

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

Tese de Doutorado

**Detecção e caracterização de vírus em morcegos-vampiros-de-asas-brancas
(*Diaemus youngi*) no Rio Grande do Sul, Brasil**

Autor: André Alberto Witt

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Wageck Canal

Porto Alegre, fevereiro de 2021.

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

**Detecção e caracterização de vírus em morcegos-vampiros-de-asas-brancas
(*Diaemus youngi*) no Rio Grande do Sul, Brasil**

Autor: André Alberto Witt Trabalho apresentado como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Veterinárias na área de Medicina Veterinária, subárea Medicina Veterinária Preventiva, especialidade Virologia. Orientador: Prof. Dr. Cláudio Wageck Canal.

PORTO ALEGRE, 2021.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

CIP - Catalogação na Publicação

Witt, André Aberto
Detecção e caracterização de vírus em
morcegos-vampiros-de-asas-brancas (*Diaemus youngi*) no
Rio Grande do Sul, Brasil / André Aberto Witt. --
2021.
68 f.
Orientador: Cláudio Wageck Canal.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre,
BR-RS, 2021.

1. vampire bats; . 2. virus; . 3. zoonoses; . 4.
Diaemus youngi. I. Canal, Cláudio Wageck, orient. II.
Título.

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

André Alberto Witt

DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE VÍRUS EM MORCEGOS-VAMPIROS-DE-ASAS-BRANCAS (*DIAEMUS YOUNGI*) NO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL

Aprovado em 25 FEV 2021

APROVADA POR:

Prof. Dr. Cláudio Wageck Canal
Orientador e Presidente da Comissão

Prof. Dr. Matheus Nunes Weber
Membro da Comissão

Prof. Dr. Samuel Paulo Cibulski
Membro da Comissão

Prof. Dr. Francisco Esmale de Sales
Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

A CAPES pelo apoio na realização deste trabalho.

Agradeço a oportunidade ao meu orientador Prof. Dr. Cláudio Wageck Canal pelo estímulo e parceria neste grande desafio. A Dra. Renata Budaszewski pela inestimável apoio na análise dos resultados e discussão do trabalho. A equipe do Laboratório de Virologia Veterinária da UFRGS pela parceria, apoio e coragem para processar e analisar as amostras de morcegos vampiros.

A minha esposa Patrícia Witt pela paciência e parceria nos momentos de ausência em ações de campo e de pesquisa em gabinete.

Agradeço a Secretaria Estadual da Agricultura, Pecuária e Desenvolvimento Rural, ao Sr. Nilton A. Rossato e, em especial, ao Coordenador do Programa da Raiva Sr. Wilson Hoffmeister Jr. pelo apoio e ajuda na coleta de exemplares em serviço de campo.

Agradeço a Dra. Lúcia Mardini, do Centro Estadual de Vigilância em Saúde, da Secretaria Estadual de Saúde do Rio Grand do Sul, pela parceria, confiança, apoio e incentivo na árdua missão de aliar serviço público às pesquisas com morcegos.

EPIGRAFE

“Era a Terra sem forma e vazia; trevas cobriam a face do abismo, e o Espírito de Deus se movia sobre a face das águas.”

Gênesis 1:2

RESUMO

Nas últimas décadas, inúmeras descobertas têm relacionado os quirópteros com doenças virais emergentes ao redor do mundo, como Ebola, Marburg, Hendra, Nipah, SARS (coronavírus) e MERS, por exemplo, ocasionado surtos e pandemias com perdas de milhares de vidas humanas e animais. Diante da biodiversidade observada entre os quirópteros, os morcegos hematófagos têm papel de destaque, visto a forte correlação entre o hábito alimentar ao alto risco da transmissão de patógenos. A raiva é sem dúvida a doença viral mais conhecida, entretanto outros vírus já foram encontrados nestes animais, o que pode representar uma ameaça à saúde pública e a sanidade animal. Neste estudo, buscamos conhecer a diversidade viral encontrada em *Diaemus youngi*, espécie rara de morcego especializada no sangue de aves e recentemente registrada no Rio Grande do Sul. Foram coletados seis indivíduos e colhidas amostradas de tecidos (pulmão, coração, rins, intestino) para análises laboratoriais utilizando sequenciamento de alto rendimento (HTS) na plataforma Illumina MiSeq. Foram encontradas sequências virais pertencentes às famílias *Anelloviridae*, *Genomoviridae*, *Smacoviridae* e *Paramyxoviridae*. Identificaram-se três genomas de vírus circulares completos e 10 quase completos intimamente relacionados a gemikrovírus (*Genomoviridae*), smacovírus (*Smacoviridae*) e 11 supostos novos vírus de torque teno (TTVs) (*Anelloviridae*). Dentro da família *Anelloviridae*, três sequências foram altamente divergentes e um novo gênero *Rhotorquevirus* foi proposto neste estudo. Este estudo buscou analisar o viroma de *Diaemus youngi*, contribuindo significativamente para a ampliação do conhecimento da espécie como reservatório de vírus importantes para saúde pública e sanidade animal.

Palavras-chave: morcegos vampiros; vírus; zoonoses; *Diaemus youngi*.

ABSTRACT

In the last few decades, numerous discoveries have linked chiropterans to emerging viral diseases around the world, such as Ebola, Marburg, Hendra, Nipah, SARS (coronavirus) and MERS, for example, causing outbreaks and pandemics with the loss of thousands of human lives and animals. In view of the biodiversity observed among chiropterans, hematophagous bats play an important role, given the strong correlation between eating habits and the high risk of pathogen transmission. Rabies is undoubtedly the most well-known viral disease, however other viruses have already been found in animals, which can pose a threat to public health and an animal health. In this study, we sought to know the viral diversity found in *Diaemus youngi*, a rare species of bat specialized in the blood of birds and recently registered in Rio Grande do Sul. Six aggregates were collected and sampled from tissues (lung, heart, kidneys, intestine) for laboratory analysis using high throughput sequencing (HTS) on the Illumina MiSeq platform. Viral sequences were found belonging to the families *Anelloviridae*, *Genomoviridae*, *Smacoviridae* and *Paramyxoviridae*. Three complete and 10 almost complete circular virus genomes were identified, closely related to gemikrovirus (*Genomoviridae*), smacovirus (*Smacoviridae*) and 11 supposed new teno torque viruses (TTVs) (*Anelloviridae*). Within the *Anelloviridae* family, three sequences were highly divergent and a new genus *Rhotorquevirus* was proposed in this study. This study sought to analyze the viroma of *Diaemus youngi*, contributing significantly to the expansion of knowledge of the species as a reservoir of viruses important for public health and animal health.

Key-words: vampire bats; virus; zoonoses; *Diaemus youngi*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1 Quirópteros e saúde pública	10
1.1.1 <i>Lyssaviridae</i>	12
1.1.2 <i>Paramyxoviridae</i>	14
1.1.3 <i>Filoviridae</i>	16
1.1.4 <i>Coronaviridae</i>	18
1.1.5 <i>Flaviviridae, Togaviridae e Orthomyxoviridae</i>	20
1.2 Doenças associadas aos morcegos hematófagos	20
1.3 Biologia e ecologia do morcego-vampiro-de-asas-brancas	24
<i>Dyaemus youngi</i>	
1.4 Risco a sanidade animal	27
2. OBJETIVOS	29
2.1 Objetivos específicos	29
2.2 Objetivos gerais	30
3. MATERIAIS E METODOS	30
3.1 Amostras biológicas	30
3.2 Metagenômica e HTS	31
3.3 Análise bioinformática	31
3.4 Detecção de paramyxovírus e coronavírus por RT-PCR	32
4. RESULTADOS	33
4.1 Visão geral	33
4.2 <i>Anelloviridae</i>	35
4.3 <i>Genomoviridae</i>	39
4.4 <i>Paramyxoviridae</i>	42
4.5 <i>Smacoviridae</i>	45
5. DISCUSSÃO	51
6. CONCLUSÕES	54
REFERÊNCIAS	55
APÊNDICE A	68

1. INTRODUÇÃO

1.1 Quirópteros e saúde pública

A ordem Chiroptera é a segunda maior ordem dentre os mamíferos, com 1.232 espécies descritas, perdendo em biodiversidade apenas para os roedores. É subdividida em duas subordens: Yinpterochiroptera e Yangochiroptera (SCHIPPER *et al.*, 2008), mas estudos moleculares recentes mostram divergências e apresentam novas propostas de classificação (TSAGKOGEOGA *et al.*, 2013). Morcegos tem ampla distribuição geográfica, ocorrendo em todos os continentes, exceto regiões muito frias, como os pólos, por exemplo.

Morcegos são animais muito importantes no equilíbrio dos ecossistemas, onde desempenham diferentes papéis que trazem importantes benefícios às atividades humanas, tais como: polinização de plantas, controle de insetos considerados pragas, recuperação de áreas degradadas, entre outros (BOYLES *et al.*, 2011; KUNZ *et al.*, 2011). Apresentam também relevante potencial zoonótico, podendo carrear diversos organismos patogênicos, tais como: bactérias, vírus, fungos e protozoários (KUZMIN *et al.*, 2010; RUPPRECHT *et al.*, 2011; QUAN *et al.*, 2013; HAYMAN, 2016).

A história natural dos quirópteros demonstra características únicas que podem explicar a associação com patógenos: diversidade de espécies, longo tempo de vida, capacidade de dispersão a longas distâncias (migração) (CONSTANTINE, 2003), agregação de indivíduos (tamanho das colônias), comportamento social e estrutura populacional, comportamento de torpor ou hibernação, além da imunologia e estrutura espacial da população (CALISHER *et al.*, 2006; STREICKER *et al.*, 2010; MORATELLI; CALISHER, 2015; RUPPRECHT *et al.*, 2017).

A capacidade de dispersão destes animais é um dos fatores mais impressionantes, aliados ao fato de que algumas das espécies são sintrópicas, favorecendo uma aproximação indesejada entre humanos e animais silvestres e o risco de um evento de *spillover* de agentes patogênicos. Neste sentido o morceguinho-das-casas *Tadarida brasiliensis* apresenta-se como uma espécie que deve ser monitorada ao longo de sua área de distribuição no Brasil, pois suas colônias apresentam milhares de indivíduos e, o sinal de alerta é que comumente são encontrados indivíduos positivos para vírus da raiva. Neste sentido, alguns pesquisadores no Rio Grande do Sul tem se dedicado a estudar a presença de vírus nesta espécie, tendo encontrado as seguintes famílias virais associadas: *Polyomaviridae*, *Circoviridae*, *Genomoviridae*, *Herpesviridae*, *Paramyxoviridae*, *Coronaviridae* e *Astroviridae* (CIBULSKI *et al.*,

2014, 2020; DE SALES LIMA *et al.*, 2015). Estes estudos demonstrando a importância do monitoramento desta espécie de modo a manter uma vigilância epidemiológica de doenças importantes como a raiva e síndromes respiratórias graves.

Comparativamente a outros mamíferos, roedores e os morcegos são os mais importantes reservatórios de doenças virais, sendo portadores de 53 e 40 vírus zoonóticos, respectivamente (NIETO-RABIELA *et al.*, 2019). Ao longo dos últimos anos mais de 200 espécies de vírus foram descobertas em morcegos, contudo poucas se destacam como patogênicas ao homem e aos animais domésticos (MORATELLI; CALISHER, 2015). Apesar disto, é notório que este grupo animal apresenta maior frequência e capacidade de dispersão viral, sendo considerados mais eficientes na transmissão de zoonoses (LUIS *et al.*, 2013; GUY *et al.*, 2019; NIETO-RABIELA *et al.*, 2019).

Nos últimos anos estudos revelaram novos patógenos associados aos quirópteros, alertando autoridades de saúde pública para o aumento do risco de surgimento de surtos de doenças e até mesmo para uma pandemia (FISCHER *et al.*, 2016; ANTHONY *et al.*, 2017; BANERJEE *et al.*, 2019; WANG; ANDERSON, 2019).

Atualmente, entre as 11.565 variantes virais encontradas em morcegos, destacam-se as que pertencem as famílias *Coronaviridae* (38,63%), *Rhabdoviridae* (23,97%), *Paramyxoviridae* (8,92%) e *Astroviridae* (6,6%), sendo que a maioria é associada aos quirópteros das famílias *Vespertilionidae* (38,12%), *Rhinolophidae* (27,73%) e *Pteropodidae* (26,04%), conforme dados do DBatVir em novembro de 2020 (<http://www.mgc.ac.cn/DBatVir/>).

Doenças emergentes têm como sua origem, em mais de 70% dos casos a vida silvestre (JONES *et al.*, 2008) que, eventualmente, resultam em surtos e pandemias ao redor do mundo, sendo indispensável o conhecimento das espécies envolvidas, bem como de seus reservatórios e vetores, de modo a facilitar a elaboração de estratégias de controle e mitigação dos impactos saúde pública e animal (GUY *et al.*, 2019; LLANOS-SOTO; GONZÁLEZ-ACUÑA, 2019).

Nas últimas décadas, o papel dos quirópteros frente às zoonoses ganhou maior atenção e interesse após o surgimento de surtos de doenças virais altamente contagiosas e mortais ocasionados pelos vírus RNA das famílias *Lyssaviridae*, *Paramyxoviridae* (Ebola - EBOV, Marburg), *Filoviridae* (Hendra - HeV e Nipah - NiV), *Coronaviridae* (SARS CoV), que causaram a morte de centenas a milhares de pessoas nos continentes africano, asiático e australiano (CALISHER *et al.*, 2006; SMITH; WANG, 2013a). Nos

últimos anos, entretanto, novas pesquisas têm demonstrado que estes animais também são reservatórios de vírus das famílias *Flaviviridae*, *Togaviridae* e *Orthomyxoviridae*.

Deste modo, passaremos a relatar a seguir sobre os vírus de grande importância para a saúde humana e saúde animal que tem como origem vetores e/ou reservatórios quirópteros ao redor do mundo.

1.1.1 *Lyssaviridae*

A raiva foi a primeira doença viral diagnosticada e associada aos morcegos desde a década de 50, caracterizado pelo vírus da raiva (RABV) que causa encefalite viral aguda em mamíferos que ocasiona o óbito do hospedeiro (RUPPRECHT *et al.*, 2011).

O vírus da raiva (RABV) é sem dúvida aquele que causa o maior número de casos da doença no mundo, devido ao seu modo de propagação e transmissão por mordeduras e arranhaduras de mamíferos infectados (FOOKS *et al.*, 2017). Atualmente, nas Américas, inúmeras linhagens têm sido associadas em morcegos dos gêneros de *Desmodus*, *Artibeus*, *Glossophaga*, *Tadarida*, *Nyctinomops*, *Molossus*, *Myotis*, *Eptesicus*, *Histiotus* e *Lasiurus* (CISTERNA *et al.*, 2005; HUGHES *et al.*, 2005; KOBAYASHI *et al.*, 2007; ALLENDORF *et al.*, 2012; YUNG *et al.*, 2012; RUPPRECHT *et al.*, 2017).

No Brasil a raiva ainda é uma doença extremamente importante para saúde pública e que tem apresentado mudanças no perfil epidemiológico ao longo dos últimos anos. Até 2004, o cão era considerado o principal reservatório e agente propagador da doença, mas frente as grandes campanhas de vacinação, melhorias na produção de vacinas, entre outros fatores, a raiva por variantes caninas foram praticamente eliminadas do país, resultado que variantes de morcegos passaram a ter maior valor.

Analisando a série histórica da doença em humanos constatou-se que entre 200 a 2008 dos 161 casos 45,9% foram provocadas por morcegos hematófagos *Desmodus rotundus*; já entre os anos de 2004 a 2005 foram 85% (n=63) e, entre 2009 a 2017 dos 27 casos humanos, 29,6% foram ocasionados por morcegos (OLIVEIRA *et al.*, 2020).

Nas áreas urbanas outras espécies também representam um risco a doença, visto que estão presentes em todas as cidades e, por vezes, em colônias de milhares de indivíduos, como é o caso de *Tadarida brasiliensis* (Molossidae). Em sua grande maioria são espécies insetívoras e frugívoras que buscam nas áreas urbanas abrigo e eventual alimento, todas muito comuns e com ampla distribuição geográfica pelas

Américas. Dentre estas espécies alguns gêneros destacam-se por apresentar espécies sinantrópicas, tais como: *Myotis*, *Eptesicus*, *Histiotus*, *Molossus*, *Nyctinomops*, *Glossophaga* e *Artibeus* (SODRÉ *et al.*, 2010).

Após décadas, por meio da biologia molecular foi possível classificar 16 espécies de lyssavírus no mundo, divididas em três filogrupos, entre os quais 14 são exclusivas de morcegos (FOOKS *et al.*, 2017; SHIPLEY *et al.*, 2019)(Fig. 01). Os Lyssavirus têm sido encontrados nos continentes africano, asiático, europeu e americano, infectando inúmeras espécies de morcegos insetívoros, frugívoros e hematófagos (BANYARD *et al.*, 2014).

A grande maioria dos lyssavírus são correlacionados aos morcegos das famílias Vespertilionidae e Pteropodidae, de hábitos alimentares insetívoros e frugívoros, em espécies de ampla distribuição geográfica e que realizam movimentos migratórios entre países e até entre continentes próximos (NADIN-DAVES, 2020). No continente asiático são conhecidas até o momento quatro diferentes tipos de lyssavirus: Aravan lyssavirus - ARAV, Irkut lyssavirus - IRKV, Khujand lyssavirus

KHUV, Gannaruwa bat lyssavirus – GBLV, Taiwan bat lyssavirus – TWBLV; no continente australiano apenas uma é apontada Australian bat lyssavirus – ABLV; na Europa já são seis os genótipos conhecidos: Bokeloh lyssavirus – BBLV, European bat lyssaviruses, type 1 and type 2, Lleida bat lyssavirus - LLBV, West Caucasian bat lyssavirus – WCBD; já na África são conhecidos até o momento quatro lyssavirus: Duvenhage lyssavirus - DUVV, Lagos bat lyssavirus – LBV, Shimoni bat lyssavirus - SHIBV, Mokola lyssavirus - MOKV, Ikoma lyssavirus IKOV. Na Ásia, os vírus IRKV foram encontrados em morcegos *Murina leucogaster* (Vespertilionidae); já o vírus e TWBLV em *Pipistrellus abramus* (Vespertilionidae). Na Europa, o vírus **EBLV-1** é já foi encontrado em *Eptesicus serotinus* (Vespertilionidae) em 97% dos casos, enquanto *E. isabellinus* e *E. serotinus* em pequena porcentagem; já o vírus **EBLV2** tem sido isolado em *Myotis daubentonii* e *M. dasycneme* (Vespertilionidae); **BBLV** tem como reservatório *Myotis nattererii* e *Pipistrellus pipistrellus* (Vespertilionidae); **LLBV** e **WCBV** têm sido isolados de *Miniopterus schreibersii* (Miniopteridae). Na África, o vírus **DUVV** foi isolado em *Miniopterus natalensis* (Miniopteridae) e *Nycteris thebaica* (Nycteridae); o vírus **LBV** já foi isolado nas seguintes espécies: *Eidolon helvum* (Pteropodidae), *Nycteris gambiensis* (Nycteridae), *Epomorphus wahlbergi* (Pteropodidae), *Eidolon dupreanum* (Pteropodidae), *Rousettus aegyptiacus* (Pteropodidae); já o vírus SHIBV foi isolado principalmente em *Hipposideros*

commersoni (Hipposideridae). Na Austrália o vírus ABLV tem sido associado a dois biótipos principais, sendo um biótipo associado a morcegos do gênero *Pteropus* (família Pteropodidae) e outro biótipo a *Saccolaimus flaviventris* (família Emballonuridae).

Os outros dois Mokola lyssavirus (MOKV) e Ikoma lyssavirus (IKOV) tiveram como origens outras espécies de mamíferos. O vírus MOKV foi isolado de algumas espécies de roedores (KGALADI *et al.*, 2013; MARKOTTER; COERTSE, 2018), enquanto o vírus IKOV foi isolado apenas de civeta africana (*Civetticus civetticus*) (MARSTON *et al.*, 2012).

1.1.2 *Paramyxoviridae*

De acordo com Drexler *et al.* (2012) morcegos são os maiores reservatórios de vírus da família Paramyxoviridae no mundo. Em 2011, 66 novos paramyxovírus foram descobertos ao redor do mundo associados a 28 espécies de quirópteros pertencentes as famílias Pteropodidae, Phyllostomidae, Vespertilionidae, Hipposideridae e Emballonuridae (DREXLER *et al.*, 2012). Na região Neotropical, em especial *Carollia perspicillata* (Phyllostomidae) e *Pteropus nattereri* (Mormoopidae), apresentaram sequências virais filogeneticamente próximas a Henipavirus. Nas Américas outras espécies foram encontradas com paramyxovírus, a saber: *Carollia brevicauda*, *Phyllostomus discolor*, *Artibeus jamaicensis*, *Phyllostomus hastatus*, todas pertencentes a família Phyllostomidae, porém alguns dados não foram publicados (DREXLER *et al.*, 2012; DBatVir, 2021).

A família Paramyxoviridae é dividida em quatro subfamílias: Avulavirinae, Metaparamyxovirinae, Orthoparamyxovirinae e Rubulavirinae, enquanto os orthoparamyxovírus estão distribuídos em oito gêneros, a saber: Aquaparamyxovirus, Ferlavirus, Henipavirus, Jeilongvirus, Morbilivirus, Narmovirus, Respirovirus e Salemvirus (International Committee on Taxonomy of Viruses, 2021). No gênero Henipavirus duas espécies merecem destaque pelos surtos e mortes de animais e humanos há algumas décadas, Hendra e Nipah vírus.

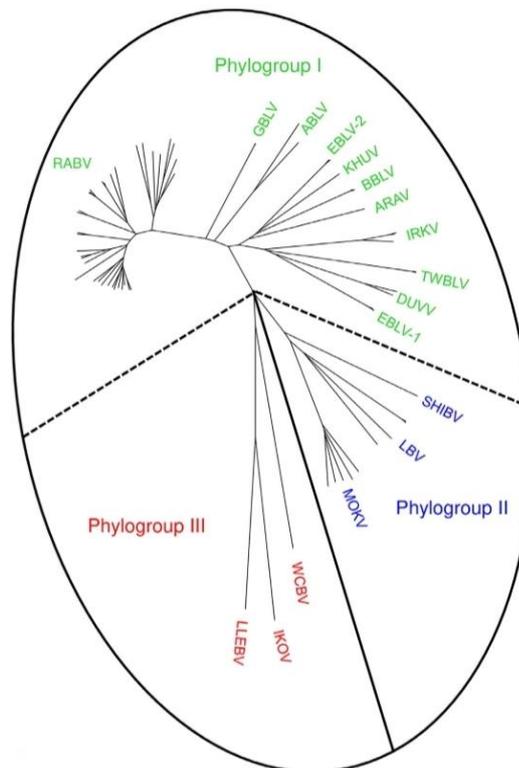
O vírus Nipah (NiP) foi descrito pela primeira vez em 1998, durante um surto da doença em porcos e humanos na Indonésia. Neste surto mais de 1 milhão de porcos foram mortos para conter a doença e 265 casos humanos foram reportados, onde 105 foram fatais (CHUA *et al.*, 2000). Posteriormente outros países (Austrália, Bangladesh, Cambodia, China, Índia, Indonésia, Madagascar, Malásia, Papua Nova Guiné, Filipinas,

Singapura e Tailândia) têm reportado surtos, enquanto outros são considerados como de risco diante das evidências sorológicas ou moleculares detectadas em morcegos do gênero *Pteropus*.

Estudos realizados em Ghana, Austrália, Bangladesh, China, Índia, Tailândia, Cambodia, Indonésia e Malásia apontam *P. lylei*, *P. giganteus* e *P. hypomelanus* como os principais reservatórios do vírus Nipah (DREXLER *et al.*, 2009; SMITH *et al.*, 2011; WACHARAPLUESADEE *et al.*, 2016; OLIVAL *et al.*, 2020).

O vírus Hendra (HeV) foi descrito pela primeira vez em setembro de 1994, quando surgiu um surto de uma síndrome respiratória grave em cavalos no subúrbio de Brisbane em Hendra, Austrália (SELVEY *et al.*, 1995). Neste surto 20 cavalos e dois humanos foram infectados, com uma morte humana e 13 animais fatais. Graves surtos de doenças continuam a ser registrados desde então em inúmeros países na Ásia e Austrália onde se distribuem morcegos da família *Pteropus* (Fig. 2). Atualmente existem estudos científicos que apontam como principais reservatórios deste vírus são os quirópteros *Pteropus conspicillatus* e *Pteropus alecto* (Pteropodidae)(SMITH *et al.*, 2011; YUAN *et al.*, 2014).

Figura 1 - Relações filogenéticas de lyssavirus.



Fonte: Nadin-Daves (2020).

1.1.3 *Filoviridae*

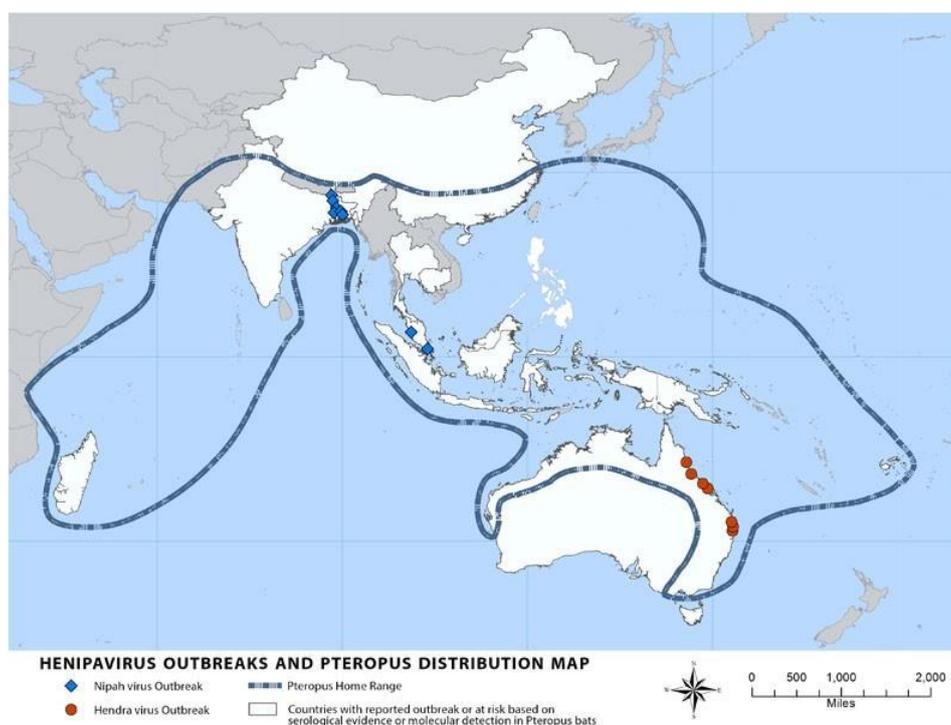
A família Filoviridae está distribuída em seis gêneros (*Cuevavirus*, *Dianlovirus*, *Ebolavirus*, *Marburgvirus*, *Striavirus* e *Thamnovirus*) e 11 espécies e causam hemorragias severas febris em humanos e primatas não-humanos, principalmente dos gêneros Ebola e Marburg.

Até o momento, 12 tipos distintos de filovirus foram descritos (KUHNS *et al.*, 2019). Destes sete filovírus tem sido encontrados em humanos pertencem ao gênero *Ebolavirus* (Bundibugyo virus (BDBV), Ebola vírus (EBOV), Reston vírus (RESTV), Sudan vírus (SUDV) e Taï Forest vírus (TAFV); já gênero *Marburgvirus* apresenta dois tipos virais (Marburg vírus (MARV) e Ravn vírus (RAVV).

Desde a descoberta dos filovirus em 1967, 43 surtos têm sido reportados originários ou exportados da África e são caracterizados pela alta taxa de mortalidade que pode chegar a mais de 80% dos casos (JACOB *et al.*, 2020; CDC, 2021)(Figura 3).

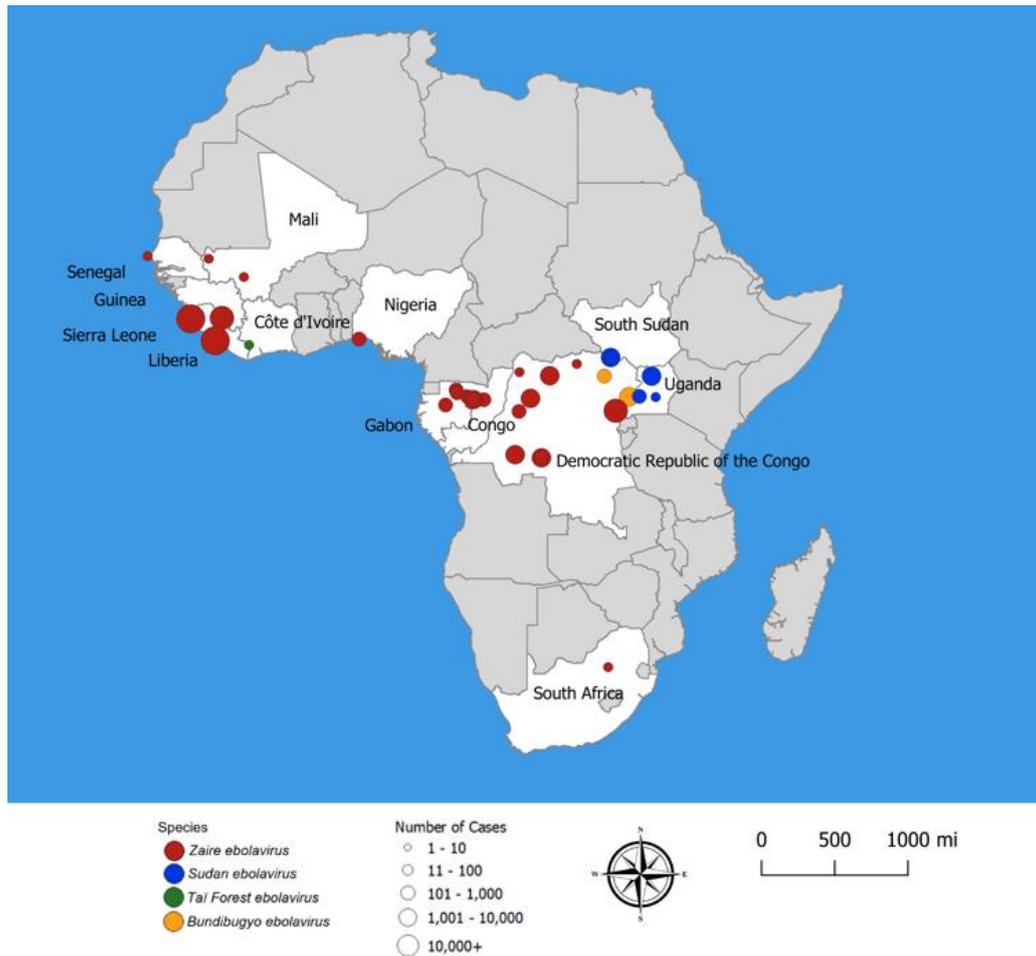
São conhecidas atualmente 130 linhagens virais de filovírus encontradas em morcegos das famílias *Molossidae*, *Vespertilionidae* e *Pteropodidae*, segundo dados obtidos no DBatVir em janeiro de 2021.

Figura 2 - Surtos ocasionados pelos vírus Nipah e Hendra e área de distribuição geográfica de morcegos da família Pteropodidae.



Fonte: CDC (2021) (<https://www.cdc.gov/vhf/hendra/outbreaks/distribution-map.html>).

Figura 3 - Surtos de Ebola registrados em países africanos e número de casos observados por tipo viral.



Fonte (CDC, 2021).

O gênero Marburgvírus apresenta uma única espécie e dois tipos virais Marburg virus (MARV) e Ravn virus (RAVV) ambas patógenos altamente letais para humanos na África (KUHNS *et al.*, 2019). Surtos de Marburg têm sido registrados principalmente em países africanos (Fig. 4), entretanto alguns acidentes também ocorreram em laboratórios europeus devido a contaminação acidental em laboratórios na Alemanha, Sérvia e Rússia.

Desde 1999 a 2019, diferentes linhagens de filovírus têm sido encontradas nos países República Democrática do Congo, Gabão, Congo, Uganda, Kenya, África do Sul, Sierra Leona e Zambia, sendo associadas aos quirópteros *Rousettus aegyptiacus*, *Rousettus leishenaultii*, *Eonycteris spelaea* (Pteropodidae), *Mops condylurus* (Molossidae) *Chaerophon pumilus* (Molossidae), *Hipposideros caffer* (Rhinolophidae), *Miniopterus inflatus*, *Miniopterus schreibersii* (Vespertilionidae), *Rhinolophus eloquens*

(Rhinolophidae) (SWANEPOEL *et al.* 2007; TOWNER *et al.* 2007, 2009; KUZMIN *et al.* 2010; KAJIHARA *et al.* 2019; AMMAN *et al.* 2020; PAWEŃSKA *et al.* 2020 LEROY *et al.* 2005; GOLDSTEIN *et al.* 2018; FORBES *et al.* 2019; KARAN *et al.* 2019).

Figura 4 - Surtos de Marburg em países africanos e europeus por ano.



Fonte CDC (2021).

1.1.4 *Coronaviridae*

A família Coronaviridae é uma das maiores entre a ordem Nidovirales, consistindo em duas subfamílias, Letovirinae e Orthocoronavirinae. Na subfamília Orthocoronavirinae encontramos quatro gêneros: alphacoronavírus, betacoronavírus, gammacoronavírus e deltacoronavírus. Alphacoronavirus e betacoronavirus são

encontramos em mamíferos, enquanto gammacoronavírus e deltacoronavírus são primariamente encontrados em aves (WOO *et al.*, 2010).

Desde o surgimento do surto causado por um coronavírus em 2002 na província de Guangdong (China), denominada Severa Síndrome Respiratória Aguda (SARS-CoV), outros surtos têm ocorrido ao longo dos anos, surpreendendo especialistas e gerando preocupações internacionais para o risco de uma verdadeira pandemia (CUI *et al.*, 2019).

Posteriormente, outro coronavírus extremamente patogênico surgiu na Arábia Saudita dez anos após o primeiro surto de SARS-CoV, denominado Síndrome Respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV). No total foram detectados 2.260 casos em 27 países, resultando em 803 casos fatais de MERS-CoV.

Atualmente quatro coronavírus tem sido reconhecidos como causadores da doença em humanos, HCoV-OC43, HCoV-NL63, HCoV-HKU1 e HCoV-229E, e dois coronavírus emergentes, SARS-CoV and MERS-CoV, que causam graves síndromes respiratórias (LIM *et al.*, 2016).

Entre 2003 a 2018 trezentos e trinta e nove genomas SARSr-CoV foram sequenciados no mundo, incluindo 274 genomas de humanos, 18 de civetas e 47 de morcegos (LUK *et al.* 2020). Desde sua primeira descoberta em morcegos-ferradura chineses em 2004 (LAU *et al.*, 2005), SARSr-CoVs foram continuamente encontrados em várias espécie de morcego-ferradura nos últimos 13 anos em contraste com o caso de civetas e humanos, onde SARSr-CoVs foram encontrados apenas em 2003/2004, e nunca relatado depois (LUK *et al.*, 2019).

Estudos moleculares apontam que morcegos do gênero *Rhinolophus* (família *Rhinolophidae*) são os reservatórios naturais dos coronavirus semelhantes geneticamente aos que infectaram animais e humanos. Após a descoberta e suspeita que os morcegos pudessem ser reservatórios naturais, outros coronavirus foram descobertos em estudos investigativos na China, África, Europa e Ásia com diferentes níveis de similaridade (LAU *et al.*, 2005; LI *et al.*, 2005; DREXLER *et al.*, 2010; LUK *et al.*, 2019).

Em 2019, um grave surto de coronavírus surgiu na China e teve como origem uma cepa semelhante às encontradas em morcegos *Rhinolophus affinis* (Rhinolophidae)(ZHOU *et al.*, 2020). Infelizmente, o surto transformou-se em pandemia, que até 27 de janeiro de 2021 já causou mais 98,2 milhões de casos e

resultou em 2,1 milhões de mortes em todos os continentes (SALATA *et al.*, 2019; WONG *et al.*, 2019; BENVENUTO *et al.*, 2020; ZHOU *et al.*, 2020; WHO, 2021).

1.1.5 Flaviviridae, Togaviridae e Orthomyxoviridae

Pesquisas realizadas recentemente revelaram a presença de importantes vírus em morcegos da região neotropical, destacando-se vírus Influenza A, Encefalite Venezuelana Equina, Zika vírus e Dengue associados aos morcegos da família Phyllostomidae, em especial aos gêneros *Artibeus*, *Sturnira*, *Glossophaga*, *Anoura*, *Carollia* e *Desmodus* (DBatVir, 2021). Em sua grande maioria são espécies comuns, de hábitos alimentares frugívoros, polívoros/nectarívoros e hematófagos, todas com ampla distribuição geográfica nas Américas. São morcegos dependentes de recursos florestais, podendo chegar às áreas periurbanas e urbanas em busca de refúgio e, eventualmente, de recursos alimentares fornecidos pela arborização urbana, promovendo assim uma aproximação indesejada com a população humana.

1.2 Doenças virais associadas aos morcegos hematófagos

Historicamente, a raiva é a zoonose mais comum associada aos morcegos no mundo, doença fatal ocasionada por vírus do gênero *Lyssavirus* é responsável por perdas significativas na produção pecuária e também de vidas humanas (FISHER; STREICKER; SCHNELL, 2018). Doença conhecida desde a antiguidade, a raiva dos herbívoros foi associada aos morcegos hematófagos somente em 1911 quando Carini instigou surtos da doença no estado de Santa Catarina. Posteriormente, Pawan (1936) descreveu os primeiros casos de raiva humana transmitida por morcegos na Ilha de Trinidad, entretanto somente em 1953, na Flórida, Estados Unidos, houve relato de uma criança com a doença transmitida por morcego insetívoro (KOTAIT, 1996). Desde então, os morcegos receberam atenção especial e tornaram-se alvo de inúmeras pesquisas no mundo em busca de patógenos causadores de doenças humanas e animais.

No século XXI, a raiva ainda preocupa as autoridades de saúde pública e pesquisadores da vida selvagem nas Américas, apesar de ter sido controlada em cães, o principal transmissor da raiva humana, o vírus persiste nas populações de animais selvagens, principalmente morcegos. No Brasil, além das espécies hematófagas, 37

outras espécies de diferentes hábitos alimentares já foram detectadas com o vírus rábico (RABV) (SODRÉ *et al.*, 2010).

Acidentes com morcegos podem ser considerados raros, visto serem animais noturnos e pouco agressivos, quando ocorrem são em decorrência da captura inadvertida realizadas por pessoas leigas e com as mãos desprotegidas. A maioria das mordeduras ocorre quando o animal se sente ameaçado, ou seja, são defensivas. Contudo, o potencial de transmissão de doenças ocasionada pela mordedura de morcegos hematófagos aumenta na medida em que os seres humanos vivem em condições de moradia precárias e áreas de floresta, visto o grande risco de se tornarem presas fáceis em áreas endêmicas.

Na América Latina, o morcego-vampiro-comum (*D. rotundus*) é considerado como o principal vetor da raiva em herbívoros, sendo endêmica no Brasil (FAHL *et al.*, 2015). É a espécie de maior relevância na transmissão do vírus da raiva em herbívoros, causando prejuízos significativos à cadeia de produção pecuária no Brasil e também no Rio Grande do Sul (TEIXEIRA *et al.*, 2008), sendo passível o controle populacional por órgãos da Secretaria de Agricultura dos Estados, conforme Instrução Normativa IBAMA nº141/2006 e Instrução Normativa nº05/2002 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

Nas regiões norte e nordeste do país são frequentes os ataques desta espécie aos seres humanos, visto à facilidade de acesso as vítimas (DANTAS-TORRES, 2008). Em 2004 e 2005, dois surtos de raiva ocorreram nos estados do Pará e Maranhão por ataque de *D. rotundus*, causando a morte de dezenas de pessoas (WADA; ROCHA; MAIA-ELKHOURY, 2011). Além disto, já existem relatos de ocorrências de mordeduras em humanos por esta espécie em áreas urbanas no Brasil, como foi observado e relatado no Rio de Janeiro, em plena área urbana (BERNARDES FILHO *et al.* 2014). Este fato tem sido observado também em outras capitais brasileiras, como São Paulo e Salvador, por exemplo (Silene Manrique Rocha, *com. pess*).

Apesar de não haver relatos frequentes sobre o ataque de outras espécies de morcegos hematófagos a seres humanos, recentemente, no nordeste brasileiro, constatou-se através de análises moleculares a ingestão de sangue humano por *D. ecaudata*, o que traz surpresa a comunidade científica, pois não havia relatos deste tipo de hábito para a espécie (ITO; BERNARD; TORRES, 2016).

O maior número pesquisas na busca de descobertas de patógenos, sem dúvida, direcionadas a *D. rotundus*, visto a facilidade de acesso a amostras desta espécie cedidas

pelo Programa Nacional de Controle da Raiva dos Herbívoros, a qual é responsável pelo controle das populações deste quiróptero, a fim de mitigar surtos de raiva em herbívoros em todo país. Assim sendo, muitas amostras enviados ao laboratório para exames de raiva também são aproveitadas em investigações paralelas, visando encontrar outros tipos de vírus, ou seja, não há sistematização de investigações sobre o papel da espécie como reservatório de doenças virais importantes para sanidade animal no país.

O conhecimento atual sobre vírus associados a *D. rotundus* aponta a presença das seguintes famílias: *Hantaviridae*, *Paramyxoviridae*, *Coronaviridae*, *Flaviridae*, *Polyomaviridae*, *Adenoviridae*, *Circoviridae*, *Parvoviridae*, *Herpesviridae* e *Rhabdoviridae* (BRANDÃO *et al.*, 2008; CASTILHO *et al.*, 2010; DREXLER *et al.*, 2012; FAGROUCH *et al.*, 2012; GUARINO *et al.*, 2013; LIMA *et al.*, 2013; QUAN *et al.*, 2013; TORRES *et al.*, 2014; ESCALERA-ZAMUDIO *et al.*, 2015; ASANO *et al.*, 2016; WRAY *et al.*, 2016; SALMIER *et al.*, 2017; SOUZA *et al.*, 2017, 2018; DE SOUZA *et al.*, 2018; JR *et al.*, 2018; SABINO-SANTOS *et al.*, 2018; FRANCO FILHO *et al.*, 2019; BERGNER *et al.*, 2020; ALMEIDA *et al.*, 2020).

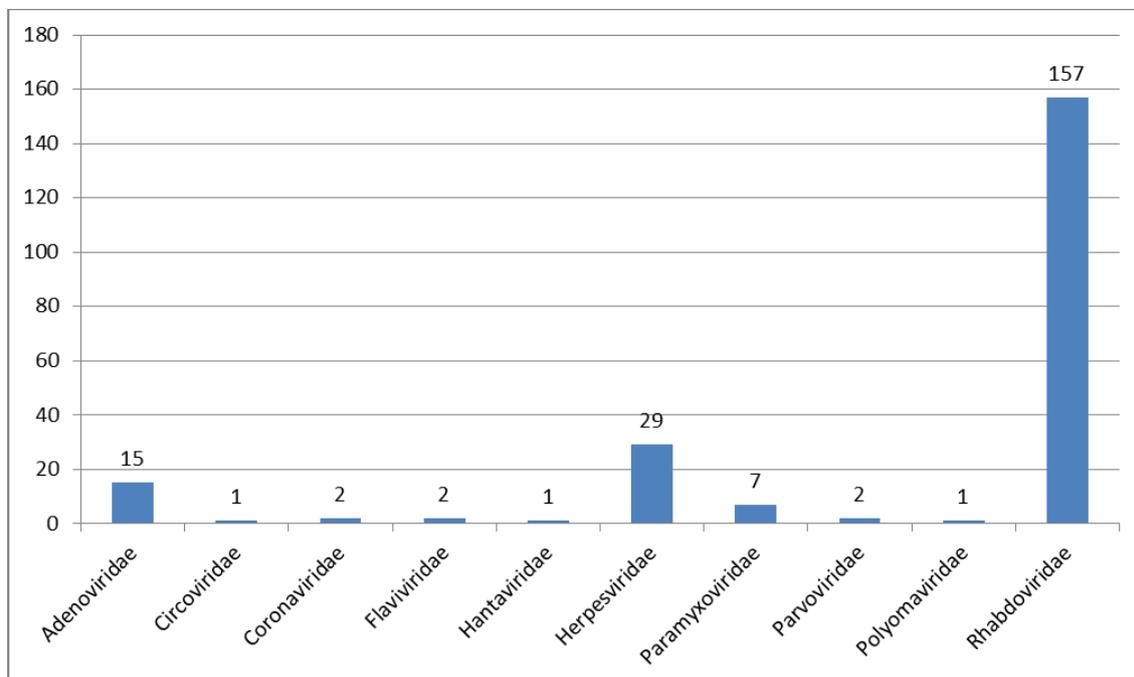
Conforme dados obtidos no DBatVir em janeiro de 2021, são conhecidas 222 genótipos virais distribuídos em dez famílias virais encontrados em *D. rotundus*, prevalecendo as famílias *Rhabdoviridae*, *Herpesviridae*, *Adenoviridae* e *Paramyxoviridae* (Gráfico 1).

Estudos científicos que visem a presença de vírus em morcegos hematófagos *D. ecaudata* são raros, apontando associação de vírus das famílias *Hantaviridae*, *Herpesviridae* e *Rhabdoviridae* (CASTILHO *et al.*, 2010; ARAUJO *et al.*, 2012; ESCALERA-ZAMUDIO *et al.*, 2016, 2018)

Em 2020, o único estudo conhecido para *D. youngi* um estudo sobre associações de herpesvírus em morcegos encontrou três genótipos de vírus desta família (JAMES *et al.*, 2020), contudo não existem outros trabalhos sobre a espécie.

Diante do cenário de mudanças climáticas que estão ocorrendo no mundo, espera-se um aumento e/ou desencadeamento de novas doenças, tendo em vista que espécies que são reservatórios e/ou vetores possam ser beneficiadas pelas alterações no meio ambiente (LAFFERTY, 2009; ALTIZER *et al.*, 2013; SHORT *et al.*, 2017). Estudos apontam que os morcegos hematófagos, importantes atores na disseminação do vírus da raiva, deverão ter suas áreas de vida ampliadas devido as mudanças climáticas, trazendo o temor de prejuízos a saúde pública e a produção animal (LEE *et al.* 2012; ZARZA *et al.* 2017; HAYES; PIAGGIO, 2018).

Gráfico 1 - Número de genótipos virais encontrados no morcego-vampiro-comum (*D. rotundus*), conforme dados do DBatVir em janeiro de 2021.



Fonte : DBatVir (<http://www.mgc.ac.cn/DBatVir>)

Além disto, outras doenças introduzidas por espécies exóticas invasoras também pode influenciar e amplificar o rol de doenças transmitidas por morcegos hematófagos no Rio Grande do Sul, visto que são conhecidos portadores de zoonoses (HUBÁLEK *et al.*, 1993; NAVARRO-GONZALEZ *et al.*, 2014; BAROCH *et al.*, 2015; LARSKA *et al.*, 2015; MONTAGNARO *et al.*, 2015; CANDELA *et al.*, 2017; RUIZ-FONS, 2017; JAENSON *et al.*, 2018; LAMA; BACHOON, 2018; FREDRIKSSON-AHOMAA, 2019; SANTORO *et al.*, 2019). Conforme Portaria SEMA n° 79 de 31 de outubro de 2013, destacamos alguns mamíferos que podem exercer este papel, como é o caso do chital (*Axis axis*), do gamo (*Dama dama*), das cabras-montesas (*Capra pyrenaica*; *Capra walie*) e do javali (*Sus scrofa scrofa*), que são presas conhecidas e/ou potenciais para os morcegos vampiros (GALETTI *et al.*, 2016).

A expansão geográfica de *D. rotundus* já é aguardada nos Estados Unidos desde 2018, quando haviam notícias que a espécie estava próxima a 50 km da fronteira com o Texas, representando um temor e prejuízo a pecuária daquele país (HAYES; PIAGGIO, 2018).

No Uruguai a espécie (*D. rotundus*) era considerada como rara, mas em 2007 um grande surto de raiva em herbívoros mobilizou e induziu as autoridades sanitárias locais a investigar e descobrir inúmeros sítios e abrigos de *D. rotundus* no país, sugerindo um expansão geográfica recente da espécie naquele território (BOTTO NUÑEZ; BECKER; PLOWRIGHT, 2019).

Recentemente, um estudo realizado no sul do Brasil também apontou a expansão geográfica de outra espécie de morcego hematófaga, *Diaemus youngi*. O último registro desta espécie no país era para o Paraná, distante 447 km (NO) do registro realizado neste estudo no Rio Grande do Sul, no município de Restinga Seca (WITT *et al.*, 2019). Este fato causou surpresa e preocupação aos órgãos de defesa sanitária animal frente a possibilidade de introdução de patógenos importantes para avicultura no Estado.

1.3 Biologia e ecologia do morcego-vampiro-de-asas-brancas *Diaemus youngi*

No Brasil, a diversidade de morcegos estimada é de 181 espécies, distribuídas em nove famílias (GARBINO *et al.*, 2020); já no Rio Grande do Sul 41 espécies são registradas, pertencentes a quatro famílias (PASSOS *et al.*, 2010; WITT *et al.*, 2019). Dentre estas se destacam as espécies hematófagas por apresentar um sério risco a sanidade animal e a saúde pública nas Américas.

Os morcegos hematófagos ou vampiros estão inseridos na família Phyllostomidae, que é subdividida em cinco subfamílias: *Desmodontinae*, *Glossophaginae*, *Phyllostominae*, *Carollinae* e *Stenodermatinae*. Nesta família encontramos os mais diversos hábitos alimentares: frugívoros, polinívoros, nectarívoros, carnívoros e hematófagos (KWON; GARDNER, 2007; REIS *et al.*, 2007).

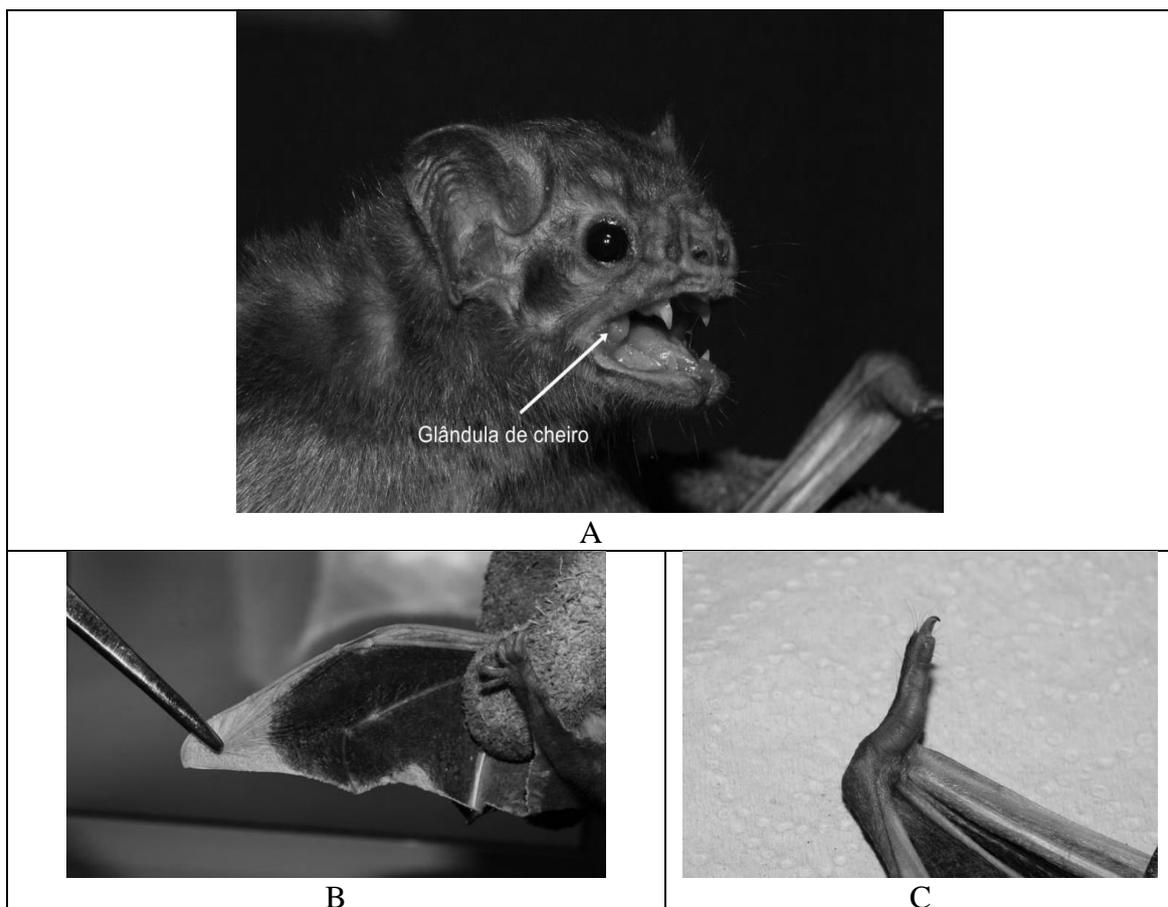
São conhecidas três espécies de morcegos hematófagos: *Diaemus youngi* (Jentink, 1893), *Diphylla ecaudata* (Spix, 1823) e *Desmodus rotundus* (E. Geoffroy, 1810) (subfamília *Desmodontinae*); todas são endêmicas da região neotropical e com ocorrência para o Brasil (REIS *et al.*, 2007; NOGUEIRA *et al.*, 2014). Evolutivamente, *D. youngi* é mais próximo a *D. rotundus*, enquanto *D. ecaudata* encontra-se noutro ramo (AGNARSSON *et al.*, 2011).

Ambas as espécies, *D. ecaudata* e *D. youngi*, têm preferência pelo sangue de aves, mas eventualmente *D. youngi* também pode atacar mamíferos (GREENHALL; SCHUTT-JR, 1996), enquanto *D. rotundus* alimenta-se quase que exclusivamente do sangue de mamíferos de médio e grande porte.

D. youngi é semelhante a *Desmodus* e *Diphylla*, diferindo no tamanho maior/menor, formato das orelhas, que são moderadamente longas e separadas, e por apresentar polegar curto e com bordas das asas brancas. Já *D. ecaudata* é menor que *Desmodus*, os olhos são grandes, possui orelhas curtas e arredondadas, os polegares são curtos e sem calosidades (PERACCHI *et al.*, 2011). *D. youngi* apresenta comprimento total de 85 mm, o antebraço pode variar de 50 a 56 mm e o peso de 30 a 45 g (GREENHALL; SCHUTT-JR, 1996) e a fórmula dentária apresenta a configuração de $i\ 1/2, c\ 1/1, pm\ 1/2, m\ 1/1 = 20$.

Diaemus youngi apresenta orelhas curtas, não possui calcar nem cauda e distingue-se das demais por apresentar as pontas das asas brancas e apenas uma única almofada no dedo polegar, enquanto *Desmodus* apresenta duas; já *Diphylla* não possui esta estrutura (AGUIAR, 2007; KWON; GARDNER, 2007) (Fig. 5).

Figura 5. A - Rosto de *D. youngi* e localização das glândulas de cheiro; B - Detalhe da ponta da asa branca; C - Polegar curto característico da espécie.



Fonte: autor

A área de distribuição conhecida percorre os territórios do México, Bolívia, Paraguai, Brasil; Trinidad, Venezuela até o norte da Argentina (Figura 5). No Brasil existem registros para os Estados do AC, AL, AM, AP, DF, GO, MG, MS, MT, PA, PE, PR, RJ, SP, SC e RS (AGUIAR *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2017; WITT *et al.*, 2019)(Fig. 6).

Figura 6. Distribuição geográfica provável de *D. youngi* na região neotropical.



Fonte: Barquez *et al.* (2015)

A gestação é de sete meses com o nascimento de apenas um filhote por parto (BREDT *et al.*, 1998). As colônias são pequenas, podendo variar de 6 a 30 indivíduos. Possui um par de glândulas bucais situadas internamente as bochechas, as quais liberam substância volátil e nauseante, sendo utilizadas quando o animal é irritado ou para evitar a predação (BREDT *et al.*, 1998).

Apesar de ser considerada uma espécie rara, devido ao fato de apresentar uma ampla distribuição geográfica, e a que pouco se conhece sobre a biologia e ecologia da espécie, *D. youngi* não consta na lista da fauna silvestre brasileira como ameaçada de

extinção (AGUIAR *et al.*, 2006). O status de conservação da espécie ao longo de sua distribuição geográfica é classificado como de “menor preocupação” pela União Internacional de Conservação da Natureza (IUCN) (BARQUEZ *et al.*, 2015).

Atualmente, a técnica de captura mais utilizada na quirópteros no Brasil é mediante o uso de redes de neblina que são instaladas a altura de três metros no nível do solo, sendo um modo seletivo para captura de espécies em meio a floresta, onde buscam no substrato inferior suas fontes alimentares. Este fato pode justificar a dificuldade em capturar *D. youngi*, visto que a espécie buscam suas presas (aves) em alturas superiores ao método descrito acima, além de apresentar pequeno número de indivíduos por colônia.

Embora a *D. youngi* possa alimentar-se do sangue de mamíferos, principalmente em cativeiro (GOODWIN; GREENHALL 1961; GREENHALL; SCHUTT-Jr 1996), as aves são suas presas preferenciais (KWON; GARDNER 2007; COSTA *et al.*, 2008).

No Brasil, um estudo sobre o ataque a aves no Estado do Rio de Janeiro, entre os anos de 2000 e 2006, constatou a predação a inúmeras espécies exóticas, entre as quais foram citadas o pavão azul (*Pavo cristatus*), perús (*Meleagris gallopavo*), galinhas d’angola (*Numidia meleagris*), galinhas d’angola vulturinas (*Acryllium vulturinun*) e pavões verdes (*Pavo muticus*), além de galinhas domésticas (*Gallus gallus domesticus*) (COSTA *et al.*, 2008).

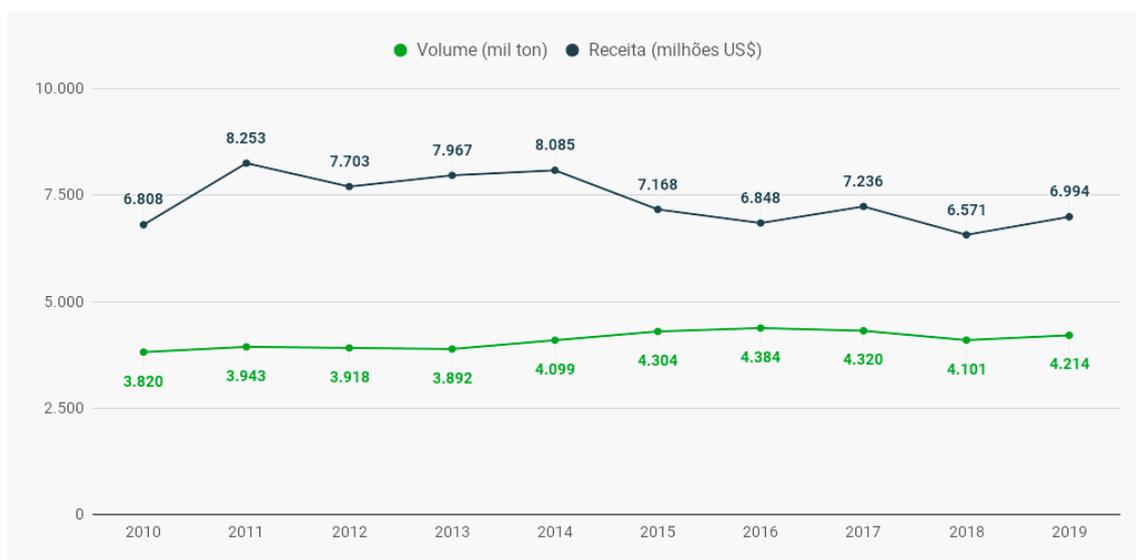
No estudo realizado por Witt *et al.* (2019) em Restinga Seca, no Rio Grande do Sul, somente aves domésticas (*Gallus gallus domesticus*) e angolistas (*Numida meleagris*) foram atacadas, pois pernoitavam em galhos de árvores ao redor do galinheiro, facilitando a predação. Posteriormente outros exemplares foram capturados em outras investigações oficiais nos município de Candelária e São Miguel das Missões o que pode representar que a espécie já está distribuída também por outras regiões do Estado.

1.4 Risco a sanidade animal

Na cadeia de produção avícola o Brasil é um considerado como um dos maiores produtores de carnes de aves do mundo, ocupando a posição de terceiro produtor de carne de frango no mundo (ABPA, 2021); já RS é o terceiro maior produtor e exportador de carne de frango e maior exportador de ovos e carne de peru do país (RS, 2021).

Somente em 2019, a receita obtida com a carne de frango foi de 6.994 milhões de dólares, além da produção significativa de carne de perus, patos e outras aves (Fig 7).

Figura 7. Exportações Brasileiras de Carne de Frango – Série histórica. Fonte: Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA, 2021).



Fonte: <https://abpa-br.org/>

Neste sentido, o controle sanitário sobre a criação de aves é estratégia fundamental para manter o *status* de grande produtor mundial de carne de aves, pelo que foi instituído em 1994 o Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA) é atualmente coordenado pela Divisão de Sanidade das Aves pela Portaria nº 193/1994 com três objetivos principais:

- Prevenir e controlar as enfermidades de interesse em avicultura e saúde pública;
- Definir ações que possibilitem a certificação sanitária do plantel avícola nacional;
- Favorecer a elaboração de produtos avícolas saudáveis para o mercado interno e externo.

De acordo com a Instrução Normativa N° 50, de 24 de setembro de 2013 que, lista as doenças de notificação compulsória para sanidade animal no país, 13 são de notificação obrigatória em aves, das quais oito são virais, a saber: Bronquite infecciosa aviária (IBV, Gammacoronavirus, Coronaviridae), Doença de Gumboro (IBDV, Birnavirus, Birnaviridae), Doença de Newcastle (Paramyxovirus aviário 1, Avulavirus, Paramyxoviridae), Hepatite viral do pato (DHBV, Avihepadnavirus, Hepadnaviridae),

Influenza aviária de alta patogenicidade, Influenza aviária de baixa patogenicidade (Alta patogenicidade: vírus influenza A subtipos H5 ou H7; qualquer combinação de H1 a H16 e N1 a N9 com código genético para múltiplos aminoácidos básicos (3 a 5) no sítio de clivagem da hemaglutinina; ou índice intravenoso (IPIV) superior a 1,2 em aves SPF; baixa patogenicidade: todas as combinações de subtipos sem o código acima e com IPIV maior que 1,2 em aves experimentais), Laringotraqueíte infecciosa aviária (GaHV-1; ILTV, Iltovirus, Alphaherpesvirinae) e Rinotraqueíte do peru (AMPV, Avian Metapneumovirus, Paramyxoviridae).

No Rio Grande do Sul o programa foi institucionalizado pela Lei nº 12.731, de 27 de junho de 2007. Está vinculado ao sistema de controle sanitário para acompanhamento da produção, comércio, transferência e trânsito de aves, ovos férteis, subprodutos ou resíduos avícolas, em conformidade com as diretrizes do PNSA (Programa Nacional de Sanidade Avícola).

A lista das doenças de notificação compulsória para sanidade animal foi atualizada pelo Estado pela Portaria SEAPDR Nº 63/2014 que dispõe sobre alteração da lista de doenças de peculiar interesse do Estado do Rio Grande do Sul, previstas no art. 11 inciso X do Decreto nº 50.072, de 18 de fevereiro de 2013.

Segundo dados disponíveis do MAPA, de 1999 a 2006, foram registrados 2.348 casos de doença de Newcastle, distribuídas nos estados do Rio de Janeiro, Goiás, Amazonas, Mato Grosso e Rio Grande do Sul.

A presença de uma espécie de morcego hematófaga especialista no sangue de aves pode representar uma nova ameaça a sanidade avícola no Estado, visto o potencial de deslocamentos e capacidade vetorial na transmissão de doenças associadas as aves.

A busca pelo conhecimento sobre os agentes patogênicos e sobre a dinâmica dos processos de infecção em morcegos é a melhor estratégia para prevenir e mitigar futuras ameaças à saúde pública e a saúde animal (HAYMAN *et al.*, 2013; SMITH; WANG 2013b; CHEN *et al.*, 2014; ANTHONY *et al.*, 2017).

Diante do exposto, este estudo contribui para o conhecimento sobre o papel de *D. youngi* como reservatório de vírus circulantes na espécie, como modo de prevenir e mitigar possíveis surtos de doenças em humanos e animais de produção, resguardando a saúde pública e a sanidade animal no Rio Grande do Sul.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Detectar e identificar vírus em morcegos-vampiros-de-asas-brancas *D. youngi* no Rio Grande do Sul.

2.2 Objetivo Específicos

- Detectar e identificar vírus em morcegos hematófagos da espécie *D. youngi* no Rio Grande do Sul, com ênfase para as famílias *Paramyxoviridae* e *Coronaviridae*;

- Prospectar e analisar agentes causadores de doenças em aves de notificação compulsória no Brasil pelo Ministério da Agricultura e pela Organização Mundial da Saúde Animal (OIE);

- Caracterizar e comparar vírus semelhantes aos encontrados em morcegos hematófagos aos dados disponíveis em banco de dados mundial (GenBank) de outras espécies de quirópteros;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Amostras biológicas

Em 2019, foram coletados seis morcegos da espécie *Diaemus youngi* (uma fêmea e cinco machos) nos municípios de Candelária, Restinga Seca e São Miguel das Missões, localizados no Estado do Rio Grande do Sul. O projeto foi autorizado pelo ICMBio (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade) sob a licença nº 61537-1. A coleta de animais contou com o apoio do serviço oficial de Defesa Sanitária Animal, da Secretaria de Estado da Agricultura do Estado do Rio Grande do Sul.

Os animais foram capturados com redes de neblina ao nível do solo, próximo aos puleiros que serviam de dormitório das aves, eutanasiados com overdose de 0,5% de tionembutal, administrado por via intraperitoneal (1 mL) e imediatamente necropsiados. Amostras de fígado, rim, pulmão, coração e intestinos foram colhidas, armazenadas separadamente em frascos de criotubo e preservadas temporariamente a -20 ° C e transportadas para o Laboratório de Virologia Veterinária, sendo então armazenadas a -80 ° C até o processamento.

Todos os órgãos foram macerados individualmente e diluídos a 20% (p / v) em solução salina tamponada com fosfato (PBS) (pH 7,2). Um pool contendo todas as amostras foi montado com 100 µL de cada órgão. PBS foi adicionado à piscina para um volume final de 10 mL, que foi então centrifugado em baixa velocidade a $2.000 \times g$ por 30 min a 10 ° C. O sobrenadante foi filtrado através de um filtro de 0,45 µm (Millipore) para remover os resíduos.

3.2 Metagenômica viral e HTS

A piscina foi ultracentrifugada em uma almofada de sacarose a 25% a $150.000 \times g$ por 3 h a 4 ° C em um rotor Sorvall AH629. O pellet contendo as partículas virais foi incubado por 1,5 h com as enzimas DNase e RNase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) (THURBER *et al.*, 2009). Posteriormente, o RNA e o DNA virais foram isolados usando TRI Reagent (Sigma Aldrich) e um protocolo padrão de fenol-clorofórmio (SAMBROOK; RUSSELL, 2006), respectivamente.

O DNA viral foi enriquecido com GenomePlex® Complete Whole Genome Ampli? Cation (WGA) Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), enquanto o RNA viral foi reversamente transcrito e enriquecido em dsDNA usando TransPlex® Complete Whole Transcriptome Ampli? Cation (WTA) Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. Os produtos de DNA produzidos a partir desses protocolos de enriquecimento foram purificados usando o kit PCR Purification Combo (Thermo Fisher Scientific). A qualidade e a quantidade do DNA foram avaliadas por espectrofotometria e fluorimetria realizadas com NanoDrop™ (Thermo Fisher Scientific) e Qubit™ (Thermo Fisher Scientific), respectivamente, e os produtos foram agrupados em quantidades equimolares até uma concentração final de 0,2 ng de purificado DNA. As bibliotecas foram ainda preparadas usando o Nextera XT DNA Library Preparation Kit e sequenciadas usando um sistema Illumina MiSeq usando um kit de reagente Illumina v2 (2×150 leituras de extremidades emparelhadas).

3.3 Análise bioinformática

As leituras geradas tiveram sua qualidade avaliada e adaptadores cortados usando FASTQ Toolkit v. 2.2.5 (BaseSpace Labs) e os dados foram montados de novo usando SPAdes Genome Assembler v. 3.9.0 (BANKEVICH *et al.*, 2012). Ambas as

ferramentas foram acessadas no BaseSpace Sequence Hub (<https://basespace.illumina.com>). Os contigs montados foram examinados quanto a semelhanças com sequências conhecidas por meio do BLASTX usando dentro do Blast2GO (GÖTZ *et al.*, 2008) e todos os conjuntos relevantes foram confirmados por meio de leituras de mapeamento para contigs usando o software Geneious Prime 2020.0.5 (<https://www.geneious.com>). Sequências com valores $E \leq 10^{-3}$ foram classificadas como provavelmente originadas de vírus eucarióticos, bactérias, fagos ou fontes desconhecidas com base na origem taxonômica da sequência com o melhor valor E. As comparações de nucleotídeos e proteínas gênicas foram realizadas com os programas BLASTN e BLASTP (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para identificar as sequências que estavam mais intimamente relacionadas aos contigs virais de interesse. ORFs completos foram previstos e anotados usando Geneious Prime. As sequências foram substituídas por seus complementos reversos, quando necessário, para manter todas as sequências na mesma fita. Na anotação de genomas circulares, para análises comparativas, escalonamos todas as sequências para a mesma posição inicial de uma proteína de referência selecionada.

Sequências de referência e / ou representativas de vírus pertencentes às famílias Anelloviridae, Genomoviridae, Smacoviridae e Paramyxoviridae foram obtidas do GenBank e alinhadas com as sequências identificadas no presente usando o ClustalW (LARKIN *et al.*, 2007) usando o software MEGA6 (TAMURA *et al.*, 2013). A análise taxonômica foi conduzida levando em consideração matrizes de distâncias de pares (de identidade ou divergência) calculadas usando MEGA6 de acordo com os valores de corte determinados pelas diretrizes ICTV específicas para cada família. Árvores filogenéticas foram construídas usando MEGA6. Para cada árvore filogenética, o melhor modelo também foi calculado usando o MEGA6.

3.4 Detecção de paramixovírus e coronavírus por RT-PCR

Todos os órgãos dos seis morcegos foram selecionados individualmente para um fragmento de 494 pb do gene L de paramixovírus usando um protocolo de PCR amplamente reativo bem estabelecido descrito anteriormente (TONG *et al.*, 2008), com o objetivo de amplificar e sequenciar altamente um fragmento particular usado para análise filogenética. Além disso, as amostras foram rastreadas individualmente para um

fragmento de 440 pb do gene pol de coronavírus usando um protocolo de pan-coronavírus descrito anteriormente (WOO *et al.*, 2006), com o objetivo de detectar quaisquer sequências relacionadas ao coronavírus.

4. RESULTADOS

4.1 Visão geral

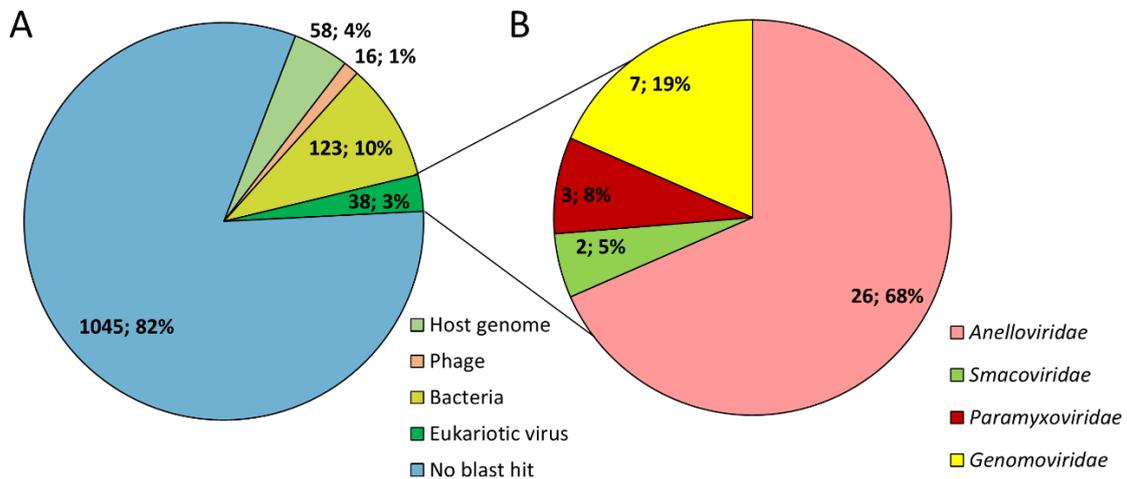
Uma biblioteca de DNA que consiste em um pool de fígado, rins, pulmões, coração e intestinos de seis morcegos vampiros *Diameus youngi* foi gerada e sequenciada usando execuções de base 2×150 emparelhadas na plataforma Illumina MiSeq, que gerou um total de 108.036 leituras. foram montados de novo em 1.280 contigs. Os contigs foram comparados com o banco de dados de proteínas não redundantes do GenBank por meio de uma pesquisa BLASTX conduzida com um valor de corte E de 10^{-5} no Blast2GO (GÖTZ *et al.*, 2008). Usando essa abordagem, a grande maioria (1.045 / 1.280; 82%) das sequências não puderam ser classificadas (“sem explosão”). Genoma hospedeiro, genomas bacterianos e fágicos corresponderam a 15% (197 / 1.280) dos contigs, enquanto as sequências relacionadas ao vírus eucariótico exógeno representaram 3% (38 / 1.280) dos contigs (Figura 8).

A maioria das sequências de vírus eucarióticos observados eram vírus de DNA circular (35/38, 92%), a maioria deles pertencente à família Anelloviridae (26/38, 68%), enquanto dez sequências eram CRESS pertencentes a duas famílias virais: Genomoviridae (7/38, 18%) e Smacoviridae (2/38, 5%). Três sequências (3/38, 8%) foram relacionadas a genomas de RNA de fita simples (ssRNA) pertencentes à família Paramyxoviridae (Figura 1b). As sequências traduzidas semelhantes às de proteínas virais eucarióticas conhecidas ou suspeitas estão resumidas na Tabela 1. Os resultados completos de blastn / blastx de contigs relacionados a vírus são apresentados na Tabela Suplementar 1. As informações sobre as sequências obtidas foram descritas nas seções a seguir .

Além disso, apesar de não ter sido detectado pelo HTS, um RT-PCR convencional “pan-coronavírus” foi realizado para confirmar sua ausência, e todos os animais resultaram negativos. Um protocolo de “pan-paramixovírus” também foi realizado, visando a análise filogenética de um fragmento do gene L altamente utilizado,

mas apesar dos resultados positivos, tentativas repetitivas de sequenciá-lo por Sanger resultaram infrutíferas.

Figura 8 - Resultado gráfico metagenômico apresentando a distribuição das sequências geradas. A. O gráfico apresenta todas as leituras obtidas nesta análise, enquanto B. apresenta a representatividade do vírus eucariótico.



Fonte: autor

Tabela 1 - Resumo dos contigs relacionados ao vírus detectados no pool de tecidos de *Diaemus youngi*

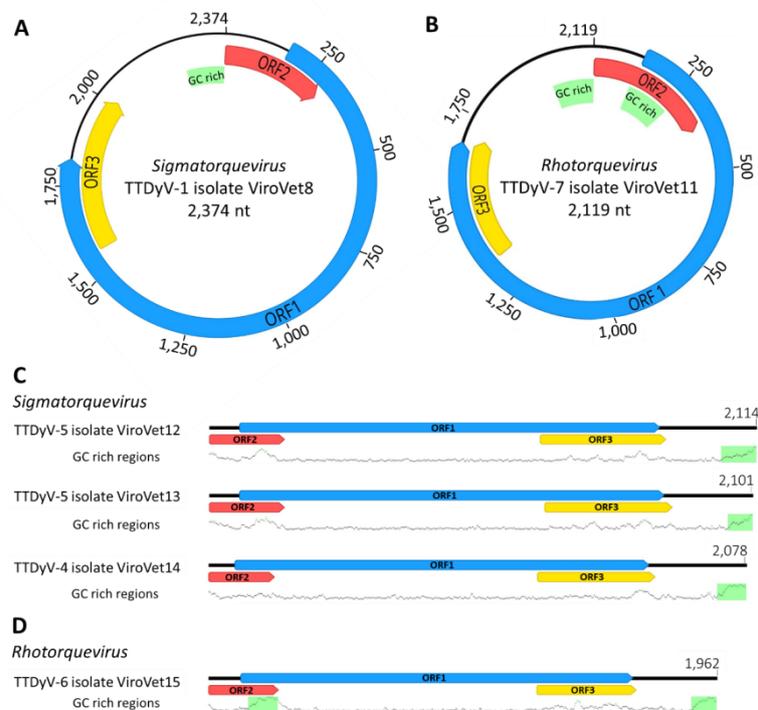
Hits	Contigs lengths (nt)	Best blastx hits	Family	Genus*	Species*
26	236 - 2429	Torque teno virus	<i>Anelloviridae</i>	<i>Sigmatorquevirus</i>	Torque teno diaemus youngi virus 1 Torque teno diaemus youngi virus 2 Torque teno diaemus youngi virus 3 Torque teno diaemus youngi virus 4 Torque teno diaemus youngi virus 5 <i>Rhotorquevirus*</i> Torque teno diaemus youngi virus 6 Torque teno diaemus youngi virus 7
7	330 - 2212	Gemycircularvirus	<i>Genomoviridae</i>	<i>Gemykrogvirus</i>	Giant panda associated gemykrogvirus 1
2	478 - 2520	CRESS virus	<i>Smacoviridae</i>		
3		Bat paramyxovirus, Mount Mabu virus 1	<i>Paramyxoviridae</i>	unclassified	unclassified

Fonte: autor

4.2 Anelloviridae

Foram detectados 26 contigs intimamente relacionados a membros de Anelloviridae (Tabela 1), dos quais oito foram classificados como Sigmatorquevirus e três eram altamente divergentes, propostos como um novo gênero aqui denominado Rhotorquevirus. Os contigs variaram de 250 a 2.374 nt de comprimento. Foi possível detectar dois genomas completos (Figuras 9a e 9b) e quatro genomas quase completos que exibiram três ORFs completos (ORF1, ORF2 e ORF3) (Figura 9c e 9d). Cinco sequências adicionais exibindo o gene ORF1 completo também foram detectadas. Considerando que a sequência de nucleotídeos ORF1 completa é necessária para a classificação dos membros de Anelloviridae, os 15 contigs relacionados a Anelloviridae restantes, que exibiram apenas ORF1 parcial ou apenas ORF2, foram excluídos da análise.

Figura 9 - A) Organização genômica do TTDyV-1 (Sigmatorquevirus) e B) TTDyV-7 (gênero proposto de Rhotorquevirus); C) Organização genômica linearizada de TTDyV-4 e 5 (Sigmatorquevirus) e D) TTDyV-6 (gênero proposto de Rhotorquevirus). As setas representam as direções e o quadro de leitura de cada ORF putativa (ORF1-ORF3). Uma caixa verde fechada indica as regiões ricas em GC.



Fonte: autor

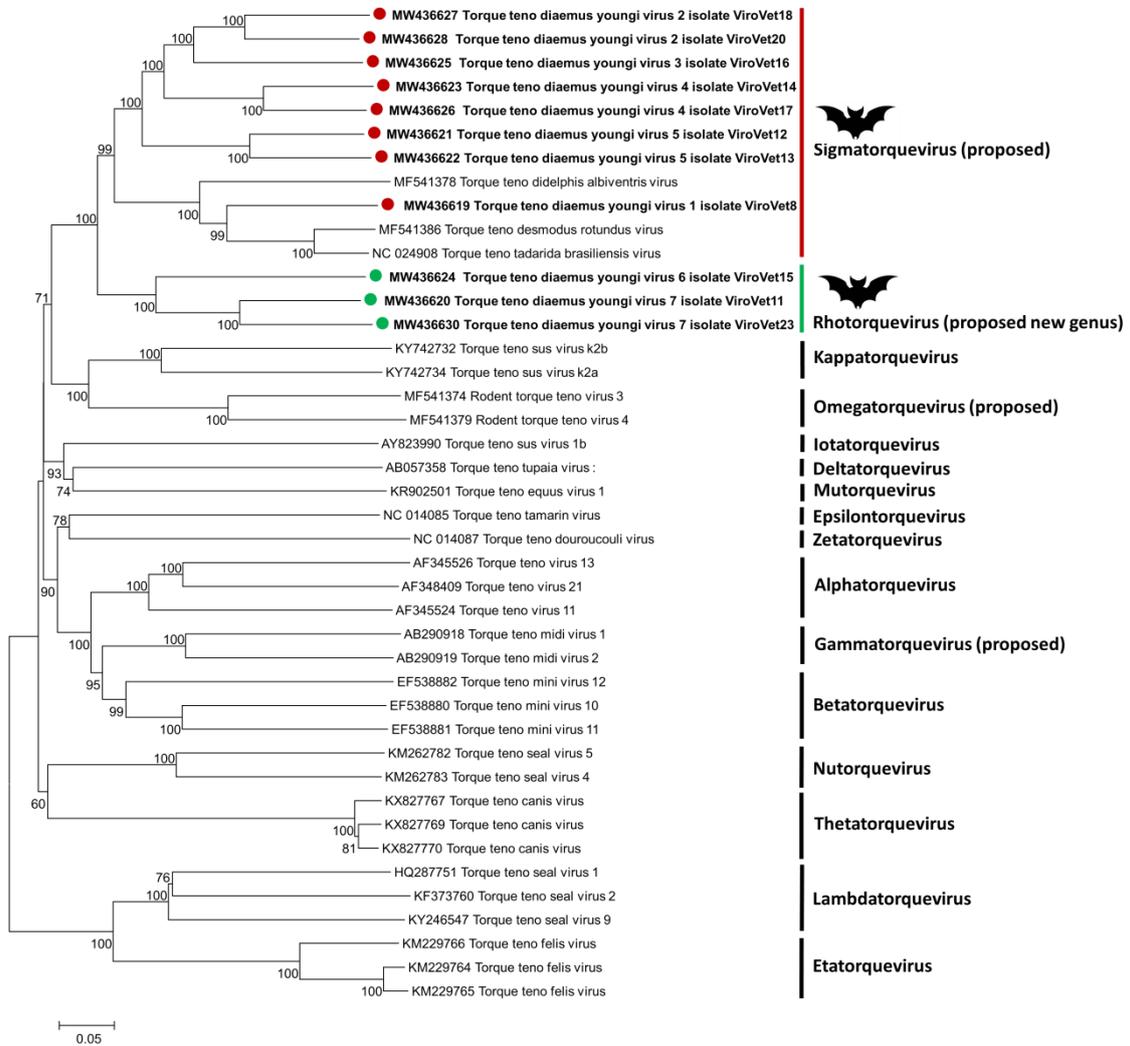
De acordo com as diretrizes do ICTV, os critérios de demarcação para novos gêneros e espécies de vírus dentro da família Anelloviridae foram definidos para divergência > 56% e > 35%, respectivamente (<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>), do nucleotídeo ORF1 completo sequências. Assim, a distância de pares de nucleotídeos foi calculada usando o software MEGA 6. Nossa comparação de identidade de pares de nucleotídeos revelou que sete espécies dentro de dois gêneros foram detectadas (Tabela 2 suplementar).

Os genomas mostraram organização semelhante em ORF1, ORF2 e ORF3; As sequências ORF1 do vírus *Torque teno diaemus youngi* (TTDyV) variaram de 442 aa a 550 aa de comprimento, com regiões ricas em arginina típicas em seus terminais N (30% dos 70 primeiros aminoácidos). Uma região rica em GC foi encontrada a montante da ORF2 de todas as sequências analisadas, enquanto uma região GC extra pode ser observada dentro da ORF2 nos membros de um novo gênero putativo (Figuras 9b e 9d). A análise da sequência indicou que os 11 TTDyVs compartilhavam a identidade da sequência de nucleotídeos de sua ORF1 variando de 26,43 a 63,91%.

A análise filogenética foi realizada com base nas sequências de nucleotídeos ORF1 dos 11 TTDyV, seus mais relacionados no GenBank e membros representativos de cada gênero (Figura 10). Os resultados indicaram que os isolados do presente estudo agruparam-se em dois clados principais, representando dois gêneros virais: o anteriormente proposto *Sigmatorquevirus* e o suposto novo gênero proposto no presente estudo, *Rhotorquevirus*.

Três sequências foram classificadas como duas novas espécies (TTDyV-6 e 7) dentro do *Rhotorquevirus*, enquanto um isolado (TTDyV-1) foi intimamente relacionado aos TTVs previamente descritos em morcegos do Brasil: um de um *Tadarida brasiliensis* (NC024908) coletado no mesmo região do presente trabalho (CIBULSKI *et al.*, 2014), e uma de um *Desmodus rotundus* (MF541386) coletado no estado de São Paulo (Sudeste do Brasil) em 2010 (DE SOUZA *et al.*, 2018a). Esses três isolados pertencem à mesma espécie dentro do gênero *Sigmatorquevirus*, calculada por distância dos pares (Tabela suplementar 1), juntamente com os sete isolados restantes detectados no presente estudo que compreende quatro novas espécies (TTDyV-2, 3, 4 e 5) dentro deste gênero.

Figura 10 - A análise filogenética foi realizada com base nas sequências de nucleotídeos ORF1 dos 11 TTDyV, suas sequências mais estreitamente relacionadas no GenBank e membros representativos de cada gênero.



Fonte: autor

Tabela suplementar 1 - Matriz de distâncias de pares baseada em sequências de nucleotídeos completas de ORF1 de isolados representativos de todos os gêneros e sequências de Torque teno virus do presente estudo. Os valores representam a porcentagem de divergência.

GENERA	σ	ρ	σ	σ	σ	ρ	σ	σ	σ	σ	ρ	σ	σ	σ	κ	ω	δ	ι	μ	ν	θ	ε	ζ	α	γ	β	λ	η
ISOLATE	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
1 Virovet_08																												
2 Virovet_11	59,34																											
3 Virovet_12	54,29	58,56																										
4 Virovet_13	55,12	58,24	26,55																									
5 Virovet_14	57,83	57,55	48,27	49,43																								
6 Virovet_15	57,98	40,32	57,53	59,53	59,44																							
7 Virovet_16	56,22	57,78	48,21	49,36	41,48	60,71																						
8 Virovet_17	58,39	60,05	52,93	53,38	28,83	60,64	44,82																					
9 Virovet_18	57,94	59,95	52,32	53,48	48,54	61,35	39,94	51,07																				
10 Virovet_20	59,13	61,22	52,84	54,29	47,89	61,44	40,83	52,59	26,43																			
11 Virovet_23	61,17	29,31	61,36	60,94	61,64	45,82	61,53	58,01	63,21	63,91																		
12 MF541378	36,23	59,68	54,23	55,03	57,88	59,37	56,67	57,90	58,90	59,46	62,81																	
13 MF541386	29,85	58,78	53,80	53,59	56,00	58,61	56,23	57,98	57,64	58,91	60,34	36,65																
14 NC 024908	29,55	58,78	53,68	54,66	55,70	57,71	55,93	57,59	57,64	57,70	60,66	36,53	9,12															
15 KY742732	71,12	72,44	71,12	71,91	70,76	72,62	71,60	74,33	72,13	71,66	74,98	71,75	70,50	69,49														
16 MF541374	65,81	68,50	69,45	68,80	69,00	69,47	68,35	71,46	69,72	70,75	71,61	68,15	66,62	65,97	63,34													
17 AB057358	70,01	69,61	69,88	69,74	66,30	67,80	66,76	69,52	67,32	67,19	73,80	69,28	68,53	68,41	73,23	72,00												
18 AY823990	69,91	70,64	70,66	70,66	70,35	71,02	70,66	72,32	71,19	71,95	73,34	70,42	70,75	70,49	71,71	71,70	68,65											
19 KR902501	71,07	71,25	72,27	71,90	71,72	71,92	72,81	73,46	73,54	74,28	72,98	72,38	71,05	71,26	72,75	72,19	68,53	64,71										
20 KM262782	71,18	71,26	70,23	70,15	70,75	71,54	69,58	73,71	71,31	71,73	74,31	71,70	70,25	69,87	69,64	70,50	71,24	71,05	71,13									
21 KX827767	68,73	67,42	67,88	68,00	68,41	68,45	67,66	69,89	68,20	69,91	70,21	67,78	67,66	66,81	72,63	69,29	70,83	68,62	68,90	69,21								
22 NC 014085	69,76	73,36	70,91	71,43	71,63	72,01	71,42	74,96	72,94	73,40	75,93	73,90	70,74	70,99	70,83	71,66	73,58	69,59	71,80	70,57	71,65							
23 NC 014087	75,24	74,18	75,14	75,22	75,81	75,62	74,89	78,31	75,53	75,11	77,67	76,23	74,71	74,49	72,42	73,70	76,40	72,28	71,76	71,47	73,26	63,48						
24 AF348409	75,73	74,88	73,52	74,35	74,79	75,58	74,93	77,97	75,23	76,44	78,68	75,19	75,68	75,76	73,29	75,83	74,94	73,68	74,27	72,69	73,90	69,52	72,61					
25 AB290918	74,36	74,10	73,90	74,66	74,51	75,03	74,19	77,73	75,53	76,45	77,66	75,73	74,02	73,69	73,42	75,53	76,15	75,04	75,49	74,58	76,52	72,66	75,09	63,56				
26 EF538880	73,47	73,26	72,59	71,97	74,04	73,61	73,77	76,42	74,14	74,37	76,98	74,31	73,74	73,64	73,01	75,18	74,22	72,63	74,63	72,85	74,44	71,29	74,21	64,12	56,09			
27 HQ287751	74,03	76,16	74,43	74,94	76,78	75,55	74,43	78,34	73,42	73,42	78,82	74,13	74,20	74,01	77,87	76,04	75,08	76,01	76,92	76,95	75,70	76,24	78,78	78,81	80,13	78,64		
28 KM229764	75,99	76,60	77,02	76,55	76,87	77,52	76,38	78,86	75,30	75,96	80,55	77,08	76,61	76,85	80,42	78,87	76,14	77,98	77,32	77,82	77,17	78,38	78,79	80,89	78,82	79,71	58,25	

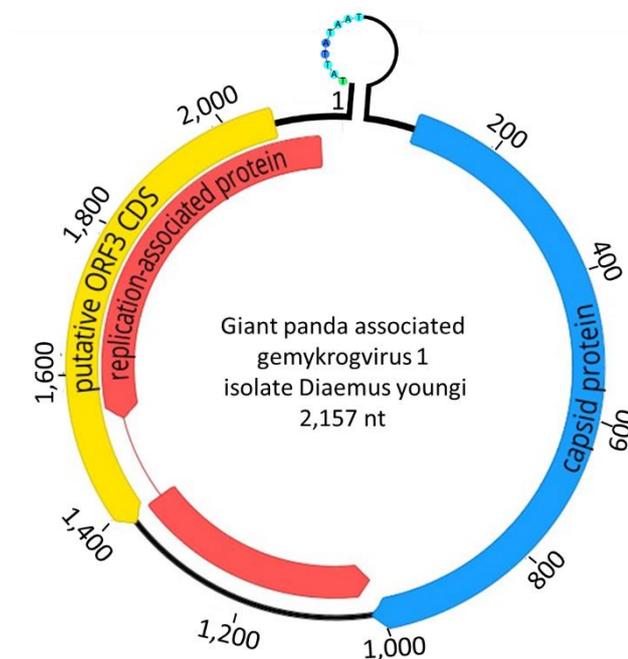
<35%	same species
35-56%	different species / same genus
>56%	different genus

σ: *Sigmatorquevirus*, ρ: *Rhotorquevirus*, κ: *Kappatorquevirus*, ω: *Omegatorquevirus*, δ: *Deltatorquevirus*, ι: *Iotatorquevirus*, μ: *Mutorquevirus*, ν: *Nutorquevirus*, θ: *Tethatorquevirus*, ε: *Epsilontorquevirus*, ζ: *Zetatorquevirus*, α: *Alphatorquevirus*, γ: *Gammatorquevirus*, β: *Betatorquevirus*, λ: *Lambdatorquevirus*, η: *Etatorquevirus*.

4.3 Genomoviridae

No presente estudo, foram detectados sete contigs intimamente relacionados a membros de Genomoviridae (Tabela 1). Os contigs variaram de 330 a 2.212 nt de comprimento. Um genoma completo de 2.157 nt de comprimento foi obtido (Figura 11). A organização do genoma incluiu uma ORF de proteína Rep emendada, uma ORF de Cap na orientação oposta e uma ORF3 putativa na mesma orientação de Rep. A estrutura de haste-alça foi encontrada entre as extremidades 5' das duas ORFs principais (Figura 4). Os demais contigs eram de Rep / Cap parcial e foram analisados apenas por meio do blastn / blastx, conforme tabela suplementar 1.

Figura 11 - Mapa do genoma do isolado *Diaemus youngi* do gemykrogvirus 1 associado ao panda gigante (GiGemyV). Os genes que codificam a proteína de iniciação da replicação (Rep) e a proteína do capsídeo (Cap) são mostrados com setas vermelhas e azuis, respectivamente. Um ORF3 putativo é representado por uma seta amarela. A posição do nonanucleotídeo (TAATATATT) na potencial estrutura haste-alça também é indicada.

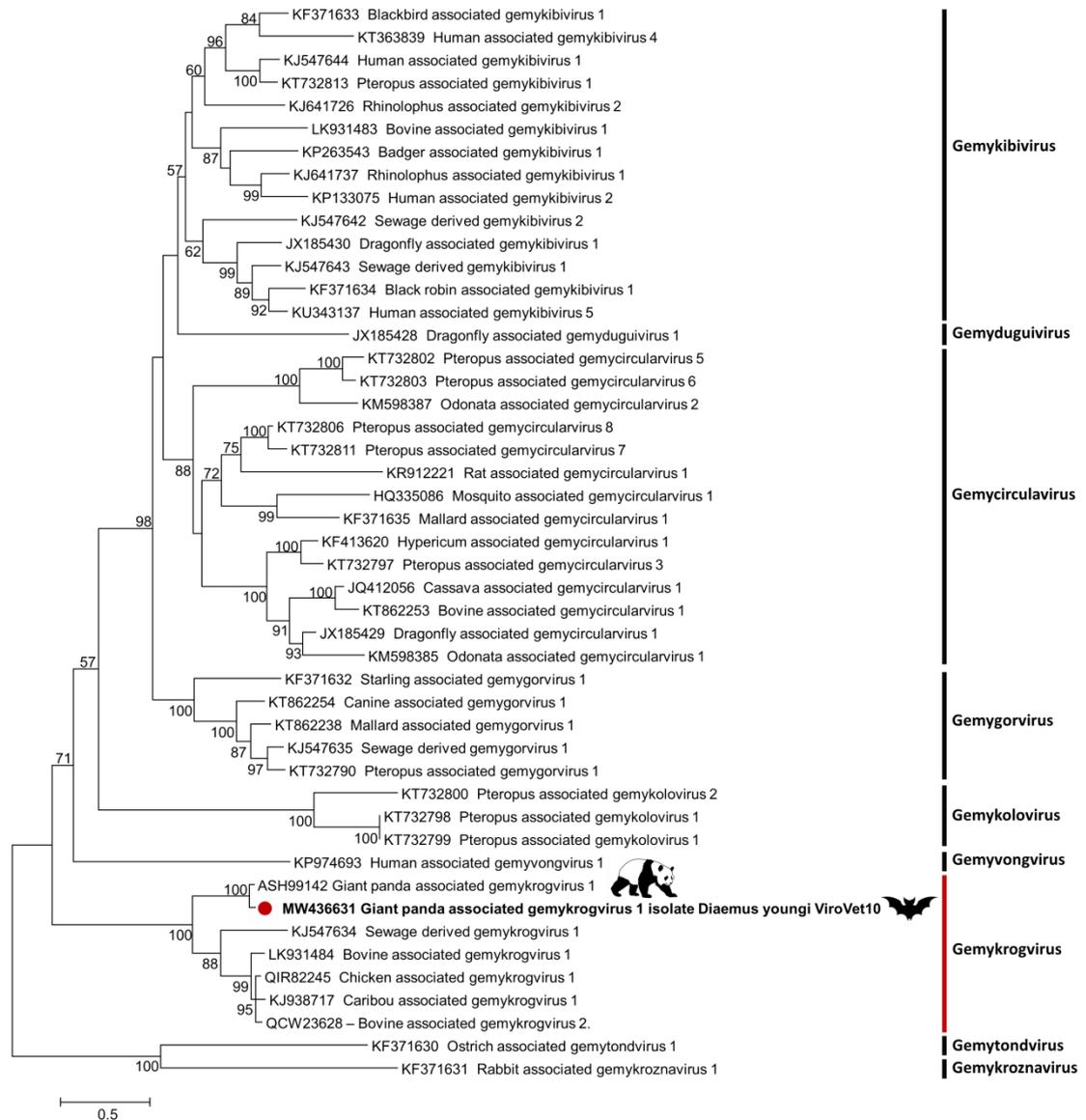


Fonte: autor

Para a classificação taxonômica, as identidades de pares em todo o genoma e a árvore filogenética do Rep traduzido foram analisadas. A análise filogenética incluiu nosso genoma completo, as melhores correspondências baseadas em Rep no GenBank e sequências de referência considerando a lista da descrição da família do ICTV (<http://talk.ictvonline.org/taxonomy/>), com um total de 47 sequências no conjunto de dados.

O faseamento de genomas completos foi necessário para alinhar os genomas circulares completos, e a caixa TATA a montante do stem-loop foi definida como posição 1. Quando o faseamento não foi possível, a sequência foi excluída da análise. As sequências traduzidas foram alinhadas com ClustalW (LARKIN *et al.*, 2007) usando o software MEGA6. As penalidades de abertura e extensão de gap foram definidas em 5 e 1, respectivamente, devido à alta divergência das sequências. Uma árvore de máxima verossimilhança de Rep traduzida foi construída (Figura 12) e as identidades em pares em todo o genoma foram calculadas (um menos p distâncias de sequências alinhadas em pares com exclusão de lacunas em pares) para classificação de espécies (Tabela suplementar 3). Seguindo as diretrizes do ICTV, 78% de identidade de pares foi definida como um valor para a demarcação de espécies. O genoma foi classificado dentro do gênero Gemykrogvirus, pertencente à mesma espécie de um vírus previamente associado a um panda gigante (número de acesso MF327559) (ZHANG *et al.*, 2017), compartilhando 94,1% de identidade par a par de todo o genoma (Tabela suplementar 3); por essa razão, nosso genoma foi denominado Gemykrogvirus 1 isolado de *Diaemus youngi* ViroVet10 (número de acesso MW436631) associado ao panda gigante.

Figura 12 - Árvore filogenética do aminoácido Rep de Genomoviridae. As sequências foram analisadas pelo método de Máxima Verossimilhança com o modelo LG + G + I. As análises foram conduzidas com 1000 réplicas de bootstrap. Valores de bootstrap superiores a 50% são mostrados. A sequência detectada no presente estudo foi destacada com um círculo vermelho.



Fonte: autor

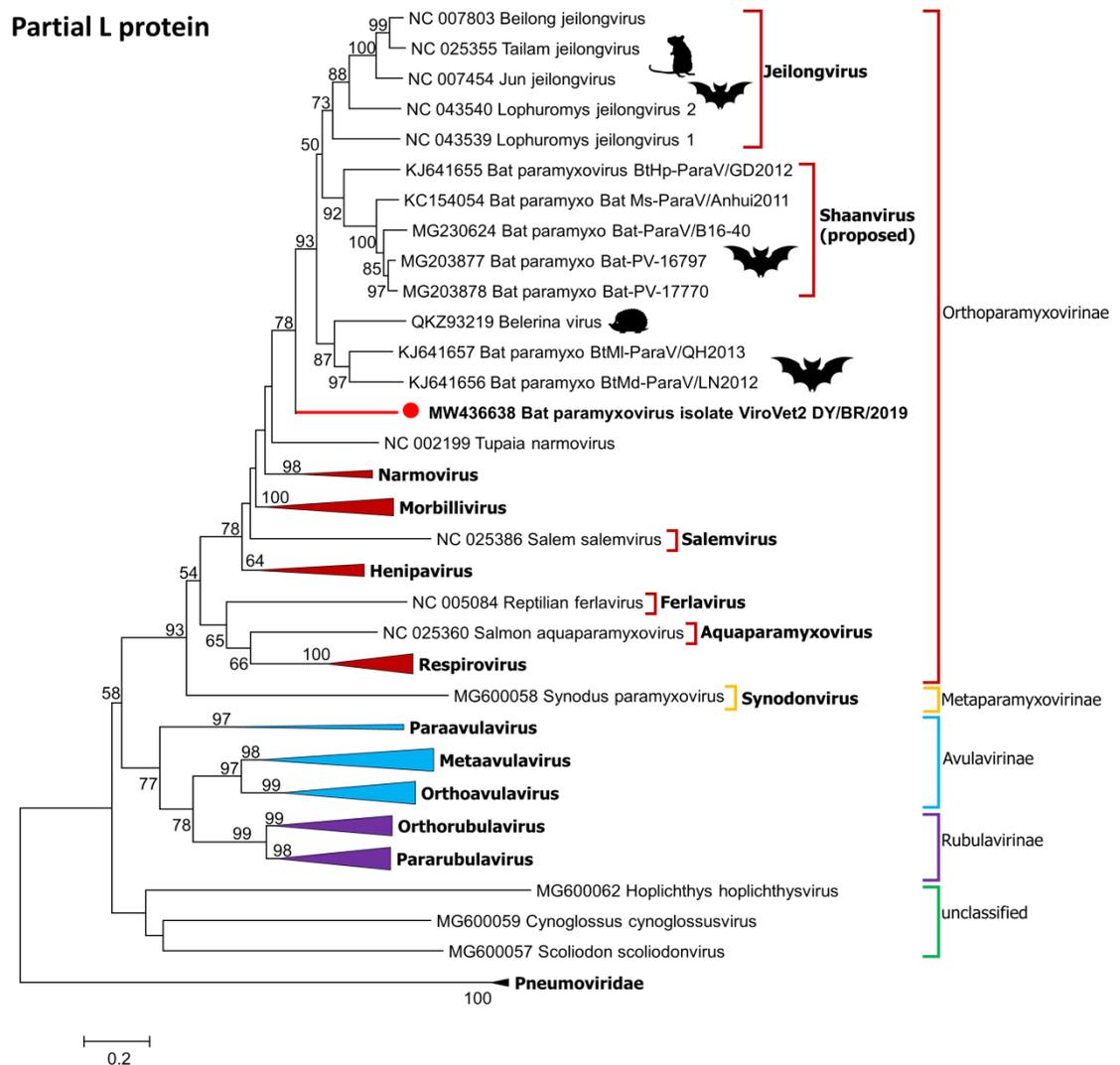
4.4 Paramyxoviridae

No presente estudo, foram detectados três contigs intimamente relacionados à família Paramyxoviridae (Tabela 1). Os comprimentos dos Contigs eram 332, 402 e 464 nt. Os nós foram renomeados como ViroVet1, 2 e 3 para melhor leitura do estudo. A análise Blastx (Tabela suplementar 1) mostrou que ViroVet2 exibiu 62,41% de identidade de aminoácidos (cobertura de consulta de 99%) com a proteína L de um paramixovírus de morcego não classificado (número de acesso AIF74184) detectado em um morcego de folha redonda Pomona, da China, 2012 (WU *et al.*, 2016); ViroVet1 tinha 64,55% de identidade (consulta de cobertura de 99%) com a proteína F de Lophumoris jeilongvirus 1 (anteriormente denominado vírus Mount Mabu 1), detectada em 2011 a partir de um roedor de Moçambique (número de acesso YP_009666844) (VANMECHELEN *et al.*, 2018), enquanto o ViroVet3 tinha 81,16% de identidade (cobertura de 44%) com a proteína M do mesmo vírus.

Com base nos resultados do blastn, as sequências mais semelhantes para cada nó foram recuperadas do banco de dados Genbank, bem como sequências de referência da família Paramyxoviridae, com um conjunto de dados final de 86 sequências. Três conjuntos de dados foram analisados separadamente. As sequências de nucleotídeos foram traduzidas e alinhadas usando ClustalW. Uma árvore filogenética de máxima verossimilhança foi construída para cada proteína parcial.

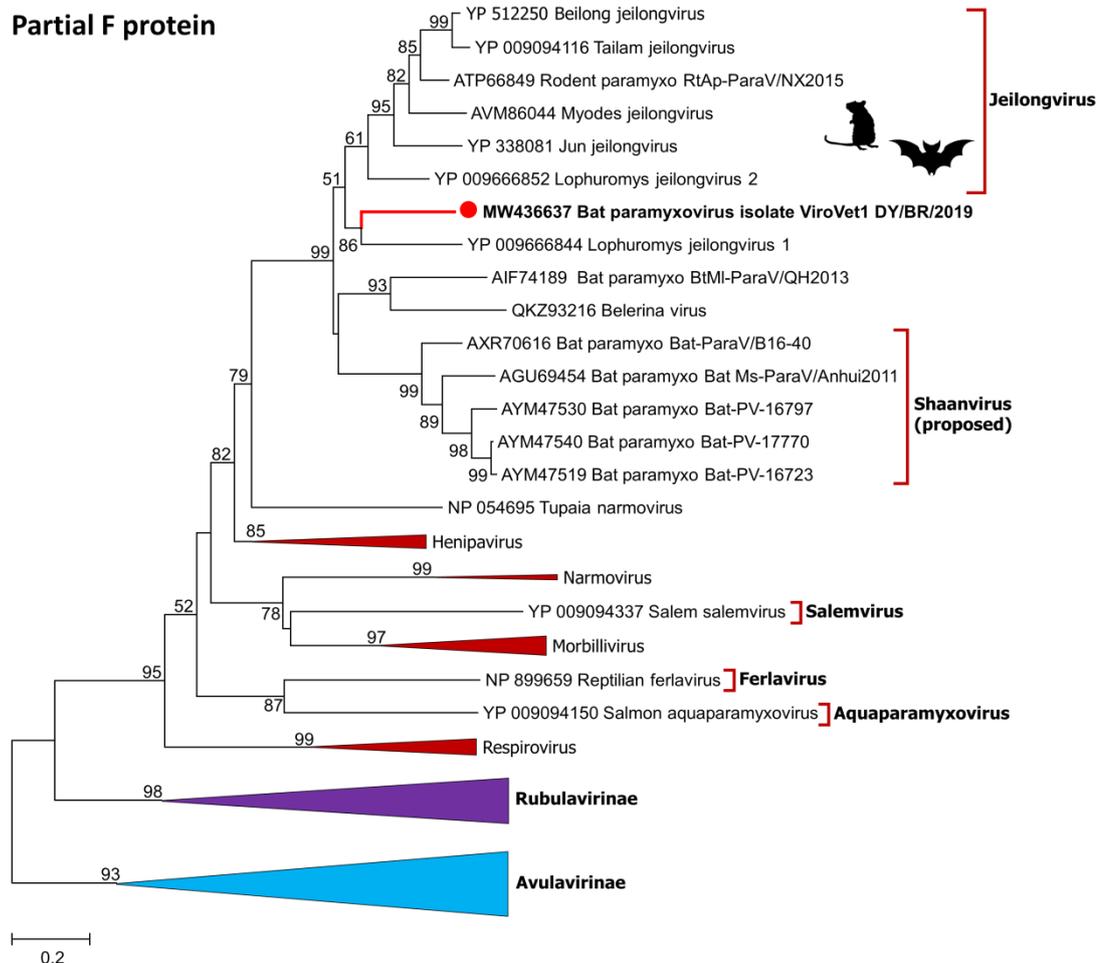
A árvore filogenética da proteína L parcial (Figura 13) mostrou que ViroVet2 pertence à subfamília Orthoparamyxovirinae, mas não se agrupa perto de nenhum gênero reconhecido. Um cluster contendo o Jeilongvirus recém-reconhecido, o Shannvirus proposto, o vírus Balerina recém-descrito (não classificado) e paramixovírus de morcego não classificado é o mais intimamente relacionado a este fragmento L. A filogenia da proteína F parcial ViroVet1 e da proteína M parcial ViroVet3 (Figuras 14 e 15), por outro lado, mostrou que nossos fragmentos estavam mais relacionados a membros do Jeilongvirus, mas ainda divergentes. Não foi possível determinar se os três fragmentos pertencem à mesma sequência genômica ou a múltiplos genomas.

Figura 13 - Árvore filogenética parcial de L aminoácidos de sequências de referência de Paramyxoviridae e “paramixovírus de morcego” não classificado. As sequências foram analisadas pelo método de Máxima Verossimilhança com o modelo LG + G + I. As análises foram conduzidas com 1000 réplicas de bootstrap. Valores de bootstrap superiores a 50% são mostrados. A sequência detectada no presente estudo foi destacada com um círculo vermelho. Sequências da família Pneumoviridae foram incluídas como grupo externo. Havia 86 sequências de aminoácidos e 148 posições no conjunto de dados final.



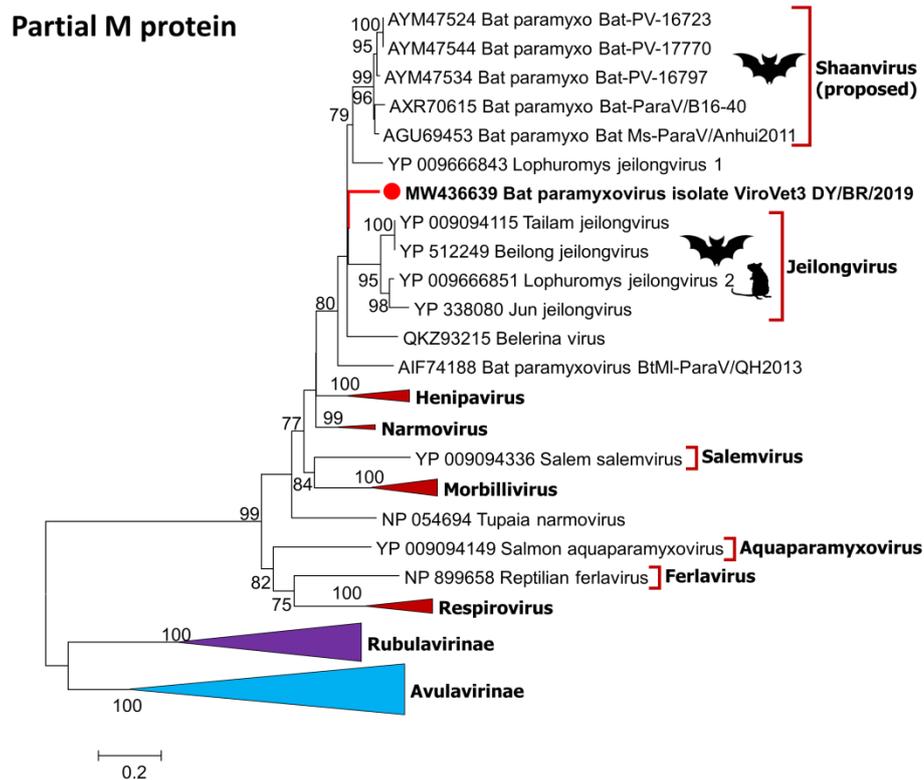
Fonte: autor

Figura suplementar 14 - Árvore filogenética de aminoácidos F parcial de seqüências de referência de Paramyxoviridae e “paramixovírus de morcego” não classificado. As seqüências foram analisadas pelo método de Máxima Verossimilhança com o modelo LG + G + I. As análises foram conduzidas com 1000 réplicas de bootstrap. Valores de bootstrap superiores a 50% são mostrados. A seqüência detectada no presente estudo foi destacada com um círculo vermelho. Havia 75 seqüências de aminoácidos e 110 posições no conjunto de dados final.



Fonte: autor

Figura 15 - Árvore filogenética de aminoácidos M parcial de sequências de referência de Paramyxoviridae e “paramixovírus de morcego” não classificado. As sequências foram analisadas pelo método de Máxima Verossimilhança com o modelo LG + G + I. As análises foram conduzidas com 1000 réplicas de bootstrap. Valores de bootstrap superiores a 50% são mostrados. A sequência detectada no presente estudo foi destacada com um círculo vermelho. Havia 74 sequências de aminoácidos e 69 posições no conjunto de dados final.



Fonte: autor

4.5 Smacoviridae

No presente estudo, foram detectados dois contigs intimamente relacionados a membros Smacoviridae, um com 478 nt (gene Rep parcial) e um genoma circular de

comprimento total de 2.465 nt de comprimento, denominado *Diaemus youngi* associado a unismacovírus (*DiaemusSV*) (Figura 16) que codifica uma Rep ORF e uma Cap ORF na mesma orientação, classificadas como organização tipo V seguindo o esquema de classificação do vírus DNA CRESS proposto por Rosario e colaboradores (2012). Uma estrutura de alça de haste putativa foi localizada perto da extremidade 3' da Rep ORF com homologia ao motivo de sequência de nonanucleotídeo NANNNTTAC degenerado que também é compartilhado por outros smacovírus relatados (TOCHETTO *et al.*, 2020).

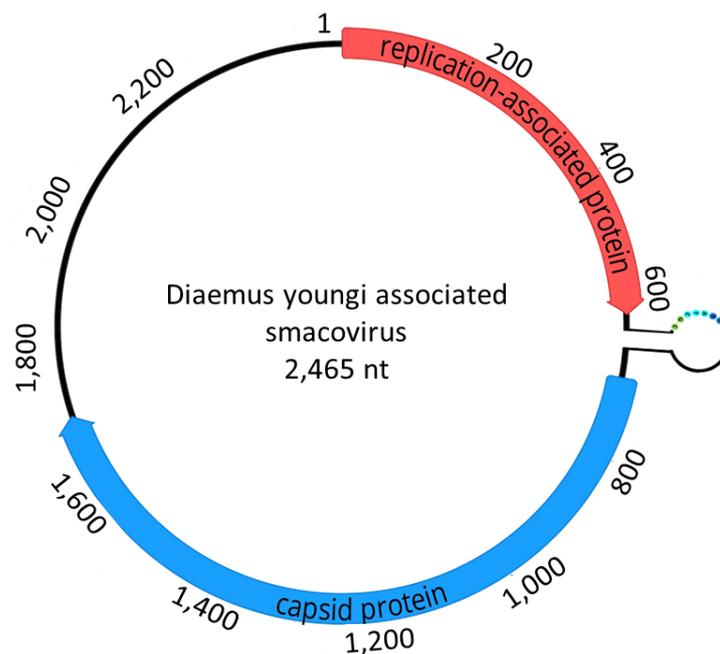
Seguindo as diretrizes do ICTV, um novo gênero dentro dos Smacoviridae poderia ser proposto acoplando menos de 40% de identidade de aminoácidos em pares Rep com um forte suporte filogenético. Os critérios para demarcação de espécies, por outro lado, consistem no alinhamento do comprimento total do genoma, e a maioria - mas não todos - os smacovírus apresentam genomas ambisense. Diante disso, até onde sabemos, todos os genomas unisense disponíveis até o momento não foram classificados nem em nível de gênero ou espécie. Assim, conduzimos nossa análise separadamente para cada proteína e a classificação taxonômica foi realizada com base nas identidades de aminoácidos Rep pairwise (Tabela complementar 4) e filogenia apenas para o nível de gênero.

Seguindo as diretrizes do ICTV, um novo gênero dentro dos Smacoviridae poderia ser proposto acoplando menos de 40% de identidade de aminoácidos em pares Rep com um forte suporte filogenético. Os critérios para demarcação de espécies, por outro lado, consistem no alinhamento do comprimento total do genoma, e a maioria - mas não todos - os smacovírus apresentam genomas ambisense. Diante disso, até onde sabemos, todos os genomas unisense disponíveis até o momento não foram classificados nem em nível de gênero ou espécie. Assim, conduzimos nossa análise separadamente para cada proteína e a classificação taxonômica foi realizada com base nas identidades de aminoácidos Rep pairwise (Tabela complementar 4) e filogenia apenas para o nível de gênero.

A análise de Blastn do genoma completo mostrou que a sequência mais semelhante era um genoma unisense recuperado de um swab traqueal de uma galinha em 2017, nos EUA (número de acesso MN379594) com identidade de 88,28% em uma cobertura de consulta de 75%. Além disso, 46 sequências de referência foram

recuperadas do GenBank, e 22 genomas unisense completos foram incluídos na análise. Para a filogenia Rep, as sequências de aminoácidos do Banana bunchy top virus (NP_604483) e do Cardamom bushy anão virus (AHF47677) foram adicionadas como grupo externo representando a família Nanoviridae. As proteínas Rep e Cap foram traduzidas e alinhadas separadamente, usando ClustalW com penalidades de abertura e extensão de gap de 5 e 1, respectivamente. As análises filogenéticas foram conduzidas usando o método de máxima verossimilhança do MEGA6.

Figura 16 - Mapa do genoma do unismacovírus associado a *Diaemus youngi*. Os genes que codificam a proteína de iniciação da replicação (Rep) e a proteína do capsídeo (Cap) são mostrados com setas vermelhas e azuis, respectivamente. A posição do nonanucleotídeo na potencial estrutura haste-alça também é indicada.



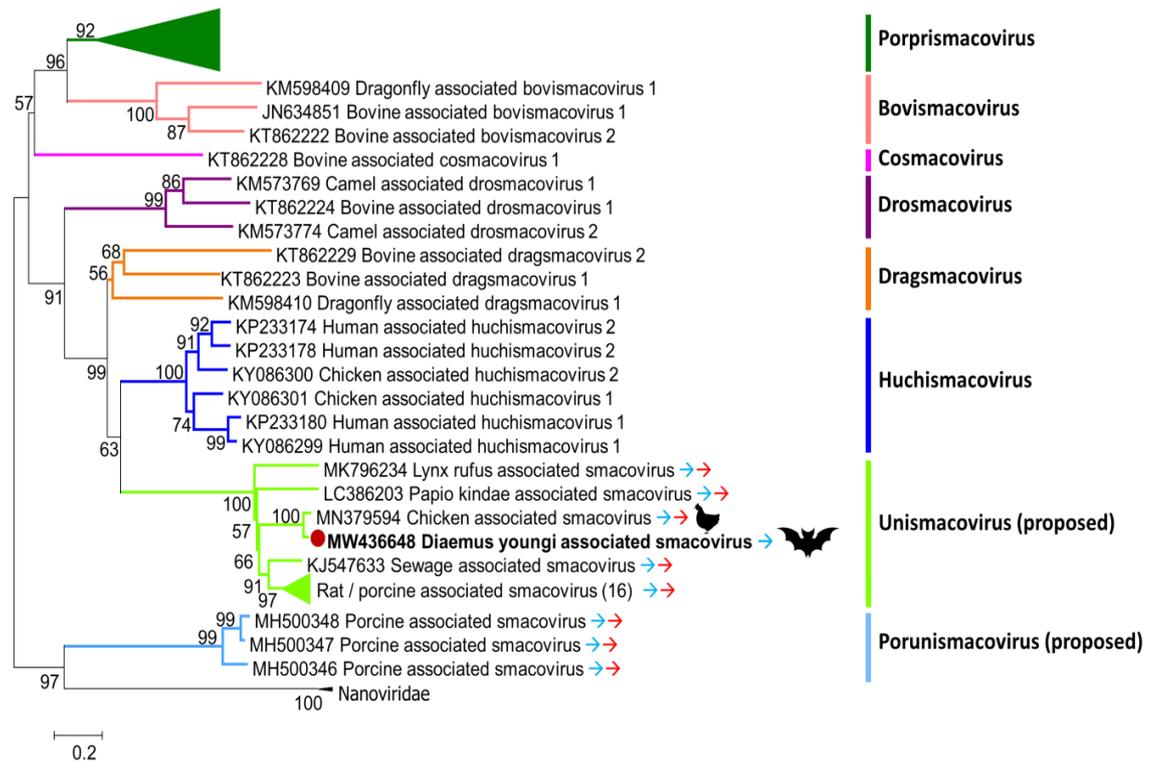
Fonte: autor

A análise filogenética da proteína Rep (Figura 8) mostrou que as sequências derivadas de genomas unisense agruparam-se em dois grupos separados, com altos valores de suporte, sendo um deles altamente divergente e mais próximo do grupo externo. Considerando a alta divergência filogenética, seguindo as diretrizes do ICTV, ambos os grupos poderiam ser classificados como novos gêneros, provisoriamente

nomeados aqui como Unismacovirus (uni = unisense) e Porunismacovirus (por = suíno, uni = unisense). Nossa sequência, denominada isolado DiaemusSV, agrupada dentro do gênero Unismacovirus proposto, juntamente com vírus associados a frango, suíno, roedor, esgoto e outros hospedeiros (Figura 17).

A identidade de aminoácidos Rep pairwise entre os Unismacovirus variou de 58,4 a 100% (Tabela complementar 4), sendo a sequência de smacovirus associado a Chicken (número de acesso MN379594) a mais próxima de DiaemusSV, com 95,3% de identidade. A identidade para gêneros estabelecidos variou de 15,2 a 37,1%, com Porprismacovirus e Huchismacovirus, respectivamente, reforçando nossa hipótese de que ele pertence a um suposto novo gênero.

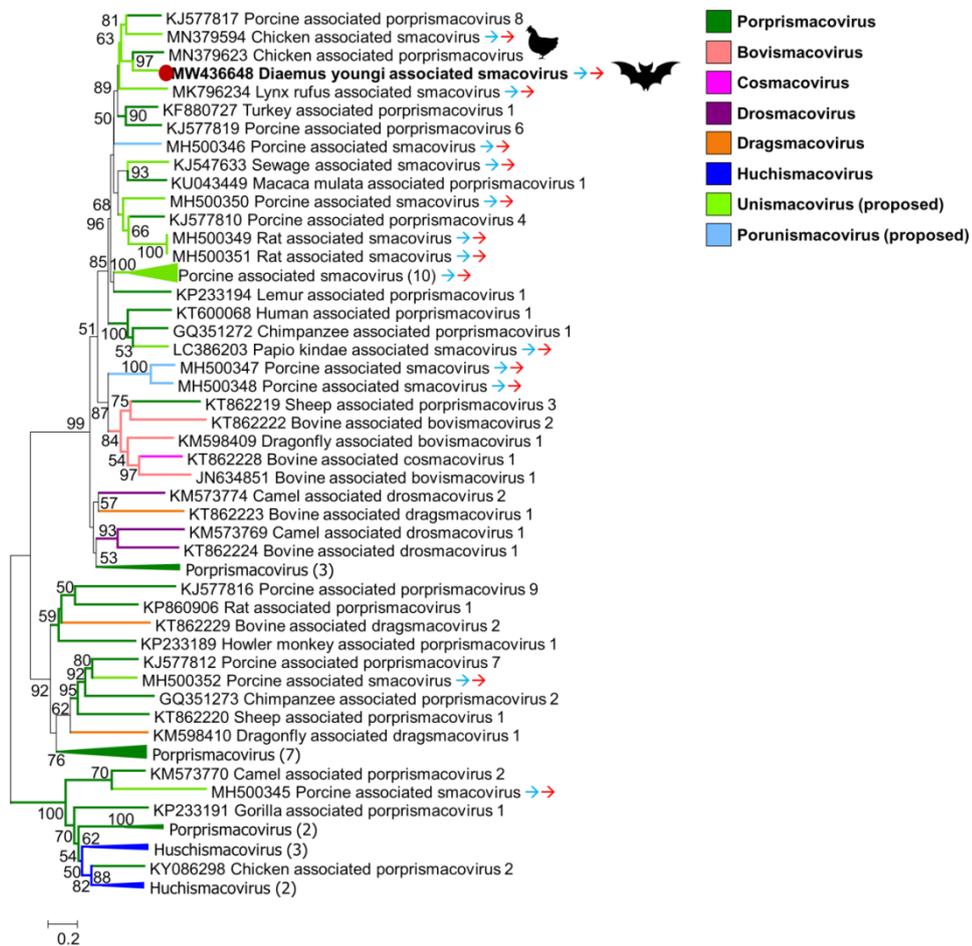
Figura 17 - Análise filogenética de 69 sequências Rep traduzidas de smacovírus. O smacovírus descrito no presente estudo é destacado com um círculo vermelho. As setas azuis e vermelhas indicam os genomas com orientação unisense. A história evolutiva foi inferida por meio do método de Máxima Verossimilhança baseado no modelo LG. Uma distribuição Gama discreta foi usada para modelar as diferenças de taxa evolutiva entre os locais (5 categorias (+ G, parâmetro = 3,4474)). As sequências de aminoácidos do Banana bunchy top virus (NP604483) e do Cardamom bushy anão virus (AHF47677) foram usadas como grupo externo representando a família Nanoviridae. Todas as posições com menos de 95% de cobertura do site foram eliminadas. Havia um total de 196 posições no conjunto de dados final. A árvore é desenhada em escala, com comprimentos de galhos medidos em número de substituições por local. As análises evolutivas foram conduzidas no MEGA6.



Fonte: autor

A análise de Blastn dos resultados do gene Cap isoladamente mostrou que sua identidade era maior com outro smacovírus de galinha isolado nos EUA, 2017 (número de acesso MN379623.1), com 70,18% de identidade em uma cobertura de consulta de 98%. Curiosamente, esta sequência é ambisense. A análise Blastn / blastx do Rep contig parcial (Tabela Suplementar 1) mostrou que era semelhante a um genoma CRESS detectado de um minnow, em 2017, EUA (número de acesso MH617713.1), pelo mesmo grupo de estudo que identificou os smacovírus de galinha descritos acima de. Uma árvore filogenética do Cap traduzido foi construída usando os respectivos genes do conjunto de dados Rep, excluindo as sequências do grupo externo. De maneira semelhante aos resultados da explosão, o DiaemusSV se agrupou intimamente relacionado a um smacovírus de galinha que pertence ao gênero Porprismacovirus. A filogenia Cap (Figura 18) apresentou grande incongruência em relação ao gene Rep, sugerindo frequentes eventos de recombinação. A análise de recombinação não foi realizada devido à necessidade de alinhamento de genomas completos, impossível entre vírus com sentidos opostos.

Figura 18 - Análise filogenética de 69 sequências de cap de smacovírus traduzidas. O smacovírus descrito no presente estudo é destacado com um círculo vermelho. As setas azuis e vermelhas indicam os genomas com orientação unisense. A história evolutiva foi inferida por meio do método de Máxima Verossimilhança baseado no modelo LG. Uma distribuição Gama discreta foi usada para modelar diferenças de taxa evolutiva entre os locais (5 categorias (+ G, parâmetro = 0,8914)). Todas as posições com menos de 95% de cobertura do site foram eliminadas. Havia um total de 216 posições no conjunto de dados final. A árvore é desenhada em escala, com comprimentos de galhos medidos em número de substituições por local. As cores dos ramos representam os gêneros e os números entre parênteses representam as sequências em subárvores compactadas. As análises evolutivas foram conduzidas no MEGA6.



Fonte: autor

5. DISCUSSÃO

O presente estudo analisou o viroma do *Diaemus youngi*, um morcego vampiro que se alimenta de sangue de galinha e é muito difundido na América Latina, embora só recentemente tenha sido observado pela primeira vez no Rio Grande do Sul, Brasil. Até onde sabemos, este é o maior e mais atualizado estudo que analisa a diversidade de vírus do morcego vampiro de asas brancas. Recentemente, um estudo realizado na Guiana Francesa descreveu a diversidade de herpesvírus na mesma espécie de morcego (JAMES *et al.*, 2020), mas curiosamente, esse vírus não foi detectado no presente trabalho.

No presente estudo, pudemos detectar 39 genomas completos ou sequências parciais relacionadas a vírus, a maioria deles vírus circulares de DNA pertencentes às famílias Anelloviridae, Genomoviridae, Circoviridae e Smacoviridae, e também genomas de RNA pertencentes à família Paramyxoviridae. Uma possível explicação para a prevalência de vírus ssDNA circulares pode ser, como sugerido anteriormente (ROSARIO *et al.*, 2012), o chamado 'estilo de vida mínimo' parece em algumas espécies animais e ambientes. Os vírus ssDNA, especialmente com genomas circulares, parecem ser comuns em algumas espécies e ambientes animais; Os vírus torque teno, por exemplo, são o componente mais abundante do viroma humano (DE VLAMINCK *et al.*, 2013).

Dentro dos anelovírus, detectamos cinco novas espécies dentro do Sigmatorquevirus proposto anteriormente (CIBULSKI *et al.*, 2014; DE SOUZA *et al.*, 2018a), um gênero ainda não reconhecido pelo comitê taxonômico. Membros desse grupo foram descritos pela primeira vez a partir de órgãos de um morcego *Tadarida brasiliensis* também detectado no Estado do Rio Grande do Sul, em 2013 (CIBULSKI *et al.*, 2014). Posteriormente, vírus semelhantes foram descritos em gambás (*Didelphis albiventris*) e morcegos (*D. rotundus* e *Carollia perspicillata*) da região Sudeste do Brasil e o gênero Sigma foi proposto (DE SOUZA *et al.*, 2018a). No presente estudo, três anelovírus foram altamente divergentes e um novo gênero denominado Rhotorquevirus foi proposto. Considerando os valores da matriz de distância, também propusemos duas espécies diferentes, denominadas Torque teno *diaemus youngi* vírus 6 e 7. Nossos resultados destacam a prevalência de torque teno vírus no viroma do morcego vampiro de asa branca.

Em 2018, a proteína circular de iniciação de replicação que codifica vírus de DNA de fita simples (CRESS) associados a hospedeiros eucarióticos foram classificados pelo ICTV em seis famílias, a saber, Circoviridae, Genomoviridae, Geminiviridae, Nanoviridae e os recém-adicionados Bacilladnaviridae e Smacoviridae. Atualmente composto por nove gêneros e 73 espécies, o Genomoviridae é uma família encontrada em uma ampla gama de fluidos corporais, tecidos, organismos e ambientes e, até o momento, não há evidências de patogênese associada. Assim, os vírus genomoviridae são geralmente nomeados de acordo com sua fonte como "associados à fonte" e esta nomenclatura será usada aqui. Os genomovírus têm uma organização genômica ambisense com duas ORFs principais arranjadas inversamente que codificam o gene da proteína associada à replicação (Rep) e o gene da proteína capsídeo (Cap). Uma estrutura de haste-alça conservada, necessária para a replicação viral, está localizada entre as extremidades 5' das duas ORFs principais.

Até onde sabemos, esta é a primeira detecção de um genomovírus em morcegos de asas brancas e a primeira detecção de Gemykrogvírus em morcegos. Membros desta família já foram detectados espécies de morcegos insetívoros e frugívoros: Gemycirculavirus foi detectado no morcego de folha redonda intermediária (*Hipposideros larvatus*) na China, 2016 (não publicado), no morcego voador do Pacífico (*Pteropus tonganus*), em Tonga, 2015 (MALE *et al.*, 2016) e em morcego de asa dobrada oriental (*Miniopterus fuliginosus*) na China, 2012 (WU *et al.*, 2016); Gemykibivirus foi descrito no morcego-ferradura (*Rhinolophus ferrumequinum*), China, 2013 (WU *et al.*, 2016) e em um morcego brasileiro de cauda livre (*Tadarida brasiliensis*) na Argentina, 2006.

O genoma completo do gemykrogvírus detectado foi surpreendentemente semelhante (94,1% de identidade de pares em todo o genoma) a um vírus previamente descrito nas fezes de um panda gigante cativo saudável, em 2017, China (ZHANG *et al.*, 2017). Outros gemykrogvírus relacionados à nossa sequência foram detectados em esgotos, bovinos, aves e renas. É improvável, porém, que o vírus tenha sido adquirido diretamente da fonte alimentar dos morcegos (sangue de galinha), mas muito provavelmente de uma fonte alimentar comum encontrada no meio ambiente, considerando que os genomovírus foram encontrados em uma ampla variedade de organismos e ambientes. Até o momento, apenas fungos foram encontrados como

hospedeiros definitivos de um genomovírus do gênero Gemycirculavirus (YU *et al.*, 2010). Considerando que nossa amostra foi um pool de órgãos, incluindo intestinos, podemos supor se a fonte foi tecido animal ou se estava presente apenas na matéria fecal.

Os smacovírus foram detectados pela primeira vez em fezes de chimpanzé de vida selvagem (BLINKOVA *et al.*, 2010), sendo posteriormente descritos em fezes de porcos saudáveis e diarreicos (CHEUNG *et al.*, 2015), gado (KIM *et al.*, 2012), aves (LIMA *et al.*, 2017), humanos (NG *et al.*, 2015), bem como insetos. Embora se acredite que esses vírus infectem eucariotos, seu hospedeiro real ainda não foi confirmado. Até agora, apenas o archaeon fecal *Candidatus Methanomassiliicoccus intestinalis* mostrou ser um candidato a hospedeiro (DÍEZ-VILLASEÑOR; RODRIGUEZ-VALERA, 2019). Resta, entretanto, ser estabelecido se os smacovírus infectam células de mamíferos, causando doenças ou não.

A família Smacoviridae é atualmente classificada em seis gêneros. Os smacovírus têm genomas de 2,3-2,9 kb, contendo duas ORFs principais, codificando as proteínas Rep e Cap, normalmente em uma organização ambisense, embora genomas unisense tenham sido relatados (ANINDITA *et al.*, 2019). A diversidade genética observada dentro dos smacovírus pode ser devido a altas taxas de mutação e eventos de recombinação intrafamiliar em seus genomas (VARSANI; KRUPOVIC, 2017). Os genomas Unisense não foram, até onde sabemos, não classificados e nem mais caracterizados até agora, provavelmente devido às limitações de alinhamento de todo o genoma necessárias para a análise. Assim, procuramos analisar os Repls e Caps traduzidos separadamente. A análise filogenética da proteína Rep mostrou que as sequências derivadas de genomas unisense agruparam-se em dois grupos distintos, com altos valores de suporte, sendo um deles altamente divergente e mais próximo do grupo externo. Sugerimos a classificação de dois novos gêneros, provisoriamente nomeados aqui como Unismacovirus (uni = unisense) e Porunismacovirus (por = suíno, uni = unisense). Uma vez que a delimitação em espécies requer um alinhamento par a par do genoma, não poderíamos realizar esta análise, nem a análise de recombinação, com nossos dados. A presença de genomas unisense de smacovírus deve ser levada em consideração em outros critérios de classificação.

Os morcegos foram recentemente reconhecidos como uma ameaça potencial de propagação de vírus devido à pandemia de coronavírus causada pelo SARS-CoV-2, depois que foi revelado que os vírus mais intimamente relacionados ao SARS-CoV-2 eram de origem morcego (ZHOU *et al.*, 2020). Notavelmente, os morcegos também hospedam os principais paramixovírus de mamíferos, incluindo os vírus Nipah e Hendra, membros do gênero Henipavirus e responsáveis por surtos respiratórios altamente transmissíveis e letais. Recentemente, três novos gêneros de ortoparamixovírus foram criados pelo ICTV (<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>) - Jeilongvirus, Narmovirus e Salemvirus - enquanto centenas de "bat paramyxovírus" não classificados estão sendo carregados para o banco de dados GenBank e cada vez mais sendo relatado em todo o mundo (CIBULSKI *et al.*, 2020; JANG *et al.*, 2020; NOH *et al.*, 2018). Um cluster de paramixovírus de morcego foi proposto como um novo gênero denominado Shaanvirus (WU *et al.*, 2016) e, juntamente com o gênero Jeilongvirus, eles abrangem uma grande quantidade de vírus associados a morcegos e roedores. No presente estudo, detectamos três sequências parciais das proteínas L, M e F de um paramixovírus de morcego. O gene L codifica a proteína polimerase e é o gene mais conservado dos paramixovírus, sendo comumente utilizado para classificação. A árvore filogenética da proteína L parcial mostrou que ela pertence a um paramixovírus altamente divergente dentro da família Orthoparamyxovirinae, que não pôde ser mais classificado. Os genes M e F são conhecidos por serem mais variáveis, o que explica a incongruência das filogenias entre os três fragmentos. Novas tentativas de amplificar e sequenciar um fragmento maior do gene L e dos genes restantes são necessárias para a elucidação da classificação desse paramixovírus altamente divergente.

6. CONCLUSÕES

Ao realizar estudos sobre vírus em animais silvestres buscamos conhecer não só a diversidade, mas também identificar espécies com potencial patogênico para animais e humanos, de maneira a contribuir nas ações de mitigação, prevenção e estratégias de controle dos planos de saúde pública e sanidade animal no país.

No Brasil, estudos sobre associações entre morcegos e vírus ainda são pouco estudados, apesar das iniciativas que percorrem os laboratórios de virologia nas universidades não há estudos dirigidos de longa duração, visando investigar o papel dos morcegos hematófagos na disseminação de doenças virais.

Este é o primeiro estudo no país que buscou analisar o viroma de *Diaemus youngi* que, apesar de rara, possui ampla distribuição geográfica e tem grande potencial para dispersar patógenos e causar prejuízos a cadeia de produção de aves, onde o Brasil ocupa o terceiro lugar como produtor.

Neste estudo várias descobertas importantes foram realizadas, cabendo destacar a proposição de um novo gênero (*Rhotorquevirus*) e a descoberta sete novas espécies de vírus da família *Anelloviridae*. Ainda foram descritas pela primeira vez em *D. youngi* novas espécies de vírus das famílias *Genomoviridae* e *Scmacoviridae*. Além disto, diferentes paramixovírus foram encontrados, entretanto outros estudos são necessários para identificá-los.

Não foram detectados vírus com potencial risco a saúde humana e animal neste estudo, entretanto é extremamente importante a continuidade de investigação e de pesquisas ao longo do tempo sobre a espécie, visto o potencial como reservatório de zoonoses.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, L. M.; CAMARGO, W. R.; PORTELLA, A. S. Occurrence of white-winged vampire bat, *Diaemus youngi* (Mammalia, Chiroptera), in the Cerrado of Distrito Federal, Brazil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 23, n. 3, p. 893-896, 2006.
- AGUIAR, L. de M. A. Subfamília Desmodontinae - Capítulo 3. *In*: REIS, N. R. dos *et al* (eds.). **Morcegos do Brasil**. Universidade Estadual de Londrina, Londrina: UNESP, 2007.
- AGNARSSON, I. *et al*. A time-calibrated species-level phylogeny of bats (Chiroptera, Mammalia). **PLoS Currents**, v. 3, RRN1212, 2011.
- ALLENDORF, S. D. *et al*. Rabies virus distribution in tissues and molecular characterization of strains from naturally infected non-hematophagous bats. **Virus Research**, v. 165, p.119–125, 2012.
- ALMEIDA, A. C. *et al*. Phylogenetic analysis of near full-length sequences of the *Desmodus rotundus* genetic lineage of rabies virus. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, v. 80, p.1-10, 2020.
- ALTIZER, S. *et al*. Climate Change and Infectious Diseases: From Evidence to a Predictive Framework. **Science**, v. 341, p.514–519, 2013.
- AMMAN, B. R. *et al*. Isolation of Angola-like Marburg virus from Egyptian rousette bats from West Africa. **Nature Communications**, v. 11, p. 510, 2020.
- ANINDITA, P. D. *et al*. Discovery and genetic characterization of diverse smacoviruses in Zambian non-human primates. **Scientific Reports**, v. 9, n.1, p.1-10, 2019.
- ANTHONY, S. J. *et al*. Further Evidence for Bats as the Evolutionary Source of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus. **American Society for Microbiology**, v. 8, n.2, p.1-13, 2017.
- ARAÚJO, J. de *et al*. Detection of hantavirus in bats from remaining rain forest in São Paulo, Brazil. Report, **BMC Research Notes**, v. 5, .n 690, p. 1-4, 2012.
- ASANO, K. M. *et al*. Group A rotavirus in Brazilian bats: description of novel T15 and H15 genotypes. **Archives of Virology**, v. 161, n. 11, p. 3225–3230, 2016.
- BANERJEE, A. *et al*. Bats and Coronaviruses. **Viruses**, v. 11, n.1., p. 1-15, 2019.
- BANYARD, A. C. *et al*. Lyssaviruses and Bats: Emergence and Zoonotic Threat. **Viruses**, v. 6, n. 8, p. 2974–2990, 2014.
- BARQUEZ, R. *et al*. *Desmodus rotundus*. **The IUCN Red List of Threatened Species**, 2015. Disponível em: <<https://www.iucnredlist.org/species/6510/21979045>>. Acesso em: 27 mar. 2019.

- BAROCH, J. A.; C. A. GAGNON; S. LACOUTURE; M. GOTTSCHALK. Exposure of feral swine (*Sus scrofa*) in the United States to selected pathogens. **Canadian Journal of Veterinary Research** , v. 79, n. 1, p.74–78, 2015.
- BANKEVICH, A. *et al.* SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. **Journal of computational biology**, v. 19, n.5, p. 455–477, 2012.
- BENVENUTO, D. *et al.* The 2019-new coronavirus epidemic: Evidence for virus evolution. **Journal of Medical Virology**, v. 92, n.2, p. 455–459, 2020.
- BERGNER, L. M.; ORTON, R. J.; STREICKER, D. G.. Complete Genome Sequence of an Alphacoronavirus from Common Vampire Bats in Peru. **Microbiology Resource Announcements**, v. 9, n. 34, p.1-3 , 2020.
- BERNARDES FILHO, F. *et al.* Multiple lesions by vampire bat bites in a patient in Niterói, Brazil - Case report. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 89, n.2., p. 340–343, 2014.
- BLINKOVA, O. *et al.* Novel circular DNA viruses in stool samples of wild-living chimpanzees. **The Journal of general virology**, v. 91, n. 1, p. 74-86, 2010.
- BOTTO NUÑEZ, G; BECKER, D. J.; PLOWRIGHT, R.K. The emergence of vampire bat rabies in Uruguay within a historical context. **Epidemiology and Infection**, v. 147, p. 1-8, 2019.
- BOYLES, JUSTIN G. *et al.* Economic importance of bats in agriculture. **Science**, v. 332, n. 6025, p. 41-42, 2011.
- BRANDÃO, P. E. *et al.* A coronavirus detected in the vampire bat *Desmodus rotundus*. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 12, n.6, p.466–468, 2008.
- BREDT, A. *et al.* **Morcegos em Áreas Urbanas e Rurais: manual de manejo e controle**. Brasília. Fundação Nacional de Saúde, 117 p.il., 1998.
- CALISHER, C.H. *et al.* Bats: important reservoir hosts of emerging viruses. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n.3, p. 531-545, 2006.
- CANDELA, M. G.; CABALLOL, A.; ATANCE, P. M.. Wide exposure to *Coxiella burnetii* in ruminant and feline species living in a natural environment: zoonoses in a human–livestock–wildlife interface. **Epidemiology & Infection**, v. 145, n.3, p. 478–481, 2017.
- CASTILHO, J. G. *et al.* A Comparative Study of Rabies Virus Isolates from Hematophagous Bats in Brazil. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 46, n. 4, p.1335–1339, 2010.
- CHEN, L. *et al.* 2014. DBatVir: the database of bat-associated viruses. **Database**, 2014.

- CHEUNG, A.K. *et al.* 2015. Identification of several clades of novel single-stranded circular DNA viruses with conserved stem-loop structures in pig feces. **Archiv Virology**, v. 160, n. 1, p. 353–358.
- CHUA, K. B. *et al.* Nipah virus: a recently emergent deadly paramyxovirus. **Science**. v. 288, n. 5470, p.1432-1435, 2000.
- CIBULSKI, S. P. *et al.* A Novel Anelloviridae species detected in *Tadarida brasiliensis* bats: First sequence of a chiropteran Anellovirus. **Genome Announcements**. v. 2, n. 5, p. e01028-14, 2014.
- CIBULSKI, S. P. *et al.* Detection of multiple viruses in oropharyngeal samples from Brazilian free-tailed bats (*Tadarida brasiliensis*) using viral metagenomics. **Archives of Virology**. v. 166, n. 1, p.207-212, 2020.
- CISTERNA, D. *et al.* Antigenic and molecular characterization of rabies virus in Argentina. **Virus Research**. v.109, n. 2, p.139-47, 2005.
- CONSTANTINE, D. G. Geographic translocation of bats: known and potential problems. **Emerging Infectious Diseases**. v. 9, n.1, p.17–21, 2003.
- COSTA, L. de M. *et al.* Ocorrência de *Diaemus youngi* (Jentink, 1893), Chiroptera, no Estado do Rio de Janeiro. **Biota Neotropical**, v. 8, n. 1, p. 1-4, 2008.
- CUI, J.; LI, F.; SHI, Z.L. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. **Nature Reviews Microbiol**, v.17, n. 3, p.181-192, 2019
- DANTAS-TORRES, F. Bats and their role in human rabies epidemiology in the Americas. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 14, n.2, p. 193-202, 2008.
- DE LIMA, F. E. de S. *et al.* First detection of adenovirus in the vampire bat (*Desmodus rotundus*) in Brazil. **Virus Genes**, v. 47, n.2. p. 378–381, 2013.
- DE SOUZA, W.M. *et al.* Discovery of novel anelloviruses in small mammals expands the host range and diversity of the Anelloviridae. **Virology**, v. 514, p. 9–17. 2018a.
- DE SALES LIMA, F. E., S. P. *et al.* Genomic characterization of two novel polyomaviruses in Brazilian insectivorous bats. **Archives of Virology**, v. 160, n. 7, p. 1831–1836, 2015.
- DE VLAMINCK, I. *et al.* Temporal response of the human virome to immunosuppression and antiviral therapy. **Cell**, v. 155, n. 5, p. 1178–1187, 2013.
- DÍEZ-VILLASEÑOR, C.; RODRIGUEZ-VALERA, F. CRISPR analysis suggests that small circular single-stranded DNA smacoviruses infect Archaea instead of humans. **Natura Communications**, v. 10, n.1, p. 1-9, 2019.
- DREXLER, J. F. *et al.* Henipavirus RNA in African bats. **PloS One**, v. 4, n. 7, p. 1-5, 2009.

DREXLER, J.F. *et al.* 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. **Journal of Virology**, v. 84, n. 21, p.11336-11349, 2010.

DREXLER, J. F. *et al.* Bats host major mammalian paramyxoviruses. **Nature Communications**, v. 3, p.1–12, 2012.

ESCALERA-ZAMUDIO, M. *et al.* A novel endogenous betaretrovirus in the common vampire bat (*Desmodus rotundus*) suggests multiple independent infection and cross-species transmission events. **Journal of Virology**, v. 89, n.9, p.5180–5184, 2015.

ESCALERA-ZAMUDIO, M. *et al.* Bats, Primates, and the Evolutionary Origins and Diversification of Mammalian Gammaherpesviruses. **mBio**, v. 7, n.6, p. 1-9, 2016.

ESCALERA-ZAMUDIO, M. *et al.* Viral Communities Among Sympatric Vampire Bats and Cattle. **EcoHealth**, v. 15, n.1, p.132–142, 2018.

FAGROUCH, Z. *et al.* Novel polyomaviruses in South American bats and their relationship to other members of the family Polyomaviridae. **Journal of General Virology**, v. 93, n. 12, p. 2652–2657, 2012.

FAHL, W. O. *et al.* Rabia transmitida por murciélagos en Brasil. **Acta biológica Colombiana**, v. 20, n. 3, p. 21-35, 2015.

FISCHER, K. *et al.* Insectivorous bats carry host specific astroviruses and coronaviruses across different regions in Germany. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 37, p. 108–116, 2016.

FISHER, C.R.; STREICKER, D.G.; SCHNELL, M.J. The spread and evolution of rabies virus: conquering new frontiers. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 4, p. 241-255, 2018.

FORBES, K.M. *et al.* Bombali Virus in *Mops condylurus* Bat, Kenya. **Emerging Infected Disease**, v. 25, n. 5, p. 955-957, 2019.

FOOKS, A. R. *et al.* Rabies. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, p.1–19, 2017.

FRANCO FILHO, L. C. *et al.* Complete Endogenous Retrovirus Genome Sequence from a Brazilian Vampire Bat (*Desmodus rotundus*). **Microbiology Resource Announcements**, v. 8, n. 2, p. e01497-18 2019.

FREDRIKSSON-AHOMAA, M. Wild Boar: A Reservoir of Foodborne Zoonoses. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 16, n. 3, p.153–165, 2019.

GALETTI, M. *et al.* Liquid lunch - vampire bats feed on invasive feral pigs and other ungulates. **Frontiers in Ecology and the Environment**, v. 14, n. 9, p. 505–506. 2016.

GARBINO, G.S.T., et al. **Updated checklist of Brazilian bats: versão 2020**. Comitê da Lista de Morcegos do Brasil—CLMB. Sociedade Brasileira para o Estudo de

Quirópteros (Sbeq).Disponível em: <<https://www.sbeq.net/lista-de-especies>>. Acesso em:21/02/2021.

GOLDSTEIN, T. *et al.* The discovery of Bombali virus adds further support for bats as hosts of ebolaviruses. **Nature Microbiology**, v. 3, n. 10, p.1084-1089, 2018.

GOODWIN, G. G.; GREENHALL, A. M. A review of the bats of Trinidad and Tobago: descriptions, rabies infection, and ecology. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 122, p. 187-302, 1961.

GÖTZ, S. *et al.* High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. **Nucleic acids research**, v. 36, n. 10, p. 3420–3435, 2008.

GREENHALL, A. M.; SCHUTT Jr, W. A. *Diaemus youngi*. **Mammalian Species**, v. 533, p.1-7, 1996.

GUARINO, H. *et al.* Antigenic and genetic characterization of rabies virus isolates from Uruguay. **Virus Research**, v. 173, n. 2, p.415–420, 2013.

GUY, C. *et al.* Phylogeny matters: revisiting “a comparison of bats and rodents as reservoirs of zoonotic viruses.” **Royal Society Open Science**, v. 6, n. 2, p. 1-14, 2019.

HAYES, M. A.; PIAGGIO, A. J. Assessing the potential impacts of a changing climate on the distribution of a rabies virus vector. **Plos One**, v.13, n.2, p. 1-17, 2018.

HAYMAN, D.T *et al.* Ecology of Zoonotic Infectious Diseases in Bats: Current Knowledge and Future Directions. **Zoonoses and Public Health**, v. 60, n. 1, p 2–21, 2013.

HAYMAN, D. T. S. Bats as Viral Reservoirs. **Annual Review of Virology**, v.3, n.1, p.v77–99, 2016.

HUBÁLEK, Z., *et al.* A Serologic Survey for Some Bacterial and Viral Zoonoses in Game Animals in the Czech Republic. **Journal of Wildlife Diseases**,v. 29, n.4, p. 604–607, 1993.

HUGHES, G. J.; ORCIARI, L. A.; RUPPRECHT, C. E. Evolutionary timescale of rabies virus adaptation to North American bats inferred from the substitution rate of the nucleoprotein gene. **Journal of General Virology**, v. 86, p. 1467–1474, 2005.

ITO, F.; BERNARD, E.; TORRES, R. A. What is for dinner? First report of human blood in the diet of the hairy-legged vampire bat *Diphylla ecaudata*. **Acta Chiropterologica**, v.18, n.2, p. 509- 515, 2016.

JAENSON, T. G. T. *et al.* The importance of wildlife in the ecology and epidemiology of the TBE virus in Sweden: incidence of human TBE correlates with abundance of deer and hares. **Parasites & Vectors**, v. 11, n. 1, p. 1-18, 2018.

JACOB, S.T. *et al.* Ebola virus disease. **Nature Public Review Disease Primers**, v. 6, n.1, p. 1-21, 2020.

- JAMES, S. Novel herpesviruses in neotropical bats and their relationship with other members of the Herpesviridae family. **Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases**, v. 84, p. 1-23, 2020.
- JANG, S.S. *et al.* The Epidemiological Characteristics of the Korean Bat Paramyxovirus between 2016 and 2019. **Microorganisms**, v. 8, n. 6, p. 1-10, 2020.
- JONES, K. *et al.* Global trends in emerging infectious diseases. *Nature*, v. 451, p.990–993, 2008.
- JR, G. S. *et al.* Natural infection of Neotropical bats with hantavirus in Brazil. *Scientific Reports*, v. 8, n. 1, p.1–8, 2018.
- KAJIHARA, M. *et al.* Marburgvirus in Egyptian Fruit Bats, Zambia. **Emerging Infectious Diseases**, v. 25, n.8, p.1577–1580, 2019.
- KARAN, L.S. *et al.* Bombali Virus in *Mops condylurus* bats, Guinea. **Emerging Infected Diseases**, v. 25, n. 9, p. 1774–1775, 2019.
- KGALADI, J. *et al.* Diversity and Epidemiology of Mokola Virus. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 10, p. 1-11, 2013.
- KIM, H.K. *et al.* Identification of a novel single-stranded, circular DNA virus from bovine stool. **Journal of General Virology**, v. 93, n. 3, p. 635–639, 2012.
- KNOW, M.;GARDNER, A. L. Subfamily Desmodontinae J. A. Wagner, 1840. *In*: GARDNER, A.L. **Mammals of South America, Volume 1, marsupials, xenarthrans, shrews, and bats**. Chicago: University of Chicago Press, 2008, 669 p.
- KOBAYASHI, Y. *et al.* Genetic diversity of bat rabies viruses in Brazil. **Archives of Virology**, v. 152, n. 11, p. 1995-2004, 2007.
- KOTAIT, Ivanete. Infecção de morcegos pelo vírus da raiva. **Boletim Instituto Pasteur**, São Paulo, v. 1, n. 2, p. 51-58,1996.
- KUHN, J. H. *et al.* ICTV Virus Taxonomy Profile: Filoviridae. *The Journal of General Virology*, v. 100, p. 911–912, 2019.
- KUNZ, T. H. *et al.* Ecosystem services provided by bats. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1223, p. 1–38, 2011.
- KUZMIN, I. V. *et al.* Marburg Virus in Fruit Bat, Kenya. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n.2, p. 352-354, 2010.
- LAFFERTY, K. D. The ecology of climate change and infectious diseases. **Ecology**, v. 90, n. 4, p. 888-900, 2009.
- LAMA, J. K., ; BACHOON, D. S. Detection of *Brucella suis*, *Campylobacter jejuni*, and *Escherichia coli* Strains in Feral Pig (*Sus scrofa*) Communities of Georgia. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 18, n. 17, p. 50–355, 2018.

- LARKIN, M.A. *et al.* 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, v. 23, n. 21, p. 2947–2948.
- LLANOS-SOTO, S; GONZÁLEZ-ACUÑA, D. Conocimiento acerca de los patógenos virales y bacterianos presentes en mamíferos silvestres en Chile: una revisión sistemática [Knowledge about viral and bacterial pathogens present in wild mammals in Chile: a systematic review]. **Revista Chilena Infectología**, v. 36, n. p. 43-67, 2019
- LARSKA, M. *et al.* Hepatitis E Virus Antibody Prevalence in Wildlife in Poland. **Zoonoses and Public Health**, v. 62, n.2, p. 105–110, 2015.
- LAU, S.K. *et al.* Severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in Chinese horseshoe bats. **Proceedings of National Academy of Science of the United States of America**, v. 102, n. 39, p. 14040-14045, 2005.
- LEROY, E.M. *et al.* Fruit bats as reservoirs of Ebola virus. **Nature**, v. 438, n. 7068, p. 575-6, 2005.
- LEE, D. N.; PAPEŞ, M.; VAN DEN BUSSCHE, R. A. Present and Potential Future Distribution of Common Vampire Bats in the Americas and the Associated Risk to Cattle. **PLoS ONE** , v. 7, n. 8, p. 1-9, 2012.
- LI, W. *et al.* Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses. **Science**. v. 310, n. 5748, p.676-679, 2005.
- LIM, YX *et al.* Human Coronaviruses: A Review of Virus-Host Interactions. **Diseases**, v. 4, n. 3, p. 1-28, 2016.
- LIMA, D.A. *et al.* Faecal virome of healthy chickens reveals a large diversity of the eukaryote viral community, including novel circular ssDNA viruses. **Journal of General Virology**, v. 98, n. 4, p. 690–703, 2017.
- LUIS, A. D. *et al.* A comparison of bats and rodents as reservoirs of zoonotic viruses: are bats special? **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 280, n. 1756, p. 1-9, 2013.
- LUK, H.K.H. *et al.* Molecular epidemiology, evolution and phylogeny of SARS coronavirus. **Infection Genetic Evolution**, n. 71, p. 1-11, 2019.
- Male, M.F. *et al.* Cycloviruses, gemycircularviruses and other novel replication-associated protein encoding circular viruses in Pacific flying fox (*Pteropus tonganus*) faeces. **Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, v. 39, p. 279–292. 2016.
- MARKOTTER, W.; COERTSE, J. Bat lyssaviruses. **Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)**, v. 37, n. 2, p. 385-400, 2018.
- MARSTON, D. A. *et al.* Ikoma Lyssavirus, Highly Divergent Novel Lyssavirus in an African Civet1. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, n. 4, p. 664–667, 2012.

- MONTAGNARO, S. *et al.* Viral and Antibody Prevalence of Hepatitis E in European Wild Boars (*Sus scrofa*) and Hunters at Zoonotic Risk in the Latium Region. **Journal of Comparative Pathology**, v. 153, n. 1, p. 1-8, 2015.
- MORATELLI, R.; CALISHER, C. H. Bats and zoonotic viruses: can we confidently link bats with emerging deadly viruses? **Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 1, p.1–22, 2015.
- NADIN-DAVES, SUSAN. Molecular epidemiology, p. 143. *In*: Fooks, Anthony; Jackson, Alan C. (eds) **Rabies: scientific basis of the disease and its management**. 4 ed. Academic Press, 2020.
- NAVARRO-GONZALEZ, N. *et al.* Campylobacter Shared Between Free-Ranging Cattle and Sympatric Wild Ungulates in a Natural Environment (NE Spain). **EcoHealth**, v. 11, n. 3, 333–342, 2014.
- NG, T.F.F. A diverse group of small circular ssDNA viral genomes in human and non-human primate stools. **Virus evolution**, v.1, n.1, p. 1-12, 2015.
- NIETO-RABIELA, F. *et al.* Viral networks and detection of potential zoonotic viruses in bats and rodents: A worldwide analysis. **Zoonoses and Public Health**, v. 66, n. 6, p. 655–666, 2019.
- NOGUEIRA, M. R. *et al.* Checklist of Brazilian bats, with comments on original records. **Check List**, v. 10, n. 4, p. 808–821, 2014.
- NOH, J.Y. *et al.* Isolation and characterization of novel bat paramyxovirus B16-40 potentially belonging to the proposed genus Shaanvirus. **Sci Rep**, v. 8, n. 1, p. 1-9, 2018.
- OLIVAL, K. J. *et al.* Population genetics of fruit bat reservoir informs the dynamics, distribution and diversity of Nipah virus. **Molecular Ecology**, v. 29, n. 5, p. 970–985, 2020.
- OLIVEIRA, G. R. DE; PORTO, G. DA S.; LIMA, I. P. DE. 2017. Subfamília Desmodontinae. p. 20 -207.p. *In*: REIS, N.R. *et al.* **História Natural dos Morcegos Brasileiros Chave de Identificação de Espécies**. 1. ed. Rio de Janeiro: Technical Books Editora Ltda, 2016, 416p.
- OLIVEIRA, I. D. de *et al.* PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DA RAIVA NO BRASIL DE 2010 a 2019. *Revista de Patologia do Tocantins*, v, 7, p. 42–46, 2020.
- PASSOS, F. C. *et al.* Morcegos da Região Sul do Brasil: análise comparativa da riqueza de espécies, novos registros e atualizações nomenclaturais (Mammalia, Chiroptera). *Iheringia, Série Zoologia*, v. 100, p. 25–34, 2010.
- PAWAN, J. L. The transmission of paralytic rabies in rindad by vampire bat (*Desmodus rotundus murinus* Wagner, 1840). **Annals Tropical Medicine Parasitology**, v. 30, p. 101-130, 1936.

- PAWĘSKA, J. T. *et al.* Shedding of Marburg Virus in Naturally Infected Egyptian Rousette Bats, South Africa, 2017. **Emerging Infectious Diseases**, v. 26, p. 3051–3055, 2020.
- PERACCHI, A. L. *et al.* Ordem Chiroptera. In: REIS, N. R. dos. **Mamíferos do Brasil**. 2 Ed. Londrina, 439 p., 2011.
- QUAN, P.L. *et al.* Bats are a major natural reservoir for hepaciviruses and pegiviruses. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 20, p. 8194–8199, 2013.
- REIS, N.R. dos *et al* (eds). **Morcegos do Brasil**. Londrina: Nelio R. dos Reis, 153 p., 2007.
- ROSARIO, K.; DUFFY, S.; BREITBART, M. A field guide to eukaryotic circular single-stranded DNA viruses: insights gained from metagenomics. **Archives of virology**, v. 157, n. 10, p. 1851–1871. 2012.
- RUIZ-FONS, F. A Review of the Current Status of Relevant Zoonotic Pathogens in Wild Swine (*Sus scrofa*) Populations: Changes Modulating the Risk of Transmission to Humans. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 64, n. 1, p. 68–88, 2017.
- RUPPRECHT, C. E.; TURMELLE, A.; V. KUZMIN, I. A perspective on lyssavirus emergence and perpetuation. **Current Opinion in Virology**, v. 1, n. 6, p. 662–670, 2011.
- RUPPRECHT, C.; KUZMIN, I.; MESLIN, F. Lyssaviruses and rabies: current conundrums, concerns, contradictions and controversies. **F1000Research**, v. 6, n. 184, p. 1-22, 2017.
- SABINO-SANTOS, G. JR; *et al.* Evidence of hantavirus infection among bats in Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 93, n. 2, p. 401-406, 2015.
- SALATA, C. *et al.* Coronaviruses: a paradigm of new emerging zoonotic diseases. **Pathogens and Disease**, v. 77, n.9, p. 1-5, 2019.
- SALMIER, A. *et al.* Virome analysis of two sympatric bat species (*Desmodus rotundus* and *Molossus molossus*) in French Guiana. **PLOS ONE**, v. 12, n. 11, p. 1-25, 2017.
- SANTORO, M. *et al.* Real-time PCR detection of *Toxoplasma gondii* in tissue samples of wild boars (*Sus scrofa*) from southern Italy reveals high prevalence and parasite load. **Parasites & Vectors**, v. 12, n.1, p. 1-6, 2019.
- SCHIPPER, J. *et al.* The Status of the World’s Land and Marine Mammals: Diversity, Threat, and Knowledge. **Science**, v. 322, p. 225–230, 2008.
- SELVEY, L. A. *et al.* Infection of humans and horses by a newly described morbillivirus. **The Medical Journal of Australia**, v. 162, n. 12, p. 642–645, 1995.
- SHIPLEY, R. *et al.* Rabies virus: defining antigenic requirements for pan-lyssavirus neutralisation. *Access Microbiology*, v. 1, 2019.

- SHORT, E. E.; CAMINADE, C., THOMAS, B. N. Climate Change Contribution to the Emergence or Re-Emergence of Parasitic Diseases. **Infectious Diseases: Research and Treatment**, v. 10, p. 1-7, 2017.
- SMITH, I. *et al.* Identifying Hendra virus diversity in pteropid bats. **PloS One**, v. 6. n. 9, p. 1-8, 2011.
- SMITH, I. ; WANG. L.-F. Bats and their virome: an important source of emerging viruses capable of infecting humans. **Current Opinion in Virology**, v. 3, n.1, p. 84–91, 2013.
- SODRÉ, M.M.S; GAMA, A. R. da; ALMEIDA, M. F. de. Updated list of bat species positive for rabies in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. São Paulo, v. 52, n. 2, p.75-81, 2010.
- SOUZA, W.M. *et al.* Chapparvoviruses occur in at least three vertebrate classes and have a broad biogeographic distribution. **The Journal of General Virology**, v. 98, n.2, p.225–229, 2017.
- SOUZA, W.M. de *et al.* Discovery of novel anelloviruses in small mammals expands the host range and diversity of the Anelloviridae. **Virology** , v. 514, p. 9–17, 2018.
- SOUZA, W. M. de *et al.* Whole-genome sequencing of parvoviruses from wild and domestic animals in Brazil provides new insights into parvovirus distribution and diversity. **bioRxiv**, v. 10, n.4, p. 1-10, 2018.
- SAMBROOK, J., RUSSELL, D.W. Purification of nucleic acids by extraction with phenol:chloroform. **CSH protocols**, v. 2006, n. 1, pdb.prot4455. 2006.
- STREICKER, D. G. *et al.* Host Phylogeny Constrains Cross-Species Emergence and Establishment of Rabies Virus in Bats. **Science**, v. 329, . 5992, p. 676–679, 2010.
- SWANEPOEL, R. *et al.* Studies of Reservoir Hosts for Marburg Virus. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 12, p.1847–1851, 2007.
- TAMURA, K. *et al.* MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular Biologic and Evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725–2729, 2013.
- TEIXEIRA, T. F. *et al.* Diagnóstico de raiva no Rio Grande do Sul, Brasil, de 1985 a 2007. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n. 10, p. 515-520, 2008.
- THURBER, R.V. *et al.* Laboratory procedures to generate viral metagenomes. **Nature Protocols**, v. 4, n. 4, p. 470–483, 2009.
- TOCHETTO, C. *et al.* Viral DNA genomes in sera of farrowing sows with or without stillbirths. **PLOS ONE**, v. 15, n. 3, p. 1-16, 2020.
- TORRES, C. *et al.* Phylodynamics of vampire bat-transmitted rabies in Argentina. **Molecular Ecology**, v. 23, n.9, p. 2340–2352, 2014.

- TONG, S. *et al.* Sensitive and broadly reactive reverse transcription-PCR assays to detect novel paramyxoviruses. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 8, p. 2652–2658, 2008.
- TOWNER, J. S. *et al.* Marburg Virus Infection Detected in a Common African Bat. **PLoS One**, v. 2, n. 8, p. 1-5, 2007.
- TOWNER, J. S. *et al.* Isolation of genetically diverse Marburg viruses from Egyptian fruit bats. **PLoS Pathogens**, v. 5, n.7,p. 1-9, 2009.
- TSAGKOGEOGA, G. *et al.* Phylogenomic analyses elucidate the evolutionary relationships of bats. **Current biology: CB**, v. 23, n. 22, p. 2262–2267, 2013.
- VANMECHELEN, B. *et al.* Discovery and genome characterization of three new Jeilongviruses, a lineage of paramyxoviruses characterized by their unique membrane proteins. **BMC genomics**, v. 19, n. 1, p. 1-6, 2018.
- VARSANI, A.; KRUPOVIC, M. Sequence-based taxonomic framework for the classification of uncultured single-stranded DNA viruses of the family Genomoviridae. **Virus evolution**, v. 3, n. 1, p. 1-14, 2017.
- WACHARAPLUESADEE, S. *et al.* Molecular characterization of Nipah virus from *Pteropus hypomelanus* in Southern Thailand. **Virology Journal**, v 13, n.53, p. 1-7, 2016.
- WADA, M. Y.; ROCHA, S. M.; MAIA-ELKHOURY, A N. S. Situação da raiva no Brasil, 2000 a 2009. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v. 20, n. 4, p. 509-518, 2011.
- WANG, L.F.; ANDERSON, D. E. Viruses in bats and potential spillover to animals and humans. **Current Opinion in Virology**, v. 34, p. 79–89, 2019.
- WITT, A. A. *et al.* Primeiro registro de *Diaemus youngi* (Jentink, 1893) no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Notas sobre Mamíferos Sudamericanos**, v. 1, p.1-7, 2019.
- WONG, A. C. P. *et al.* Global Epidemiology of Bat Coronaviruses. **Viruses**, v. 11, n.2, p.1-17, 2019.
- WOO, P.C.Y. *et al.* Molecular diversity of coronaviruses in bats. **Virology**, v. 351, n. 1, p. 180–187, 2006.
- WRAY, A. K. *et al.* Viral Diversity, Prey Preference, and Bartonella Prevalence in *Desmodus rotundus* in Guatemala. **EcoHealth** , v.13, n. 14, p.761–774, 2016.
- WU, Z. *et al.* Deciphering the bat virome catalog to better understand the ecological diversity of bat viruses and the bat origin of emerging infectious diseases. **The ISME Journal**, v.10, n. 3, p. 609–620 , 2016.
- YU, X. *et al.* A geminivirus-related DNA mycovirus that confers hypovirulence to a plant pathogenic fungus. **PNAS**, v. 107, n 18, p. 8387–8392, 2010.

YUAN, L. *et al.* Evidence for retrovirus and paramyxovirus infection of multiple bat species in china. **Viruses**, v. 6, n. 5, p. 2138–2154, 2014.

YUNG, V.; FAVI, M.; FERNANDEZ, J. Typing of the rabies virus in Chile, 2002–2008. **Epidemiology & Infection**, v. 140, n.12, p. 2157–2162, 2012.

ZARZA, H. *et al.* Geographic distribution of *Desmodus rotundus* in Mexico under current and future climate change scenarios: Implications for bovine paralytic rabies infection. **Veterinaria México OA**, v. 4, n. 3, p.1–16, 2017.

ZHANG, W. *et al.* Virome comparisons in wild-diseased and healthy captive giant pandas. **Microbiome**, v. 5, n. 1, p. 1-19, 2017.

ZHOU, P. *et al.* A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. **Nature**, v. 579, n. 7798, p. 270–273, 2020.

APÊNDICE A

Artigo publicado

Witt, A.A., Alves, R.S., do Canto Olegário, J. et al. The virome of the white-winged vampire bat *Diaemus youngi* is rich in circular DNA viruses. *Virus Genes* (2022). <https://doi.org/10.1007/s11262-022-01897-6>

Classificação CAPES Qualis Periódicos: “A2”