Mikami T, Cunha EM, Samara SI, Carvalho AA, Nocitti DP, Ito FH, Kurane I, Sakai T. 2004. Genetic Characterization of Rabies Viruses Isolated from Frugivorous Bat (*Artibeus spp.*) in Brazil. *J. Vet. Med. Sci.* 66(10), 1271–1273. doi:10.1292/jvms.66.1271
- Simas PVM. 2015. *Metaviroma de morcegos Tadarida brasiliensis*. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) Universidade Estadual de Campinas, Campinas
- Simmonds P, Adams MJ, Benk M, Breitbart M, Brister JR, Carstens EB, Davison AJ, Delwart E, Gorbalenya AE, Harrach B, Hull R, King AM, Koonin EV, Krupovic M, Kuhn JH, Lefkowitz EJ, Nibert ML, Orton R, Roossinck MJ, Sabanadzovic S, Sullivan MB, Suttle CA, Tesh RB, van der Vlugt RA, Varsani A, Zerbini FM. 2017. Consensus statement: Virus taxonomy in the age of metagenomics. *Nat. Rev. Microbiol.* 15(3), 161–168. doi:10.1038/nrmicro.2016.177
- Sleator RD, Shortall C, Hill C. Metagenomics. *Lett Appl Microbiol.*, vol. 47, no. 5, pp. 361–366, 2008. doi:10.1111/j.1472-765X.2008.02444.x.
- Sodré MM, da Gama AR, de Almeida MF. 2010. Updated list of bat species positive for rabies in Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 52(2):75-81.
- Sonntag M, Mühldorfer K, Speck S, Wibbelt G, Kurth A. 2009. New adenovirus in bats, Germany. *Emerg Infect Dis.* 15(12), 2052–2055. <https://doi.org/10.3201/eid1512.090646>
- Sotero-Caio CG, Baker RJ, Volleth M. 2017. Chromosomal evolution in chiroptera. *Genes*, 8(10). doi:10.3390/genes8100272
- Spandole S, Cimponeriu D, Berca LM, Mihăescu G. 2015. Human anelloviruses: an update of molecular, epidemiological and clinical aspects. *Arch Virol*. 160(4):893-908. doi: 10.1007/s00705-015-2363-9

- Staggemeier R, Heck TM, Demoliner M, Ritzel RG, Röhnelt NM, Girardi V, Venker CA, Spilki FR. 2017. Enteric viruses and adenovirus diversity in waters from 2016 Olympic venues. *Sci Total Environ.* 586:304-312. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.01.223.
- Stang A, Korn K, Wildner O, Uberla K. 2005 Characterization of virus isolates by particle-associated nucleic acid PCR. *J Clin Microbiol* 43:716–720. doi: 10.1128/JCM.43.2.716–720.2005
- Swanepoel R, Lemana PA, Burt FJ, Zachariades NA, Braack L, Ksiazek TG, Rollin PE, Zaki SR, Peters CJ. 1996. Experimental inoculation of plants and animals with Ebola virus. *Emerg Infect Dis* 2: 321 doi:10.3201/eid0204.960407
- Tan B, Yang XL, Ge XY, Peng C, Zhang YZ, Zhang LB, Shi ZL. 2016. Novel bat adenoviruses with an extremely large E3 gene. *J. Gen. Virol.* 97(7), 1625–1635. doi:10.1099/jgv.0.000470
- Tan B, Yang XL, Ge XY, Peng C, Liu HZ, Zhang YZ, Zhang LB, Shi ZL. 2017. Novel bat adenoviruses with low G+C content shed new light on the evolution of adenoviruses. *J. Gen. Virol.* 98(4), 739–748. doi:10.1099/jgv.0.000739
- Temmam S, Monteil-Bouchard S, Robert C, Pascalis H, Michelle C, Jardot P, Charrel R, Raoult D, Desnues C. 2015. Host-Associated metagenomics: A guide to generating infectious RNA Viromes. *PLoS ONE*, 10(10), 1–21. doi:10.1371/journal.pone.0139810
- Tokarz R, Sameroff S, Tagliafierro T, Jain K, Williams SH, Cucura DM, Rochlin I, Monzon J, Carpi G, Tufts D, Diuk-Wasser M, Brinkerhoff J, Lipkin WI. 2018. Identification of Novel Viruses in *Amblyomma americanum*, *Dermacentor variabilis*, and *Ixodes scapularis* Ticks. *mSphere*. 7;3(2). pii: e00614-17. doi:10.1128/mSphere.00614-17.
- Tong S, Li Y, Rivaller P, Conrardy C, Castillo DA, Chen LM, Recuenco S, Ellison JA, Davis CT, York IA, Turmelle AS, Moran D, Rogers S, Shi M, Tao Y, Weil MR, Tang K, Rowe LA, Sammons S, Xu X, Frace M, Lindblade KA, Cox NJ, Anderson LJ, Rupprecht CE, Donis RO. 2012. A distinct lineage of influenza A virus from bats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 109, 4269–4274. doi:10.1073/pnas.1116200109.
- Tong S, Zhu X, Li Y, Shi M, Zhang J, Bourgeois M, Yang H, Chen X, Recuenco S, Gomez J, Chen LM, Johnson A, Tao Y, Dreyfus C, Yu W, McBride R, Carney PJ, Gilbert AT, Chang J, Guo Z, Davis CT, Paulson JC, Stevens J, Rupprecht CE, Holmes EC, Wilson IA, Donis RO. 2013. New world bats harbor diverse influenza A viruses. *PLoS Pathog.* 9, e1003657. doi:10.1371/journal.ppat.1003657
- Treacy A, Carr MJ, Dunford L, Palacios G, Cannon GA, O'Grady A, Moran J, Hassan J, Loy A, Connell J, Devaney D, Kelehan P, Hall WW. 2010. First report of sudden death due to myocarditis caused by adenovirus serotype 3. *J. Clin. Microbiol.* 48:642– 645. doi:10.1128/JCM.00815-09
- Tringe SG, von Mering C, Kobayashi A, Salamov AA, Chen K, Chang HW, Podar M, Short JM, Mathur EJ, Detter JC, Bork P, Hugenholtz P, Rubin EM. 2005. Comparative metagenomics of microbial communities. *Science*, vol. 308, no. 5721, pp. 554–557. doi:10.1126/science.1107851
- Tse H, Tsang AKL, Tsoi HW, Leung ASP, Ho CC, Lau SKP, Woo PC, Yuen KY. 2012. Identification of a novel bat papillomavirus by metagenomics. *PLoS ONE*, 7(8). doi:10.1371/journal.pone.0043986

- van Doorslaer K, Chen Z, Bernard HU, Chan PKS, DeSalle R, Dillner J, Forslund O, Haga T, McBride AA, Villa LL, Burk RD, Ictv Report Consortium. 2018. ICTV Virus Taxonomy Profile: *Papillomaviridae*. J Gen Virol. 2018 Aug;99(8):989-990. doi:10.1099/jgv.0.001105.
- van Vuren PJ, Allam M, Wiley MR, Ismail A, Storm N, Birkhead M, Markotter W, Palacios G, Paweska JT. 2018. A novel adenovirus isolated from the Egyptian fruit bat in South Africa is closely related to recent isolates from China. Sci Rep. 25;8(1):9584. doi:10.1038/s41598-018-27836-w.
- Venter JC, Remington K, Heidelberg JF, Halpern AL, Rusch D, Eisen JA, Wu D, Paulsen I, Nelson KE, Nelson W, Fouts DE, Levy S, Knap AH, Lomas MW, Nealson K, White O, Peterson J, Hoffman J, Parsons R, Baden-Tillson H, Pfannkoch C, Rogers YH, Smith HO 2004. Environmental Genome Shotgun Sequencing of the Sargasso Sea. Science, 304(5667), 66–74. doi:science.1093857
- Vidovszky M, Kohl C, Boldogh S, Görföl T, Wibbelt G, Kurth A, Harrach B1.2015. Random sampling of the Central European bat fauna reveals the existence of numerous hitherto unknown adenoviruses. Acta Vet Hung. 63(4):508-25. doi:10.1556/004.2015.047
- Vieites JM, Guazzaroni ME, Beloqui A, Golyshin PN, Ferrer M. Metagenomics approaches in systems microbiology. FEMS Microbiol. Lett. vol. 33, no. 1, pp. 236– 255, 2009. doi:10.1111/j.1574-6976.2008.00152.x.
- Vizotto LD, Taddei VA. 1973 Chave para determinação de quirópteros brasileiros. São José do Rio Preto, Gráfica Francal, 72p.
- Xiang Z, Li Y, Cun A, Yang W, Ellenberg S, Switzer WM, Kalish ML, Ertl HC. 2006. Chimpanzee adenovirus antibodies in humans, sub-Saharan Africa. Emerg. Infect. Dis. 12:1596 –1599. doi:10.3201/eid1210.060078
- Walsh MP, Chintakuntlawar A, Robinson CM, Madisch I, Harrach B, Hudson NR, Schnurr D, Heim A, Chodosh J, Seto D, Jones MS. 2009. Evidence of molecular evolution driven by recombination events influencing tropism in a novel human adenovirus that causes epidemic keratoconjunctivitis. PLoS One. 4(6):e5635. doi:10.1371/journal.pone.0005635.
- Wang J, Moore NE, Murray ZL, McInnes K, White DJ, Tompkins DM, Hall RJ. 2015. Discovery of novel virus sequences in an isolated and threatened bat species, the New Zealand lesser short-tailed bat (*Mystacina tuberculata*). J. Gen. Virol. 96(8), 2442–2452. doi:10.1099/vir.0.000158
- Waruhiu C, Ommeh S, Obanda V, Agwanda B, Gakuya F, Ge XY1, Yang XL, Wu LJ, Zohaib A, Hu B, Shi ZL. 2017. Molecular detection of viruses in Kenyan bats and discovery of novel astroviruses, caliciviruses and rotaviruses. Virol Sin. 32(2):101-114. doi:10.1007/s12250-016-3930-2.
- Webster CL, Waldron FM, Robertson S, Crowson D, Ferrari G, Quintana JF, Brouqui JM, Bayne EH, Longdon B, Buck AH Lazzaro BP, Akorli J, Haddrill PR, Obbard DJ. 2015. The discovery, distribution, and evolution of viruses associated with *Drosophila melanogaster*. PLoS Biol, 13:33. doi:10.1371/journal.pbio.1002210.
- WHO - World health organization. 2018. Disponível em <http://www.who.int/rabies/epidemiology/en/> Acessado em Agosto de 2018.
- Wilkinson GS, South JM 2002. Life history, ecology and longevity in bats. Aging Cell 1: 124-131.

- Williams SH, Che XY, Garcia JA, Klena JD, Lee B, Muller D, Ulrich W, Corrigan RM, Nichol S, Jain K, Lipkin WI. 2018. Viral diversity of house mice in New York city. *Mbio*, 9:17. doi:10.1128/mBio.01354-17.
- Wong M, Woolford L, Hasan NH, Hemmatzadeh F. 2017. A Novel Recombinant Canine Adenovirus Type 1 Detected from Acute Lethal Cases of Infectious Canine Hepatitis. *Viral Immunol.* 30(4):258-263. doi:10.1089/vim.2016.0041.
- Wu Z, Ren X, Yang L, Hu Y, Yang J, He G, Zhang J, Dong J, Sun L, Du J, Liu L, Xue Y, Wang J, Yang F, Zhang S, Jin Q. 2012. Virome Analysis for Identification of Novel Mammalian Viruses in Bat Species from Chinese Provinces. *J. Virol.* 86(20), 10999–11012. doi:10.1128/JVI.01394-12
- Wu Z, Yang L, Ren X, He G, Zhang J, Yang J, Qian Z, Dong J, Sun L, Zhu Y, Du J, Yang F, Zhang S, Jin Q. 2016. Deciphering the bat virome catalog to better understand the ecological diversity of bat viruses and the bat origin of emerging infectious diseases. *ISME J.* 10(3), 609–620. doi:10.1038/ismej.2015.138
- Yang S, Liu Z, Wang Y, Li W, Fu X, Lin Y, Shen Q, Wang X, Wang H, Zhang W. 2016. A novel rodent Chapparvovirus in feces of wild rats. *Virol J.* 29;13:133. doi:10.1186/s12985-016-0589-0.
- Yatsyshina SB, Ageeva MR, Deviatkin AA, Pimkina EV, Markelov ML, Dedkov VG, Safonova MV, Shumilina EY, Lukashev AN, Shipulin GA. 2016. Complete Genome Sequence of Human Adenovirus 7 Associated with Fatal Adult Pneumonia. *Genome Announc.* 4(5), e01204-16. doi:10.1128/genomeA.01204-16
- Yinda CK, Ghogomu SM, Conceição-Neto N, Beller L, Deboutte W, Vanhulle E, Maes P, Van Ranst M, Matthijssens J. 2018. Cameroonian fruit bats harbor divergent viruses, including rotavirus H, bastroviruses, and picobirnaviruses using an alternative genetic code. *Virus Evol.* 30;4(1):vey008. doi:10.1093/ve/vey008
- Zaki AM, van Boheemen S, Bestebroer TM, Osterhaus AD, Fouchier RA. 2012. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *N Engl J Med.* 367(19):1814-20. doi:10.1056/NEJMoa1211721.
- Zheng X, Qiu M, Chen S, Xiao J, Ma L, Liu S, Zhou JH, Zhang QH, Li X, Chen Z, Wu Y, Chen HF, Jiang LN, Xiong YQ, Ma SJ, Zhong XS, Huo ST, Ge J, Cen SW, Chen Q. 2016. High prevalence and diversity of viruses of the subfamily Gammaherpesvirinae, family Herpesviridae, in fecal specimens from bats of different species in southern China. *Arch. Virol.* 161(1), 135–140. doi:10.1007/s00705-015-2614-9
- Zhu HC, Chu DKW, Liu W, Dong BQ, Zhang SY, Zhang JX, Li LF, Vijaykrishna D, Smith GJ, Chen HL, Poon LL, Peiris JS, Guan Y. 2009. Detection of diverse astroviruses from bats in China. *J. Gen. Virol.* 90(4), 883–887. doi:10.1099/vir.0.007732-0
- Zur Hausen H. 2009. The search for infectious causes of human cancers: where and why. *Virology.* 15;392(1):1-10. doi:10.1016/j.virol.2009.06.001.

9. APÉNDICES

9.1 Secuencias geradas

>Artibeus_lituratus_Adenovirus

CCTCCTCCTCATTCTTCATCGGCTATCAATACGTCGTGCGCATTGCAACG
 ACTACGTTTTTGATACCAGAGCCTACAGTCGCATCTCTTATTCTGAAGCTCTCATGAAAG
 AACGCCAGTTGGTAGATTGGTCTGTGCTGGCTAACTGCTCTTACACCATTAACACGGGA
 GCGTATCACCGCTTTGTGGACATGGAAAACCTTTGCCGAGACTCTTATGCAAGTTCAACA
 AGCCATCTTAGCCGAGCGGGTTGTTGCAGATTTAGCCTTATTCCGCCCTTACGAGGGT
 ATGGAGCTACCCACCTGAGTGGA

>Artibeus_lituratus_Papilomavirus

GTCACACCTAGTGGCTCTCTTATTAGTTCTGAAGGGCAGGTGTTTAATAAAG
 CTTACTGGGTTCAAAGGTCACAGGGGCAGAACAATGGCATACTGTGGAACAATGAAATG
 TTCATCACCTTGTTTGACAACACTAGAGGCACGTGTATGTCCATCAACATTAAGAAACAA
 GCAAAGCAAAGTGAGACAGAGTATAAGGATGGTACATTCATGCAGTTCCTCAGGCATGT
 GGAAGAGTTTGAAATCCAACCTCATTTCAGCTATGCAAGGTAAAGCTGACACCTGAAA
 ACCTAGCCTTCATACATACTATGGACCCTACCATCATAGATGAGTGGCACTTAGCTGTCA
 ATCCACCTCCTACTCACATAGTGGATGACAAGTATAGATACATTACCTCCTGGGCAACTA
 AATGCCCTTCCGATGTGACACCCACAGAAAGGCCTGATCCTTATGCTGATCTTAAGTTTT
 GGGAAATTGATCTGAGTGACCGCATGACAGAGCAGTTAGATCAGACCCCGTTAGGAAG
 AAAGTTTTTGCATCAGACAGGT

>Artibeus_lituratus_Parvovirus_Capsid

ATGGCGGAAGATATTAACCTATTCTAACACATACATGGCCTATTGGAAAAATG
 GACCATACATCTATACCAATAATGATGTGGGTAACACCAAACCCAGACTATGACAGCA
 GGCATAAACAACCTGGATGGAACATTATACCTACTATGTTATGGAAACAACCTCACTACA
 CAAAACAATGGTGCAACTTTATGATTCATATGAAGCATATACTGTTAAAGGATACACA
 GTTACTGTATATAATCCTATACCAATGACACAACAATTAGCTATACAAGGAACCTACTGCTT
 TACTGCTTTCAACAATACAATCTATACCTTAGGAGCACAAGATGATATATATGAAACAAA
 TTACCATAATTGGTACATAGATGTTCCCTTTCAACACTTCAATATAGCATATAAAGAAGGA
 CAATTTAAAGATAACACAAATACCTGGAATAAACTGTATTCCCTGTATATTCATGGGCTA
 CACCAATAGTAGAGACACTAGTGATAATACCTTCTCCTATCTACAAGGAATCAACAGCT
 ATTCTACCTGGCCTCGTCTTTCTGATTCACATGTAATTCCTAATGGATTATTCTGGGACC
 CATTAAATGATCCTGATAGCATTATGGAATTAAGACCTGGGAAAAACAGCATGTCATTTT
 CCTGGAATTGTCATGATTGTGATAGCAATAAATGGTACAATCTGGATGAAATTGCCAAAT
 GGACTCCGTATGTTTCATGATAATCCCTTCTGCACATTGGGCGTCCTGGTCAAGCAGGA

ACTGACAGAATCACCACAACAGATGACCCAGATCCAATACTAACATTCTCGTCATGGGC
TACTAGCACTCCATCCAAAGATGAT

>Artibeus__lituratus_Parvovirus_NS1

ATCCATCTCTGTCTCATTTCATCAGGGCATACTACCTTCTGAATTTGATCCTAT
ATTTTATTCTGGATAACAAAAAGTAATCTTAAAAAAACACTATAGTCCTATGGGGAACC
ACTAATACAGGGAAAAGTGCCTTCATTTTCAGGTTTTAAGCAATGTGTTAATTGGGGAGAA
GTAGTAAACAGCAACACCTTTGCCTTTGAAGGTTTAATTAATAATCAGTTTGGCATATGG
GAAGAACCACTCATCTCACCTGAATTAGCAGAAAAAGCAAAACAAATATTTGAAGGAATG
GAAACATCCATTCCAGTAAAATATAGAAAACCTACCAAATTACCTCGCACACCTATATTAA
TCACTACTAATCATGCACCATGGAGATTCTGTACTAAAGAAGAGGAAATGTTTAAAAATA
GAATGTACATCTTTTCATGGAATCATAACATGCATAACACTTCTTTCACTCCTAGAACTAG
TGAACATTGCTGCAAATGCCGAGTTTGTAAAGCAAGTCGAAGCAGCTCGCCTGTTACTA
GTAGGGAATCAACTAGCAGCCTGCAGGGAGGAGAACAATCCATACAACAACCTGGTTTCA
AGCACCAGCACGGCAGGCCATGTTTCAACCAGACCCTTGTCTCCATCTAGAGAGGGAG
AAGTGGGAACTAGAACAGAGAGCAAAACAAAGGGAAACACAGCTAGCGGGAGCAACAG
TGGACAATCTACCAGCCACACAGCTAGCAGGACGGAGCAACGCTCCGACAGCCCAGGA
CCTAGCTGCAGCTCCAGCACCGCAACTACATACAGCATAACGATCCAGTGGGGAATACA
GACCCAGCAATACCAGAGAGCGAGATGGAAGTCCAAGTAGCAGGGGCTCAGAACATAT
GGGAACCAGCGGATCTAGACGAGATAATGATAGATATCCTAGAGATGATGGACATACCG
CAGTACTACCAACCCTACAACAACAGATTCTAGTGATTCTAGACGATCTGTACGAAAAC
GCGATCTTAGCAAAGAAGTGGTGGTGTGGGGGAAACCAAAAAGCAAAAACACGGGA
TCAAGTTCATACCACCGAACCTGGACTGGGTAGGGAGATGGGCACCTTAACTATAACCA
CTCGTTTACAGTGGTATATGTATCTTTCTCACTTACAGAAACAATATGGC

>Glossophaga_soricina_papiloma_E1

GGCAATGGTTTTATTTTAGATCGATGCCGACGTATAGATAGTGATATGCAGG
ACAGTGATTGTGAGAATGAAAATAATGGGGAGTTGTGTAATCATACTGGATAACTTGACA
ATGCGCCTATAGCACAAGGAAATACCCTGGCCCTATTCCAGACCCAACCTGTCCCAGGC
GGGAAAAGAGAAAGTAACTTTCTCAAAGCTAACTG

>Glossophaga_soricina_papiloma_E2

CGACACCTGGAAAGCGGCCAGCGCCCGCCATCGCCGACTCGACAGAAGA
AGAAAGGCAAGCGCCAGTAGCCGCCCCAGGAACGCAAGGGCTTTTTTATATATTTTATG
GCAATGGATTTGTTCACTGCTAATACACCACAGGAATTTGCAACAAGATCAGAGGCTTG
CGCTTTAGACTGAAAAGGGGCCACCGCCACCGTTCTGGAACATAACCTTCTCAATGCC
ACACAGATGTGATGAG

>Glossophaga_soricina_papiloma_E2

AGAGATGGTAACAGACCGCACAGTCAGTTCAGAGGGTATAGAAACAGTGTC

CAGAAAAGTTTTGCGTTCAGCTGAAGAGCCAAAAGTCACTAAGATTGTGCCATTTCTTG
CCTGTCCGACCCCTCATCACC

>Glossophaga_soricina_papiloma_E7

GCATGGGCACTGCAAAGTCACAAAGAATAGTCCACACTGCAATGAGGCTTG
TTCTCTTACAAGTCGGCAAGGAGCTGGCTTTGGACAGTATTTGTCTCCAGGCTTGAAAG
CAGCATGCAGCGAAGGAAAGTCAGAAATGTTTGGAGTGGCAGCATCACAATCAGAATCA
GTCCTCGAAAGCACAAGAGTAATTCCTCCTAATGACTCTCCGTCTTTAGGCAAGTGTTA
GT

>Glossophaga_soricina_papiloma_L2

CTTACATTTATTGAACCACATGAAACACAGGATGTTGCTGTTTTAGATATGAA
TCCTGCTGAGCATGACCAAAGTGGACTCTTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCCG
CTGCGCGGGATTATATGACAGTTTACAGTGATATAGGGGAAACTTCTGAAGTGGAGAAC
CTGCTAATTGGGGTAGTAGCATAGGGTCAAACCGAGGAGAGGAAATTCAGATGCAAC
TATTCAGTGGGCCTAAGACAAGCACTCCAGAGACCGAGGCTGTCACTAAGGTGAGGGG
TCGAGCTAACTGGTTTAGCAAAGATACTATACACAGGTTCCAGTAAAAGATCCAGCAA
TCTTGATATTTTTCTTCTGTATTGTCTATAGGGGTTTGAAAACCACCATCATCACCATCAT
CCTGACTAGGACAGTTTTGATGTGTACAGGTCAGCCCCTCAGTAAGGGTGGAG

>Molossus_molossus_circovirus

TTCTGTTGGTTCATCCATTTCAATTAAGTTATATATTTCTTTAGGATGTTTTAT
TGAAGTCACCCATATTTTTTTGCTAATAGTTGTCTGTATCCTCCTTTTACTTCTAATCTGA
GCGGGTATCTATCTAGGAATTTAGCAAAAATTGAATTCATATTTCTCCCCTGAAGT
CGTCCAATAATACGTGTTTCGTGTGCGTCGTATCCGTGCAACCATTTTGTTCGGTTCGTGC
CAGTACGCGTTCGTTTCCAGCTTCTTCACTAGCCGCGCGCGTTTTTCCGGTTCGGGATGA
CCCGTAGTACCAGTATACTTCGGATTTGAAGTATCTCCTTTCTTCGTTAAATGACAACCA
TATTTGGCAGATCCGAATTCCTGACAGGTTTGGTGGTTCGTCCAATATTTGTGCGATGTT
TTGTCCGGATTTAACTCTGGTAACGGCTTCTTGCTGGATTTGCTCGATGCGCTTTCCG
GTAGGGTCCCACGTTCCCTCATATCTGCCTTCTTTTTGCAGTAATTTGCTGCTGTATCGC
GATTACTTCGTGCTTCCCAATGTAAGTTCGTGGGAATAGATTTTTGAGCGCCGTGAATT
TTTTCTTTTTTTGAGTTCACCGTAGCCTTGCAGATGCGGCGTTCCAGTATCTCCAATTT
CTTTTCCAATGATAACGTATCTCCATTCGCCGAATTCAAAATTGATTTGTATTCATCTTC
CGAATAATTATTTAAAGTAAAGCACACGAACTGAATCACACTCATTCTCACGATGGCTTT
TAAGCGAATGAGACGTACCCGAAAGCGGGTCCCCGACGTGACAGTATCGACGTTCC
AAAATTGATTTGTATTCATCTTCCGAATAATTATTTAAAGTAAAGCACACGAACTGAATCA
CACTCATTCTCACGATGGCTTTAAGCGAATGAGACGTACCCGAAAGCGGGCTCCCCGT
CGTCGACAGTATCGACGTCGTTATCGCGCGGACGTCGTTTTAATATTTCTTATACTCGC
GCCGCTCTTCGCAAATTTTATGACACATCGTTCTCTACTGGCGGCGTTGCATATAATTAT

ATGCATGATAACCCGAAAGGTCTTCCAGGCTGGTCGTATTATGCATCCGCTTATCACAAT
TATCGCGTCGTTGGCATTGCGGTTAAGTATGTTCCCTAAGGCGACGACGGCTCCCATGGA
AACGGGTCAGGTCCACTACGATTCTTCTTTGTTTTTTGTTTCGCGATTCTACTTCTGTGGT
TTGGACTGAAACTGGCGATAACCTTATCAATAAGGCTATGAGTTATCCCTACATGAAACA
ACGGACTTTGACGCGGCCTTTTTCGATTTATTTTCCAATGTCTCGAGCAACCACCAACTC
TTATGCACAACTTCTGGAGGATGGCTAACTACCGAGGAACCGAAATCAACCCAAGTGA
TTAATATTATTTCTGAAAAAGTTGCTATTGACAAACCTGGCCGATTTTATATTACATATTAT
ATTAGATTTAAGAACAAGCGTTATACTATAACCCAGTGTGATATCTCAATAAATGATATA
CAAAACAAAATATATTTATTTCAACTGATTTATTTTCATCCGAATTTTACATGCAAGCGGAG
CGCGCCAGCAAGGTACGTTGCTACTGCAGCCCGGTACAATCCCTTCACCGCGCCGAAG
CGCGTCAGCGCGAGTGCGGGCCCGTCAGGGCCTTCGCGCCACTTCACTGATTAATTAC
TCTCTCGCTCTCCGCTCTTTCTCTCCGTTTCGCTTTTAGTGCTAGTATTACCACTAAAAG
CGTACCTCGTACCTTAGGGCGATTCAATATTGTTAGGGTGATTCAAATTAATGAAATGTT
TTACAATTGTTATTCTTCTTAATAATTG

>Sturnira_lilium_Adenovirus

CAAGACTCTGACAAAGCCCAAGAGCAACAACAGCGCCAAGGCTACCGCTCA
TGGCGCGGGCACAAGAACGCCATAGTTGCTTGCTTGCAAACTGTGGGGGCAACATCT
CCTTCGCCCCGCGCTTTCTTCTCTACCATCACGGCGTGGCCTTCCCCGTAACATCCTG
CATTACTAC

>TTV_Glossophaga_soricina_1_

CTGGTGTTGATCCTCCCCATTACAAGATACAGAAGACGCTTTAAGGTAAGAA
GAACAAGGAGAAAAGCTCCTCATAAAGAACTGTTACACAGTGGAGACCTACCACTGTT
AGAAAATGTAAAATAATTGGTTACTTTCTGCCATGACTGGAACTTTTAAGACAAGGACA
TGGCAATGGGACTATGAAAACCTAGCAGAATGGGAAGGTGGTGGCATAACACACCATAA
CTTTAAACTTACAAGCCTTATATACAGAAAATATAAAACACAGAAATATTTGGACTGCTAC
AAATCAAGGAACTGATTTAGCAAGATACCAGGGAACCCAGATAACACTTTTTCCAAAGTGA
CAGATACTCATATATTTGTACATGGGACCCTGAATTTGGCAAAAAAACAAGTACCCAAT
TTGGACTAAACATCCTTTCTTACAAATGCTTAATCCTAACCATAAAATAATCTTAAGCAGC
AACAAAACCTGGTAAAGTTAGGCCTAAAAAATTTGGATTCCACCTCCTAGCATAATGACT
AGTGAATGGTACTTTTCAGAACAACTTACAAGACTATGGACTATTTGCTATAACTTTTTCCC
TTTTTGACCCATGGGAAACATTTATGGGAGAATCCCAACAATCATACAAGAGTGAAATAG
GATTTCTAGGTCTGATGGATACAGTTCAGACTTTAAAAAGGTTTACTATGCCACTTTTT
GGGATGATGCTAAAGGAAATAGGGTGGCATTACTACTGTGGGAAATACTCCATCTAAT
TTACAAAGGCCTGAAGGTAATCAAACAGCTATGCAATGGAAATACTGGGGAGAAGAGTA
CCCATACTGGATAACTTTATGGGGATCAAATTTCCACACACTGCTAATACACCACAGGA
ATTTGCAACAAGATCAGAGGTGTGGATAAAGTGGTATCCACCTAAAAATGACAGAGATG

ATCCTACACCTAACTTCAAAGTGCTAAAATTTGGATTCCAATATCACAAACCCAGGCCT
 TTGTAATTGGACAGAGTGGTTGGTTTGCACAGAAAGAAAATGAAAATAATTATAATGTTC
 ATTTTAAGTACAAGAGCTACTGGGAATGGGGAGGATCAACACCAGATGTCACCAGACAA
 CATTACAAAGACCCAAATGACACCTTTGGAGGATCAGACGGCTCTCGTCCCAGTTTCTT
 CAGCCATCAGGTACAAGCAATTGACCCGAGGGAAACTCAGGCCTCAGTGCTCCACCCA
 TGGGACTACAGAAGAGGGATGCCAACTAAGTCTGCCTGGGAAAGGGTCACAGGAGAAT
 ATAAACCTTTTATGGAACTATTCTTACAGGAGCAAAGAAAACAGAGCCATCGCCATCAG
 AAGAAGAAACAACATCAGAAGAGCAAGACAGCTACAGCAGCACCTCAGAAACAGACACA
 GAAGAGAAGGAGAAAACAAGGAAAATGTTCAAGAAAATATACAGAAAGCTCAAGCAGCG
 ACACAGACTCCGACAGCACCTCCTCGAGTGA

>TTV_Glossophaga_soricina_2_

CTGGTGTTGATCCTCCCCATTCCCAGTAGCTCTTGTACCCTTAAAATAAGAA
 GAACAAGGAGAAAAGCTCCTCATAAAGAACTGTTACACAGTGGAGACCTACCACTGTT
 AGAAAATGTAAAATAATTGGTTACTTTTCTGCCATGACTGGAACCTTTTAAGACAAGGACA
 TGGCAATGGGACTATGAAAACCTAGCAGAATGGGAAGGTGGTGGCATAACACCATAA
 CTTTAACTTACAAGCCTTATATACAGAAAATATAAAACACAGAAATATTTGGACTGCTAC
 AAATCAAGGAACTGATTTAGCAAGATACCAGGGAACCCAGATAACACTTTTCAAAGTGA
 CAGATACTCATATATTTGTACATGGGACCCTGAATTTGGCAAAAAACAAGTACCCAAT
 TTGGACTAAACATCCTTTCTTACAAATGCTTAATCCTAACCATAAAATAATCTTAAGCAGC
 AACAAAACCTGGTAAAGTTAGGCCTAAAAAATTTGGATTCCACCTCCTAGCATAATGACT
 AGTGAATGGTACTTTCAGAACAACCTACAAGACTATGGACTATTTGCTATAACTTTTTCCC
 TTTTGACCCATGGGAAACATTTATGGGAGAATCCCAACAATCATACAAGAGTGAAATAG
 GATTTCTAGGTCTGATGGATACAGTTCAGACTTTAAAAAGGTTTACTATGCCACTTTTT
 GGGATGATGCTAAAGGAAATAGGGTGGCATTACTACTGTGGGAAATACTCCATCTAAT
 TTACAAAGGCCTGAAGGTAATCAAACAGCTATGCAATGGAAATACTGGGGAGAAGAGTA
 CCCATACTGGATAACTTTATGGGGATCAAATTCCACACACTGCTAATACACCACAGGA
 ATTTGCAACAAGATCAGAGGTGTGGATAAAGTGGTATCCACCTAAAAATGACAGAGATG
 ATCCTACACCTAACTTCAAAGTGCTAAAATTTGGATTCCAATATCACAAACCCAGGCCT
 TTGTAATTGGACAGAGTGGTTGGTTTGCACAGAAAGACAATGAAAATAATTATAATGTTC
 ATTTTAAGTACAAGCAGCTACTGGGAATGGGGAGGATCAACACCAGATGTCACCAGACA
 ACATTACAAAGACCCAAATGA

>TTV_Molossus_molossus_1

CCTCAAGTGACTTCTTCAGTGACTTTTGATCTAGCCTTTGATAACTTTATATT
 AAGGCCTAGAACCCATGCATGCTCACAGCCTGTAACCTAACCAAGATTTTCAGAGACCTTT
 ACCCCGCCCCCAACCGCTTTGCAAAGCCTCCTCCACACTTCTCCTAGCCCCAATAAAC
 CACTAAATTTGCATTTAGTTTGTGGTCGGCAGCTTCTTCTGGGGGAGGGGGTATAA

ACCACAAATTTGCATATGACAGTTTGTGGTCGGCACACAGGAAACCACAAAAAGGGAA
GGGACAGAGTCCCCTCCCCTTAAACCCCTCCCCTGATGACTCCAACCAATCAAAACAGT
CACATGATTAAACTATATAAGTACATGCACAGACGAATGGTAGAGTTTATTCTGCTAGA
CGGTCTGCTAGCTTGCTAGCCGACGGTGTGGGCGGGGGCCGGAGGCCAGAGGCCG
GAGTCAAGGGGCCTATCGGGCGCACCGAGTCTTGCAGGTGGGCTAAAACAATGGACAT
TGATATTAAGACTAAAAACTAGTCTGGGTATCTGCTAATAGAACCTGGATAAAAGGACT
TATTTATCAACACAGCACTTTCTGTAAGTGCAAAAACATCCAGGATCACCTCACCAAATG
GCTTACCCCGGCAGATTTAAAGCCAGAGCTCGGTACAGGAGGTGGAGACAACCAACCT
GGAGAAGAAGATACAGAAGAACTTATCCAGGCTTTTCTAGAAGACGACTCAAGGTAAGA
AGAAGGAGACACAGAGGAAAATGGCATAATAGGCCACACAAGCAAGTGGTGAICTCAGT
GGTCTCCTAAGAATATTAGATCTTGCCAGATAATTGGATGGGTACCACTATTAAGTGGCA
CATTTTCCAGAAGATTTCTCTTCTGGAATGTTAAAGATAATAAGAGATATACAGGTGGTG
GTGTTGGACAATTGTTTTTACTTTACAAAGACTATATGTTGAGAATAAGATGCACAGGA
ATTGGTGGACTGAACTAATGATGGGACTGACCTCTGTCAATACAAAGGAACTAACTAT
ATCTCTATCCTAATGAAAAGTACACATATATTGTGTACTGGGACAGAGAATATGGCACAG
AGGACAAATACCCACTGTGGAAACACCATCCTGCTCTAATGCTCTTAATCCTCAACACA
AAATAGTCTGGAGTAAAGAAACAAAAGGCAACAGAACTCCACAAAAGTGTGGATGCCA
CCACCTGCTATAACAACCTCTGAATGGTACTTTCAAAGAGGATTCTCAAATTATGGCCTG
TTTGGACTCACTGTCTCCTTAATAGACATGACTGATCCATTCATGACAGAACAACAGGCC
ACATACAAGGCCAAAATTGGATTTTATACTGGAACATGGAACCCAACAAATGAACATATC
AGAGCTGTCAACTATGACATTTTTACAGACAATGGTCTTGGCAACATGACAGCATTTAAT
CACAATCCATGGGCAGCTAACACTCAGTTACCAGGAGACAATGACTCTAATAACAAAGT
GGAATACTGGGGAGAAAATTATCCTCTCTGGGCAACAGTCTGGTGTGTTTTGAACCTGAAC
TAGTGGATGATAATATAACCACTGGAATACAAGGCCAAAAAAGTTATCTGGGTAAAATGGT
TTCCACCAGTATCTGACACAAACAGTACTCCAGATGTTAAACAGCCAAAACAATGGACTG
TTATTAACAGAGAACAGATAAAGATATTACAGTCTATGGGACCATTTGTACAAAAACAATT
TGACAGCAACTTTTCTATTTTTTTAAAGTACAAAAGCTTCTGGAAATGGGGAGGACTCAC
TCCAGATGTTACAGACCAATACAACGAGCCAGTTTTCGACCCCCCAAGGGATCCTCAA
CCCGTGTCTTCAGAGCTCAGGTACCTGCTAGGGACCCTTCCACAATCTCTAAAAGAATC
ATCCATCCCTGGGACATCTATGGGACAGACATTCTCCACTACAAGTGGAGGCAGCTCAC
TGCAGAATCTCCTCAAAAACTTTACCAGAACTCTCCACACAGGGCCCAAATCAACAA
GAGGAGGGCCCTGGCCCTACGAAGAAGAGCCAGAAGAAAGCTCGCCCTCGGACAGCG
AAGAGGAGGAGGTGCAGAGACACCGGGAGGAAGACCTACGAAGACTCCTCAGAAGAG
TCCTCAGACGCCTCAAGCGTCTTCTGCGGTGTCTGTTGTTGCCTTTTATAACTTTATATT
ATGGCCTAGAACCCATCCATGCTCCCAGCCTGTAACAACCAACGATTTTACAGAGGCCTTC
TCCCCGCCCCACCGTCTGGCTAGCAAGCTAGACGACCGTCTAGCAGAATAAACTCTAC

CATTCGTCTGTGCATGTACTTATAT

>TTV_Molossus_molossus_2

TCCCCACACCCCTCCCCTCATGAATAATAATTAGGCGCCAAAATTCAA
AACTGACCAATCACATAAACTTCCTCAAAAAAAGTATAAACTAGCAGGGGTGACGAATGGCT
GAGTTTACTCTGCAGACGGTCAGACAGAGCACAGCTACTGTCTGACGAGGTGGGCGGG
TGCCGGAGGCTTCCGAAGGTAAGCCGGAGTCAAGGGGCCTATCGGGCACCGAGAGTC
TTAGCAGGAGGGCTAAATGGAGGGAGGTAAGTGTCTTTTCTTTATGTTTCTATGGCCTG
CAGGAATTATACTGCTACTGGCATGTCATCTGATCTTAAAAAATACTGTGGTTCGGGCTG
CAGCTATACTTGGGCCAAGACAACCAGAGACCACCATTCCACTTTCTGCAACTGTGGTA
AACCCCTACAACACCTAGCTAAATGGCTTGGAGAAGAAGATACAGGAGATGGTTCAGGA
AAAGGAGATTCCCCTATAGACAATACAGAAGAAAATATACAAGATTTGCTGGAGGCATTC
AAAGAAGATACAGAAGACGCTTTAAGGTAAGAAGAACAAGGAGAAAAGCTCCTCATAAA
GAACTGTTACACAGTGGAGACCTACCACTGTTAGAAAATGTAAAATAATTGGTTACTTT
CCTGCCATGACTGGAACCTTTAAGACAAGGACATGGCAATGGGACTATGAAAACCTAGC
AGAATGGGAAGGTGGTGGCATAACACCATAACTTTAACTTACAAGCCTTATATACAGA
AAATATAAACACAGAAATATTTGGACTGCTACTAATCAAGGAACTGATTTAGCAAGATA
CCAGGGAACCCAGATAAACAACCTTTTCAAAGTGACAGATACTCATATATTTGTACATGGGA
CCCTGAATTTGGCAAAAAACAAGTACCCAATTTGGACTAAACATCCTTTCTTACAAAT
GCTTAATCCTAACCATAAAATAATCTTAAGCAGCAACAAAACCTGGTAAAGTTAGGCCTAA
AAAAATTTGGATTCCACCTCCTAGCATAATGACTAGTGAATGGTACTTTCAGAACAACCT
ACAAGACTATGGACTATTTGCTATAACTTTTTCCCTTTTTGACCCATGGGAAACATTTATG
GGAGAATCCCAACAATCATACAAGAGTGAAATAGGATTTCTAGGTCTGATGGATACAG
TTCAGACTTTAAAAAGGTTTACTATGCCACTTTTTGGGATGATGCTAAAGGAAATAGGGT
GGCATTACTACTGTGGGAAATACTCCATCTAATTTACAAAGGCCTGAAGGTAATCAAAC
AGCTATGCAATGGAAATACTGGGGAGAAGAGTACCATACTGGATAACTTTATGGGGAT
CAAATTTCCACACACTGCTAATACACCACAGGAATTTGCAACAAGATCAGAGGTGTGG
ATAAAGTGGTATCCACCTAAAAATGACAGAGATGATCCTACACCTAACTTCAAAGTGCT
AAAATTTGGATTCCAATATCACAAACCCAGGCCTTTGTAATTGGACAGAGTGGTTGGTTT
GCACAGAAAGAAAATGAAAATAATTATAATGTTCAATTTAAGTACAAGAGCTACTGGGAA
TGGGGAGGATCAACACCAGATGTCACCAGACAACATTACAAAGACCCAAATGACACCTT
TGGAGGATCAGACGGCTCTCGTCCCAGTTTCTTCAGCCATCAGGTACAAGCAATTGACC
CGAGGGAACTCAGGCCTCAGTGCTCCACCCATGGGACTACAGAAGAGGGATGCCAAC
TAAGTCTGCCTGGGAAAGGGTCACAGGAGAATATAAACCTTTTATGGAACTATTCTTAC
AGGAGCAAAGAAACAGAGCCATCGCCATCAGAAGAAGAAACAACATCAGAAGAGCAA
GACAGCTACAGCAGCACCTCAGAAACAGACACAGAAGAGAAGGAGAAAACAAGGAAAA
TGTTCAAGAAAATATACAGAAAGCTCAAGCAGCGACACAGACTCCGACAGCACCTCCTC

GAGTGACTTTTGATTTATTATTGGACACTCAAACCTTTGTGATTCCAACCCAAACATATTA
TTCTTCTGTAGCTATAACAAACAAAGATGTATACCAGCTTTATGGGCGGGGAGGGGCAC
TCCAATTAAACTTCCCTTTTTCAATGCAACTATGTACACAATAAACCGCTAATTTGCATA
TGACAGTTTGTGGTCGGCCATTTCTTCCTGACTGTTTAACCACAAGAAAGGGAGGGGG
GAGAACCCCCCTTAACCCCCCGGGGGAGGTGTGGTTAACAGTCAGGAAGGAAA

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23

9.2 Artigo submetido à *Achives of virology*

Detection of adenovirus, papillomavirus and parvovirus in Brazilian bats *Artibeus lituratus* and *Sturnira lilium*.

Fernando Finoketti,¹ Raíssa Nunes dos Santos,¹ Aline Alves Scarpellini Campos,^{1,2} André Luís da Silva Zani,¹ Camila Mosca Barboza,³ Marcélia Emanuele Sad Fernandes,³ Tatiane de Cassia Pardo de Souza,³ Driele Delanira dos Santos,⁴ Giovana Werneck Bortolanza,⁴ Henrique Ortêncio Filho,⁴ Paulo Michel Roehe,¹ Ana Cláudia Franco,¹ Helena Beatriz de Carvalho Ruthner Batista³

¹Laboratório de Virologia, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Rua Sarmiento Leite, 500 - 90050-170 - Bairro Farroupilha - Porto Alegre – Rio Grande do Sul – Brasil.

²Centro Estadual de Vigilância em Saúde, Secretaria Estadual da Saúde do Rio Grande do Sul, Rua Domingos Crescêncio, 132 - 90650-090- Bairro Santana - Porto Alegre – Rio grande do Sul – Brasil.

³Instituto Pasteur, Secretaria da Saúde do Governo do estado de São Paulo, Avenida Paulista, 393 – 01311-000 - Bairro Cerqueira César - São Paulo – São Paulo – Brasil.

⁴Grupo de Estudos em Ecologia de Mamíferos e Educação Ambiental - Av. Reitor Zeferino Vaz, s/n, 87360-000, Goioerê, Paraná, Brasil.

#Address correspondence to Fernando Finoketti:
fernando_finoketti@yahoo.com.br; 55 (51) 3308-3655

24 **Abstract**

25 Bats play a significant role in maintaining the ecosystem through
26 pollination, seeds dispersal and control of insect populations. However, they are
27 known to host many microorganisms and have been described as natural
28 reservoirs for viruses with zoonotic potential. However, viral diversity in these
29 animals remains largely unknown because studies are limited by species,
30 localization, virus target or sample type. We performed high throughput
31 sequencing analyses on anal and oropharyngeal swabs pools from *Artibeus*
32 *lituratus* and *Sturnira lilium* collected in South Brazil. As a result, a member of the
33 *Adenoviridae* related to *Human adenovirus C* was detected in *S. lilium* anal
34 swabs. In addition, we describe the presence of papillomavirus from *A. lituratus*
35 anal swab. Our analyses also allowed the detection of adenovirus and parvovirus
36 in samples of oropharyngeal swabs collected from *A. lituratus*. These results
37 increase the knowledge about viral diversity and reinforce the importance of viral
38 surveillance among bats.

39 **Introduction**

40 Bats (order *Chiroptera*) are the only mammals with morphological and
41 physiological adaptations to fly. Such animals comprehend one fifth of the world's
42 mammal species. Widely spread in the world, bats play a significant role in
43 maintaining the ecosystem. Through dietary diversity, they are involved in
44 pollination, seeds dispersal and in the control of insect populations. Therefore,
45 they help in restoration of deforested areas, plants reproduction and predation of
46 bugs that harm humans, animals and plants [1].

47 However, distinctive characteristics make them reservoirs of various
48 pathogens, especially viruses. They live in large colonies, with multispecies

49 association sometimes, and their long lifespan, maybe associated with specific
50 characteristics of their immune system, may promote the maintenance of viral
51 infections. The migration of same species favors viral dispersal to different
52 regions. The increased contact with humans, directly or indirectly by saliva, urine
53 or feces, due to habitat sharing, increases the risk of virus transmission to
54 humans. Thus, they have an important involvement in the maintenance,
55 dispersion and transmission of viruses with impact on public health [2].

56 A large number of viruses, including important zoonotic viruses like
57 severe acute respiratory syndrome (SARS)-like coronaviruses [3, 4], filoviruses
58 [5], hantaviruses [6], and henipaviruses [7, 8] have already been reported on bats.
59 However, most viruses founded in bats have no confirmed zoonotic potential,
60 such as adenoviruses, papillomaviruses and parvoviruses [9]. Adenoviruses,
61 double-stranded DNA (dsDNA) viruses, were detected in bats for the first time in
62 2006 and since then, adenovirus DNA has been detected in different bat species
63 [10]. Only four bat adenoviruses (BtAdVs) had their genome nearly fully
64 sequenced: BtAdV-2 from *Pipistrellus pipistrellus* in Germany [11, 12], BtAdV-3
65 from *Myotis ricketti* in China [13], BtAdV WIV9-11 from *Rhinolophus sinicus* [14]
66 and BtAdV isolate 250-A from *Corynorhinus rafinesquii* in USA [10]. These
67 sequences reveal large differences between BtAdVs genomes. In Brazil, BtAdV
68 was detected in *Desmodus rotundus*, the most common vampire bat in Brazil
69 [15]. Papillomaviruses (PV), which are also dsDNA viruses, were reported in
70 diverse bats species [16-18]. However, no studies reported the presence of PV
71 on bats in Brazil. Parvoviruses, a single-stranded DNA (ssDNA) viral group,
72 exhibit the highest mutation rate among DNA viruses [9]. These viruses have
73 been reported worldwide, including in Brazil [19], and have already been related

74 to human-infecting parvoviruses [20-22].

75 More recently applied, studies using high throughput sequencing tend
76 to improve the identification of viruses because such approach allows the
77 detection of the whole virus diversity (virome) present in a biological sample [23].
78 For example, in 2013 viruses from *Adenoviridae*, *Herpesviridae*,
79 *Papillomaviridae*, *Parvoviridae*, *Picornaviridae*, *Polyomaviridae*, *Poxviridae*, and
80 *Retroviridae* families in African bats have been identified using this approach [24].
81 In 2016, Male et al. described three new species of cycloviruses, 14 species of
82 gemycircularviruses and 17 species of unclassified viruses in *Pteropus tonganus*
83 feces [25].

84 In Brazil, adenoviruses, anelloviruses, circoviruses, coronaviruses,
85 polyomaviruses, parvoviruses and rhabdoviruses have already been detected in
86 different bat species [15, 19, 26-29]. However, such previous studies have been
87 performed using traditional genome amplification methods. This study aims to
88 analyze and identify DNA viruses present in *Artibeus lituratus* and *Sturnira lilium*
89 through high throughput sequencing and Polymerase Chain Reaction (PCR).

90 **Material and methods**

91 **Samples**

92 Anal and oropharyngeal swabs from 69 *A. lituratus* and 24 *S. lilium*
93 close to urban centers in south Brazil were collected from September 2015 to
94 March 2016. Permanent license to collect biological material was granted from
95 the Chico Mendes Institute for Biodiversity Conservation - ICMBio (number:
96 17869-3, date of issue: 2012) and certification of the Ethical Committee on the
97 Use of Animals (CEUA) of the State University of Maringá (number 1697070515,
98 date of issue: 05/05/2015). To capture the specimens, five nylon nets (mist-nest)

99 were used, according to Greenhall and Paradiso [30], so that they are at least 30
100 meters away from each other. The capture effort in the forest fragment was
101 calculated according to Straube and Bianconi [31], multiplying the area of the nets
102 used (height × length), the number of nets and the number of hours of total
103 collection (collection period × number of days of collection). The captured animals
104 were hand-held with leather-shaved gloves, and biometric data and taxonomic
105 identification were collected in addition to the anal and oropharyngeal swabs,
106 according to Vizotto and Taddei [32], Jones and Carter [33] and Gregorin and
107 Taddei [34]. The swabs were stored in vials containing 2 mL Minimum Essential
108 Medium with 200 U/mL penicillin (Sigma-Aldrich) and 200 µg/mL streptomycin
109 (Sigma-Aldrich) and stored under refrigeration at 4 °C until the time of processing.
110 The animals were stored in cotton bags until data collection and collection of the
111 swabs and were subsequently released.

112 Viral enrichment

113 Samples were processed in pools of 1 mL for each animal. Twenty mL
114 were vigorously vortexed with glass beads and then centrifuged at 2500 × g for 5
115 min at 4 °C. The supernatant was again centrifuged for 14 min at maximum speed
116 and then filtered through a 0.22 µm syringe filter (MF-Millipore). The viral particles
117 were harvested and pelleted on a 25 % sucrose cushion by ultracentrifugation at
118 190 000 × g for 4 h at 4 °C. The pellet was resuspended in TE buffer [10 mM Tris
119 (Invitrogen) pH 7.4; 1 mM EDTA (Invitrogen) pH 8.0] and clarified by emulsifying
120 with 1/1 (v/v) chloroform and centrifugation. In order to remove nucleic acids not
121 protected by the capsid, the purified samples were treated with 100 U of DNase
122 I (Roche) and 20 U of RNase (Invitrogen) at 37 °C for 2 h, similar to other studies
123 [35]. Viral genomes were extracted with phenol (Invitrogen) and ethanol

124 precipitated according to Sambrook and Russel [36]. Random amplifications for
125 DNA were performed according to Stang et al [37] using primers K-randoms
126 (GAC CAT CTA GCG ACC TCC ACM NN MNM).

127 High throughput sequencing

128 Seventy ng of random amplification products of each sample, were
129 used for sequencing. Such samples were sent to Institute of Veterinary Research
130 Desidério Finamor (IPVDF), Fepagro Animal Health, Eldorado do Sul, Brazil, and
131 sequencing was performed in Illumina MiSeq platform using Kit Nextera XT
132 (2x150pb).

133 Bioinformatics

134 Reads are trimmed using PRINSEQ (prinseq.sourceforge.net) and the
135 sequences quality was analyzed with FastQC
136 (www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/). Trimmed reads were
137 assembled *de novo* by using St. Petersburg genome assembler (SPAdes) 3.10.1
138 (<http://cab.spbu.ru/software/spades/>). The resulting contigs (>100bp) were
139 submitted to blastx against for viral protein database with software Blas2GO
140 (<https://www.blast2go.com/>). Viral contigs were checked manually through
141 BLASTx search against the National Center for Biotechnology Information (NCBI,
142 www.ncbi.nlm.nih.gov) non-redundant database (nr). Amminoacids alignment
143 were performed with *software* MEGA 7 (<http://www.megasoftware.net/>), and
144 phylogenetic trees were reconstructed with software MrBayes 3.2.6
145 (<http://mrbayes.sourceforge.net/>) using evolutionary and substitution models
146 predicted for ProtTest 3.4.2 (<https://github.com/ddarriba/prottest3>).
147 Bacteriophage contigs were not further analyzed.

148 Polimerase Chain Reaction (PCR)

149 Nucleic acids from pooled samples of oral swabs from 24 *S. liliium* and
150 58 *A. lituratus* were extracted with the RTP DNA/RNA Virus mini kit (Stratec). The
151 nucleic acids were then submitted to Polymerase Chain Reaction (PCR) or
152 Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) according to the
153 investigated virus. Such amplification reactions targeted genomic fragments of
154 members from the families *Rhabdoviridae*, *Herpesviridae*, *Adenoviridae* and
155 *Paramyxoviridae* as described by Carnieli et al. [38], Razafindratsimandresy et
156 al. [39], Li et al. [13] and Tong et al. [40], respectively.

157 Results

158 The high throughput sequencing resulted in 1,345,784 total reads and
159 12,073 total contigs after trimming and assembly. Eleven percent (1,300)
160 matched against viral protein databases in Blast2go analysis, where 99.6 % were
161 bacteriophages, 0.15 % adenovirus, 0.15 % parvovirus and 0.1 % papillomavirus
162 (Table 1). Adenoviruses contigs were identified in *A. lituratus* oropharyngeal swab
163 (ALOS) and *S. liliium* anal swabs (SLAS) while papillomavirus and parvoviruses,
164 in *A. lituratus* anal swabs (ALAS) and ALOS respectively. Bacteriophages were
165 detected in all samples and only viral components were found in *S. liliium*
166 oropharyngeal swabs (SLOS). For further analyses, only adenoviruses,
167 papillomaviruses and parvoviruses contigs were used.

168 To confirm the sequences identities, contigs were manually submitted
169 to NCBI blastx (Table 2). *Artibeus lituratus* adenovirus (AIAdV) genomic fragment
170 is 312 nucleotides (nt) long and displays 71.2 % identity to *Equine adenovirus*
171 DNA terminal protein (Genbank accession number YP_009272543). *Sturnira*
172 *liliium adenovirus* (SIAdV) fragment is 177 nt long and displays 98 % identity to
173 *Human adenovirus C* L4 encapsidation protein (Genbank accession number

174 AFS50339). Phylogenetic analysis of both fragments allowed us to include these
175 viruses in the genus *Mastadenovirus* (Fig. 1 and Fig. 2).

176 *Artibeus lituratus papillomavirus* (AIPV) fragment was 549 nt long and
177 displayed 68.9 % identity to the L1 protein of *Rhinolophus ferrumequinum*
178 *papillomavirus* (*RferPV1*) (Genbank accession number AHJ81407), which
179 belongs to the *Treisdeltapapillomavirus* genus. In an attempt to further identify
180 and characterize the AIPV genus we reconstructed the *Papillomaviridae*
181 phylogenetic tree (Fig. 3). AIPV and *RferPV1* clustered together, suggesting that
182 they are phylogenetically related, however, the branch distance between them
183 may indicate that they do not belong to same genus. AIPV was thus defined as
184 belonging to an unclassified genus from *Papillomaviridae* family.

185 Both *Artibeus lituratus parvovirus* (AIPrV) fragments align to
186 *Desmodus rotundus parvovirus* (DrPV-1). The first fragment, which is 1170 nt
187 long, displays 70.9 % identity to the nonstructural protein 1 (NS1) (Genbank
188 accession number YP_009328889). The second fragment, which is 858 nt long,
189 displays 80.0 % identity to the capsid protein Genbank accession number
190 YP_009328890). Although both AIPrV and DrPrV-1 grouped in the same cluster,
191 phylogenetic distance between these sequences may indicate that they belong
192 to different genera (Fig. 4 and Fig 5). By PCR all samples shown negative results.

193 **Discussion**

194 Bats are recognized as potential hosts of many zoonotic viruses. To
195 assess viral diversity in two bat species in southern Brazil, were collected 69 *A.*
196 *lituratus* and 24 *S. liliium* anal and oropharyngeal swabs from Maringa, Paraná
197 state, Brazil, and submitted to Illumina MiSeq sequencing. From the generated
198 contigs, only 11 % matched against viral proteins. From these, about 1 %

199 belonged to eukaryotic viruses, from distinct families. Diversity of viral contigs
200 was lower than previously described in other bat species [24, 25, 41]. As it is
201 unlikely that viral diversity differs greatly among different species of bats, we
202 believe that environmental features like different alimentary habits, geographical
203 localization, and contact with other species of bats [25, 41-43] may contribute to
204 these different results. Besides, the nucleic acid extraction and enrichment
205 techniques may also influence such results.

206 Adenoviruses genome fragment were detected in both species of this
207 study; from *A. lituratus* oropharyngeal swabs and from *S. liliium* anal swabs.
208 Although not totally unexpected, this is the first study to describe the presence of
209 adenovirus DNA in samples from these two species. *A. lituratus adenovirus*
210 (AIAdV) fragment displayed 71.2 % identity to *Equine adenovirus* DNA terminal
211 protein and *S. liliium adenovirus* (SIAdV) showed 98 % identity to *Human*
212 *adenovirus C L4* encapsidation protein. Phylogenetic analyses showed that
213 AIAdV and SIAdV cluster with *Mastadenovirus* genus members. Although
214 adenoviruses have already been identified in Brazilian bats, the previous study
215 described a different DNA fragment in comparison to our study, making
216 impossible any comparison between them. Although adenoviruses infections are
217 species specific, recently findings suggest that cross-species transmissions can
218 occur. In 2011 Chen et al described an adenovirus in titi monkey (TMAdV) which,
219 due to its aggressiveness in this species, resulted from a spillover event [44].
220 Finally, SIAdV displayed high identity with *Human adenovirus C*, indicating that a
221 possible direct/indirect contact between bats and humans may allow interspecies
222 transmission.

223 Papillomaviruses (PV) were detected only in *A. lituratus* anal swabs.

224 The obtained fragment was 183 amino acid (aa) long and displayed 68.9 %
225 identity to *Rhinolophus ferrumequinum papillomavirus* (*RferPV1*) L1 protein,
226 firstly described in Spain by Garcia-Pérez [16]. This is the first PV detection in *A.*
227 *lituratus* and first PV described in Brazilian bats. Phylogenetic analysis showed
228 that *Artibeus lituratus papillomavirus* (AIPV) and *RferPV1* (which belongs to the
229 *Treisdeltapapillomavirus* genus) clustered independently. Indeed, AIPV-*RferPV1*
230 branch distance may indicate that these viruses belong to different genera. Thus,
231 to achieve a correct AIPV genus identification, a larger DNA fragment should be
232 analyzed, and we suggest that AIPV is an unclassified papillomavirus. In bats,
233 PVs have already been detected in oropharyngeal and anal swabs in distinct
234 species [16, 42, 45, 46]. Although most mammalian PV infections are
235 asymptomatic, some reports associated the presence of these viruses to different
236 human's cancer types. However, papillomavirus infection-associated cancers
237 have also been described in bats [47]. Although transmission between species
238 rarely occurs, the highly genomic diversity of these viruses, associated with
239 ecological characteristics of bats can intensify their spread and increase the
240 chances of interspecies transmission.

241 Two DNA fragments of parvovirus (PrV) were detected in *A. lituratus*
242 oropharyngeal swabs. The first one aligns to the capsid protein and the second
243 one to the nonstructural protein 1 (NS1), both related to *Desmodus rotundus*
244 *parvovirus* (DrPV-1), detected previously in Brazil [19]. *Artibeus lituratus*
245 *parvovirus* (AIPrV) capsid fragment is 286 aa long and displays 80.0 % identity
246 with DrPV-1 capsid protein, while AIPrV NS1 fragment is 390 aa long and displays
247 70.9 % identity with DrPV-1 NS1 protein. Although *Artibeus jamaicensis* *Bat*
248 *Parvovirus 1* (Aj-BtPV-1) has been previously identified in one sample collected

249 from *A. lituratus* samples, phylogenetic analysis of both fragments showed that
250 AIPrV and DrPV-1 are in the same cluster [48]. The cluster distances between
251 these two viruses and between them and other members, suggest that AIPrV
252 belongs to a new genus in *Parvovirinae* subfamily. Although it was not the first
253 PrV detected in *A. lituratus*, AIPrV differs significantly from Aj-BtPV-1.

254 Different metagenomic studies already identified adenoviruses,
255 papillomaviruses and parvoviruses in a number of bat species [24, 41, 42, 46,
256 49]. However, differences in sample collection, sample types, viral nucleic acid
257 isolation methodologies, nucleic acid amplification and/or high-throughput
258 sequencing platforms, may account for the diverse results found in different
259 studies, not allowing a direct comparison between studies. This work highlight the
260 importance to investigate viruses in bats and indicates that high throughput
261 sequencing can be more suitable than PCR to explore the viral diversity in bats.
262 In addition, our results add knowledge on the diversity of viruses carried by bats;
263 however, the number of species analyzed, and the targeted geographical region
264 are limited. Such studies should be continued, so that the knowledge on the viral
265 diversity in bats and identify infectious agents to correlate potential viruses that
266 cause zoonotic infections can be improved, facilitating the decision-making
267 concerning the strategies that should be adopted to combat emerging viruses.

268 **Acknowledgements**

269 We thank Dra. Fabiana Quoos Mayer from Instituto de Pesquisas
270 Veterinárias Desidério Finamor. All authors have seen and approved the
271 manuscript and have contributed significantly to the work.

272 **Funding**

273 This study was supported by a grant from FAPESP, Brazil in 2016

274 (Project Code No. 2015/25367-0) and Health State Secretary of São Paulo. Part
275 of this work was supported by CNPq and CAPES. A. C. F. and P. M. R. are CNPq
276 fellows.

277 **Conflict of interest**

278 All authors declare that there are no financial or other relationships
279 that might lead to a conflict of interest.

280 **References**

281 1. Allocati N, Petrucci AG, Di Giovanni P, Masulli M, Di Ilio C, De
282 Laurenzi V (2016) Bat–man disease transmission: zoonotic pathogens from
283 wildlife reservoirs to human populations. *Cell Death Discov.* doi:
284 10.1038/cddiscovery.2016.48

285 2. Serra-Cobo J, López-Roig M (2016) Bats and emerging infections:
286 an ecological and virological puzzle. *Adv Exp Med Biol.* doi
287 10.1007/5584_2016_131

288 3. Lau SK, Woo PC, Li KS, Huang Y, Tsoi HW, Wong BH, Wong SS,
289 Leung SY, Chan KH, Yuen KY (2005) Severe acute respiratory syndrome
290 coronavirus-like virus in Chinese horseshoe bats. *Proc Natl Acad Sci USA*
291 102:14040–14045. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506735102>

292 4. Li W, Shi Z, Yu M, Ren W, Smith C, Epstein JH, Wang H, Crameri
293 G, Hu Z, Zhang H, Zhang J, McEachern J, Field H, Daszak P, Eaton BT, Zhang
294 S, Wang LF (2005) Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses.
295 *Science* 310:676–679. <https://doi.org/10.1126/science.1118391>

296 5. Leroy EM, Kumulungui B, Pourrut X, Rouquet P, Hassanin A, Yaba
297 P, Délicat A, Paweska JT, Gonzalez JP, Swanepoel R (2005) Fruit bats as
298 reservoirs of Ebola virus. *Nature* 438:575–557. <https://doi.org/10.1038/438575a>

- 299 6. Guo WP, Lin XD, Wang W, Tian JH, Cong ML, Zhang HL, Wang
300 MR, Zhou RH, Wang JB, Li MH, Xu J, Holmes EC, Zhang YZ (2013) Phylogeny
301 and origins of hantaviruses harbored by bats, insectivores, and rodents. *PLoS*
302 *Pathog* 9:e1003159. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003159>
- 303 7. Halpin K, Hyatt AD, Fogarty R, Middleton D, Bingham J, Epstein JH,
304 Rahman SA, Hughes T, Smith C, Field HE, Daszak P, Henipavirus Ecology
305 Research Group (2011) Pteropid bats are confirmed as the reservoir hosts of
306 henipaviruses: a comprehensive experimental study of virus transmission. *Am J*
307 *Trop Med Hyg* 85:946 – 951. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.10-0567>
- 308 8. Smith I, Wang LF (2013) Bats and their virome: an important source
309 of emerging viruses capable of infecting humans. *Curr Opin Virol* 3:84–91.
310 <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2012.11.006>
- 311 9. Geoghegan JL, Duchêne S, Holmes EC (2017) Comparative
312 analysis estimates the relative frequencies of co-divergence and cross-species
313 transmission within viral families. *PLoS Pathog* 13(2):e1006215.
314 [doi:10.1371/journal.ppat.1006215](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006215)
- 315 10. Hackenbrack N, Rogers MB, Ashley RE, Keel MK, Kubiski SV,
316 Bryan JA, Ghedin E, Holmes EC, Hafenstein SL, Allison AB (2017) Evolution and
317 cryo-electron microscopy capsid structure of a North American bat adenovirus
318 and its relationship to other mastadenoviruses. *J Virol* 91:e01504-16.
319 <https://doi.org/10.1128/JVI.01504-16>
- 320 11. Sonntag M, Mühldorfer K, Speck S, Wibbelt G, Kurth A (2009) New
321 adenovirus in bats, Germany. *Emerg Infect Dis* 15:2052–2055.
322 <https://doi.org/10.3201/eid1512.090646>
- 323 12. Kohl C, Vidovszky MZ, Mühldorfer K, Dabrowski PW, Radonic A,

- 324 Nitsche A, Wibbelt G, Kurth A, Harrach B (2012) Genome analysis of bat
325 adenovirus 2: indications of interspecies transmission. *J Virol* 86:1888–1892.
326 <https://doi.org/10.1128/JVI.05974-11>
- 327 13. Li Y, Ge X, Zhang H, Zhou P, Zhu Y, Zhang Y, Yuan J, Wang LF,
328 Shi Z (2010) Host range, prevalence, and genetic diversity of adenoviruses in
329 bats. *J Virol* 84:3889–3897. <https://doi.org/10.1128/JVI.02497-09>
- 330 14. Tan B, Yang XL, Ge XY, Peng C, Zhang YZ, Zhang LB, Shi ZL
331 (2016) Novel bat adenoviruses with an extremely large E3 gene. *J Gen Virol* 97:
332 1625–1635. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000470>
- 333 15. Lima FES, Cibulski SP, Elesbao F, Carnieli JrP, Batista HBCR,
334 Roehe PM, Franco AC (2013) First detection of adenovirus in the vampire bat
335 (*Desmodus rotundus*) in Brazil. *Virus Genes*. doi:10.1007/s11262-013-0947-6
- 336 16. García-Pérez R, Ibáñez C, Godínez JM, Aréchiga N, Garin I,
337 Pérez-Suárez G, de Paz O, Juste J, Echevarría JE, Bravo IG (2014) Novel
338 papillomaviruses in free-ranging iberian bats: no virus–host co-evolution, no Strict
339 host specificity, and hints for recombination. *Genome Biol Evol* 6(1):94–104.
340 doi:10.1093/gbe/evt211
- 341 17. Hu D, Zhu C, Wang Y, Ai L, Yang L, Ye F, Ding C, Chen J, He B,
342 Zhu J, Qian H, Xu W, Feng Y, Tan W, Wang C (2017) Virome analysis for
343 identification of novel mammalian viruses in bats from Southeast China. *Sci Rep*
344 7;7(1):10917. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11384-w>
- 345 18. Salmier A, Tirera S, de Thoisy B, Franc A, Darcissac E, Donato D,
346 Bouchier C, Lacoste V, Lavergne A (2017) Virome analysis of two sympatric bat
347 species (*Desmodus rotundus* and *Molossus molossus*) in French Guiana. *PLoS*
348 *ONE* 12(11):e0186943. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186943>

349 19. de Souza WM, Romeiro MF, Fumagalli MJ, Modha S, de Araujo J,
350 Queiroz LH, Durigon EL, Figueiredo LTM, Murcia PR, Gifford RJ (2017)
351 Chapparvoviruses occur in at least three vertebrate classes and have a broad
352 biogeographic distribution. *J Gen Virol* 2017;98:225–229. doi
353 10.1099/jgv.0.000671

354 20. Kemenesi G, Dallos B, Görföl T, Estók P, Boldogh S, Kurucz K,
355 Oldal M, Marton S, Bányai K, Jakab F (2015) Genetic diversity and recombination
356 within bufaviruses: Detection of a novel strain in Hungarian bats. *Infect Genet*
357 *Evol.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2015.05.017>

358 21. Lau SKP, Ahmed SS, Yeung HC, Li KS, Fan RY, Cheng TY, Cai
359 JP, Wang M, Zheng BJ, Wong SS, Woo PC, Yuen KY (2016) Identification and
360 interspecies transmission of a novel bocaparvovirus among different bat species
361 in China. *J Gen Virol* 97, 3345–3358. doi: 10.1099/jgv.0.000645

362 22. Sasaki M, Gonzalez G, Wada Y, Setiyono A, Handharyani E,
363 Rahmadani I, Taha S, Adiani S, Latief M, Kholilullah ZA, Subangkit M, Kobayashi
364 S, Nakamura I, Kimura T, Orba Y, Ito K, Sawa H (2016) Divergent bufavirus
365 harboured in megabats represents a new lineage of parvoviruses. *Sci Rep*
366 6:24257. doi: 10.1038/srep24257

367 23. Moratelli R, Calisher CH (2015) Bats and zoonotic viruses: can we
368 confidently link bats with emerging deadly viruses? *Mem Inst Oswaldo Cruz*
369 10(1):1-22. doi: 10.1590/0074-02760150048

370 24. Baker KS, Leggett RM, Bexfield NH, Alston M, Daly G, Todd S,
371 Tachedjian M, Holmes CE, Cramer S, Wang LF, Heeney JL, Suu-Ire R, Kellam
372 P, Cunningham AA, Wood JL, Caccamo M, Murcia PR (2013) Metagenomic
373 study of the viruses of African straw-coloured fruit bats: detection of a chiropteran

- 374 poxvirus and isolation of a novel adenovirus. *Virology* 5;441(2):95-106. doi:
375 10.1016/j.virol.2013.03.014
- 376 25. Male MF, Kraberger S, Stainton D, Kami V, Varsani A (2016)
377 Cycloviruses, gemycircularviruses and other novel replication-associated protein
378 encoding circular viruses in Pacific flying fox (*Pteropus tonganus*) faeces. *Infect*
379 *Genet Evol* 39:279-292. doi: 10.1016/j.meegid.2016.02.009
- 380 26. Cibulski SP, Teixeira TF, Lima FES, do Santos HF, Franco AC,
381 Roehe PM (2014) A novel Anelloviridae species detected in *Tadarida brasiliensis*
382 bats: first sequence of a chiropteran Anellovirus. *Genome Announc* 2(5):e01028-
383 14. doi:10.1128/genomeA.01028-14
- 384 27. Lima FES, Cibulski SP, Witt AA, Franco AC, Roehe PM (2015)
385 Genomic characterization of two novel polyomaviruses in Brazilian insectivorous
386 bats. *Arch Virol*. doi: 10.1007/s00705-015-2447-6
- 387 28. Asano KM, Hora AS, Scheffer KC, Fahl WO, Iamamoto K, Mori E,
388 Brandão PE (2016) Alphacoronavirus in urban Molossidae and Phyllostomidae
389 bats, Brazil. *Virol J* 24;13:110. doi: 10.1186/s12985-016-0569-4
- 390 29. Góes LGB, Campos ACA, de Carvalho C, Ambar G, Queiroz LH,
391 Cruz-Neto AP, Munir M, Durigon EL (2016) Genetic diversity of bats
392 coronaviruses in the Atlantic Forest hotspot biome, Brazil. *Infect Genet Evol*
393 44:510-3. doi: 10.1016/j.meegid.2016.07.034
- 394 30. Greenhall GG, Paradiso JL (1968) BaLs and hal handing.
395 Washington, U.S. Dep. In: Fish and Wildlife Service. Bureau 01' Sport Fisheries
396 and Wildlife 45p.
- 397 31. Straube FC, Bianconi GV (2002) Sobre a grandeza e a unidade
398 utilizada para estimar esforço de captura com utilização de redes-de-neblina.

399 Chiroptera Neotropical, Brasília, 8 (1-2): 150-152.

400 32. Vizotto LD, Taddei VA (1973) Chave para determinação de
401 quirópteros brasileiros. São José do Rio Preto, Gráfica Francal, 72p.

402 33. Jones JK, Carter DC (1976) Annotated checklist, with keys to
403 subfamilies and genera. In BABER, R.J., JONES JR, JK. and CARTER, DC.
404 (Eds.). Biology of bats of the new world family Phyllostomidae, part I. Lubbock:
405 Museum Texas Tech. University. p. 7-38. Special Publications

406 34. Gregorin R, Taddei VA (2002) Chave artificial para identificação
407 de molossídeos brasileiros (Mammalia, Chiroptera). Mastozoologia Neotropical,
408 vol. 1, no. 9, p. 13-32.

409 35. Kluge M, Campos FS, Tavares M, de Amorim DB, Valdez FP,
410 Giongo A, Roehe PM, Franco AC (2016) Metagenomic survey of viral diversity
411 obtained from feces of subantarctic and south american fur seals. PLoS One.
412 17;11(3):e0151921. doi: 10.1371/journal.pone.0151921

413 36. Sambrook J, Russell DW (2001) Molecular Cloning: A Laboratory
414 Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New
415 York.

416 37. Stang A, Korn K, Wildner O, Uberla K (2005) Characterization of
417 virus isolates by particle-associated nucleic acid PCR. J Clin Microbiol 43:716–
418 720. doi: 10.1128/JCM.43.2.716–720.2005

419 38. Carnieli JrP, Brandão PE, Carrieri ML, Castilho JG, Macedo CI,
420 Machado LM, Rangel N, de Carvalho RC, de Carvalho VA, Montebello L, Wada
421 M, Kotait I (2006) Molecular epidemiology of rabies virus strains isolated from
422 wild canids in Northeastern Brazil. Virus Res 120(1-2):113-20. doi:
423 10.1016/j.virusres.2006.02.007

- 424 39. Razafindratsimandresy R, Jeanmaire EM, Counor D, Vasconcelos
425 PF, Sall AA, Reynes JM (2009) Partial molecular characterization of
426 alphaherpesviruses isolated from tropical bats. *J Gen Virol* 90(Pt 1):44-7. doi:
427 10.1099/vir.0.006825-0
- 428 40. Tong S, Chern SW, Li Y, Pallansch MA, Anderson LJ (2008)
429 Sensitive and broadly reactive reverse transcription-PCR assays to detect novel
430 paramyxoviruses. *J Clin Microbiol* 46(8):2652-8. doi: 10.1128/JCM.00192-08
- 431 41. He B, Li Z, Yang F, Zheng J, Feng Y, Guo H, Li Y, Wang Y, Su N,
432 Zhang F, Fan Q, Tu C (2013) Virome profiling of bats from Myanmar by
433 metagenomic analysis of tissue samples reveals more novel Mammalian viruses.
434 *PLoS One* 22;8(4):e61950. doi: 10.1371/journal.pone.0061950
- 435 42. Wang J, Moore NE, Murray ZL, McInnes K, White DJ, Tompkins
436 DM, Hall RJ (2015) Discovery of novel virus sequences in an isolated and
437 threatened bat species, the New Zealand lesser short-tailed bat (*Mystacina*
438 *tuberculata*). *J Gen Virol* 96, 2442–2452. doi 10.1099/vir.0.000158
- 439 43. Yinda CK, Conceição-Neto N, Zeller M, Heylen E, Maes P,
440 Ghogomu SM, Ranst MV, Matthijnssens J (2017) Novel highly divergent
441 sapoviruses detected by metagenomics analysis in straw-colored fruit bats in
442 Cameroon. *Emerg Microbes Infect.* doi:10.1038/emi.2017.20
- 443 44. Chen EC, Yagi S, Kelly KR, Mendoza SP, Maninger N, Rosenthal
444 A, Spinner A, Bales KL, Schnurr DP, Lerche NW, Chiu CY (2011) Cross-species
445 transmission of a novel adenovirus associated with a fulminant pneumonia
446 outbreak in a new world monkey colony. *PLoS Pathog* 7(7):e1002155.
447 doi:10.1371/journal.ppat.1002155
- 448 45. Tse H, Tsang AKL, Tsoi HW, Leung ASP, Ho CC, Lau SKP, Woo

- 449 PCY, Yuen KY (2012) Identification of a novel bat papillomavirus by
450 metagenomics. PLoS ONE 7(8): e43986. doi:10.1371/journal.pone.0043986
- 451 46. Wu Z, Ren X, Yang L, Hu Y, Yang J, He G, Zhang J, Dong J, Sun
452 L, Du J, Liu L, Xue Y, Wang J, Yang F, Zhang S, Jin Q (2012) Virome analysis
453 for identification of novel mammalian viruses in bat species from Chinese
454 provinces. J Virol 86(20):10999-1012. doi: 10.1128/JVI.01394-12
- 455 47. Rector A, Mostmans S, Van Doorslaer K, McKnight CA, Maes RK,
456 Wise AG, Kiupel M, Van Ranst M (2006) Genetic characterization of the first
457 chiropteran papillomavirus, isolated from a basosquamous carcinoma in an
458 Egyptian fruit bat: the *Rousettus aegyptiacus* papillomavirus type 1. Vet Microbiol
459 31;117(2-4):267-75. doi: 10.1016/j.vetmic.2006.06.010
- 460 48. Canuti M, Eis-Huebinger AM, Deijs M, de Vries M, Drexler JF,
461 Oppong SK, Müller MA, Klose SM, Wellinghausen N, Cottontail VM, Kalko EK,
462 Drosten C, van der Hoek L (2011) Two novel parvoviruses in frugivorous New
463 and Old World bats. PLoS ONE 6(12): e29140.
464 doi:10.1371/journal.pone.0029140
- 465 49. Ge X, Li Y, Yang X, Zhang H, Zhou P, Zhang Y, Shia Z (2012)
466 Metagenomic analysis of viruses from bat fecal samples reveals many novel
467 viruses in insectivorous bats in china. J Virol. doi:10.1128/JVI.06671-11.

468

Table 1. Sequencing results by sample.

Sample	Reads	Contigs	Viral contigs	Bacteriophages contigs	Parvovirus contigs	Adenovirus contigs	Papillomavirus contigs
ALAS	152,788	2,839	406	405	-	-	1
ALOS	277,710	3,042	387	384	2	1	-
SLAS	539,804	1,998	163	162	-	1	-
SLOS	375,482	4,205	347	347	-	-	-
TOTAL	1,345,784	12,084	1,303	1,298	2	2	1

ALAS – *A. lituratus* anal swab; ALOS – *A. lituratus* oropharyngeal swab; SLAS – *S. liliium* anal swab; SLOS – *S. liliium* oropharyngeal swab

469

470

Table 2. Contigs (>150bp) with significant BLASTx hits to known

471

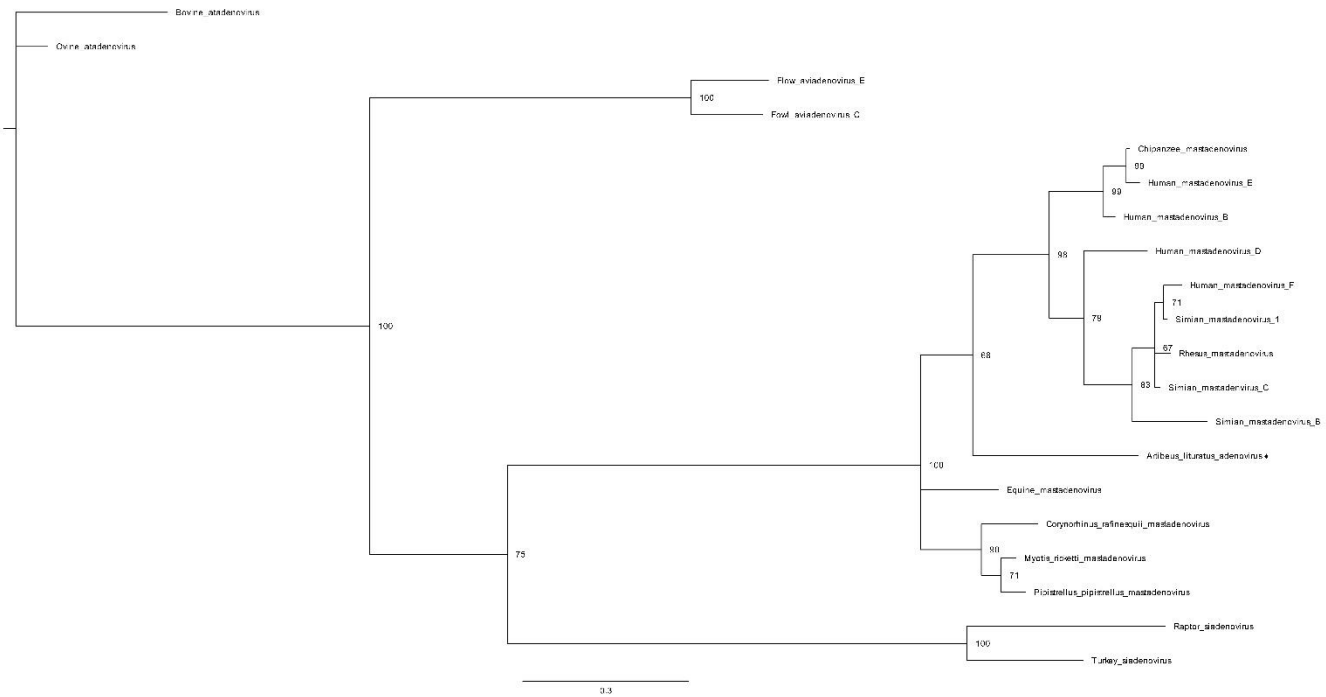
eukaryotic viruses obtained from Brazilian bats *S. liliium* and *A. lituratus*.

Sample	Name	Length (nt)	Protein	Best hit	Genbank ID	Identity	e-value
ALSA	<i>Artibeus lituratus</i> papillomavirus	549	L1 protein	<i>Rhinolophus ferrumequinum papillomavirus</i>	AHJ81407	68.9%	3e ⁻⁸⁹
ALSO	<i>Artibeus lituratus</i> parvovirus NS1	1170	Nonstructural protein 1	<i>Desmodus rotundus parvovirus</i>	YP_009328889	70.9%	3e ⁻¹⁷³
	<i>Artibeus lituratus</i> parvovirus capsid	858	Capsid protein	<i>Desmodus rotundus parvovirus</i>	YP_009328890	80.0%	3e ⁻¹⁵⁷
	<i>Artibeus lituratus</i> adenovirus	312	DNA terminal protein	<i>Equine adenovirus</i>	YP_009272543	71.2%	9e ⁻⁵⁰
SLSA	<i>Sturnira liliium</i> adenovirus	177	L4 encapsidation protein	<i>Human adenovirus C</i>	AFS50339	98%	3e ⁻³⁴

ALAS – *A. lituratus* anal swab; ALOS – *A. lituratus* oropharyngeal swab; SLAS – *S. liliium* anal swab

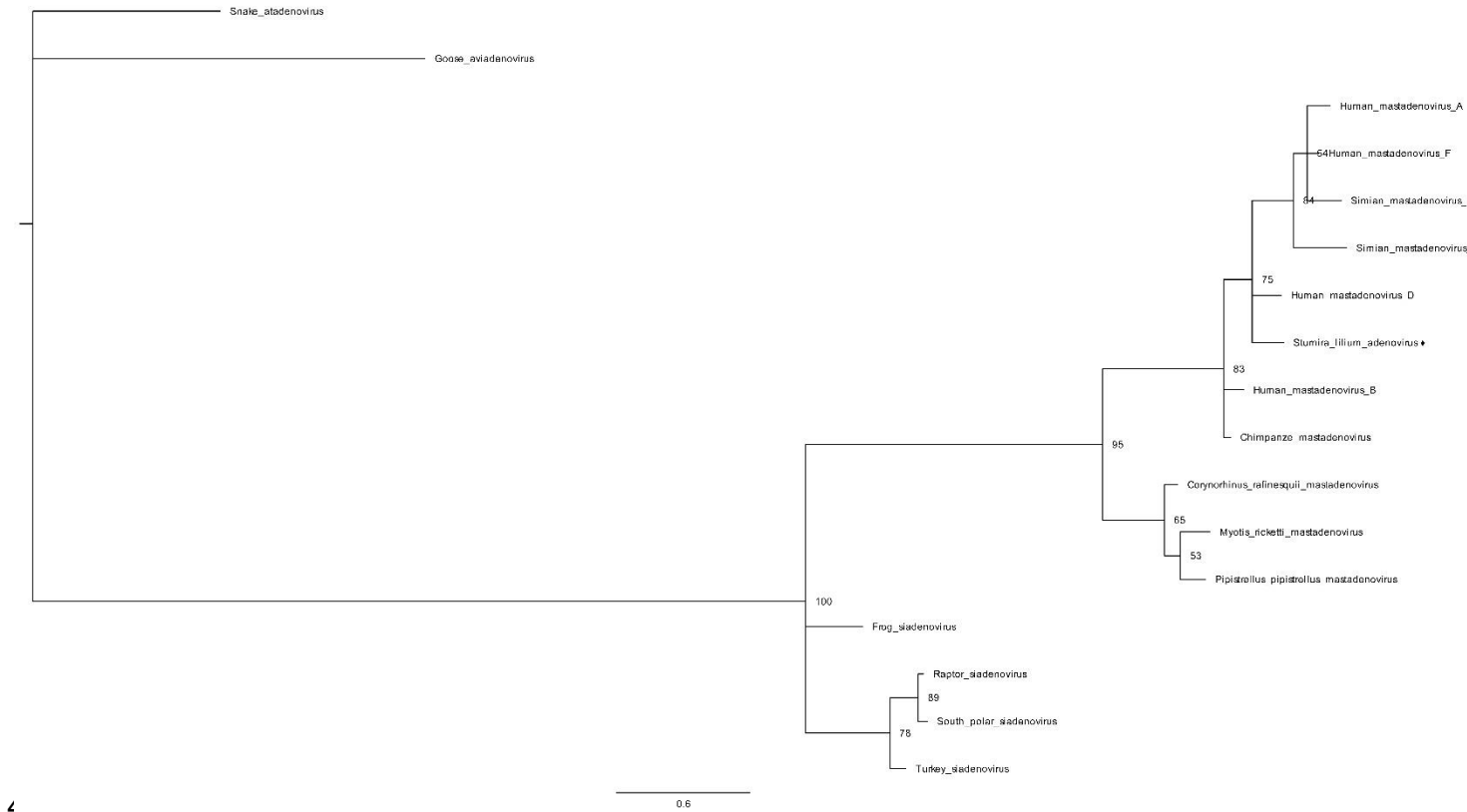
472

473 **Figure 1:** Phylogenetic tree of *A. lituratus adenovirus*. Reconstructed tree
 474 based on the partial sequence of the *Adenoviridae* DNA terminal protein. The *A.*
 475 *lituratus adenovirus* detected in this study is represented by ♦. Tree was constructed
 476 using Bayesian inference with LG substitution matrix and gamma distribution, as
 477 predicted by ProtTest. Generation number was 1.000.000 and 2 chains were used.



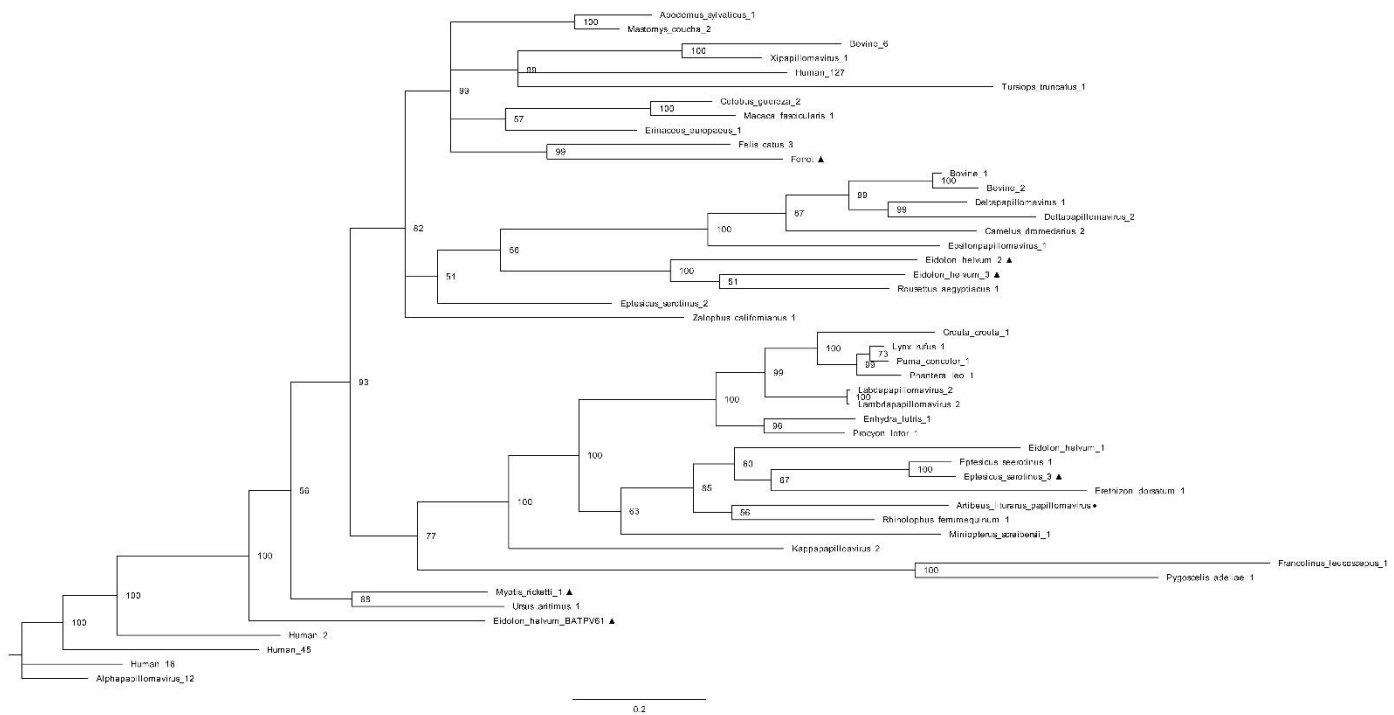
479

480 **Figure 2:** Phylogenetic tree of *S. liliium adenovirus*. Reconstructed tree
481 based on the partial sequence of the *Adenoviridae* L4 encapsidation protein. The *S.*
482 *liliium adenovirus* detected in this study is represented by ♦. Tree was constructed using
483 Bayesian inference with JTT substitution matrix and gamma distribution, as predicted
484 by ProtTest. Generation number was 1.000.000 and 2 chains were used.



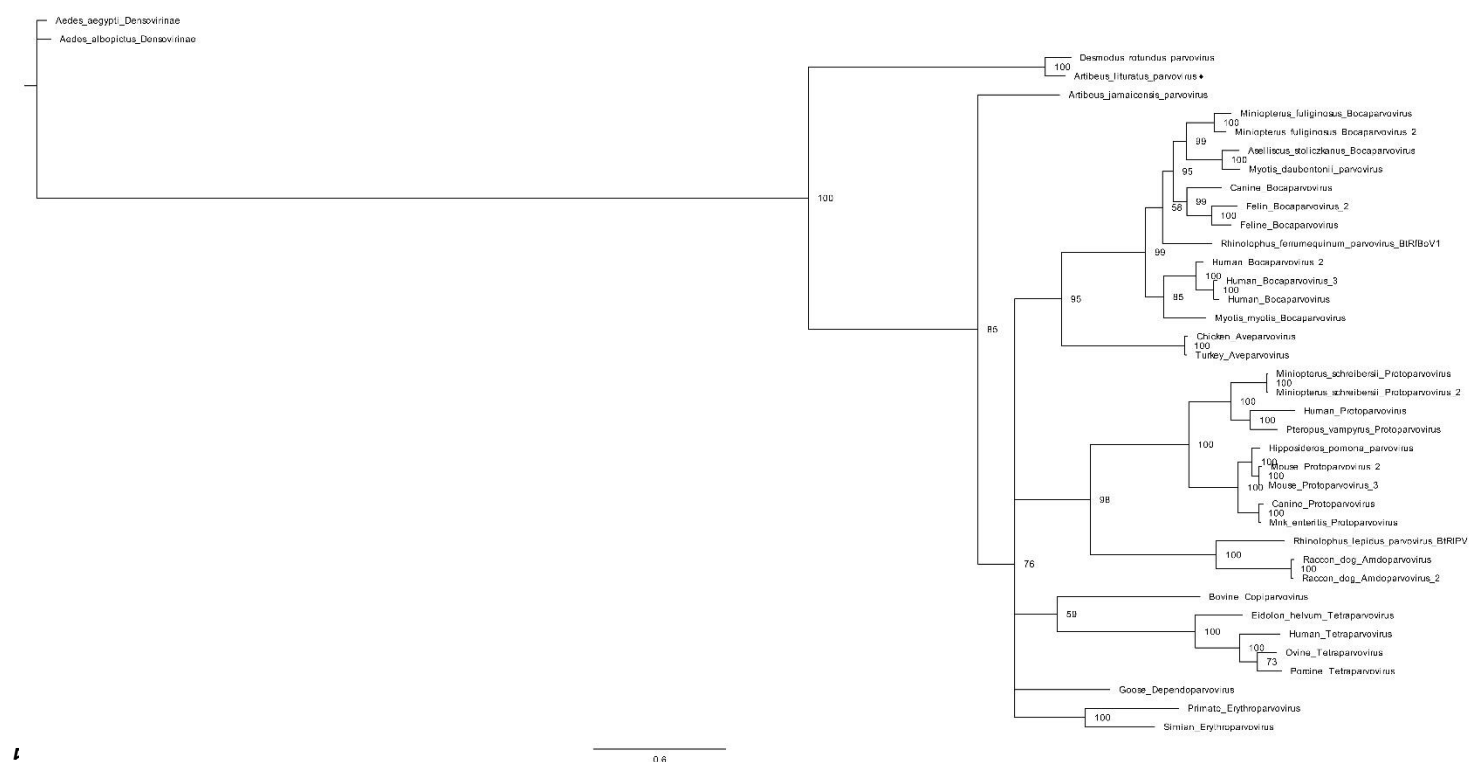
486

487 **Figure 3:** Phylogenetic tree of *A. lituratus papillomavirus*. Reconstructed
 488 tree based on the partial sequence of the *Papillomaviridae* L1 protein. The *A. lituratus*
 489 *papillomavirus* detected in this study is represented by ♦. Samples still unclassified are
 490 represented by ▲. Phylogenetic tree was constructed using Bayesian inference with
 491 LG substitution matrix and gamma distribution with a portion of invariables sites, as
 492 predicted by ProtTest. Generation number was 1.000.000 and 2 chains were used.



494

495 **Figure 4:** Phylogenetic tree of *A. lituratus parvovirus*. Reconstructed tree
 496 based on the partial sequence of the *Parvoviridae* NS1 protein. The *A. lituratus*
 497 *parvovirus* detected in this study is represented by ♦. *Aedes aegypti* and *Aedes*
 498 *albopictus*, *Densovirinae* subfamily were utilized as outgroups. Phylogenetic tree was
 499 constructed using Bayesian inference with RtREV substitution matrix and gamma
 500 distribution, as predicted by ProtTest. Generation number was 1.000.000 and 2 chains
 501 were used.



503

504 **Figure 5:** Phylogenetic tree of *A. lituratus parvovirus*. Reconstructed tree
 505 based on the partial sequence of the *Parvovirinae* subfamily capsid protein. The *A.*
 506 *lituratus parvovirus* detected in this study is represented by ♦. *Aedes aegypti* and
 507 *Aedes albopictus*, *Densovirinae* subfamily were utilized as outgroups. Phylogenetic
 508 tree was constructed using Bayesian inference with LG substitution matrix, gamma
 509 distribution and empirical amino acids frequency, as predicted by ProtTest. Generation
 510 number was 1.000.000 and 2 chains were used.

