



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E BIOTECNOLOGIA
DA REDE BIONORTE

ECOVIGILÂNCIA MOLECULAR E METAGENÔMICA VIRAL EM MORCEGOS
DE AMBIENTES URBANOS DA AMAZÔNIA.

WANDERCLEYSON UCHÔA ABREU

SANTARÉM-PARÁ

2023

WANDERCLEYSON UCHÔA ABREU

**ECOVIGILÂNCIA MOLECULAR E METAGENÔMICA VIRAL EM MORCEGOS
DE AMBIENTES URBANOS DA AMAZÔNIA.**

Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, na Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Biodiversidade e Biotecnologia.

Orientador(a): Prof. Dr. Luís Reginaldo Ribeiro Rodrigues.

SANTARÉM-PARÁ

FEVEREIRO – 2023

Ficha catalográfica

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

A162e Abreu, Wandercleyson Uchôa.
 Ecovigilância molecular e Metagenômica viral em morcegos de
 ambientes urbanos da Amazônia. / Wandercleyson Uchôa Abreu. — 2023.
 148 f. : il. color.

 Orientador(a): Prof. Dr. Luis Reginaldo Ribeiro Rodrigues Tese
 (Doutorado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de
 Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em
 Biodiversidade e Biotecnologia, Belém, 2023.

 1. Diversidade viral. 2. Sequenciamento de Nova Geração
 – SGN. 3. Morcegos. 4. Metagenômica. I. Título.

CDD 579.209811

WANDERCLEYSON UCHÔA ABREU

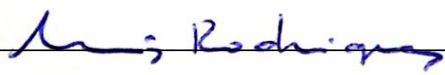
**ECOVIGILÂNCIA MOLECULAR E METAGENÔMICA VIRAL EM
MORCEGOS DE AMBIENTES URBANOS DA AMAZÔNIA.**

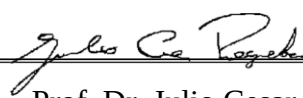
Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, na Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Biodiversidade e Biotecnologia.

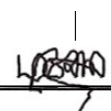
Orientador(a): Prof. Dr. Luís Reginaldo Ribeiro Rodrigues.

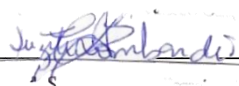
Aprovada em 08/02/2023.

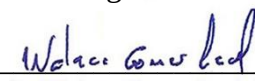
Banca examinadora


Prof. Dr. Luis Reginaldo Ribeiro Rodrigues (Orientador)
Universidade Federal do Pará


Prof. Dr. Julio Cesar Pieczarka
Universidade Federal do Pará


Profª. Drª. Daniele Barbosa de Almeida Medeiros
Instituto Evandro Chagas


Profª. Drª. Suzete Cleusa Ferreira Spina Lombardi
Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo


Prof. Dr. Wallace Gomes Leal
Universidade Federal do Oeste do Pará

AGRADECIMENTOS

Desejo exprimir os meus agradecimentos a todos aqueles que, de alguma forma, permitiram que esta pesquisa pudesse ser realizada.

Em primeiro lugar quero agradecer ao Prof. Dr. Luís Reginaldo Ribeiro Rodrigues, da Universidade Federal do Oeste do Pará por ter aceito ser meu Orientador, nessa longa trajetória de pesquisa, e por ter acreditado em meu potencial.

Agradeço ainda o trato simples, correto e científico, com que sempre abordou as nossas reuniões de trabalho, sem nunca ter permitido que o desalento se instalasse, mesmo quando as coisas não corriam bem.

Agradeço ao meus colegas e parceiros de Laboratório, por me trazer a luz, o conhecimento que sempre me faltava durante à pesquisa, e por possibilitar que eu pudesse aprender tecnologias modernas, para o tipo de pesquisa a qual desenvolvi.

Agradeço ao Centro Universitário da Amazônia – *Campus Santarém*, pela permissão de uso do Zoológico da instituição, para obtenção de exemplares de quirópteros, para minha pesquisa.

Infinitos agradecimentos ao Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo e toda sua equipe, em especial ao Dr. Antônio Charlys da Costa e a doutoranda Vanessa Moraes pela parceria e ajuda primordial dada, para que essa pesquisa fosse consolidada, bem como a Dr. Elcio Leal e sua equipe, da Universidade Federal do Pará, pela generosa contribuição em nosso estudo.

Agradeço à Coordenação do Programa de Pós-Graduação da Rede Bionorte, à Pró-Reitoria de Pesquisa, à Coordenação de Pós-Graduação e Inovação Tecnológica da Universidade do Oeste do Pará e a Fundação Amazônia Paraense de Amparo à Pesquisa – Fapespa, pelo incentivo à pesquisa aos alunos de Doutorado e a concessão da bolsa de pesquisa.

E agradeço eternamente a minha mãe, que tanto me incentiva na busca de crescimento profissional e da minha realização pessoal e sonhos de vida.

“EPÍGRAFE”

“Tudo o que um sonho precisa para ser realizado, é alguém que acredite que ele possa ser realizado.”.

Roberto Shinyashiki

ABREU, Wandercleyson Uchôa. **Ecovigilância Molecular e Metagenômica viral em morcegos de ambientes urbanos da Amazônia**. 2023. 148f. Tese. (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia) – Rede Bionorte – Universidade Federal do Pará.

RESUMO

Estudos acumulados ao longo dos últimos anos, tem mostrado que os morcegos podem abrigar muitos vírus, inclusive espécies de importância médica que podem ser transmitidos a humanos e outros animais, e causar doença. Atualmente, o mundo sofre as consequências de um vírus, cuja origem ainda é desconhecida, porém, indícios tem reportado, como sendo um coronavírus de origem de morcegos. Assim, estudos moleculares e metagenômicos extensivos de amostras biológicas nesses animais, podem revelar um grande número de vírus, tanto aqueles já classificados como também, de vírus novos. Para tanto, com o objetivo de caracterizar molecularmente a diversidade viral de quirópteros da região urbana do Município de Santarém-Pará-Brasil, realizamos um estudo metagenômico e prospectivo a partir de amostras biológicas de sangue, swabs oral e anal e de diferentes órgãos (intestino, fígado, rins e baço). Foram coletadas amostras de 5 espécies: *Noctilio albiventris* – n=19, *N. leporinus* n=1, *Artibeus lituratus* n=15, *Myotis* sp. n=06 e *Molossus molossus* n=67, pertencentes a 4 Famílias (*Phyllostomidae*, *Molossidae*, *Vespertilionidae* e *Noctilionidae*). Para as análises, 376 amostras biológicas, pré-processadas para o sequenciamento, foram divididas em *pools* (SO=56, SA=56, S=56, I=52, F=52, R=52 e B=52) e submetidas ao SNG na Plataforma Illumina (NovaSeq6000). Foram gerados *contigs* de 16 famílias virais – *Adenoviridae*, *Anelloviridae*, *Astroviridae*, *Bornaviridae*, *Circoviridae*, *Coronaviridae*, *Genomoviridae*, *Hespesviridae*, *Parvoviridae*, *Papillomaviridae*, *Picobirnaviridae*, *Picornaviridae*, *Polyomaviridae*, *Paramyxoviridae*, *Rhabdoviridae* e *Retroviridae*. A maior variedade de nucleotídeos de famílias virais foi encontrada nos *pools* de baço e intestino (11 famílias), seguidos das amostras de swab oral (10 famílias). Uma diversidade vírus de interesse em saúde pública e veterinária tiveram *contigs* montados durante a metagenômica das amostras, incluindo *Coronavirus*, *Retrovirus*, *Adenovirus*, *Parvovirus*, *Papilomavirus* e outros. Um novo *Chaphamaparvovirus* (CHPV) foi identificado em *pools* de fígado de *M. molossus* bem como novos *Totivirus* que se agruparam filogeneticamente e estão relacionados a outros *Totivirus* descobertos em outros invertebrados. Este estudo forneceu informações importantes sobre a diversidade viral das espécies de morcegos estudadas, onde pudemos registrar leituras de material genético de vírus classificáveis e novos nas diferentes amostras biológicas e que tais registros podem dar base para propor a vigilância contínua de vírus de potencial infeccioso a partir dos estudos de amostras biológicas dos morcegos da região.

Palavras-chave: Diversidade viral; Metagenômica; Morcegos; Sequenciamento de Nova Geração – SGN.

ABREU, Wandercleyson Uchôa. **Molecular Epidemiological and Viral Metagenomic Ecovigilance in Bats from Urban Amazon Environments**. 2023. 148f. Thesis. (Doctorate in Biodiversity and Biotechnology) – Bionorte Network – Federal University of Pará

ABSTRACT

Studies accumulated over the past years have shown that bats can harbor many viruses, including medically important species that can be transmitted to humans and other animals, and cause disease. Currently, the world is suffering the consequences of a virus, whose origin is still unknown, but evidence has reported it to be a coronavirus of bat origin. Thus, extensive molecular and metagenomic studies of biological samples from these animals may reveal a large number of viruses, both classified and novel. Therefore, in order to molecularly characterize the viral diversity of chiropterans from the urban region of the Municipality of Santarém-Pará-Brazil, we have performed a prospective metagenomic study from biological samples of blood, oral and anal swabs and organs (intestine, liver, kidneys and spleen), collected from 5 species of bats: *Noctilio albiventris* - n=19, *N. leporinus* n=01, *Artibeus lituratus* n=15, *Myotis* sp. n=06 and *Molossus molossus* n=67, belonging to 4 Families (*Phyllostomidae*, *Molossidae*, *Vespertilionidae* and *Noctilionidae*). For the analyses, 376 biological samples, pre-processed for sequencing, were divided into pools (SO=56, SA=56, S=56, I=52, F=52, R=52 and B=52) and submitted to SNG on the Illumina Platform (NovaSeq6000). Contigs were generated from 16 Families - *Adenoviridae*, *Anelloviridae*, *Astroviridae*, *Bornaviridae*, *Circoviridae*, *Coronaviridae*, *Genomoviridae*, *Hespesviridae*, *Parvoviridae*, *Papillomaviridae*, *Picobirnaviridae*, *Picornaviridae*, *Polyomaviridae*, *Paramyxoviridae*, *Rhabdoviridae* and *Retroviridae*. The greatest nucleotide variety of viral families was found in the spleen and intestine pools (11 Families), followed by the oral swab samples (10 families). A diversity of viruses of public health and veterinary interest had contigs assembled during metagenomics of the samples, including *Coronavirus*, *Retrovirus*, *Adenovirus*, *Parvovirus*, *Papillomavirus* and others. A novel *Chaphamaparvovirus* (CHPV) was identified in *M. molossus* liver pools as well as novel Totiviruses that clustered phylogenetically and are related to other Totiviruses discovered in other invertebrates. This study provided important information on the viral diversity of the bat species studied, where we were able to record readings of classifiable and novel viruses in the different biological samples and that such records can be a basis to propose continued surveillance for viruses of infectious potential from the studies of biological samples from bats in the Region.

Keywords: Bats; Metagenomic; Next Generation Sequencing - NGS; Viral Diversity.

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	10
1.1- OBJETIVOS	12
1.2.1 – Geral	12
1.2.2 – Específicos	12
2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
3- MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1- ASPECTOS ÉTICOS	29
3.2 – OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS	29
3.3 – PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	31
3.3.1 – ALIQUOTAGEM E PREPARAÇÃO	31
3.4 - EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS (DNA/RNA).....	33
3.5 – PREPARAÇÃO DAS BIBLIOTECAS PARA A PLATAFORMA ILLUMINA.....	34
3.6 – SEQUENCIAMENTO DAS AMOSTRAS NA PLATAFORMA ILLUMINA	34
3.7 – BIOINFORMÁTICA.....	34
3.8 – ANÁLISE FILOGENÉTICA	35
4 –RESULTADOS	36
5- DISCUSSÃO.....	60
6 – CONCLUSÕES	72
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
APÊNDICES	104
ANEXOS	109

1- INTRODUÇÃO

Grande parte das zoonoses, que têm origem em animais silvestres, são causadas por vírus. Portanto, estimar corretamente a diversidade viral em grupos zoológicos pode fornecer subsídios para melhorar a vigilância sobre as zoonoses emergentes e reemergentes (SIMON ANTHONY *et al.* 2013).

Neste sentido, os morcegos, apesar de atuarem como agentes biológicos por exercerem importante contribuição para o equilíbrio natural de muitas regiões do país, atuando como polinizadores, disseminadores de sementes e controladores de populações de insetos, podem ser reservatórios naturais de muitos microrganismos e transmitir diversas doenças a outros animais e ao ser humano (KUIKEN *et al.* 2005).

A recente epidemia causada pelo SARS-CoV-2 veio reforçar as premissas de que os morcegos são implicados como hospedeiros reservatórios naturais para vários vírus emergentes que podem induzir doenças graves em humanos. Além disso, evidências acumuladas em pesquisas, mostram que vírus emergentes, como *Ebola vírus* (EBOV), Coronavírus da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV e coronavírus respiratório do Oriente Médio - MERS-CoV), reforçam a ideia de que os morcegos participam, juntamente com outros hospedeiros, como civetas para SARS-CoV e camelos para MERS-CoV, como reservatórios virais próximos para infecção humana (OLIVAL e HAYMAN, 2014; MEMISH *et al.* 2013; LEROY *et al.* 2005; AMMAN *et al.* 2015).

Dados sobre distribuição geográfica, tem mostrado que em regiões tropicais, como a área de estudo dessa pesquisa, a transmissão de muitos vírus ocorre ao longo de todo o ano. Esses locais, possibilitam que tanto vetores como hospedeiros compartilhem ambientes, e essa interação tem favorecido o conhecimento de novos arbovírus nessas regiões, sendo registrados mais de 530 vírus no Catálogo Internacional dos Arbovírus e outros vírus de vertebrados (VASCONCELOS *et al.* 2013).

Além disso, mudanças ecológicas no *habitat* natural dos reservatórios desses vírus levam a alterações em seus ciclos, podendo haver adaptação a novos reservatórios e, com isso, aumentar sua multiplicação e o risco da emergência (FIGUEIREDO, 2007). Também, as alterações de ecossistemas e recursos naturais tem contribuído diretamente para o surgimento e disseminação de agentes infecciosos, e juntamente com a invasão humana em áreas de floresta, tem ampliado a interface entre a vida selvagem e o homem, aumentando diretamente as oportunidades para o surgimento de novas doenças infecciosas e sua transmissão para as pessoas (BARCELLOS *et al.* 2009). Um exemplo de surgimento de doença viral que pode estar associada a mudanças ambientais foi a raiva, uma zoonose cujo reservatório principal é o morcego e transmitida por animais que se habituou a ambientes urbanos (SINGH *et al.* 2001).

Desta maneira, considerando as informações relevantes de que os morcegos são implicados como reservatórios de vírus de importância mundial em saúde pública, sua detecção e identificação em laboratório, seguida de estudos de patogenia e monitoramento de infecções, tem sido utilizadas com sucesso, para explorar a relação entre vírus e seus reservatórios, e contribuir para o diagnóstico e controle de infecções em humanos, advindas de quirópteros em áreas silvestres e urbanas (KUIKEN *et al.* 2005),

Nesse sentido, métodos de biologia molecular como a Transcrição Reversa (*Reverse Transcription-RT*) seguida da Reação em Cadeia pela Polimerase (*Polymerase Chain Reaction-PCR*), tem sido utilizado por muito tempo, para a detecção e identificação de vários agentes infecciosos, incluindo os *Alphavirus*, *Flavivirus* e *Orthobunyavirus* (MAHERSTURGESS *et al.* 2008). E atualmente, com o advento do sequenciamento genômico de nova geração (NGS), em princípio com a aplicação do método de pirosequenciamento e posteriormente com a segunda geração utilizando os métodos de sequenciamento paralelo e semi-condução iônica, tais técnicas tem possibilitado que um grande número de genomas virais tenha sido descobertos, principalmente referente a agentes virais não cultiváveis (MILLER *et al.* 2013, SCHLABERG *et al.* 2017).

Assim, observa-se atualmente que novas sequências virais são constantemente descobertas em uma ampla faixa geográfica e em um número crescente de espécies de morcegos. E como resultado dos crescentes esforços de pesquisa sobre morcegos e doenças infecciosas, a tarefa de conhecer os vírus da quiropterofauna de regiões brasileiras, torna-se relevante e necessária. Para tanto, estudos de campo, especialmente sobre os vírus de potencial zoonótico e seus reservatórios naturais fornecem informações valiosas, gerando dados epidemiológicos, e por isso, com base em tais necessidades, nosso estudo pretendeu expor um repertório dinâmico, sobre a diversidade viral obtida por NGS em amostras biológicas de morcegos de ambientes urbanos na Amazônia.

1.1- OBJETIVOS

1.2.1 – Geral

Identificar e caracterizar os tipos virais presentes em espécies de morcegos capturados na área urbana da cidade de Santarém/PA.

1.2.2 – Específicos

Observar as diferenças virais para cada tecido coletado (saliva, sangue, amostra fecal, intestino, baço, fígado e rins);

Identificar vírus de interesse em Medicina Veterinária e Saúde Pública nas diferentes amostras biológicas dos morcegos;

Caracterizar e prospectar genomas de novos vírus em diferentes amostras biológicas de morcegos;

Identificar taxonomicamente as sequências ou genomas virais obtidos.

2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 – MORCEGOS COMO RESERVATÓRIOS DE VÍRUS.

A ordem Chiroptera (morcegos) é um táxon rico em espécies que se destaca por ser capaz de voar com potência única. Os morcegos representam 1.423 das mais de 6.400 espécies conhecidas de mamíferos (SIMMONS e CIRRANELLO, 2020). Os quirópteros são a segunda ordem de mamíferos mais diversa na Terra, depois dos roedores, compreendendo aproximadamente 22% de todas as espécies de mamíferos nomeados, e residem em todos os continentes, exceto na Antártica (BURGIN, 2018).

Os morcegos são espécies-chave das quais outras faunas e flora são altamente dependentes para fertilização, polinização, dispersão de sementes e controle de populações de insetos (VOIGT e KINGSTON, 2015). Entre as famílias reconhecidas atualmente Emballonuridae, Molossidae e Vespertilionidae ocorrem no Novo e no Velho Mundo, Cistugidae, Craseonycteridae, Hipposideridae, Megadermatidae, Miniopteridae, Mystacinidae, Myzopodidae, Nycteridae, Pteropodidae, Rhinolophidae, Rhinolophidae e Europomatidae, apenas no Velho Mundo. Já as famílias Furipteridae, Mormoopidae, Natalidae, Noctilionidae, Phyllostomidae e Thyropteridae ocorrem apenas no Novo Mundo (FENTON e SIMMONS 2015).

O Brasil abriga cerca de 20% da riqueza mundial de morcegos, apresentando registros em florestas tropicais, de nove famílias, 14 subfamílias, 68 gêneros, 181 espécies de morcegos oficialmente registradas, sendo 10 espécies endêmicas no país. As famílias de morcegos que ocorrem no território brasileiro são: Emballonuridae (7 gêneros, 17 espécies), Furipteridae (1 gênero, 1 espécie), Molossidae (8 gêneros, 31 espécies), Mormoopidae (1 gênero, 4 espécies), Natalidae (1 gênero, 1 espécie), Noctilionidae (1 gênero, 2 espécies), Phyllostomidae (43 gêneros, 93 espécies), Thyropteridae (1 gênero, 5 espécies), Vespertilionidae (5 gêneros, 26 espécies) (GARBINO *et al.* 2020).

Os morcegos têm sido associados a doenças infecciosas desde o século XX. Seu papel na transmissão do vírus da raiva (RABV) levou Metchnikov a investigar macrófagos de morcegos frugívoros e as respostas imunológicas frente a essa infecção em 1909 (METCHNIKOFF. 1909). Ao longo do tempo, vários surtos virais novos ou reemergentes associados com transbordamento de reservatórios de morcegos foram documentados, e vários relatórios destacaram o risco de eventos futuros de transbordamento em populações humanas (CALISHER *et al.* 2006).

Consequentemente, tem havido especulações repetidas de que os morcegos podem ser únicos em seu potencial para abrigar vírus zoonóticos (CALISHER *et al.* 2006). As características que podem tornar os morcegos adequados para hospedar mais vírus em geral

(zoonóticos e não zoonóticos) que incluem: uma expectativa de vida relativamente longa para o tamanho de seu corpo que pode facilitar a persistência viral para infecções crônicas (MUNSHI-SOUTH e WILKINSON 2010); a dependência de algumas espécies em manter torpor prolongado, que pode diminuir a replicação viral e a função imunológica; e o vôo, permitindo movimento e dispersão viral por longas distâncias em algumas espécies (PRENDERGAST *et al.* 2002).

Além disso, muitas espécies de morcegos são gregárias, como a exemplo, algumas colônias de morcegos mexicanos de cauda livre (*Tadarida brasiliensis mexicana*), que podem atingir altas densidades por metro quadrado, com populações de centenas de indivíduos por caverna (BETKE *et al.* 2008). Esses locais de empoleiramento podem abrigar diversas espécies de morcegos e essas altas taxas de contato intra e interespecífico, podem facilitar a transmissão rápida de patógenos e tais populações podem sustentar infecções imunizantes persistentes (KUZMIN *et al.* 2010).

Desde que Antonio Carini, médico italiano, então diretor do Instituto Pasteur, que em 1911 admitiu, pela primeira vez, a hipótese de os morcegos hematófagos atuarem como transmissores da raiva, em um surto de raiva bovina e eqüina que acometeu 4.000 animais em Santa Catarina (CARINI, 1911), vários estudos tem buscado ampliar o conhecimento da diversidade viral cujos os morcegos atuem como reservatório.

Dos estudos pioneiros de vírus em quirópteros, os membros da família *Rabdoviridae* e gênero *Lyssavirus*, cujo principal reservatório são os morcegos (BANYARD *et al.* 2011), representam uma grande parcela nas referências bibliográficas da área. O vírus rábico (RABV) é um dos vírus mais conhecidos, dada a sua importância médica, que causa uma pan-encefalite, a raiva, com letalidade em torno de 100% em humanos e outros animais. A infecção pelo vírus rábico é considerada zoonótica, transmitida através da mordedura, arranhadura ou contaminação das mucosas com saliva de vertebrados infectados pelo *Lyssavirus*, para indivíduos suscetíveis. Dentre os ciclos biológicos de transmissão da doença, o morcego tem participação em dois deles: rural (animais de produção) e silvestre aéreo (exclusivamente por morcegos) (TAKAOKA, 2009).

Com o avanço das pesquisas, novos vírus foram implicados como tendo os morcegos como reservatório. Dentre eles, quatro novos coronavírus sugeriram e por serem coronavírus (CoV) semelhantes aos detectados em outras espécies de morcegos, posicionaram esses mamíferos em evidência para pesquisas de descobertas virais (HAN *et al.* 2015, HU *et al.* 2015). Esses novos CoVs causaram impactos significativos na saúde humana e na economia global. Inicialmente, dois deles, que apresentam tropismo aos pulmões e causam síndrome respiratória aguda grave (SARS) (GE XY *et al.* 2013) e a síndrome respiratória do Oriente

Médio MERS (YANG *et al.* 2014). Ambos os vírus causaram surtos, sendo que o SARS em 2002-2003 levou a 8.096 casos, com mortalidade de 10% em 27 países e, cerca de 1.900 casos de MERS foram notificados, com uma taxa de mortalidade de cerca de 35% no ano de 2012 (WHO, 2012).

O terceiro coronavírus, o coronavírus da diarreia epidêmica suína (PED-CoV) (HUANG *et al.* 2013) foi introduzido nos rebanhos de suínos comerciais da América do Norte e levou a uma perda econômica de quase 2 bilhões de dólares nos Estados Unidos (HAN *et al.* 2015, HU *et al.* 2015).

Desde então, com o início da pandemia causada pelo SARS-CoV-2, o mais recente coronavírus emergente no mundo, muitas informações têm apontado os morcegos como responsáveis por sua origem. Entretanto, não há nenhum estudo categórico consensual até a atualidade mostrando uma conexão direta entre os morcegos e o vírus SARS-CoV-2, responsável pela pandemia de COVID-19. Desta maneira, pesquisas apontam para um hospedeiro intermediário ainda não descoberto. O sequenciamento do genoma SARS-CoV-2 (WU *et al.* 2020), o vírus causador da doença em humanos, foi o ponto de partida para os estudos em busca de evidências em hospedeiros desse vírus. Assim, apesar do sequenciamento genômico de um coronavírus (RaTG13), previamente isolado de morcegos *Rhinolophus affinis* na China apresentar cerca de 96% semelhante ao genoma SARS-CoV-2 (ZHOU *et al.* 2020), e tenha alta similaridade genética com o SARS-CoV-2, a divergência na região do domínio ligante do receptor viral (RBD), sugeriu que este coronavírus de morcego não pode se ligar de forma eficiente ao ECA2 humano, deixando assim, lacunas sobre a real origem do novo coronavírus.

Outros vírus como o *Hendra* e o *Nipah*, ambos paramixovírus zoonóticos altamente patogênicos (*Mononegavirales*, *Paramixoviridae*), foram detectados em morcegos nas últimas décadas (MARSH *et al.* 2012). Outro paramixovírus detectado também em quirópteros chamados de raposas voadoras (*Pteropus alecto*), o vírus *Menangle* (gênero *Rubulavirus*), foi responsável por uma doença zoonótica em 1997 que afetou porcos e humanos em New South Wales, Austrália. Nesse estudo, os anticorpos capazes de neutralizar o vírus *Menangle*, foram detectados nessa espécie, fornecendo assim evidências provisórias da origem de um morcego para esse vírus. Tanto que estudos posteriores, mostraram em raposas voadoras negras e em amostras de morcegos indonésios, a presença de RNAs de henipavírus e desse rubulavírus (BARR *et al.* 2012).

No Brasil, foram identificadas pelo menos 181 espécies de morcegos em diferentes biomas, algumas das quais definitivamente associadas à transmissão de zoonoses importantes, como raiva e histoplasmoses. Devido à grande diversidade de alfacoronavírus e betacoronavírus

relatados em morcegos, acredita-se que tais espécies sejam reservatórios e progenitores de muitos membros desses gêneros, enquanto delta e gammacoronavírus parecem ter se originado do CoV de aves. A maioria dos CoVs recuperados de morcegos brasileiros são alfacoronavírus (Lima *et al.* 2013; SIMAS *et al.* 2015; ASANO *et al.* 2016). No entanto em 2016, dois betacoronavírus distintos que se agruparam dentro do MERS-CoV foram detectados em morcegos com potencial contato com humanos do bioma Mata Atlântica (GÓES *et al.* 2016).

Com o objetivo de detectar novos coronavírus, um estudo conduzido com amostras de 97 morcegos do Brasil, identificou em morcegos *Molossus rufus* e *Molossus molossus*, um novo alfacoronavírus, idêntico ao que foi detectado, denominado de BatCoV- *M. rufus* 28 / Brasil / 2010. Ambos os espécimes foram coletados no Brasil durante 2010 em áreas urbanas de propriedades residenciais (GOES *et al.* 2013). Mais recentemente, outros coronavírus também foram identificados em *Molossus rufus* (21,9%), *Molossus molossus* e *Artibeus lituratus* (20,3% cada) e *Artibeus planirostris* (23,1% cada) (BITTAR *et al.* 2020).

Os vírus da influenza A são as principais causas de doenças humanas e são predominantemente mantidos em reservatórios aviários (OLSEN *et al.* 2006). Entretanto, estudos pioneiros de 2012 a 2013, detectaram os primeiros *Influenza A* vírus de morcego, denominados H17N10 e H18N11, descobertos em duas espécies de morcegos, *Sturnira lilium* (morcego de ombros amarelos) e *Artibeus planirostris* (morcego frugívoro de cara achatada) (TONG *et al.* 2012). Anos depois, no Brasil, a triagem de 533 morcegos para *Influenza* vírus, mostrou o subtipo HL18NL11 em intestinos de dois morcegos da espécie *A. lituratus*. Neste estudo, altas concentrações sugeriram eliminação fecal do vírus e, as caracterizações genômicas revelaram a conservação de genes virais em diferentes espécies de hospedeiros (CAMPOS *et al.* 2019).

Sequências de membros das famílias *Herpesviridae*, *Paramyxoviridae* e *Parvoviridae* também foram detectadas em amostras de morcegos de diversas regiões do Brasil, sendo que as análises filogenéticas realizadas mostraram relações com linhagens semelhantes às aquelas detectadas em humanos. Esses estudos alertam a importância de se manter um trabalho contínuo e sistemático em relação à vigilância de potenciais reservatórios naturais (ARAÚJO *et al.* 2012; DREXLER *et al.* 2012; SOUZA *et al.* 2017).

Outro grupo de vírus pesquisados em morcegos são os arbovírus. Apesar de vários estudos terem resultados negativos para uma diversidade de famílias pertencentes a estes vírus (PRICE, 1978; CHIANG *et al.* 2018), muitas pesquisas já tem detectado a presença de muitos arbovirus em quiróptero, como a detecção duas cepas do vírus Nepuyo isoladas de morcegos *Artibeus jamaicensis* e *A. lituratus* em Honduras, e evidências de soros protetores, encontrados em morcegos frugívoros jamaicanos em Trinidad (CALISHER *et al.* 1971). Kading *et al.*

(2018), detectaram um título significativo de anticorpos neutralizantes contra o vírus da febre amarela em um morcego rousette egípcio em Uganda em 2012, indicando que os morcegos estão expostos a este vírus na natureza.

Outros estudos para arbovírus, neste caso para detecção de *Flavivirus* em morcegos, identificaram o ácido nucléico do Dengue vírus (DENV) e os anticorpos anti-DENV em morcegos mexicanos na costa do Golfo e do Pacífico, e o ácido nucléico foi detectado no fígado e/ou soro de morcegos selvagens capturados na Guiana Francesa (AGUILAR-SETIÉN *et al.* 2008, THOISY *et al.* 2009).

Por ser o Brasil um grande país tropical altamente povoado, com um terço de seu território coberto por florestas, o país apresenta condições ideais para a existência de muitos arbovírus (FIGUEIREDO, 2007), mais de 200 arbovírus foram isolados no país, e aproximadamente quarenta desses vírus, causam doenças em humanos (CASSEB *et al.* 2013). Porém, apesar da infecção de morcegos por arbovírus tem sido relatada por vários autores e embora tenha sido levantada a possibilidade de atuarem como reservatórios naturais, ainda não está claro se eles desempenham esse papel no ciclo ecológico, deixando portanto, a ampla possibilidade de estudo desse grupo de vírus em morcegos (CALISHER *et al.* 2006, KUNO *et al.* 2005, KUNO *et al.* 2017).

As hipótese de que os morcegos são os principais reservatórios de várias famílias de vírus de RNA a partir dos quais foram derivados outros vírus de mamíferos, inclusive de seres humanos (SMITH e WANG, 2013) e os registros de numerosos vírus altamente patogênicos identificados em quirópteros (HAYMAN, 2016), tem embasado novos estudos de investigações sobre viromas de morcegos ao redor do mundo.

2.2 – O PROCESSO DE URBANIZAÇÃO E AS MUDANÇAS NOS *HABITATS* DE MORCEGOS: FATORES QUE DETERMINAM AS INTERAÇÕES PARA O SURGIMENTO DE VIROSES ZOONÓTICAS.

Com a invasão humana em áreas naturais se intensificando, particularmente naquelas com alta riqueza biológica de morcegos, reconhecidos como importantes reservatórios de vírus zoonóticos, considerável preocupação e interesse têm sido gastas com eles, pela autoridades sanitárias. Além disso, os morcegos de algumas espécies se adaptam bem a *habitats* modificados, de modo que esses vertebrados se tornaram rapidamente um foco de estudos epidemiológicos (CEBALLOS e EHRLICH, 2006; JONES *et al.* 2009; LUIS *et al.* 2013).

O aumento do contato ou interação humano-animal resultante de: mudanças no comportamento humano e animal, no *habitat*, na ecologia, na biologia de vetores, na adaptabilidade de patógenos, na mudança nas práticas agrícolas e sistemas de produção

pecuária, na segurança alimentar, na urbanização, no desmatamento e mudanças climáticas, estão entre os fatores desencadeadores para emergência de doenças zoonóticas. Neste sentido, estudos mostram que nessas condições, a vida selvagem pode atuar como uma fonte para patógenos zoonóticos emergentes e reemergentes (KRUSE *et al.* 2004; LINDAHL e GRACE, 2015).

A densidade da população humana está fortemente correlacionada com o risco de emergência para todas as principais classes de doenças infecciosas emergentes, atualmente conhecidas (WEISS e MICHAEL, 2004). Dessa forma, considerando o conceito de infecções zoonóticas, aquelas entre pessoas que vêm de fontes animais, a biodiversidade foi correlacionada com o surgimento de novas doenças infecciosas em escala macro (NAEEM, 2009). Mais especificamente, a quantidade de hospedeiros mamíferos para infecções zoonóticas se associa com a riqueza de espécies entre os mamíferos (DIZNEY *et al.* 2009). Isso mostra que, a invasão humana em *habitats* ricos em espécies, pode simultaneamente diminuir a biodiversidade e aumentar a exposição das pessoas a novos micróbios e novas doenças (CHAN *et al.* 2010).

Pesquisas tem esclarecido que a ação humana mais impactante no ambiente, tem sido a mudança na cobertura dos solos (NEWBOLD *et al.* 2015). Durante este processo, que envolve a supressão e queima da vegetação nativa, a maioria das espécies vegetais e animais sésseis com reduzida mobilidade (ex.: moluscos, artrópodes, anfíbios) é extinta rapidamente; porém, as espécies que conseguem fugir de forma rápida (ex. mamíferos, aves) e que não foram incineradas fogem, deixando os recursos alimentares, abrigos e suas próprias crias (TURNER, 2010). Nessa migração, decorrente da redução dos seus *habitats* e nichos, os animais em fuga, são obrigados a se dispersar em busca de refúgios na extensão de seu nicho fundamental, onde os recursos e condições disponíveis são favoráveis à sobrevivência (SOBERÓN E NAKAMURA, 2009). Tal situação gera uma nova condição nas áreas que já estão ocupadas com biodiversidade local e leva a impactos decorrentes tanto da intensificação, como da competição, da predação e da superexploração de recursos (alimentação e abrigos) (BURDON *et al.* 2019). Nesses novos ambientes, ocorre o aumento repentino de biodiversidade, potencializando o contato entre os organismos, e dessa maneira, elevando a probabilidade de transmissão e circulação de parasitos dentro das populações, mas também de *spillover* (transbordamento) entre espécies (WILKINSON *et al.* 2018).

Em ambiente espacialmente reduzido e “compactado” por um grande número espécies, o processo de transmissão viral é facilitado e pode ocorrer por meio de interações diretas, notavelmente por predação e conflitos entre indivíduos, por relações sexuais ou comportamentais e sociais, e agrupamentos noturnos ou compartilhamento de abrigos. De

forma indireta, poderá ocorrer pelo contato com urina e fezes contaminadas durante o compartilhamento de habitat, pelo contato com saliva e muco durante o uso de recursos alimentares, ou pelo contato com sangue e restos de animais predados (JOFRIN *et al.* 2018).

Em ambientes com alta sobreposição de habitat, como mencionado anteriormente, os recursos compartilhados entre espécies tornam-se superexplorados, aproximando as diferentes espécies e intensificando os riscos de transbordamento, principalmente pelo compartilhamento de abrigos por espécies de diferentes nichos (PLOWRIGHT *et al.* 2017).

Sobre o uso do solo, alguns modelos em que há conversão integral das áreas naturais, criam zonas transicionais abruptas entre ambientes silvestres e matrizes antrópicas (plantações, estradas e áreas urbanas). Nessa transição forma-se o que se chama de cinturão marginal contornando os fragmentos remanescentes, que atua como ecótono, sob influência do “efeito de borda” (FLETCHER *et al.* 2018; FAHRIG *et al.* 2019). De modo geral, esse efeito de bordas transicionais largas, resultam em maior probabilidade de transbordamento em paisagens altamente fragmentadas; propiciando maiores riscos de troca de patógenos intra e interespecies. Isso porque, as bordas, por se comportarem como ecótonos, apresentam alta diversidade, por serem interfaces usadas por espécies oriundas de variados tipos de ambientes; portanto, nessa faixa haveria potencial também para uma maior diversidade viral, aumentando o risco de transbordamento (FLETCHER *et al.* 2018; FAHRIG *et al.* 2019).

Dentre os principais efeitos relacionados ao efeito borda, está o aumento do risco de novas epidemias, pois conforme o efeito de borda consome a floresta, por diversos motivos pode haver um grande fluxo de animais entre os fragmentos, como por exemplo a rotineira atividade de forrageamento ou os eventuais episódios reprodutivos. Durante essas atividades esses animais silvestres casualmente podem entrar em contato com seres humanos e transmitir patógenos nunca antes catalogados (COUTINHO, 2020).

Desta maneira, a conversão dos solos e a fragmentação dos habitat de diferentes espécies animais, geram zonas de maior contato, viabilizando novas interfaces entre os habitats naturais e os ambientes antrópicos, promovendo interações interespecíficas, e aproximando reservatórios, vetores e hospedeiros, aumentando as probabilidade de transmissão e *spillover* viral (WILKINSON *et al.* 2018).

Tem-se demonstrado ainda, que a fragmentação e mudança da paisagem, atuam em conjunto com “efeitos co-evolutivos”, aumentando a diversificação viral em ambientes silvestres, favorecendo a emergência de novas cepas (ZOHDY *et al.* 2019). Existem evidências associando alterações de paisagens com emergência de doenças como malária, hantavirose, filariose, febres hemorrágicas, e muitas outras (PATZ *et al.* 2004).

A transmissão de transbordamento é promovida por processos sucessivos que permitem que um patógeno animal estabeleça infecção em um ser humano. A probabilidade de transbordamento zoonótico é determinada por interações entre vários fatores, incluindo a dinâmica da doença no hospedeiro reservatório, a exposição a patógenos e os fatores intra-humanos que afetam a suscetibilidade a infecções. Esses fatores podem ser divididos em três fases funcionais distintas, que descrevem todas as principais rotas de transmissão. Na primeira fase, a quantidade de patógeno disponível para o hospedeiro humano em um determinado ponto no espaço e tempo, conhecida como pressão do patógeno, é determinada por interações entre a distribuição do hospedeiro reservatório, prevalência do patógeno e liberação do patógeno do hospedeiro reservatório, seguido por: sobrevivência, desenvolvimento e disseminação do patógeno fora dos hospedeiros reservatórios. Em segundo lugar, o comportamento humano e do vetor determina a exposição ao patógeno; especificamente, a probabilidade, via e dose de exposição. E por último, os atributos individuais, genéticos, fisiológicos e imunológicos do hospedeiro humano, juntamente com a dose e a via de exposição, afetam a probabilidade e a gravidade da infecção (PLOWRIGHT *et al.* 2017).

Várias espécies de morcegos vivem em ecossistemas urbanos, utilizando recursos fornecidos direta ou indiretamente pelo homem, como edificações, plantas e iluminação noturna. As edificações são usadas geralmente como abrigos diurnos. Algumas espécies de plantas de arborização servem como abrigos (diurnos e/ou noturnos), e outras, como fontes de alimento. A iluminação noturna das cidades atrai insetos voadores que são habitualmente comidos por morcegos. Esses mamíferos voadores podem trazer transtornos às pessoas dependendo dos locais em que se abrigam, do tamanho de suas colônias e de possíveis doenças (WALSH, 1996; GAISLER *et al.* 1998; BARROS *et al.* 2006).

O contato com os fluidos corporais dos morcegos (saliva, urina e fezes) é cada vez mais reconhecido como um importante mecanismo de disseminação de patógenos para os humanos. A invasão humana nos habitats dos morcegos, bem como o aumento da urbanização, que facilita o alojamento dos morcegos em estruturas artificiais, provavelmente aumentará o contato com os fluidos corporais dos morcegos. Um exemplo claro desta situação, foi o ocorrido nos casos de infecção humana pelo *Nipah vírus* (*Paramyxoviridae*), relatados em Bangladesh, onde as contaminações foram associadas ao consumo de seiva crua de tamareiras contaminadas com saliva e urina de morcegos frugívoros (LUBY *et al.* 2006).

No caso do *Marburg vírus* (*Filoviridae*), estudos experimentais indicam que a transmissão de morcego a morcego pode ocorrer via saliva e aerossóis, sugerindo que o vírus pode ser transmitido a outros hospedeiros por um mecanismo semelhante (AMMAN *et al.* 2015). Esta hipótese é apoiada por investigações que revelam que a maioria dos humanos

infectados com o *Marburg vírus* entraram em cavernas de morcegos (*Rousettus aegyptiacus*) antes de adoecer e relataram contatos regulares com morcegos ou suas secreções (ADJEMIAN *et al.* 2011).

Dada a informação sobre os fatores que podem propiciar a interação interespecífica por aproximação e troca de microrganismos entre eles, sabe-se que para que o patógeno se estabeleça em novas espécies, o processo de emergência envolve várias etapas, incluindo a invasão inicial no novo hospedeiro ('transbordamento'), a produção de estágios de transmissão dentro do novo hospedeiro e o estabelecimento do patógeno na população hospedeira como um todo (WOLFE *et al.* 2007; HUDSON *et al.* 2008). Nesse processo, o efeito da biodiversidade pode variar para cada uma dessas etapas. Para a invasão inicial, a biodiversidade pode atuar como um reservatório de origem. Essa hipótese é apoiada por pesquisas de doenças emergentes em humanos: a maioria são zoonóticas - saltando para humanos de outros animais vertebrados (WOOLHOUSE e GOWTAGE-SEQUERIA, 2005).

Os estudos têm mostrado que a probabilidade de emergência de patógenos da vida selvagem para os humanos foi positivamente correlacionada com a riqueza de espécies da vida selvagem de mamíferos (JONES *et al.* 2008). Outros fatores ambientais e socioeconômicos que colocam os humanos em contato mais próximo com patógenos potencialmente novos, já citados anteriormente (por exemplo, desmatamento de floresta, caça de animais selvagens) também podem contribuir para esse padrão (Figura 1).

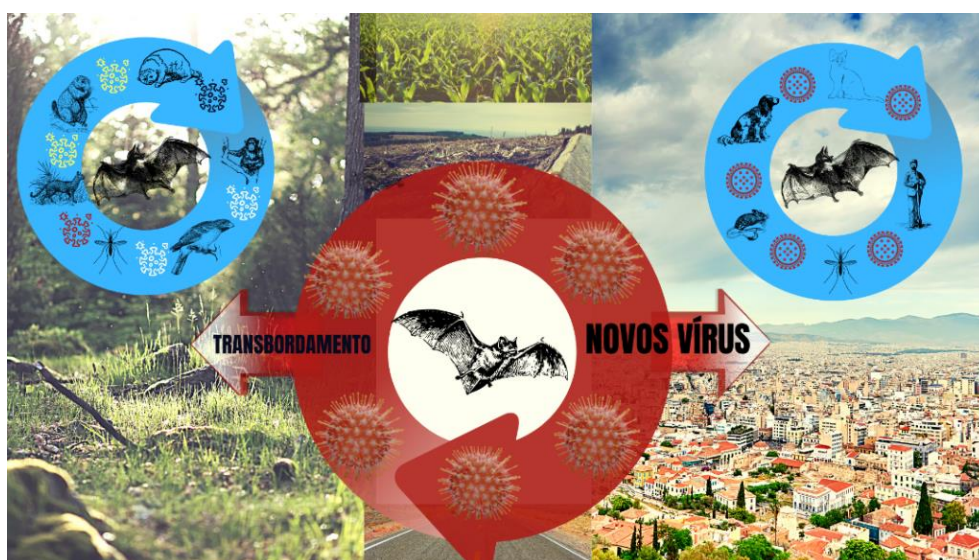


Figura 1 – Fatores associados a ocorrência de vírus em ambiente urbano e as interações de interespecíficas que favorecem o surgimento de novas cepas virais a partir de morcegos. Fonte: autor

Na verdade, o que se observou até o momento é que quase metade das doenças zoonóticas que surgiram em humanos desde 1940, resultou de mudanças no uso da terra, de mudanças na agricultura ou outras práticas de produção de alimentos, ou de caça de animais

selvagens. Essas atividades humanas aumentam as taxas de contato entre humanos e animais, o que pode ser um fator crítico subjacente ao contágio (JONES *et al.* 2008).

Deste modo, as evidências atuais sugerem que as mudanças ambientais e as interações entre a vida selvagem, e os humanos contribuem para o transbordamento de agentes infecciosos de morcegos para outros hospedeiros. Um número crescente de estudos investigando a diversidade e a dinâmica da infecção de patógenos de morcegos foi publicado recentemente; no entanto, como esses agentes infecciosos são transmitidos tanto dentro das populações de morcegos quanto para outros hospedeiros, incluindo humanos, muitas vezes permanece desconhecido, necessitando de mais estudos de cunho epidemiológico e evolutivo das diferentes espécies virais e seus reservatórios (MORATELLI e CALISHER, 2015).

2.3 – IDENTIFICAÇÃO VIRAL: MÉTODOS DE DETECÇÃO DE VÍRUS E SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO EMPREGADOS NOS ESTUDOS EPIDEMIOLÓGICOS DE ZOOVIROSES.

Embora a comunicação e a educação sobre o risco associado a patógenos transmitidos por morcegos tenham aumentado na última década, os benefícios dos morcegos nas funções do ecossistema, por exemplo, na polinização, fertilização do solo e controle de pragas de safras, tendem a ser desconsiderados. Obter conhecimento sobre epidemiologia de doenças e ecologia de morcegos é fundamental para avaliar completamente os desafios associados à saúde humana e à conservação de morcegos. Nesse contexto, a implementação das abordagens de Saúde única (One health), parece essencial e benéfica para um desenvolvimento sustentável, particularmente para as populações que vivem em pontos críticos de emergência de doenças transmitidas por morcegos (WOOD *et al.* 2012).

A capacidade de prever e prevenir epidemias virais tornou-se um objetivo importante nas disciplinas de saúde pública. O conhecimento dos hospedeiros virais permite a identificação das populações de manutenção das quais podem surgir epidemias (HAYDON *et al.* 2002; GREGER, 2007). De uma perspectiva ecológica, o hospedeiro natural de um determinado vírus pode ser considerado seu habitat (HAYDON *et al.* 2002; STREICKER *et al.* 2010; KITCHEN *et al.* 2011). Entretanto, a delimitação das espécies virais muitas vezes não são bem definidas. As filogenias virais podem identificar se os vírus existentes encontrados em um determinado hospedeiro estão menos ou mais diretamente ligados a ancestrais comuns, fornecendo pistas para as origens do vírus (HAYDON *et al.* 2002; STREICKER *et al.* 2010; KITCHEN *et al.* 2011).

A busca ativa de vírus em morcegos está se tornando cada vez mais importante para obter informações sobre a diversidade, ecologia e epidemiologia viral no mundo. Entretanto, a

interpretação das descobertas virais pode variar muito, quando se refere as estratégias de vigilância e detecção empregadas. A adoção de técnicas de detecção sorológica (detecção de anticorpos) e de ácido nucleico (ensaios de PCR e tecnologias de sequenciamento de nova geração), bem como isolamentos virais, tem sido as principais ferramentas atuais para estudos nessa categoria (MARKOTTER *et al.* 2020).

A microscopia eletrônica (ME) há muito considerada uma ferramenta eficaz para a detecção direta de vírus a partir da visualização e contagem das partículas virais em fluidos corporais, fezes ou amostras histopatológicas. A identificação baseia-se na características morfológicas específicas de cada família de vírus e requer uma quantidade suficiente de partículas virais (até 10⁶ partículas/mL), o que faz com que durante a preparação da amostra realizada com antecedência possa haver a redução na concentração do vírus, o que torna a análise mais difícil e limitada (GOLDSMITH e MILLER, 2009).

Para tanto, o advento de cultura de células tem sido um dos métodos mais populares para isolar vírus usando linhagens de células e com apoio da ME, torna o diagnóstico morfológico mais eficaz. Na técnica de isolamento viral, utilizando a cultura celular, evidência do crescimento do vírus é vista através do efeito citopático (ECP) exibindo características específicas e alterações das células (ROBBINS *et al.* 1950). A identificação definitiva do vírus é então realizada usando coloração de imunofluorescência (IF). Tal método de isolamento de vírus não é ideal no caso de vírus não passíveis de crescimento em linhagens de células (norovírus, vírus da hepatite) ou de produção de ECP (PAPAFRAGKOU *et al.* 2013).

Assim, muitas ferramentas de diagnóstico convencionais tendem a ser complicadas, demoradas, caras e pouco reproduzíveis (PANKAJ, 2007). Em contraste, as técnicas moleculares revolucionaram a virologia diagnóstica ao detectar a presença ou ausência de ácidos nucleicos virais na amostra de um paciente (ACHARYA *et al.* 2004). Entretanto, as técnicas baseadas em imunidade ainda desempenham um grande papel para a detecção e sorovigilância de infecções virais humanas, apesar do fato de que muitos dos métodos tradicionais são substituídos por técnicas baseadas em ácido nucleico (ATMAR, 2014).

Sabe-se que as técnicas sorológicas geralmente não distinguem entre imunoglobulinas de morcego, IgM e IgG, e são apenas uma indicação de exposição ao agente - seja uma infecção ativa ou prévia. Esse fato não fornece informações sobre a manutenção ou patogenicidade do agente na população hospedeira e ainda, tem como limitação o potencial de reatividade cruzada com outras espécies virais relacionadas. (MARKOTTER *et al.* 2020).

Os métodos automatizados baseados em imunoenaios estão entre os mais frequentemente usados para teste sorológicos virais e são eficazes devido à alta especificidade e afinidade de ligação entre o antígeno e o anticorpo. O princípio do teste baseia-se na formação

de um imuno-complexo entre o anticorpo presente na amostra do paciente e o antígeno sintético presente no reagente ou vice-versa, para gerar um sinal mensurável. O *radioimunoensaio (RIA)* é provavelmente o método inicial difundido nos anos 1960. Essa técnica usa radioisótopos, como o Iodo 125, para marcar o antígeno ou anticorpo. O método Elisa (*Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay*) é o mais difundido nas pesquisas tanto para vírus como para outros patógenos (SOUF, 2016).

Neste sentido, para a maioria das famílias virais, testes de detecção de ácido nucleico (ensaios de PCR), que são baseados em *primers* amplamente reativos de consenso degenerado, visando regiões conservadas do genoma viral parcial, estão disponíveis para vários ensaios laboratoriais de detecção de patógenos. Tais métodos, no entanto, requerem que as informações de sequência de vírus recém-detectados compartilhem um certo grau de similaridade com os vírus anteriormente caracterizados no gênero ou família, e, portanto, terá menos probabilidade de detectar sequências altamente divergentes que podem representar novos vírus. Para resolver essa lacuna, métodos independentes de sequência imparcial, como tecnologias de sequenciamento de próxima geração (NGS), também ganharam mais popularidade e são excelentes ferramentas para a descoberta de novos patógenos, como veremos mais adiante (SIBNARAYAN *et al.* 2015).

A virologia molecular oferece uma gama de novos métodos, que são capazes de acelerar e melhorar o diagnóstico de doenças infecciosas em animais e no homem. Os novos ensaios oferecem possibilidades para um diagnóstico muito rápido, uma vez que a detecção de vírus pode ser concluída em várias horas ou minutos. No que diz respeito à detecção direta de vírus ou componentes virais, várias abordagens moleculares são introduzidas, como PCR convencional baseado em gel, PCR em tempo real, PCR multiplex, aprimorado hibridização *in situ* e PCR *in situ* (BELÁK, 2007).

Desenvolvido por Mullis e Faloona (1987) a amplificação do ácido nucléico por reação em cadeia da polimerase (PCR) revolucionou o campo do diagnóstico molecular. O ensaio de PCR básico se baseia na extração e purificação do ácido nucleico e, em seguida, na amplificação exponencial da sequência alvo, usando uma enzima polimerase termoestável e *primers* específicos. Os amplicons resultantes são então identificados usando um sistema de detecção baseado em fluorescência, e o resultado é relatado em unidades internacionais IU/mL.

As técnicas moleculares que envolvem a amplificação do material genômico viral são extremamente sensíveis e específicas, fornecem um diagnóstico rápido e permitem a detecção de vários vírus ao mesmo tempo (CELLA *et al.* 2013). Tais técnicas são muito úteis para a detecção de vírus que são difíceis de manter em cultura, vírus de crescimento lento em cultura e vírus que apresentam variações antigênicas (HODINKA e KAISER, 2013). Esses testes de

amplificação de ácido nucleico são muito populares no diagnóstico de infecções virais causadas por vários vírus, incluindo vírus da hepatite C (HCV), vírus da imunodeficiência humana (HIV), DENV, vírus Epstein-Barr (EBV), vírus influenza, vírus Zika (ZIKV), EBV e coronavírus (ENDER *et al.* 2004; CORMAN *et al.* 2020).

O poder de diagnóstico das técnicas de PCR é aumentado com o sequenciamento de nucleotídeos e a análise comparativa da sequência dos produtos de PCR, o que possibilitam determinar as relações genéticas dos vírus detectados ou outros agentes microbianos. Com esta técnica, as árvores filogenéticas são construídas, ilustrando a relação genética e o histórico da diversidade de vírus. As variantes genéticas são rapidamente identificadas e as rotas de disseminação do vírus são prontamente rastreadas e registradas em um país ou mesmo em áreas geográficas muito maiores. Essa abordagem, denominada epidemiologia molecular, fornece novas ferramentas, por exemplo, aos veterinários e às autoridades de saúde animal, no combate às doenças virais. Para a realização de estudos de epidemiologia molecular, regiões genômicas variáveis dos genomas virais são selecionadas, amplificadas e sequenciadas (BELÁK, 2007).

As variantes mais amplamente utilizadas de amplificação convencional, como já mencionados, são PCR em tempo real (PCR quantitativo - qPCR) e PCR de transcrição reversa (RT-PCR). Ambos são utilizados na avaliação da carga viral, e enquanto o primeiro método quantifica o DNA ao longo das reações em tempo real (NTZIORA *et al.* 2013); o segundo realiza RT do mRNA (RNA mensageiro) e amplifica o cDNA resultante (DNA complementar). A combinação de ambas as técnicas aumenta a sensibilidade na detecção de vírus (NTZIORA *et al.* 2013).

Sobre a aplicabilidade, os métodos de PCR multiplex (usando múltiplos *primers* para permitir à amplificação de múltiplos modelos dentro de uma única reação) são úteis para fins de diagnóstico múltiplo, fornecendo ao diagnosticador a capacidade de detectar mais de um agente infeccioso (s) em um único ensaio (GREGORY, 2000). Este tipo de ensaio de PCR multiplex é muito utilizado para patógenos respiratórios virais e para detecção de infecções virais do sistema nervoso central. Além disso, esse método é adotado em vários segmentos da saúde, como exemplo, foi utilizado com sucesso na detecção simultânea de *Vírus sincicial respiratório bovino* e *Coronavírus respiratório bovino*, dois patógenos importantes nos complexos de doenças respiratórias de bezerros jovens, mostrando assim, que o PCR multiplex em tempo real, tem o potencial de produzir resultados satisfatórios, utilizando baixo custo e tempo reduzido, sem comprometer a robustez e a sensibilidade dos ensaios de detecção de vírus (AGÜERO *et al.* 2004).

Assim, devido sua alta sensibilidade e especificidade, o curto tempo de resposta para resultados e facilidade de desempenho a maioria dos laboratórios em todo o mundo emprega

PCR em tempo real para a detecção e quantificação de vírus de interesse médico em amostras clínicas (ESPY *et al.* 2006).

Outro método laboratorial muito utilizado para diagnóstico viral é o LAMP (Amplificação isotérmica mediada por loop), um método de amplificação de ácido nucleico isotérmico que é amplamente utilizado para detecção sensível, específica, rápida e econômica de vírus de DNA e RNA em espécimes humanos. O método foi desenvolvido pela primeira vez por NOTOMI *et al.* (2000) e rapidamente ganhou popularidade em virologia. A técnica emprega quatro a seis *primers* únicos e DNA polimerase com atividade de deslocamento de fita para amplificar o DNA alvo (NOTOMI *et al.* 2000; NAGAMINE *et al.* 2002). Alguns pesquisadores têm demonstrado que, devido ao uso do número de *primers* específicos, o ensaio LAMP pode apresentar uma boa sensibilidade e especificidade na detecção de ácidos nucleicos alvo (NAGAMINE *et al.* 2002; BECHERER *et al.* 2020).

Com a necessidade contínua da busca de novos patógenos e as pequenas limitações dos métodos de diagnóstico e identificação destes, nos últimos anos, novos métodos de sequenciamento de nova geração (NGS) foram introduzidos e se tornaram úteis em virologia diagnóstica e de pesquisa, pois podem, com sua aplicabilidade, analisar diretamente fragmentos de ácido nucléico virais extraídos de amostras clínicas, tecidos e excreções de diversas espécies (LEFTEROVA *et al.* 2015). O processo de NGS envolve a preparação de amostra de teste, sequenciamento dos fragmentos de ácido nucleico alvo usando uma das plataformas NGS disponíveis e análise dos dados de sequência a partir das ferramentas de bioinformática adequadas (SOUF 2016; RUUD *et al.* 2017).

Entre as diversas técnicas usadas para explorar novos vírus, tanto o sequenciamento convencional e de nova geração, tem sido utilizada para estudar os genomas virais não identificados nos bancos de dados de virologia (GARZA e DUTILH, 2015; MARTINEZ-HERNANDEZ *et al.* 2017). O sequenciamento de captura de viroma é outra abordagem para vírus de vertebrados, em que vários milhões de sondas cobrindo os genomas de várias taxonomias virais são usadas para enriquecer os alvos de vírus (BRIESE *et al.* 2015).

Existem diferentes máquinas que usam variados métodos de sequenciamento, reagentes e ferramentas de análise de dados. O mais antigo e já em desuso, foi o de pirosequenciamento (Roche 454) que detecta a liberação de pirofosfato após a incorporação de nucleotídeos em um processo de polimerização de DNA. Já a plataforma de nova geração da Illumina, detectam a liberação de marcadores fluorescentes de nucleotídeos incorporados em um processo de polimerização de DNA (RUUD *et al.* 2017).

Dentre as tecnologias emergentes, a plataforma de nanopóros da Universidade de Oxford, o MinIon, mostrou-se extremamente eficaz, pois é capaz de sequenciar o ácido nucleico

alvo por meio da detecção da corrente iônica de moléculas de DNA / RNA que passam pelos nanopóros (SOUF, 2016; RUUD *et al.* 2017). Relata-se que a pesar de sua alta taxa de erro de sequência que chega até a 38,2% (LAVER *et al.* 2015), o sequenciador nanopore MinION tem méritos sobre outras plataformas SNG, pois, pode gerar comprimentos de leitura mais longos (até 882 kb) em tempo real, tornando-o adequado para o sequenciamento do genoma completo de patógenos virais com tempo de resposta bastante curto (WANG *et al.* 2017). Outra vantagem do MinION é seu tamanho, pois, por ser portátil e de fácil transporte e por não ser necessária Internet para análise, torna-o implantável no campo durante surtos de infecções virais onde se quer uma identificação rápida destes microrganismos (QUICK *et al.* 2017). E por último, tem baixo custo de capital, tornando-o acessível em países de baixa renda e laboratórios com orçamento restrito em todo o mundo (JAIN *et al.* 2018).

Vale ressaltar que dentre as várias abordagens metagenômicas disponíveis, a meta-transcriptômica também vem ganhando espaço nas pesquisas virais. Esta abordagem é particularmente eficaz para descoberta de vírus de RNA, embora transcritos de RNA de vírus de DNA replicantes, bactérias, fungos e parasitas eucarióticos também possam ser facilmente identificados. É importante ressaltar que, ao contrário do sequenciamento de DNA shotgun, não há etapas de enriquecimento viral que possam introduzir viés (Figura 2) KUMAR *et al.* 2017).

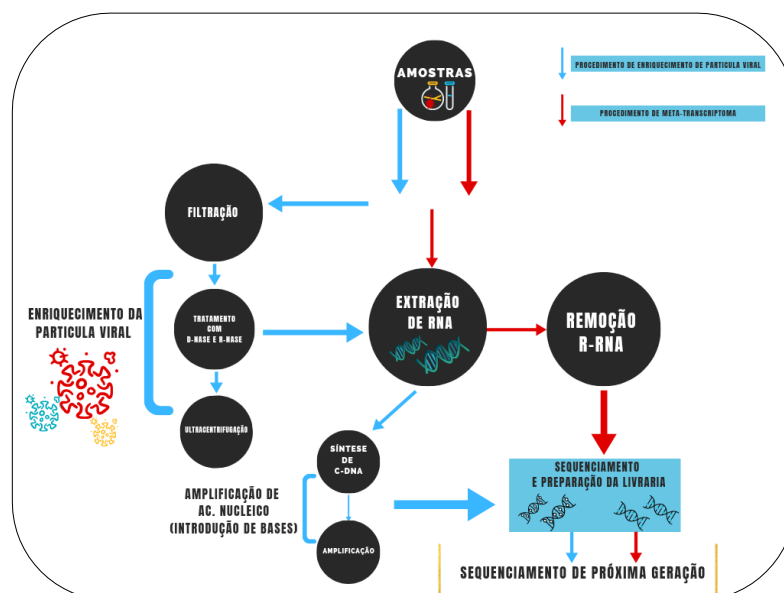


Figura 2 – Esquema comparativo de enriquecimento de vírus e abordagens de meta-transcriptômica para descoberta de vírus de RNA. Adaptado de SHI *et al.* 2018.

Embora seja provável que uma parcela dessas espécies virais não possuam a capacidade de causar doença nos morcegos, é possível que os quirópteros possam desempenhar um papel importante para facilitar a dispersão de vírus para diferentes áreas geográficas e diferentes

hospedeiros, incluindo o homem (O'SHEA *et al.* 2014; MORATELLI e CAISHER, 2015; BRIERLEY *et al.* 2016).

Desta maneira, verificamos então que a detecção bem-sucedida de uma gama de vírus em seus reservatórios silvestres, inclusive os morcegos, foco desta pesquisa, dependem de vários fatores, que vão desde a amostra a ser analisada e o tipo de vírus que se quer investigar, até as particularidades de cada método diagnóstico.

3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1- ASPECTOS ÉTICOS

O projeto recebeu aprovação da Comissão de Ética no uso de Animais da Universidade Federal do Oeste do Pará (CEUA/UFOPA) com o N° 0220220128 (Apendice A). As coletas de campo foram autorizadas pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (Licença SISBIO – 18313-1) (Apendice B).

3.2 – OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

3.2.1- Caracterização do local de amostragem

Os quirópteros foram obtidos na região urbana e peri-urbana do Município de Santarém-PA (Latitude: 2° 26' 22" Sul, Longitude: 54° 41' 55" Oeste), localizado na Mesorregião do Baixo Amazonas, cujos pontos de capturas foram identificados e georreferenciados (Figura 3).

A cidade de Santarém situa-se na foz do rio Tapajós e confluência com o rio Amazonas, distante 1.369 km em linha reta da capital do Estado do Pará, Belém. Ocupa uma área de 22.887,08 km² e tem uma população de 308.339 habitantes, sendo então o terceiro município paraense mais populoso, o oitavo mais populoso da Região Norte e o 91º mais populoso município do Brasil (IBGE, 2021).



Figura 3 – Mapa do Município de Santarém-Pa-Brasil (a esquerda na parte inferior em destaque nos mapas) e localizações dos pontos de capturas dos morcegos (pontos em azul). Fonte: Adaptação de imagem do earth.google.com/web/search/Santarém/Pa e PIRES *et al.* 2018.

3.2.2 – Obtenção dos quirópteros e amostras biológicas

A amostragem dos morcegos foi realizada em duas campanhas. A primeira ocorreu nos meses de dezembro de 2020 e janeiro de 2021, com 4 dias de coleta dos quirópteros (2 dias em

cada mês). Já a segunda foi conduzida no mês de julho de 2021, também sendo realizada em 4 dias consecutivos.

Para a captura, foram utilizadas redes de neblina na configuração de tamanho de malha de 36 mm, 50 ou 70/75 denier e 2 ply com 12 m de comprimento, dispostas estrategicamente em locais pré-definidos (próximo a abrigos – forros de casas e ocos de árvores, e onde havia disponibilidade de alimento – árvores frutíferas) e fixadas ao entardecer com o auxílio de hastes de metal e barbantes, de maneira que apresentassem “bolsas” ao ficarem armadas. O período médio de captura foi de 6 a 7 horas por noite, sendo as redes revisadas a cada 10-20 minutos para evitar o emaranhamento excessivo dos animais (Figura 4).

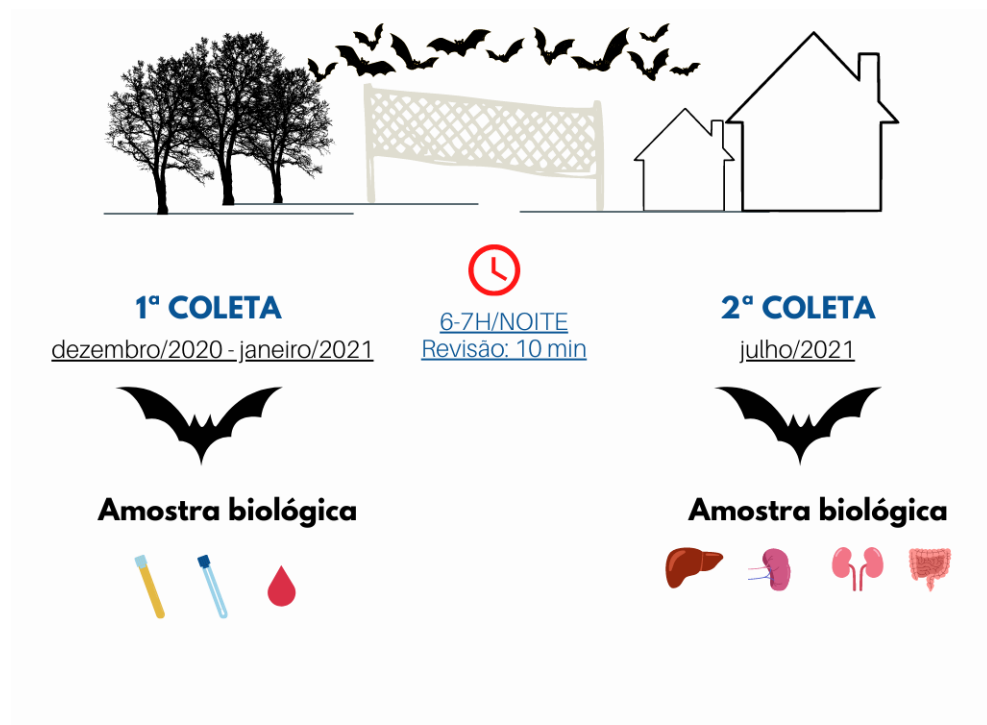


Figura 4 – Mostra onde as redes de neblina eram colocadas para a captura dos morcegos, o tempo de coleta por noite e quais as amostras biológicas foram colhidas durante as 2 campanhas realizadas. Fonte: Arquivo pessoal.

Após capturados, os morcegos eram identificados ao nível específico por biólogo especialista em taxonomia do grupo Chiroptera, em seguida eram anotadas informações sobre a morfologia externa, sexo, localização geográfica e características ambientais dos locais de captura. Apenas espécimes adultos e jovens (machos e fêmeas) foram utilizados para esse estudo. As fêmeas gestantes ou em amamentação eram identificadas e imediatamente soltas, não sendo colhidos qualquer material biológico.

Neste estudo, utilizamos diferentes amostras biológicas dos espécimes capturados, assim, na primeira campanha, extraímos sangue, saliva e fezes (por swab anal) de animais vivos, que em seguida eram soltos no mesmo local da coleta. Na segunda campanha, os morcegos capturados foram eutanasiados conforme os procedimentos éticos, e dissecados para então

obtermos amostras de intestinos, fígado, rins e baço. A coleta do sangue foi por punção venosa alar (0,1 ml por animal). Para saliva e fezes, utilizamos *swabs* estéreis, colocados em cavidade oral e retal, respectivamente de cada exemplar capturado. Amostras dos órgãos internos (intestinos – sem resíduos fecais evidentes, fígado, rins e baço) foram extraídas após a eutanásia individual, realizada com Cloridrato de Xilazina (1mg/kg) associada a Cloridrato de Quetamina (1-2 mg/kg) por via IM, seguida, pós constatação da perda da consciência dos animais, de Fenobarbital (40mg/kg) por via intra-cardíaca. A necropsia foi feita no Laboratório de Morfofisiologia Animal da Universidade Federal do Oeste do Pará, seguindo as normas institucionais de biossegurança.

Todas a amostras foram identificadas e mantidas em frascos rosca em meio PBS (Phosphate Buffered Saline) e congeladas a - 80°C até as análises laboratoriais. Já as informações sobre espécie, sexo e idade dos exemplares, data e local de captura e amostras foram registradas em planilha Excel e arquivadas.

3.3 – PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

3.3.1 – ALIQUOTAGEM E PREPARAÇÃO

O procedimento de aliquotagem foi necessário para que se pudesse ter quantidade suficiente de material para realizar todas as etapas do protocolo de Sequenciamento (NGS) aplicado à metagenômica viral e armazenamento das mesmas para estudos futuros. A figura 5 representa todas as etapas realizadas nesse estudo e em seguida, as mesmas são descritas detalhadamente.

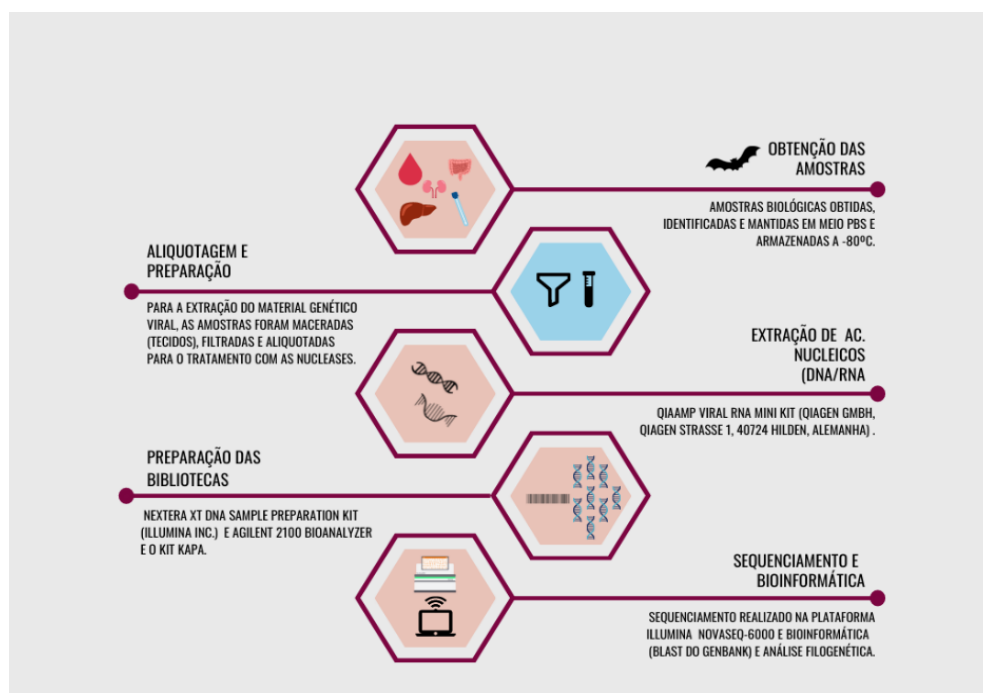


Figura 5 – Fluxograma das atividades no estudo Metagenômico viral das amostras biológicas dos morcegos para o sequenciamento na plataforma Illumina. Fonte: Arquivo

As amostras biológicas (sangue, swabs oral e anal, intestino, fígado, rins e baço) foram inicialmente maceradas em disruptor (exceto sangue) e depois diluídas em 500 µL de solução salina tamponada de Hanks (HBSS), adicionada a um tubo de 2 mL contendo matriz de lise C (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, EUA) e homogeneizado em Vórtex. Em seguida foram submetidas a um “giro suave”, 8000 rpm, por 5 min para remover detritos grandes, e os sobrenadantes foram colocados através de filtros de 0,45 µM (Merck Millipore, Billerica, MA, EUA) para remover partículas de células eucarióticas e bacterianas. As alíquotas dos filtrados foram postas em tubos com tampa de rosca de 1,5 ml, seguida de “rotação rígida” em ultracentrífuga Beckman Coulter Optima LE-80 com rotor Heraeus Maximum a 32.000 rpm por 2 horas a 8 ° C para sedimentar as partículas virais. Removeu-se então, cuidadosamente o sobrenadante e ressuspendeu-se o pellet (pode não ser visível) com 250 µl de PBS, estando as amostras prontas para tratamento com enzimas nucleases. Os filtrados foram tratados com DNase (concentração, 20 U/ml; Ambion) e RNase A (concentração, 0,1 mg/ml; Fermentas) a 37°C por 30 min com o intuito de digerir ácidos nucleicos não protegidos por partículas. Também utilizamos para a amplificação de DNA circular, a enzima polimerase Phi29 (Φ29).

Para a realização de estudo metagenômico, agrupamos as amostras em *pools* contendo apenas amostras biológicas diferentes por *pool* (ex: *pool* somente se sangue, *pool* somente de rins). A maioria dos *pools* continham 05 alíquotas individuais de espécie de morcego (Tabela 1). Para a divisão dos *pools*, consideramos o número de cada exemplar identificado no Apêndice C e para tanto, estabelecemos critérios utilizados em outras pesquisas para o agrupamento de *pools* (KOHL *et al.* 2021) que foram: 1- Os *pools* deveriam conter o número e amostras semelhantes, 2- Os *pools* deveriam ter apenas uma espécie de morcego e 3- Se o número de morcegos não fosse suficiente para construir um único *pool*, as espécies seriam misturadas.

Tabela 1 – a e b) Identificação dos *Pools* das amostras biológicas (S: sangue, SA: swab anal e SO: swab oral, F: fígado, B: baço, I: intestino e R: rins), de morcegos obtidas em Santarém-PA. Obs:

a)

<i>Pool</i>	Nº de indivíduos/ intervalo entre indivíduos	Espécies de morcegos contidas no <i>Pool</i>	Amostras biológicas individuais
1	5 (1-5)	<i>M. molossus</i>	S, SA, SO
2	5 (6-10)	<i>M. molossus</i>	S, SA, SO
3	5 (11-15)	<i>A. lituratus</i>	S, SA, SO
4	5 (16-20)	<i>Myotis</i> sp.	S, SA, SO
5	5 (21-25)	<i>M. molossus</i>	S, SA, SO
6	5 (26-30)	<i>N. albiventris</i>	S, SA, SO
7	5 (31-35)	<i>N. albiventris</i> , <i>N. leporinus</i>	S, SA, SO
8	5 (36-40)	<i>M. molossus</i>	S, SA, SO
9	5 (41-45)	<i>N. albiventris</i>	S, SA, SO
10	5 (46-50)	<i>N. albiventris</i>	S, SA, SO
11	6 (51-56)	<i>A. lituratus</i> , <i>Myotis</i> sp.	S, SA, SO

b)

Pool	Nº de indivíduos/ intervalo entre indivíduos	Espécies de morcegos contidas no Pool	Amostras biológicas individuais
1	5 (1-5)	<i>M. molossus</i>	F, B, I, R
2	5 (6-10)	<i>M. molossus</i>	F, B, I, R
3	5 (11-15)	<i>M. molossus</i>	F, B, I, R
4	5 (16-20)	<i>M. molossus</i>	F, B, I, R
5	5 (21-25)	<i>M. molossus</i>	F, B, I, R
6	5 (26-30)	<i>M. molossus</i>	F, B, I, R
7	5 (31-35)	<i>M. molossus</i>	F, B, I, R
8	5 (36-40)	<i>M. molossus</i>	F, B, I, R
9	5 (41-45)	<i>M. molossus</i>	F, B, I, R
10	7 (46-50)	<i>M. molossus</i> e <i>A. lituratus</i>	F, B, I, R

3.4- EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS (DNA/RNA)

Após a preparação das amostras, os ácidos nucleicos virais foram extraídos usando QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Alemanha) que purifica o RNA e o DNA, e as etapas seguiram-se de acordo com as instruções do fabricante com algumas modificações.

Em cada tubo de 1,5 ml pipetou-se 60 µl de tampão AVL (Lise) – Preparado contendo RNA transportador, e após homogeneização, adicionaram-se a cada tubo, 210 µl de amostra (preparadas anteriormente de sangue, swabs anal e oral) livres de células, ao RNA transportador do buffer AVL, em seguida, misturou-se no vórtex por 15s e incubou-se os tubos em temperatura ambiente por 10 minutos para garantir uma lise completa e eficiente. (Nessa etapa ocorre a lise de partículas virais e mesmo que o tempo seja mais longo, não afetará o rendimento ou a qualidade do RNA purificado). Foram adicionados 600 µl de etanol (96%-100%) a amostra e depois vortizada durante 15 segundos e centrifugada brevemente, para remover as gotas aderidas a tampa. A solução resultante então foi transferida para o dispositivo da coluna QIAamp minikit® (em tubo de coleta de 2ml sem molhar o aro) e centrifugada a 6.000 x g (8.000 rpm) por um minuto. Nessa etapa o dispositivo com a coluna foi removido do tubo e recolocado em um tubo limpo de 2ml e o tubo que continha o ultrafiltrado, descartado. Repetiu-se a etapa anterior por mais 2 vezes e depois realizou-se a adição de 600 µl de Buffer AW1 (Wash Buffer 1) ao dispositivo com a coluna que foi centrifugado a 8.000 rpm por um minuto. O procedimento de lavagem foi repetido com 600 µl de Buffer AW2 (Wash Buffer 2), seguido de centrifugação em velocidade máxima de 20.000 × g; (14.000 rpm) durante 1 minuto. A recomendação de repetição de etapa de lavagem da coluna QIAamp Mini, com a colocação da mesma em um novo tubo de coleta de 2ml (não fornecido pelo fabricante) e realizasse o descarte do tubo de coleta antigo com o filtrado, seguido de centrifugação em velocidade máxima de 1 minuto, teve o objetivo de retirar todo o excesso de álcool. Por fim, o RNA extraído da coluna foi eluído pela adição de 60 µl de tampão AVE equilibrado à temperatura ambiente, sendo

aguardado 10 minutos para então fosse centrifugado a $20.000 \times g$ (14.000 rpm) por 2 minutos e após as amostras terem sido transferidas do dispositivo para tubo de recuperação. As mesmas foram armazenadas a -20°C .

3.5 – PREPARAÇÃO DAS BIBLIOTECAS PARA A PLATAFORMA ILLUMINA

Os produtos de PCR foram verificados em gel de agarose em seguida coletados fragmentos de DNA de 500-1000 pb com esferas Ampure - SAGE BluePippin Targeted Size Selection (1,5% agarose, 250bp - 1,5kb). A preparação das bibliotecas foi feita como o kit Nextera XT DNA Sample Preparation Kit (Illumina Inc.) identificadas por códigos de barras duplos e seguindo as orientações do fabricante. O sistema Agilent 2100 Bioanalyzer e o kit KAPA foram utilizados para fazer a qualificação e quantificação da biblioteca.

3.6 – SEQUENCIAMENTO DAS AMOSTRAS NA PLATAFORMA ILLUMINA

As bibliotecas agrupadas em pools (de acordo com o a tabela 1 a e b) foram sequenciadas na plataforma Illumina NovaSeq-6000, para fornecer leituras emparelhadas de 100 bp, com o kit TruSeq PE Cluster v3 e o kit TruSeq SBS v3 (Illumina).

3.7 – BIOINFORMÁTICA

As leituras brutas obtidas do sequenciamento Illumina foram pré-processadas, onde os registros de sequência de extremidades emparelhadas foram removidos de ambas as extremidades. As sequências com baixa qualidade (dados brutos gerados de leituras com comprimento inferior a 100 bp) foram cortadas. As sequências do adaptador e dos *primers* também foram cortadas usando o VecScreen baseado em BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) nos parâmetros padrão (MCGINNIS e THOMAS, 2004). E ainda nesta etapa, as leituras que continham homopolímero e leituras duplicadas foram identificadas e removidas.

As análises de bioinformática foram realizadas de acordo com o protocolo descrito por Deng *et al.* 2015. Neste estudo, nos concentramos em viromas de morcegos, com foco em sequencias de interesse em Saúde Pública, Medicina Veterinária e que denotassem ser novos vírus. As *reads* e *contigs* resultantes foram comparados utilizando o BLASTx para pesquisar similaridade com proteínas virais e também aos bancos de dados não redundantes de nucleotídeos BLASTn do GenBank. Os melhores resultados (melhor percentual de similaridade com o vírus correspondente) das pesquisas BLASTx e BLASTn, foram escolhidos para análises e os dados genômicos foram montados usando GS “*de novo*” Assembler ver. 2.8 software de computador (Roche).

3.8 – ANÁLISE FILOGENÉTICA

Nesta etapa utilizamos apenas as sequências de boa qualidade (*contigs* com mais de 100pb, genomas completos ou parciais). Para a filogenia, as sequências de nucleotídeos ou proteínas de referência da diversidade de famílias virais foram baixadas dos bancos de dados GenBank e UniProt, respectivamente e os alinhamentos múltiplos e as árvores filogenéticas foram geradas a partir do *plugin* ClustalX do programa Mega Versão 11 (TAMURA *et al.* 2007) e as edições e visualizações das árvores pelo programa FastTree (PRICE *et al.* 2010).

Os alinhamentos das sequências de aminoácidos foram verificados e identificados manualmente, e aparados para às regiões do genoma e/ou proteínas correspondentes às sequências de *contigs* sequenciados para vírus específicos, gerados neste estudo. Todas as árvores filogenéticas foram construídas usando o método de Máxima Verossimilhança e o modelo evolutivo selecionado foi o modelo GTR, com os suportes estatísticos (baseado no teste de Simodaira e Hasegawa) calculados utilizando bootstrap com 1000 réplicas.

4 – RESULTADOS

4-1 – Espécies de morcegos amostrados

Neste estudo, obtivemos um total de 108 morcegos de 4 famílias de quirópteros (Phyllostomidae, Molossidae, Vespertilionidae e Noctilionidae), sendo as espécies capturadas e número de exemplares e seu hábito alimentar : *Noctilio albiventris* (n= 19 - insetívoro), *N. leporinus* (n=1 - piscívoros), *Artibeus lituratus* (n=15 - frugívoro), *Myotis* sp. (n= 6 - insetívoro) (Figura 6) e *Molossus molossus* (n=67 - insetívoro). A identificação da espécie de morcegos amostradas foi baseada nas características morfológicas destes animais, e como já mencionado anteriormente, realizada por taxonomista.

Obtivemos o maior número de exemplares bem como diversidade de espécies durante a primeira campanha de amostragem realizada, com um total de 56 morcegos obtidos (*N. albiventris* - n= 19, *N. leporinus* - n=1, *A. lituratus* - n=10 e *Myotis* sp. - n= 6 (Figura 4) e *M. molossus* (n=20). No segundo período de capturas, 52 morcegos foram obtidos, e apenas 02 espécies foram registradas (*A. lituratus* (n=5) e *M. molossus* (n=47).



Figura 6 – Espécies de morcegos capturadas para obtenção de amostras biológicas (Sangue, Swabs oral e anal) para pesquisas de vírus. Esquerda – *Noctilio leporinus*; Direita – *Artibeus lituratus*. Fonte: Arquivo pessoal.

Quanto a distribuição dos quirópteros capturados em nosso estudo, observamos que numericamente, tanto em quantidade de exemplares quanto a variedade de espécies, estiveram mais concentradas nas áreas mais centrais da cidade de Santarém, como observa-se na figura 7. Possivelmente esta concentração possa estar associada justamente aos fatores de abrigos e alimento (forros de casas e árvores frutíferas), abundantes nesta região.

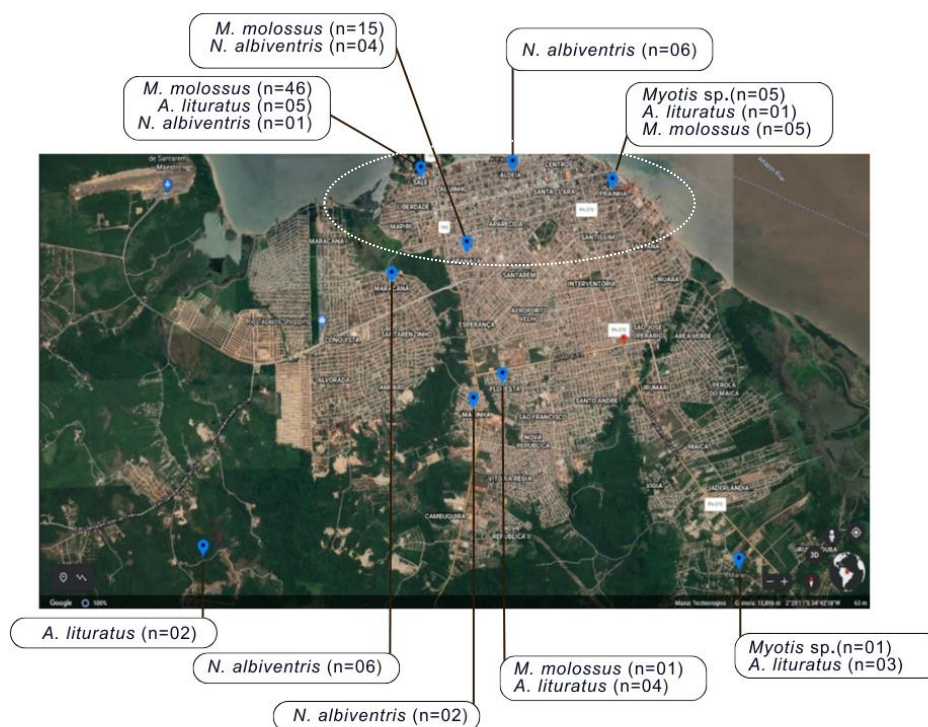


Figura 7 – Distribuição de espécies de morcegos quanto aos pontos de captura realizado nas duas campanhas de amostragem realizadas nos períodos de dezembro de 2020, janeiro e julho de 2021 no município de Santarém-Pa. Área central - tracejado. Fonte: Arquivo pessoal.

4-2 Análise dos Viromas das amostras biológicas

O sequenciamento dos 33 *pools* das amostras (sangue, *swabs* oral e anal) e dos tecidos dos morcegos (intestino, fígado e baço) via Illumina novaSeq gerou cerca de 14.696 milhões de sequências de leituras brutas para vírus de mamíferos e insetos. Os resultados virais mostraram sequências correspondentes a uma ampla gama de vírus conhecidos e novos. O total de leituras por *pool* encontra-se na tabela 2.

Tabela 2- Total de leituras brutas por amostras dos morcegos, obtidos no sequenciamento na Plataforma Illumina.

<i>Pools</i>	S	SA	SO	F	B	R	I
1	566.935	141.762	208.347	290.987	253.784	171.212	201.312
2	314.056	221.836	275.573	57.201	340.358	350.117	591.109
3	17.012	148.322	297.640	299.211	321.225	260.322	508.742
4	579.538	268.257	311.369	236.038	320.077	234.083	180.320
5	93.534	108.227	262.622	148.320	347.372	301.615	310.234
6	557.833	94.705	241.595	195.835	397.440	153.526	185.771
7	204.858	15.886	58.229	167.834	99.995	124.145	60.473
8	90.213	204.474	239.922	212.444	353.525	102.404	329.551
9	205.000	93.209	166.817	267.029	533.313	104.621	138.564
10	80.432	25.315	257.287	260.308	398.956	50.098	265.179
11	291.628	146.914	188.312	-	-	-	-
Total	3.366.045	1.468.907	2.507.713	2.135.207	3.366.045	1.852.143	201.312

(S: sangue, SA: swab anal e SO: swab oral, F: fígado, B: baço, I: intestino e R: rim)

Como obtivemos um número expressivo de resultados, os dados serão expostos na seguinte ordem (i) distribuição do viroma de famílias virais nas diferentes amostras biológicas, (ii) a diferença na composição do viroma dos diferentes *pools* por espécie de morcego, (iii) um foco em famílias de vírus selecionadas que apresentam interesse em Saúde Pública e Medicina Veterinária, incluindo Coronaviridae, Adenoviridae, Parvoviridae, Circoviridae e Retroviridae e (iv) um foco para novos vírus - *Parvovirus* e *Totivirus*.

4.2.1 - Diferença na composição de família viral de acordo com o tipo de amostra biológica e espécie de morcegos obtidas no Sequenciamento da Plataforma Illumina.

Obtivemos *contigs* para dezesseis famílias virais de interesse de nosso estudo: *Anelloviridae*, *Astroviridae*, *Bornaviridae*, *Circoviridae*, *Genomoviridae*, *Hespesviridae*, *Parvoviridae*, *Papillomaviridae*, *Picobirnaviridae*, *Picornaviridae*, *Polyomaviridae*, *Paramyxoviridae*, *Rhabdoviridae* e *Retroviridae*.

A composição viral diferiu das amostras utilizadas neste estudo. Em geral, para amostras onde os morcegos não foram eutanasiados (sangue, *swabs* oral e anal), foram registrados viromas de doze famílias – *Anelloviridae*, *Bornaviridae*, *Circoviridae*, *Genomoviridae*, *Hespesviridae*, *Parvoviridae*, *Papillomaviridae*, *Picornaviridae*, *Polyomaviridae*, *Rhabdoviridae* e *Retroviridae*, com maior diversidade nas amostras de *swab* oral (n° = 10 famílias) (Figura 8).

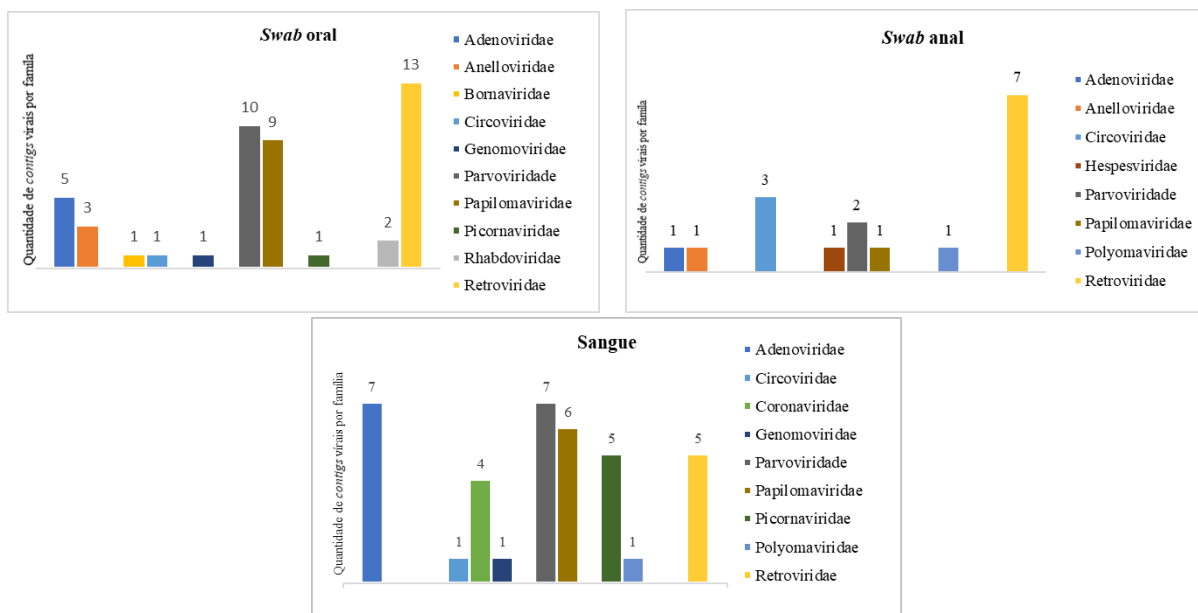


Figura 8 – Variedade de Famílias virais e quantidade de *contigs* virais por amostra biológica de swabs oral e anal e sangue de morcegos, obtidas no sequenciamento na plataforma Illumina.

Para os *pools* de fígado, baço, rins e intestino, sequências de doze famílias estiveram leituras de sequências virais, sendo os maiores registros destas, para a amostragem de *pools* de baço e intestino (n° =11 famílias cada) (Figura 9).

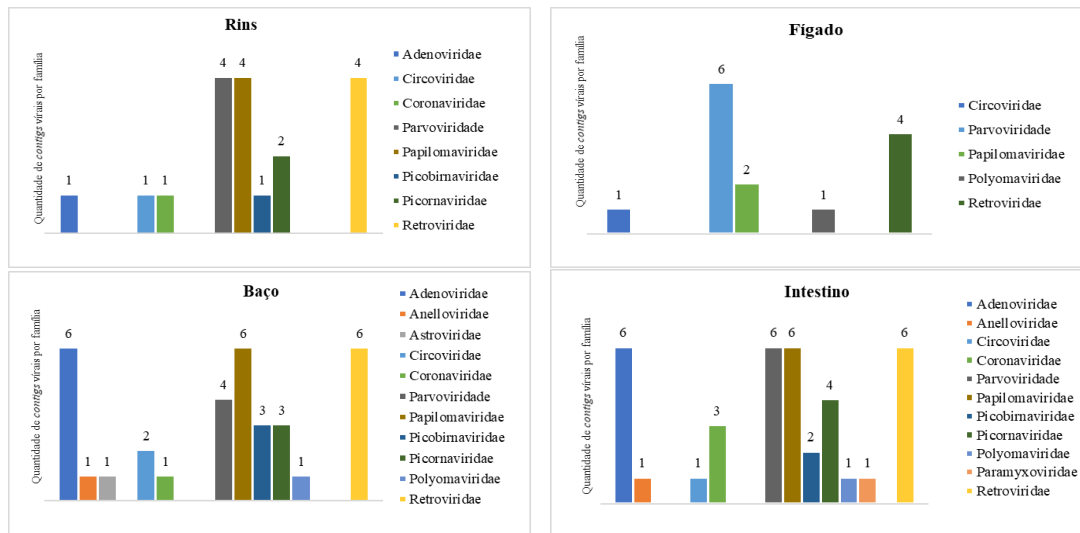


Figura 9 – Variedade de Famílias virais e quantidade de *contigs* virais por amostra biológica de fígado, rins, baço e intestino de morcegos, obtidas no sequenciamento na plataforma Illumina.

Em relação as espécies de morcegos, a espécie *M. molossus*, que numericamente apresentava mais exemplares (n= 67), também apresentou a maior diversidade de famílias, registrando 12 famílias ao total, seguida da espécie *Myotis* sp., que mesmo apresentando um número expresivamente menor (n=6), obteve *contigs* montados para nove famílias virais (Figura 10). Para essa análise, não consideramos *pools* mistos (que apresentavam amostras de espécies diferentes).

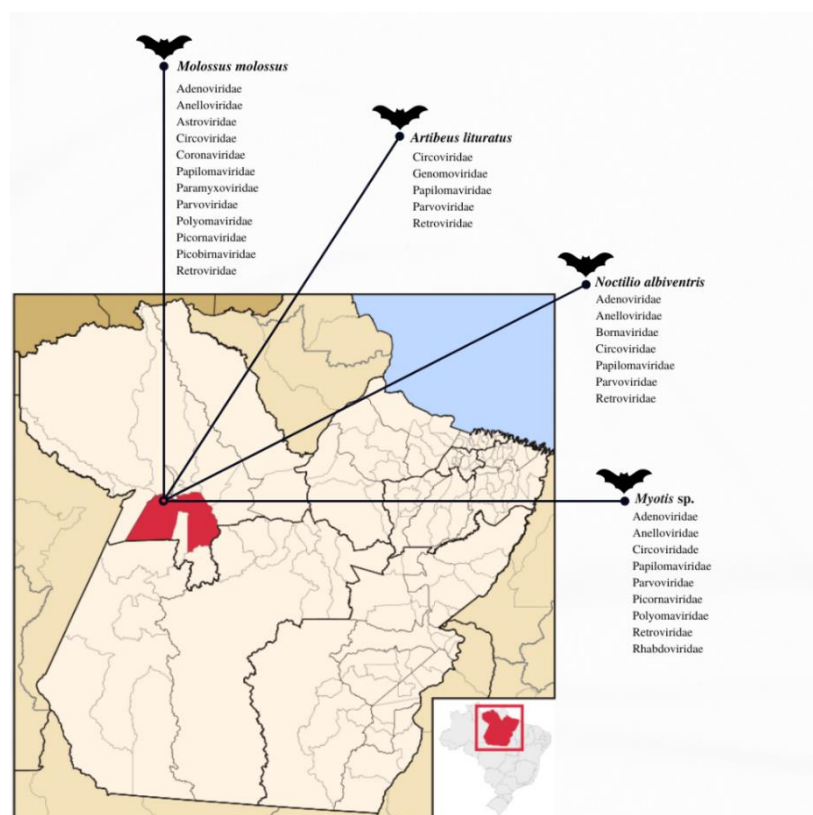


Figura 10 – Variedade de Famílias virais que tiveram *contigs* montados por espécies de morcegos, obtidas nas amostras biológicas no sequenciamento na plataforma Illumina. Santarém-Pa-Brasil (Área em vermelho). Fonte: Adaptado de <https://raizesds.com.br/pt/projeto/tbc-aritapera/santarem-pa-mapa>.

4.1.2 – Visão geral na composição do viroma dos diferentes *pools* de amostras biológicas obtidas no Sequenciamento da Plataforma Illumina.

Para cada família, as espécies/gênero de vírus que tiveram sequências identificadas por *pools* individuais, obtivemos o nº acesso dos melhores resultados recuperados no BLASTn e BLASTx do banco de dados NCBI, bem como as proteínas correspondentes dos *contigs* (Quadro 1).

As sequências de eucaritoas, de plantas, insetos e outros invertebrados, foram identificadas e arquivadas, por não ser nosso foco de nossa pesquisa, exceto aquelas que denotavam ser de novos vírus, que para o estudo, direcionamos aos Totivirus. Todas as sequências virais foram armazenadas sendo que algumas foram ou serão depositadas no Genbank (aquelas utilizadas nos artigos).

Quadro 1 – Leituras de vírus identificadas em amostras de: a) *pools* intestinos (I), b) *pools* de baço (B), c) *pools* de swab anal (SA), d) *pools* de fígado (F), e) *pools* de swab oral (SO) e f) *pools* de sangue (S). As colunas indicam respectivamente: o nº do *pool*, a família e as sequências do vírus obtidas na plataforma Illumina, a proteína correspondente a sequência obtida no Blastx, o comprimento do nucleotídeo e total de leituras, o nº de acesso do vírus correspondente no GenBank, o percentual de similaridade e o valor de E.

a)	Nº Pool	Família	Vírus	Proteína	Comp. (nt)	Hits	Vírus Correspondente (Nº) Acesso	% similaridade	E-value
	11	Parvoviridae	<i>Artibeus jamaicensis parvovirus 1</i>	Proteína não-estrutural	251	1	YP_005397851.1	35.71%	2e-05
		Picornaviridae	<i>Bovine rhinitis B virus</i>	Poliproteína	251	1	ANX02879.1	73.08%	0.009
		Paramyxoviridae	<i>Canine kobovirus</i>	Poliproteína	163	4	QJE07158.1	66.04%	9e-12
			<i>Canine morbillivirus</i>	Proteína hemaglutinina	185	2	ABX84034.1	85.71%	7e-11
	12	Circoviridae	<i>Bat circovirus</i>	Replicase	2320	45	AIF76270.1	52.47%	2e-34
		Papillomaviridae	<i>Betapapillomavirus 1</i>	Proteína L1	251	1	AYA94092.1	71.23%	6e-29
		Picornaviridae	<i>Human papillomavirus</i>	Proteína E1	251	3	NP_040287.1	52.08%	4e-04
		Parvoviridae	<i>Canine kobovirus</i>	Poliproteína	251	8	AZS64122.1	91.18%	2e-10
			<i>Parvovirus NIH-CQV</i>	Replicase	250	2	YP_008431133.1	58.44%	3e-20
	13	Circoviridae	<i>Bat circovirus</i>	Proteína Rep. (replicase)	251	21	AIF76270.1	42.11%	0.006
		Adenovirus	<i>Bat mastadenovirus</i>	Proteína termin DNATP	251	3	BBE29305.1	75.00%	5e-10
		-	<i>Canine mastadenovirus A</i>	Proteína ORF 8	249	1	UKI59076.1	77.63%	3e-23
		-	<i>Human mastadenovirus C</i>	Poliproteína	251	12	UAW96132.1	100.00%	6e-51
		-	<i>Porcine mastadenovirus C</i>	Proteína hexon	219	1	AKH10608.1	42.53%	3e-09
		Papillomaviridae	<i>Human papillomavirus</i>	Proteína E1 e L2	250 e 251	1 e 2	AYA94301.1 e	54.00%	0.009 e 3e-14
		-	<i>Felis catus papillomavirus</i>	Proteína E1	172	1	QXH75609.1	53.06%	2e-06
		Retroviridae	<i>Equine infectious anemia virus</i>	Poliproteínas	5366	1	AAA43022.1	99.82%	0.0
		-	<i>Enzootic nasal tumour virus of goats</i>	Poliproteína gag	251	1	P32542.1	47.22%	2e-11
		-	<i>Gibbon ape leukemia virus</i>	Poliproteína	249	1	NGS8675.1	49.28%	7e-12
		Coronaviridae	<i>Squirrel monkey retrovirus</i>	Proteína Envelope (env)	250	3	ALV83306.1	48.19%	2e-12
		Parvoviridae	<i>SARS-related bat coronavirus</i>	Proteína ORF1ab	212	1	NP_041262.1	98.55%	7e-38
		-	<i>Rat parvovirus 2</i>	Proteína NS1	251	1	UEF20961.1	32.91%	0.001
		-	<i>Turkey parvovirus</i>	Proteína ns2	188	1	YP_010086594.1	66.67%	8e-13
	14	Circoviridae	<i>Bat circovirus</i>	Replicase	251	18	AIF76270.1	56.96%	4e-13
		Adenoviridae	<i>Bat mastadenovirus C</i>	Proteína hexon	217	3	ADZ52950.1	86.05%	2e-17
		Picornaviridae	<i>Ovine mastadenovirus A</i>	Proteína hexon	251	1	ABG22143.2	92.77%	2e-44
		Picornaviridae	<i>Bat posalivirus</i>	Poliproteína	251	1	AQP31136.1	37.68%	0.015
		Papillomaviridae	<i>Feline picobornavirus</i>	RdRp	251	3	ASK8595.1	80.70%	3e-40
			<i>Turkey picobornavirus</i>	Proteína capsídeo	251	2	AHY84711.1	45.21%	1e-13
			<i>Pipapillomavirus 1</i>	Proteína L2	250	1	UJQ88223.1	83.75%	4e-23
	15	Parvoviridae	<i>Turkey parvovirus 1078</i>	Proteína não-estrutural	251	1	AQR59067.1	36.84%	4e-04
	16	Adenoviridae	<i>Human mastadenovirus C</i>	Proteína capsídeo VI	196	1	QZW33723.1	100.00%	9e-36
			<i>Skunk mastadenovirus A</i>	Proteína 22K	250	1	YP_009162601.1	50.60%	2e-11
	17	Parvoviridae	<i>Desmodus rotundus parvovirus</i>	Proteína não-estrutural	251	1	YP_009328889.1	59.76%	7e-21
		Papillomaviridae	<i>Lambdapapillomavirus 2</i>	Proteína L1	251	1	AOI33384.1	64.71%	2e-28
	18	Papillomaviridae	<i>Betapapillomavirus 1</i>	Proteína E7	251	1	YP_009553371.1	72.31%	8e-22
		Retroviridae	<i>Enzootic nasal tumour virus of goats</i>	Poliproteína gag	251	4	QPZ85371.1	39.76%	2e-06
		-	<i>Mason Pfizer monkey virus</i>	Proteína Capsídeo (caps)	248	6	6HW1_A	78.83%	5e-29
		Adenoviridae	<i>Squirrel monkey retrovirus</i>	Poliproteína	251	3	P03364.3	98.36%	3e-30
		Polymaviridae	<i>Human mastadenovirus C</i>	Proteína L1	251	16	QYJ58268.1	96.61%	1e-32
		Picornaviridae	<i>Bat polyomavirus</i>	Proteína antigênica	184	1	YP_0091750.1	53.85%	5e-05
			<i>Rhinovirus A</i>	Poliproteína	176	1	QIM74092.1	48.08%	6e-05
	19	Papillomaviridae	<i>Alphapapillomavirus 10</i>	Proteína E2	250	1	CCC55769.1	45.45%	1e-08
		Coronaviridae	<i>Bat betacoronavirus</i>	RdRp	210	1	GA88252.1	97.14%	1e-41
		-	<i>Bat coronavirus BM48 31 BGR 2008</i>	ORF1ab	251 - 143	5	UIX36054.1	100.00%	1e-44
		Adenoviridae	<i>SARS-related bat coronavirus</i>	ORF1ab	251-148	13	UQC18417.1	100.00%	1e-34
		Anelloviridae	<i>Human mastadenovirus C</i>	Poliproteína	249	1	QZW33723.1	100.00%	9e-40
			<i>Human anellovirus</i>	ORF 1	232	1	QYD01987.1	53.33%	3e-16
	110	Adenoviridae	<i>Human mastadenovirus C</i>	Proteína core V	251 - 113	3	AZR67740.1	94.29%	2e-26
		Retroviridae	<i>Duck infectious anemia virus</i>	Poliomerase	250	1	AGV92859.1	61.11%	4e-12
		Papillomaviridae	<i>Rattus norvegicus papillomavirus 2</i>	Proteína E1	250	1	ANX295699.1	45.68%	1e-04

b)

Nº Pool	Família	Vírus	Proteína	Comp. (nt)	Hits	Vírus Correspondente (Nº) Acesso	% similaridade	E-value
B1	Circoviridae	<i>Bat circovirus</i>	Replicase	250	2	AI1F76270.1	61.40%	2e-15
	Papillomaviridae	<i>Betapapillomavirus 1</i>	Proteína E	164	2	ATQ38094.1	77.78%	2e-18
B2	Papillomaviridae	<i>Nuapapillomavirus 1</i>	Poliproteína	251	1	NP_040285.1	44.30%	8e-12
	Parvoviridae	<i>Simian parvo like virus 3</i>	Poliproteína	251	6	APC23167.1	47.56%	0.003
B3	Retroviridae	<i>Enzootic nasal tumour virus of goats</i>	Poliproteína	251	2	ANG58679.1	57.50%	6e-23
		<i>Feline immunodeficiency virus</i>	Poliproteína (pol)	251	1	NP_040973.1	45.83%	0.001
	Adenoviridae	<i>Human mastadenovirus C</i>	Poliproteína	251	7	AZR67740.1	96.08%	1e-25
	Papillomaviridae	<i>Lambdapapillomavirus 1</i>	Proteína L1 (caps)	250	1	AAM33466.1	67.64%	0.001
	Coronaviridae	<i>SARS-related bat coronavirus</i>	Proteína ORF1ab	141	1	UJU94448.1	100.00%	6e-22
	Circoviridae	<i>Bat circovirus</i>	Replicase	251	9	AI1F76270.1	37.10%	8e-04
	Adenoviridae	<i>Bat mastadenovirus B</i>	Proteína 3K	251	1	YP_004782113.1	65.38%	1e-29
B4	Adenoviridae	<i>Bovine mastadenovirus C</i>	Proteína DBP	251	2	AEW91341.1	58.75%	1e-14
	Parvoviridae	<i>Carnivore protoparvovirus 1</i>	Proteína VP2	251	2	QJX15795.1	97.56%	3e-49
	Papillomaviridae	<i>Equus caballus papillomavirus</i>	Proteína L1	242	2	YP_009315925.1	65.00%	3e-29
		<i>Human papillomavirus</i>	Proteína E2	251	1	QAB14039.1	94.44%	1e-14
	Parvoviridae	<i>Primate erythroparvovirus 1</i>	Proteína NS1	68	1	QIA46557.1	85.71%	5e-05
	Retroviridae	<i>Reticuloendotheliosis virus</i>	Proteína gag	251	3	QHF16617.1	42.17%	8e-15
	B5	Circoviridae	<i>Bat circovirus</i>	Replicase	251	3	UOF80215.1	52.63
Adenoviridae		<i>Bovine mastadenovirus A</i>	Proteína DBP	250	2	NP_046325.1	59.46%	1e-24
		<i>Equine mastadenovirus A</i>	Proteína DBP	251	1	ANG08567.1	70.51%	8e-32
B6		Circoviridae	<i>Bat circovirus</i>	Proteína Rep. (replicase)	251	4	AI1F76270.1	54.00%
	Adenoviridae	<i>Canine mastadenovirus A</i>	Proteína ORF26	251	1	APD29226.1	50.88%	7e-09
		<i>Equine mastadenovirus B</i>	Proteína Hexon (caps)	251	1	YP_009162357.1	76.19%	4e-33
		<i>Human mastadenovirus C</i>	Poliproteína	251	13	AZR67740.1	96.08%	1e-25
	Retroviridae	<i>Equine infectious anemia virus</i>	Transcriptase reversa	250	1	WP_104389314.1	78.31%	1e-43
		<i>Simian retrovirus 8</i>	Poliproteína	223	1	AOS48109.1	75.00%	2e-28
	Polyomaviridae	<i>Human polyomavirus 12</i>	VP1	251	1	YP_007684355.2	59.32%	2e-12
B7	Parvoviridae	<i>Rat parvovirus 2</i>	Proteína não-estrutural	251	1	YP_010086594.1	66.67%	2e-22
	Retroviridae	<i>Murine leukemia virus</i>	Proteína gag	251	5	AAL69910.1	96.67%	2e-08
B8	Adenoviridae	<i>Bat mastadenovirus A</i>	Proteína Terminal	251	1	BBE29335.1	73.17%	6e-35
	Parvoviridae	<i>Desmodus rotundus parvovirus</i>	Proteína não-estrutural 1	2287	64	YP_009328889.1	76.65%	0.0
	Retroviridae	<i>Equine infectious anemia virus</i>	Poliproteína	251	1	BAB12110.1	95.18%	8e-45
		<i>Reticuloendotheliosis virus</i>	Proteína gag	251	15	QHF16622.1	59.57%	8e-12
	Anelloviridae	<i>Feline anellovirus</i>	Proteína ORF 1	251	1	QYD02374.1	40.00%	2e-11
	Picobornaviridae	<i>Fox picobornavirus</i>	RdRp	201	5	AGK45555.1	75.51%	3e-18
	B9	Papillomaviridae	<i>Alphapapillomavirus 9</i>	Proteína E1	251	2	QNM74057.1	65.75%
		<i>Betapapillomavirus 1</i>	Proteína L1	251	5	ATQ38132.1	60.00%	6e-16
Picornaviridae		<i>Bat badcivir 1</i>	Proteína não-estrutural	188	2	YP_00945910.1	57.38%	4e-17
		<i>Rhinovirus C</i>	Poliproteína	251	4	AN170116.1	38.46%	3e-06
		<i>Enterovirus B</i>	Replicase	251	3	QTM69012.1	47.73%	0.002
Circoviridae		<i>Bat circovirus ZS China</i>	Protease	251	1	QTM69012.1	79.52%	1e-41
Astroviridae		<i>Canine astrovirus</i>	Poliproteína	204	2	AEL28798.1	95.38%	3e-35
B10	Retroviridae	<i>Equine infectious anemia virus</i>	Proteína capsídeo	251	2	BAB12104.1	47.37%	8e-07
	Picobornaviridae	<i>Picobornavirus sp.</i>		224	2	USE08144.1	58.11%	9e-18
	Circoviridae	<i>Bat circovirus</i>	Replicase	249	2	AI1F76270.1	62.50%	2e-27
B10	Papillomaviridae	<i>Betapapillomavirus 2</i>	Proteína L1	251	3	ATQ38118.1	86.42%	3e-41
		<i>Duck papillomavirus</i>	Proteína L1	251	2	ANN29877.1	67.07%	5e-31
	Picobornaviridae	<i>Picobornavirus PREDICT PbV-87</i>	RdRp	251	2	ALA11508.1	61.90%	2e-09

c)

Nº Pool	Família	Vírus	Proteína	Comp. (nt)	Hits	Vírus Correspondente (Nº) Acesso	% similaridade	E-value
SA 1	Anelloviridae	<i>Giant panda anellovirus</i>	ORF 1	250	1	QZE11981.1	52.50%	1e-20
	Retroviridae	<i>Murine leukemia virus</i>	Transcriptase reversa	251	4	AAB58752.1	82.77%	4e-46
SA 2		<i>Squirrel monkey retrovirus</i>	Poliproteína	167	1	P03364.3	64.15%	3e-15
	Circoviridae	<i>Bat circovirus</i>	Proteína Rep. (replicase)	2321	75	AI1F76270.1	54.00%	2e-42
SA 3		<i>Columbid circovirus</i>	Proteína Rep. (Replicase)	2479	14	ASX95448.1	45.83%	9e-17
		<i>Duck associated cyclovirus 1</i>	Proteína Rep. (Replicase)	251	1	AZQ25300.1	50.60%	2e-16
	Retroviridae	<i>Bat gammaretrovirus</i>	Poliproteína (Pol)	251	1	AF57735.1	61.11%	0.004
		<i>Enzootic nasal tumour virus of goats</i>	Proteína gag	251	1	QTE34358.1	67.74%	7e-17
		<i>Moloney murine sarcoma virus</i>	Transcriptase	168	1	AAA46524.1	93.94%	1e-10
		<i>Simian retrovirus 4</i>	Poliproteína	249	1	ADC52784.1	56.45%	7e-14
		<i>Squirrel monkey retrovirus</i>	Poliproteína	251	4	AAA46815.1	85.00%	2e-28
SA 4	Papillomaviridae	<i>Betapapillomavirus</i>	Proteína L	118	1	CCV02863.1	100.00%	4e-15
	Circoviridae	<i>Bat circovirus</i>	Proteína Rep. (replicase)	251	19	AI1F76270.1	42.11%	0.006
SA 5		<i>Columbid circovirus</i>	Proteína Rep. (replicase)	251	2	CAC50250.1	50.85%	7e-10
		<i>Duck associated cyclovirus</i>	Proteína Rep. (replicase)	250	1	AXL64564.1	59.26%	7e-28
	Papillomaviridae	<i>Betapapillomavirus</i>	Proteína L2	251	1	AYA94753.1	72.73%	1e-20
	Polyomaviridae	<i>Human polyomavirus 2</i>	Large T Proteína Antigenica	251	10	BAF40812.1	100.00%	3e-50
	Retroviridae	<i>Murine leucemia virus</i>	Proteína gag	251	2	ARB03406.1	100.00%	9e-46
SA 6	Parvoviridae	<i>Desmodus rotundus parvovirus</i>	Proteína não estrutural	251	10	QOR29549.1	82.61%	0.037
	Circoviridae	<i>Bat circovirus</i>	Proteína Rep. (replicase)	251	1	AI1F76267.1	57.50%	1e-21
	Retroviridae	<i>Equine infectious anemia virus</i>	Polimerase (Pol)	251	1	AAC24015.1	97.59%	1e-45
SA 7	Anelloviridae	<i>Giant panda anellovirus</i>	ORF 1	250	1	QZE11973.1	53.19%	4e-05
SA 8	Hesperiviridae	<i>Bat betaherpesvirus 2</i>	Glicoproteína B	251	1	BAI22794.1	50.57 %	7e-18
	Circoviridae	<i>Bat circovirus</i>	Replicase	251	5	QIM58708.1	54.41%	2e-14
SA 9		<i>Porcine circovirus 2</i>	Replicase	251	3	ADF80773.1	62.16%	4e-05
	Adenoviridae	<i>Human mastadenovirus C</i>	Proteína 52K	251	2	AZR66390.1	100.00%	1e-48
SA 10	Anelloviridae	<i>Giant panda anellovirus</i>	ORF 1	251	1	QZE11973.1	52.27%	4e-05
SA 11	Parvoviridae	<i>Human bocavirus</i>	Proteína NP1	251	26	AFU35575.1	96.34	5e-50

d)

Nº Pool	Família	Vírus	Proteína	Comp. (nt)	Hits	Vírus Correspondente (Nº) Acesso	% similaridade	E-value
F1	Retroviridae	<i>Duck infectious anemia virus</i>	Polimerase	251	2	AGV92859.1	51.95%	2e-18
	Papillomaviridae	<i>Betapapillomavirus 6</i>	Proteína L2	165	2	ATQ38103.1	86.96%	0.005
F2	Parvoviridae	<i>Eidolon helvum parvovirus 2</i>	Proteína NS1	251	5	AYG97824.1	39.21%	6e-04
	Parvoviridae	<i>Desmodus rotundus parvovirus</i>	Proteína não-estrutural 1	251	18	YP_009328889.1	84.34%	1e-44
F3	Polyomaviridae	<i>Human polyomavirus 2</i>	Proteína antigenica	250	1	5J40_A	74.39%	3e-33
	Retroviridae	<i>Equine infectious anemia virus</i>	Poliproteína	189	1	AA C24015.1	89.87%	2e-13
F4	Papillomaviridae	<i>Betapapillomavirus 6</i>	Proteína L2	208	2	ALJ32287.1	69.23%	1e-08
F5	Parvoviridae	<i>Aribeus lituratus parvovirus</i>	Proteína não-estrutural	251	6	AWN56767.1	86.59%	5e-42
F6	Parvoviridae	<i>Canine bocavirus</i>	Proteína não-estrutural 1	250	1	UMB41517.1	79.52%	2e-40
F7	Retroviridae	<i>Ovine enzootic nasal tumor virus</i>	Protease	123	1	QBZ23637.1	55.00%	3e-05
	-	<i>Enzootic nasal tumour virus 2</i>	Proteína gag	180	2	QCY65252.1	55.63%	4e-06
F8	Retroviridae	<i>Equine infectious anemia virus</i>	Polimerase	243	1	AA C24015.1	98.77%	2e-47
F9	Circoviridae	<i>Bat associated cyclovirus 16</i>	Replicase	251	1	UJO02085.1	65.62%	1e-19
F10	Retroviridae	<i>Equine infectious anemia virus</i>	Poliproteína	251	1	AA G02702.1	54.05%	0.007
	Papillomaviridae	<i>Alphapapillomavirus 1</i>	Proteína L2	217	1	ATQ38103.1	89.96%	0.005

e)

Nº Pool	Família	Vírus	Proteína	Comp. (nt)	Hits	Vírus Correspondente (Nº) Acesso	% similaridade	E-value
S1	Adenoviridae	<i>Adenovirus squirrel 96 29 KOR</i>	Proteína hexon	251	1	QP112650.1	80.49%	7e-37
	Coronaviridae	<i>Bat coronavirus BM48 31 BGR 2008</i>	Proteína de superfície	205	2	URN32356.1	100.00%	9e-44
	-	<i>Betacoronavirus Rhinolophus hipposideros</i>	RdRp	191	1	QGA88252.1	89.83%	2e-29
	-	<i>SARS related bat coronavirus</i>	Proteína ORF1ab	133	2	7KAC_A	100.00%	2e-21
	Picornaviridae	<i>SARS related coronavirus</i>	Proteína ORF1ab	202	17	P0DT133.1	98.41%	2e-35
	-	<i>Bat falisvirus</i>	Polproteína	97	1	AQP31137.1	67.74%	9e-07
	-	<i>Bat criparvirus</i>	Proteína não-estrutural	251	2	ULF99871.1	45.21%	3e-12
	Parvoviridae	<i>Bat flavivirus</i>	Polproteína	251	3	YP_009345906.1	66.15%	3e-21
	Papillomaviridae	<i>Bovine rhinitis B virus</i>	Polproteína	232	3	ANN02879.1	73.08%	0.008
	-	<i>Chicken picornavirus 1</i>	Polproteína	251	4	YP_00954888.1	42.19%	0.022
	-	<i>Bat parvovirus 2</i>	Proteína VP2	250	1	A1F74239.1	76.62%	2e-33
	-	<i>Canine papillomavirus</i>	Proteína E7	251	1	YP_009126907.1	39.77%	1e-04
	-	<i>Felis catus papillomavirus</i>	Proteína E1	124	2	YP_009408618.1	60.00%	0.002
	S2	<i>Bat circovirus</i>	Replicase	251	1	A1F76278.1	45.21%	4e-27
		<i>Bat mastadenovirus A</i>	Proteína IIIa	251	1	E29307.1	66.27%	2e-18
		<i>Human mastadenovirus C</i>	Proteína capsídeo	191	1	BBN51264.1	82.54%	1e-27
		<i>Rat parvovirus 2</i>	Proteína não-estrutural	250	2	YP_010086594.1	34.72%	0.001
S3	Retroviridae	<i>Reticuloendotheliosis virus</i>	Proteína gag	235	1	QHFI6618.1	49.33%	4e-17
	-	<i>Duck infectious anemia virus</i>	Proteína gp8	251	13	ACV32858.1	66.67%	0.011
S4	Retroviridae	<i>Desmodus rotundus endogenous retrovirus</i>	Proteína truncada	243	4	AJR27940.1	97.44%	5e-44
	Circoviridae	<i>Bat circovirus</i>	Replicase	2320	287	A1F76270.1	52.47%	2e-34
	Adenoviridae	<i>Bat mastadenovirus A</i>	Proteína IIIa	251	6	BBE29337.1	72.29%	8e-34
	-	<i>Bovine mastadenovirus A</i>	Proteína DBP	251	8	YP_094041.1	62.20%	3e-26
	-	<i>Canine mastadenovirus A</i>	Proteína ORF21	250	7	UKI50089.1	76.47%	2e-20
	-	<i>Human mastadenovirus C</i>	Proteína L1	251	11	UAW96881.1	96.10%	2e-29
	Papillomaviridae	<i>Ovine mastadenovirus A</i>	Proteína hexon	251	8	ABG22141.1	88.89%	2e-17
	-	<i>Porcine mastadenovirus A</i>	Proteína hexon	251	3	AMN10065.1	40.00%	4e-06
	Retroviridae	<i>Bos taurus papillomavirus 18</i>	Proteína E1	249	1	YP_009272595.1	50.70%	6e-11
	Papillomaviridae	<i>Colobus monkey papillomavirus</i>	Proteína E1	250	1	YP_004646340.1	61.33%	2e-09
	Parvoviridae	<i>Enzootic nasal tumour virus of goats</i>	Protease	251	1	ANG38658.1	50.00%	2e-10
	-	<i>Human polyomavirus 2</i>	Proteína VP1	146	2	AC089512.1	100.00%	2e-26
	-	<i>Parvovirus NIH-CQV</i>	Proteína VP1	251	5	QJIS3772.1	72.94%	3e-33
	-	<i>Turkey parvovirus TP1</i>	Proteína não-estrutural	251	3	AHF54688.1	52.24	9e-06
	-	<i>Simian parvo like virus 3</i>	Proteína não-estrutural	251	27	APC23167.1	43.82%	1e-08
S5	Parvoviridae	<i>Desmodus rotundus parvovirus</i>	Proteína capsídeo	251	2	YP_009328890.1	75.61%	3e-28
	Papillomaviridae	<i>Human polyomavirus 2</i>	Proteína antígenica T	251	4	ACF41629.1	97.59%	2e-51
	Retroviridae	<i>Reticuloendotheliosis virus</i>	Proteína gag	251	3	AZ194152.1	50.72%	2e-12
S6	Adenoviridae	<i>Adenovirus squirrel 96 29 KOR</i>	Proteína hexon	251	4	ALE33729.1	75.31%	2e-32
	Papillomaviridae	<i>Alphapapillomavirus 3</i>	Proteína E1	237	4	AUB51277.1	57.14%	1e-21
S7	Circoviridae	<i>Bat circovirus</i>	Replicase	250	3	A1F76278.1	42.21%	9e-08
	Papillomaviridae	<i>Equus caballus papillomavirus 8</i>	Proteína L1	251	1	UIP37422.1	63.86%	3e-27
	Retroviridae	<i>Equine infectious anemia virus</i>	Polproteína	251	1	QBCT7618.1	61.54%	5e-07
	-	<i>Reticuloendotheliosis virus</i>	Proteína gag	249	1	QHFI6617.1	53.75%	6e-21
	Adenoviridae	<i>Human mastadenovirus C</i>	Proteína de capsídeo	251	5	B0HA7822.1	98.89%	1e-49
S8	Papillomaviridae	<i>Human polyomavirus 2</i>	Proteína antígenica T	251	2	ACF15354.1	100.00%	8e-38
	-	<i>Desmodus rotundus parvovirus</i>	Proteína não-estrutural	250	8	YP_009328889.1	84.20%	5e-12
S9	Parvoviridae	<i>Simian parvo-like virus 3</i>	Proteína não-estrutural	251	4	APC23167.1	53.19%	0.001
	Retroviridae	<i>Squirrel monkey retrovirus</i>	Proteína Envelope	128	2	NP_041262.1	62.16%	5e-06
	-	<i>Feline immunodeficiency virus</i>	Proteína gag	251	1	AH753489.1	41.67%	5e-06
	-	<i>Desmodus rotundus parvovirus</i>	Proteína não-estrutural	251	10	YP_009328889.1	83.13%	5e-43
S10	Parvoviridae	<i>Bat circovirus</i>	Polproteína	177	2	A1F76270.1	43.64%	5e-08
	Genomoviridae	<i>Canine feces-associated gemycircularvirus</i>	Replicase	249	4	ASM93483.1	66.67%	2e-27
	Retroviridae	<i>Enzootic nasal tumour virus of goats</i>	Proteína gag	250	7	AD150273.1	76.19%	4e-10
	-	<i>Mason-Pfizer monkey virus</i>	Polproteína	251	8	NP_056891.1	70.13%	2e-30
	Adenoviridae	<i>Murine leukemia virus</i>	Proteína gag	251	1	AAP37287.1	46.43%	4e-07
	Papillomaviridae	<i>Human mastadenovirus C</i>	Proteína capsídeo	251	4	QDQ015996.1	98.89%	3e-48
	Parvoviridae	<i>Human papillomavirus 174</i>	Proteína E	115	2	CCV02860.1	97.37%	6e-17
	-	<i>Simian parvo-like virus 3</i>	Proteína não-estrutural	249	3	APC23167.1	39.76%	2e-04
	S11	<i>Bat circovirus</i>	Replicase	251-145	9	A1F76270.1	55.00%	1e-04
		<i>Bat hepatovirus</i>	Polproteína	186	3	YP_009179216.1	88.89%	4e-23
		<i>Betapapillomavirus 1</i>	Proteína E2	206	2	UIQ88222.1	68.75%	0.044
		<i>Bos taurus papillomavirus 18</i>	Proteína E1	251	1	YP_009272595.1	49.23%	3e-10
		<i>Canine papillomavirus 14</i>	Proteína E1	106	1	YP_007195267.1	58.33%	4e-04
		<i>Bat rhabdovirus</i>	Poliomerase	250	1	A1F74284.1	42.03%	5e-06
		<i>Piry vesiculovirus</i>	RdRp	251	1	YP_009505336.1	51.81%	9e-14
		<i>Canine bocavirus</i>	Proteína NS1	251	1	UMB41514.1	75.31%	5e-36
		<i>Porcine bocavirus</i>	Proteína NS1	249	1	AYC49708.1	63.75%	1e-27
		<i>Rat parvovirus 2</i>	Proteína não-estrutural	251	52	YP_010086594.1	49.40%	4e-20
		<i>Turkey parvovirus TP1 2012</i>	Proteína não-estrutural	251	27	AHF54688.1	50.00%	2e-04
S O 1	Retroviridae	<i>Enzootic nasal tumour virus of goat</i>	Polproteína	250	5	QE026602.1	43.13%	4e-06
	-	<i>Mason-Pfizer monkey virus</i>	Transcriptase reversa	251	8	2D4L_A	68.29%	1e-26
	-	<i>Reticuloendotheliosis virus</i>	Poliomerase	251	11	ASH96780.1	63.77%	4e-20
	Adenoviridae	<i>Human mastadenovirus C</i>	Proteína Capsídeo	251	3	BBN51264.1	100.00%	1e-54
	Anelloviridae	<i>Torque teno canis virus</i>	ORF 2	251	1	QCQ29650.1	65.91%	5e-12
	-	<i>Tupaia hepatovirus A</i>	Polproteína	196	1	YP_009215780.1	76.56%	2e-25
	S O 5	<i>Bat hepatovirus</i>	Polproteína	110	2	YP_009505614.1	48.57%	0.013
		<i>Mouse mammary tumor virus</i>	Proteína integrase	184	4	5CZ1_A	60.38%	2e-10
		<i>Protoparvovirus HK 2014</i>	Proteína não-estrutural	251	10	QOR29549.1	81.93%	7e-39
	S O 6	<i>Bat circovirus</i>	Replicase	251	8	A1F76270.1	43.18%	3e-10
		<i>Turkey parvovirus TP1-2012/HUN</i>	Proteína não-estrutural	251	6	AHF54688.1	50.82%	0.002
	S O 7	<i>Simian parvo-like virus 3</i>	Proteína não-estrutural	251	2	APC23167.1	45.12%	0.016
		<i>Murine leukemia virus</i>	Proteína gag	115	1	0711245A	100.00%	4e-16
		<i>Feline leukemia virus</i>	Polproteína (env)	251	23	AYG96585.1	71.19%	9e-07
	-	<i>Avian leukosis virus</i>	Polproteína (env)	251	1	AUT36432.1	55.88%	0.035
	S O 8	<i>Desmodus rotundus parvovirus</i>	Proteína não-estrutural	2511	34	YP_009328889.1	76.65%	0.0
		<i>Alphapapillomavirus</i>	Replicase	251	1	AEM24637.1	50.00%	8e-11
	S O 9	<i>Bat bornavirus</i>	Poliomerase	137	1	BBL33072.1	50.00%	0.037
		<i>Ovine enzootic nasal tumor virus</i>	Proteína	251	6	QTE34358.1	71.74%	2e-11
	Anelloviridae	<i>Torque teno sus virus 1a</i>	ORF1	248	1	AFS64006.1	49.09%	2e-05
S O 10	Papillomaviridae	<i>Betapapillomavirus 1</i>	Proteína L2	130	2	ATQ38103.1	88.37%	5e-16
	Retroviridae	<i>Simian retrovirus 8</i>	Proteína gag	148	2	AOS48103.1	57.41%	4e-11
	-	<i>Feline immunodeficiency virus</i>	Proteína gag	251	1	AHZ63409.1	41.67%	3e-06
S O 11	Adenoviridae	<i>Bat mastadenovirus E</i>	Proteína E1b	147	1	YP_009272877.1	73.47%	6e-18
	-	<i>Cervid adenovirus 1</i>	Proteína E1b	249	1	YP_009373235.1	46.91%	4e-09
	-	<i>Porcine mastadenovirus A</i>	Proteína E	251	1	YP_009205.1	83.13%	4e-41
	Papillomaviridae	<i>Betapapillomavirus 1</i>	Proteína E1	251	2	ATQ38086.1	55.51%	2e-09
	-	<i>Ferret papillomavirus</i>	Proteína E1	251	1	YP_008519310.1	53.52%	3e-17
	Retroviridae	<i>Mason Pfizer monkey virus</i>	Proteína não-estrutural	251	12	NP_056893.1	50.70%	2e-12
	-	<i>Ovine enzootic nasal tumor virus</i>	Proteína	2753	56	ACX93977.1	59.41%	4e-148
S O 12	-	<i>Gibbon ape leukemia virus</i>	Polproteína	251	1	ALV83303.1	50.00%	1e-05

f)

Nº Pool	Família	Vírus	Proteína	Comp. (nt)	Hits	Vírus Correspondente (Nº) Acesso	% similaridade	E-value
S O 1	Parvoviridae	<i>Desmodus rotundus parvovirus</i>	Proteína capsídeo	151	4	YP_009328890.1	91.84%	8e-25
	Retroviridae	<i>Simian retrovirus Y</i>	Poliproteína	251	2	BAM71050.1	79.52%	1e-32
S O 2	Circoviridae	<i>Bat circovirus</i>	Replicase	251	1	A1F76270.1	55.07%	1e-25
	Adenoviridae	<i>Cervid adenovirus 1</i>	Proteína 52k	184	2	YP_009373240.1	85.25%	4e-27
S O 3	Papillomaviridae	<i>Alphapapillomavirus 10</i>	Proteína E1	251	1	ACS72928.1	53.57%	4e-11
	Genomoviridae	<i>Canine feces-associated gemycircularvirus</i>	Replicase	250	1	ASM93483.1	71.95%	2e-33
	-	<i>Duck infectious anemia virus</i>	Proteína gag	200	5	AGV92858.1	40.68%	0.003
	Retroviridae	<i>Ovine enzootic nasal tumor virus</i>	Poliproteína	250	1	QBZ39636.1	50.72%	6e-11
	-	<i>Squirrel monkey retrovirus Rat</i>	Proteína envelope	251	12	NP_955543.1	57.89%	1e-20
	Parvoviridae	<i>Parvovirus 2</i>	Proteína não-estrutural	132	2	AXX39021.1	88.10%	3e-15
	-	<i>Parvovirus 2</i>	Proteína não-estrutural	132	2	AXX39021.1	88.10%	3e-15
S O 4	Circoviridae	<i>Bat circovirus</i>	Replicase	251-145	9	A1F76270.1	55.00%	1e-04
	Papillomaviridae	<i>Bat hepatovirus</i>	Poliproteína	186	3	YP_009179216.1	88.89%	4e-23
	-	<i>Betapapillomavirus 1</i>	Proteína E2	206	2	UIQ88222.1	68.75%	0.044
	Papillomaviridae	<i>Bos taurus papillomavirus 18</i>	Proteína E1	251	1	YP_009272595.1	49.23%	3e-10
	-	<i>Canine papillomavirus 14</i>	Proteína E1	106	1	YP_007195267.1	58.33%	4e-04
	Rhabdoviridae	<i>Bat rhabdovirus</i>	Poliomerase	250	1	A1F74284.1	42.03%	5e-06
	-	<i>Piry vesiculovirus</i>	RdRp	251	1	YP_009505336.1	51.81%	9e-14
	Parvoviridae	<i>Canine bocavirus</i>	Proteína NS1	251	1	UMB41514.1	75.31%	5e-36
	-	<i>Porcine bocavirus</i>	Proteína NS1	249	1	AYC49708.1	63.75%	1e-27
	-	<i>Rat parvovirus 2</i>	Proteína não-estrutural	251	52	YP_010086594.1	49.40%	4e-20
	-	<i>Turkey parvovirus TP1 2012</i>	Proteína não-estrutural	251	27	AHF54688.1	50.00%	2e-04
	Retroviridae	<i>Enzootic nasal tumour virus of goat</i>	Poliproteína	250	5	QE026602.1	43.13%	6e-11
-	<i>Mason-Pfizer monkey virus</i>	Transcriptase reversa	251	8	2D4L_4	68.29%	1e-26	
-	<i>Reticuloendotheliosis virus</i>	Poliomerase	251	11	ASH96780.1	63.77%	4e-20	
Adenoviridae	<i>Human mastadenovirus C</i>	Proteína Capsídeo	251	3	BBN51264.1	100.00%	1e-54	
Aneloviridae	<i>Torque toro canis virus</i>	ORF 2	251	1	QCQ29650.1	65.91%	5e-12	
-	<i>Tupaia hepatovirus A</i>	Poliproteína	196	1	YP_009215780.1	76.56%	2e-25	
S O 5	Picornaviridae	<i>Bat hepatovirus</i>	Poliproteína	110	2	YP_009505614.1	48.57%	0.013
	Retroviridae	<i>Mouse mammary tumor virus</i>	Proteína integrase	184	4	5CZL_4	60.38%	2e-10
	Parvoviridae	<i>Protoparvovirus HK 2014</i>	Proteína não-estrutural	251	10	QOR29549.1	81.93%	7e-39
S O 6	Circoviridae	<i>Bat circovirus</i>	Replicase	251	8	A1F76270.1	43.18%	3e-02
	Parvoviridae	<i>Turkey parvovirus TP1-2012/HUN</i>	Proteína não-estrutural	251	6	AHF54688.1	50.82%	0.000
S O 7	Parvoviridae	<i>Simian parvo-like virus 3</i>	Proteína não-estrutural	251	2	OPC23167.1	45.12%	0.016
	Retroviridae	<i>Marine leukemia virus</i>	Proteína gag	115	1	071245A	100.00%	4e-16
	-	<i>Feline leukemia virus</i>	Poliproteína (env)	251	23	AYG65685.1	71.19%	9e-07
-	<i>Avian leukosis virus</i>	Poliproteína (env)	251	1	AUT36432.1	55.88%	0.035	
S O 8	Parvoviridae	<i>Desmodus rotundus parvovirus</i>	Proteína não-estrutural	251	34	YP_009328890.1	76.65%	0.0
	Papillomaviridae	<i>Alphapapillomavirus 10</i>	Replicase	251	1	AEM24637.1	50.00%	8e-11
S O 9	Bornaviridae	<i>Bat bornavirus</i>	Poliomerase	137	1	BBL33072.1	50.00%	0.037
	Retroviridae	<i>Ovine enzootic nasal tumor virus</i>	Poliproteína	251	6	QTE3458.1	71.74%	2e-11
	Aneloviridae	<i>Torque toro sus virus 1a</i>	ORF1	248	1	AFS64006.1	49.09%	2e-05
S O 10	Papillomaviridae	<i>Betapapillomavirus 1</i>	Proteína L2	130	2	ATQ38103.1	88.37%	5e-16
	Retroviridae	<i>Simian retrovirus 8</i>	Proteína gag	148	2	AOS48103.1	57.41%	4e-11
	-	<i>Feline immunodeficiency virus</i>	Proteína gag	251	1	AHZ63409.1	41.67%	3e-06
S O 11	Adenoviridae	<i>Bat mastadenovirus E</i>	Poliproteína	147	1	YP_009272877.1	73.47%	6e-18
	-	<i>Cervid adenovirus 1</i>	Proteína E1b	249	1	YP_009373255.1	46.91%	4e-09
	-	<i>Porcine mastadenovirus A</i>	Proteína E	251	1	YP_009205.1	83.13%	4e-41
	Papillomaviridae	<i>Betapapillomavirus 1</i>	Proteína E1	251	2	ATQ38086.1	55.51%	2e-09
	-	<i>Ferret papillomavirus</i>	Proteína E1	251	1	YP_008519301.1	53.52%	3e-17
	Retroviridae	<i>Mason Pfizer monkey virus</i>	Proteína não-estrutural	251	12	NP_056893.1	50.70%	2e-12
-	<i>Ovine enzootic nasal tumor virus</i>	Poliproteína	2753	56	ACX83977.1	59.41%	4e-148	
-	<i>Gibbon ape leukemia virus</i>	Poliproteína	251	1	ALV83303.1	50.00%	1e-05	

4.1.3 – Famílias que apresentam sequências de vírus de interesse em Saúde Pública e Veterinária.

4.1.3.1 – *Contigs* relacionados à Família *Retroviridae*

Os Retrovírus (família *Retroviridae*) são vírus de RNA com envelope de sentido positivo com uma molécula de RNA genômico de comprimento de 7–12 kb. Todos os retrovírus contêm três proteínas principais: *gag*, que direciona a síntese de proteínas internas do vírion; *pol*, que compreende as enzimas protease, transcriptase reversa e integrase; e *env*, que constitui o envelope viral (COFFIN *et al.*, 1997).

Do total de contigs obtidos, foram identificados quatro gêneros de retrovírus (*Alpha*, *Beta*, *Gamma* e *Lentivirus*) (Tabela 3). As sequências retrovirais aqui identificadas representam genes, que codificam a protease / polimerase (*pol*) e as glicoproteínas de envelope (*env*), e aquelas envolvidas no processo de replicação viral (Poliproteínas *gag* e transcriptase reversa).

Tabela 3 – *Contigs* de retrovírus de interesse em saúde pública e veterinária identificados nas leituras por pools nas diferentes amostras biológicas de morcegos. swab anal (SA), swab oral (SO), sangue (S), fígado (F), baço (B) e intestino (I).

Gênero	Vírus identificado (<i>Contigs</i>)	Amostra (<i>Pool</i>)
<i>Alpharetrovirus</i>	<i>Avian retrovirus</i>	SO
	<i>Avian leukosis virus</i>	SO
<i>Gammaretrovirus</i>	<i>Feline leukemia virus</i>	SO, B
	<i>Murine leukemia virus</i>	SA, SO, S
	<i>Reticuloendotheliosis virus</i>	SO, S, F
	<i>Gibbon ape leukemia virus</i>	I
	<i>Duck infectious anemia virus</i>	I
	<i>Moloney murine sarcoma virus</i>	SA
	<i>Bat gammaretrovirus</i>	SA,
<i>Betaretrovirus</i>	<i>Mason Pfizer monkey virus</i>	SO, S, F, I
	<i>Enzootic nasal tumour virus of goats</i>	SA, S, SO, B, I
	<i>Simian retrovirus 8</i>	AS, B
	<i>Squirrel monkey retrovirus</i>	SA, S, I
	<i>Ovine enzootic nasal tumor virus</i>	SO, F
<i>Lentivirus</i>	<i>Equine infectious anemia virus</i>	SA, S, B, I
	<i>Feline immunodeficiency virus</i>	B
	<i>Human immunodeficiency virus</i>	SO

Todas as amostras tiveram leituras retrovirais, sendo numericamente mais registros de sequências observadas nos swabs orais, com 13 *contigs* de retrovírus identificados. Os vírus *Avian leukosis vírus*, *Reticuloendotheliosis virus*, *Feline leukemia vírus* - FeLV, *Feline immunodeficiency vírus* - FIV, *Enzootic nasal tumour virus of goats*, *Duck infectious anemia vírus*, *Equine infectious anemia vírus* - EAIV, estão entre aqueles que apresentam interesse em Medicina Veterinária.

Observamos que dentre as diversas leituras em diferentes amostras com nucleotídeos para o EAIV, um genoma quase completo (5366 nucleotídeos). A sequência continha fragmentos de genes que codificam proteínas estruturais *pol* e *env*. O genoma parcial foi minerado em *Pool* de intestino, onde haviam apenas amostras de *M. molossus*. Denominamos essa *read* de I3_EIVACG. Para a identificação mais precisa, após a montagem do genoma parcial, realizamos a reconstrução filogenética baseada na sequência de referência de EAIV e de outros dois lentivírus (*Virus da Artrite-encefalite caprina* - CAEV e o *Virus VisnaMaedi*) e para os genes *pol* e *env*. A análise filogenética para I3_EIVACG mostrou proximidade com as sequências depositadas de EAIV e agrupou-se com o CAEV e o *VisnaMaedi* no GenBank (Figura 11), bem como para as regiões de proteína *pol* (Figura 12) e *env* (Figura 13) correspondentes de outros lentivírus.

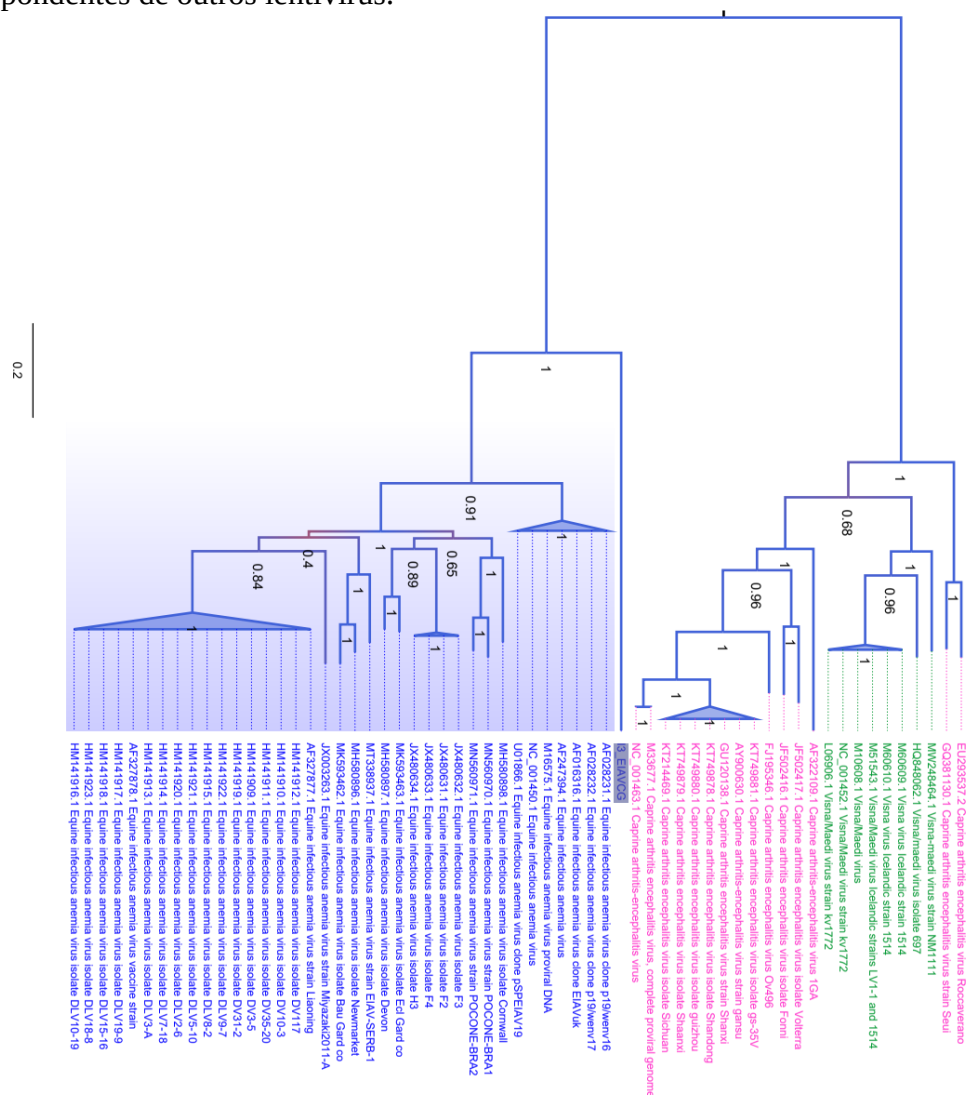
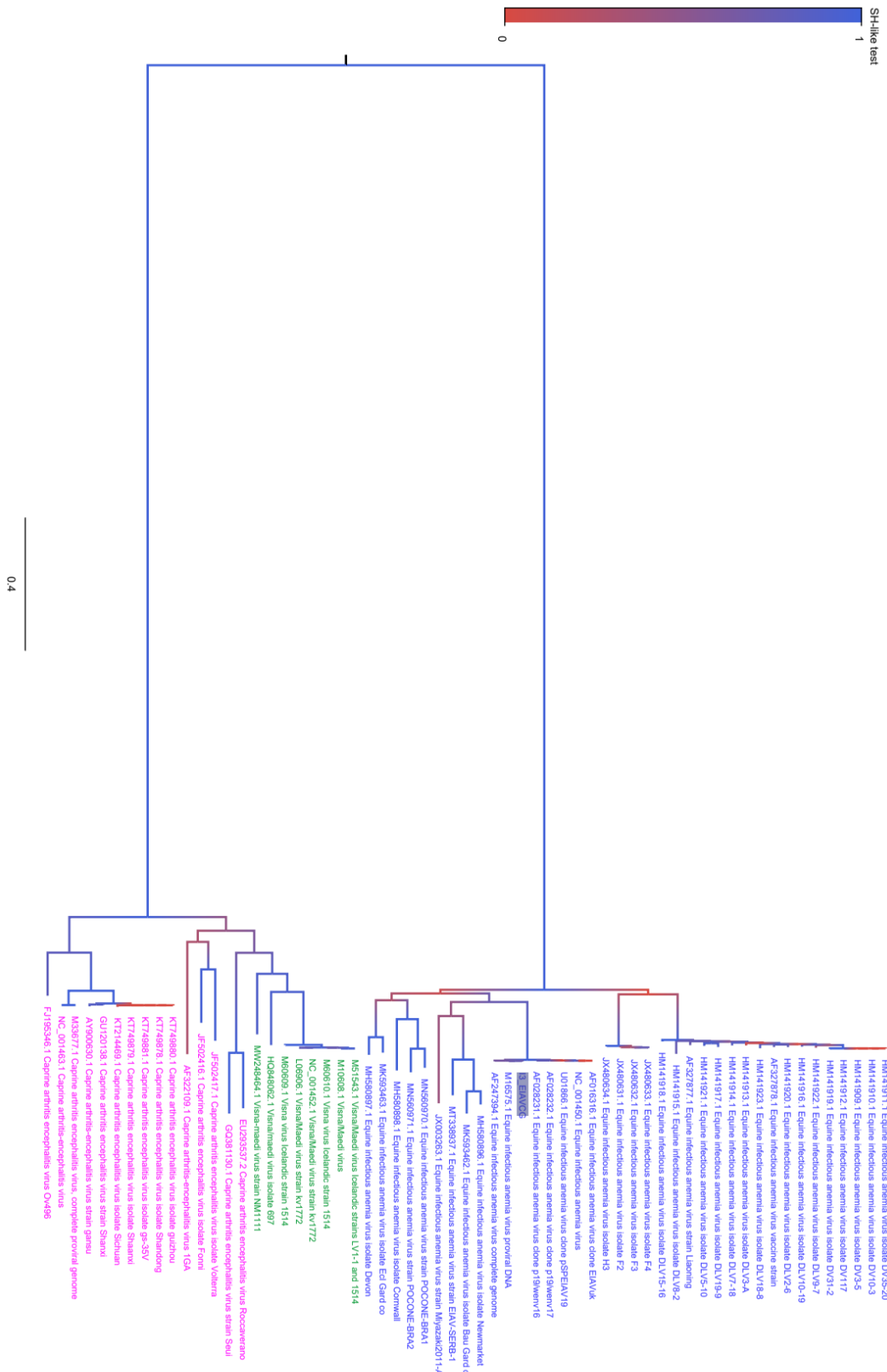


Figura 11- Árvore filogenética construída com genoma quase completos de EIAV e VisnaMaedi-CAEV. O genoma parcial da sequência I3 contém 5366 pares de bases. As sequências de EIAV estão indicadas em azul, as de CAEV estão em magenta e as sequências de VisnaMaedi estão em verde. Os números indicam o suporte estatístico (baseado no teste de Simodaira e Hasegawa) nos respectivos nós da árvore. A árvore foi construída usando o critério de verossimilhança máxima e o modelo evolutivo selecionado foi o modelo GTR. Todas as árvores foram feitas usando o programa FastTree.



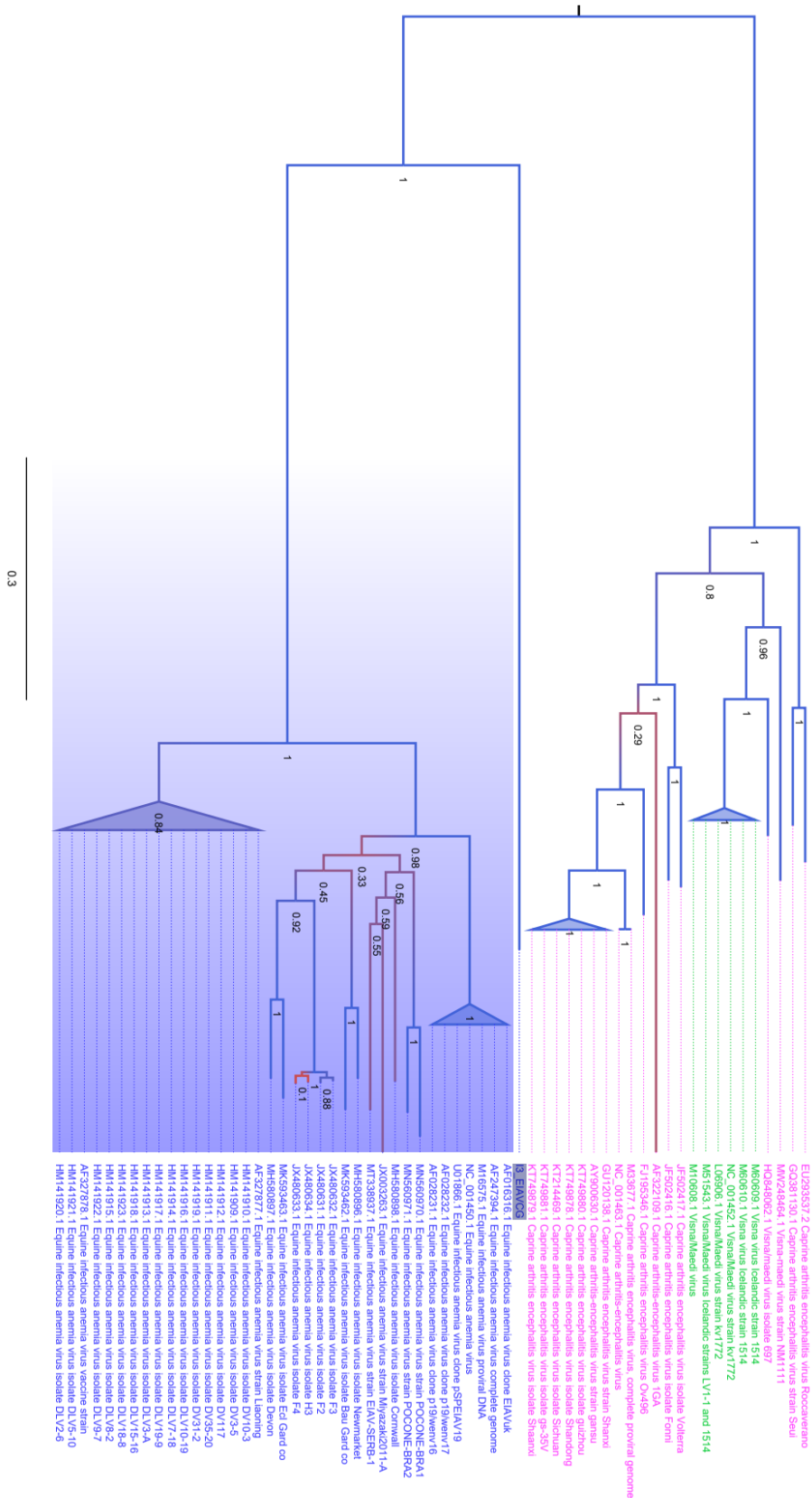


Figura 13- Árvore filogenética construída com fragmento do gene env. O fragmento da sequência I3 contém 805 bp e corresponde as posições 6693 até 7473 da sequência de referência MN560971. Os números indicam o suporte estatístico (baseado no teste de Simodaira e Hasegawa) nos respectivos nós da árvore. A árvore foi construída usando o critério de verossimilhança máxima e o modelo evolutivo selecionado foi o modelo GTR. Todas as árvores foram feitas usando o programa FastTree.

4.1.3.2 – Contigs relacionados à Família *Parvoviridae*

Os Parvovírus são pequenos vírus de DNA de fita simples (ssDNA) sem envelope que pertencem à família *Parvoviridae*. Os avanços recentes em tecnologias moleculares e de sequenciamento tem possibilitado, como já mencionado anteriormente, na descoberta de vários novos parvovírus e na enorme expansão da taxonomia dos parvovírus (WOO *et al.* 2017).

Foram identificadas doze sequências de parvovírus que tiveram percentual de similaridade no Blastn correspondente no GenBank para: *Desmodus rotundus parvovirus* (nº Acesso [YP_009328889.1](#)), *Canine bocavirus* (nº Acesso [UMB41517.1](#)), *Porcine bocavirus* (nº Acesso [AYC49708.1](#)), *Rat parvovirus 2* (nº Acesso [YP_010086594.1](#)), *Turkey parvovirus TP1 2012* (nº Acesso [AHF54688.1](#)), *Protoparvovirus HK 2014* (nº Acesso [QOR29549.1](#)), *Simian parvo-like virus 3* (nº Acesso [APC23167.1](#)), *Human bocavirus* (nº Acesso [AFU35575.1](#)), *Carnivore protoparvovirus*, *Artibeus lituratus parvovirus* (nº Acesso [AWN56767.1](#)), *Artibeus jamaicensis parvovirus 1* (nº Acesso [AIF74239.1](#)) e *Eidolon helvum parvovirus 2* (nº Acesso [AYG97824.1](#)).

Todas as amostras biológicas apresentaram leituras de *pools* com *contigs* para parvovírus. As sequências aqui identificadas representam genes que codificam proteína de capsídeo (VP2), glicoproteína do envelope (*env*) e poliproteína (*pol*) e proteínas não estruturais (NS1), de acordo com a análise BLASTx.

Sequenciamos ainda, de forma quase completa, um fragmento de *Chaphamaparvovirus* (CHPV) em *pool* de fígado de *M. molossus* (*Pool* - F1). Chamamos a sequência de F1009_*Molossus molossus* e tinha 4281 bp, respectivamente com o genoma com a sequência de aminoácidos da Proteína Não-estrutural 1 (NS1), localização no genoma: 699...2705) e sequência de aminoácidos da proteína da cápside viral (VP1), localização no genoma: 2698...4152) (Figura 14).

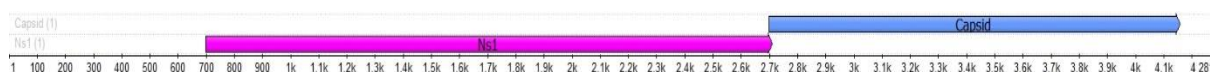


Figura 14- Mapa de localização da proteína não estrutural (NS1) e proteína de capsídeo (VP1) no genoma do Chaphamaparvovírus identificado no *Pool* de fígado de *M. molossus*.

A sequência F1009_*Molossus molossus*, foi alinhada com outros CHPV, sendo que ficou agrupada de forma mais próxima das linhagens de morcegos do gênero *Artibeus* e *Desmodus* (Figura 15).

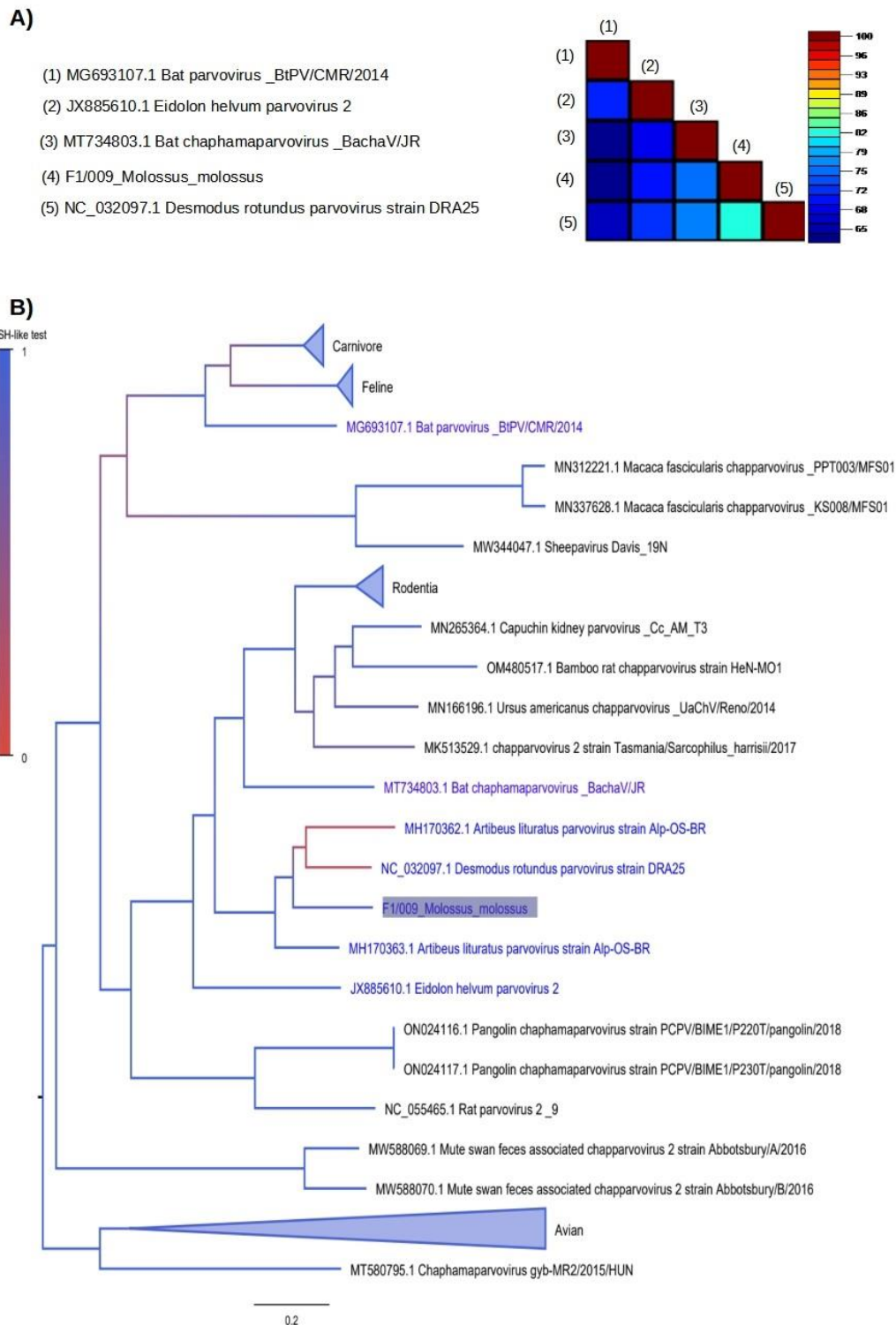


Figura 15- A- Matriz de distância em aminoácidos para a diversidade de Parvovirus. **B-** Árvore filogenética construída com genoma parcial Chaphamaparvovirus identificado em *Pool* de fígado de *M. molossus* (em azul destacado). A árvore foi construída usando o critério de verossimilhança máxima e o modelo evolutivo selecionado foi o modelo GTR. Todas as árvores foram feitas usando o programa FastTree.

A análise filogenética quantos a proteína da cápside viral (VP1) (Figura 16) e Proteína Não-estrutural 1 (NS1) (Figura 17) e sequência de aminoácido que mostrou proximidade com

as sequências depositadas no GenBank para outros PVs - de suínos, felinos, carnívoros, aves, roedores e outros quirópteros.

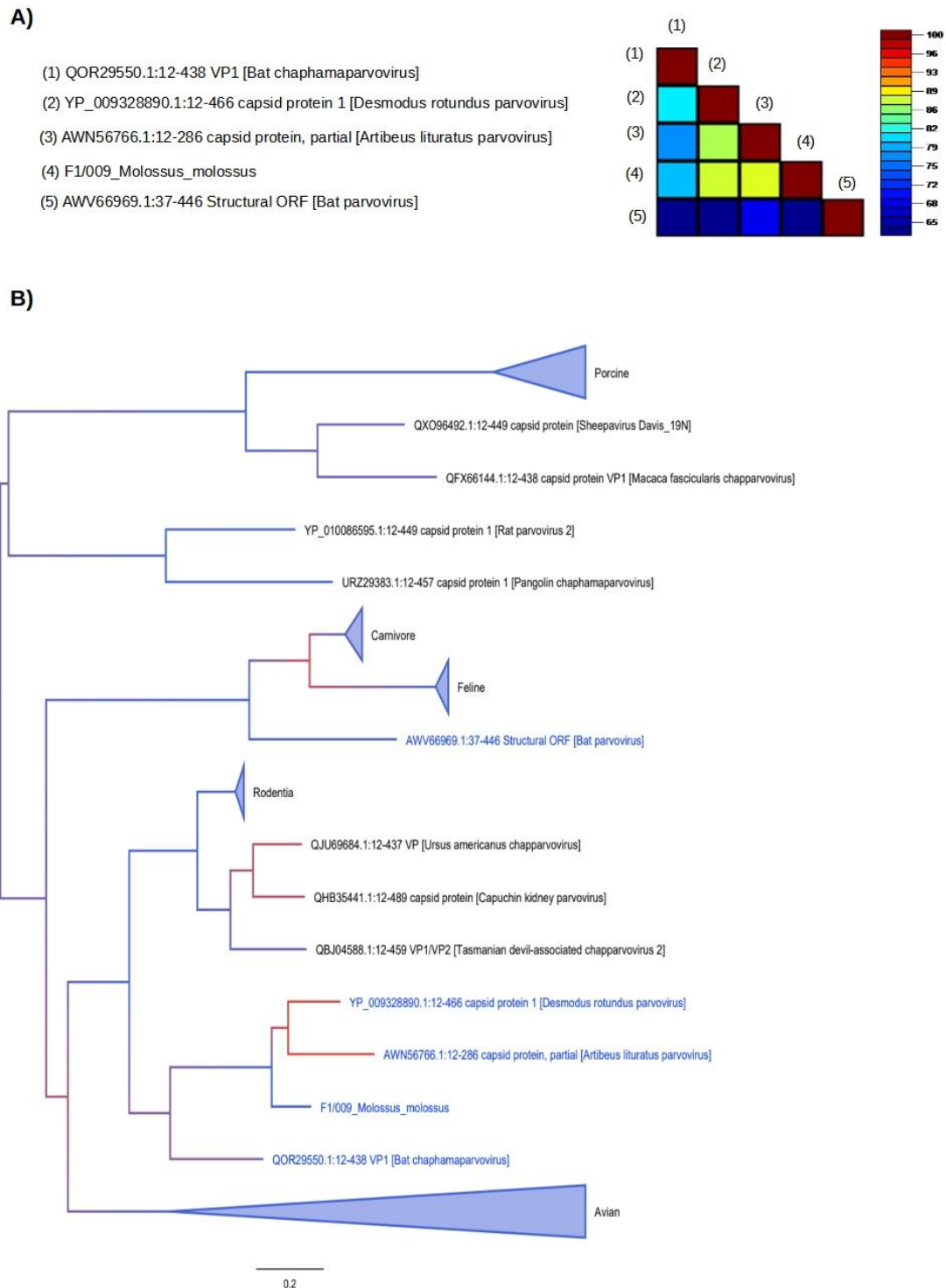
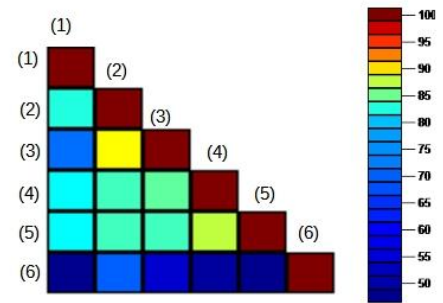


Figura 16 – A – Matrizes de distância em aminoácidos; B - Árvores filogenéticas construídas com fragmento de proteína capsídeo (VP1) da sequência F1009_*Molossus molossus* em relação as sequências de referência de outros *Parvovirus*. A árvore foi construída usando o critério de verossimilhança máxima e o modelo evolutivo selecionado foi o modelo GTR. Todas as árvores foram feitas usando o programa FastTree.

A)

- (1) QOR29549.1:1-660 nonstructural protein [Bat chaphamaparvovirus]
 (2) AGL97807.1:1-441 NS1, partial [Eidolon helvum parvovirus 2]
 (3) AWN56767.1:1-390 nonstructural protein, partial [Artibeus lituratus parvovirus]
 (4) YP_009328889.1:1-668 nonstructural protein 1 [Desmodus rotundus parvovirus]
 (5) F1/009_Molossus_molossus
 (6) AWW66968.1:1-681 Non-structural ORF [Bat parvovirus]



B)

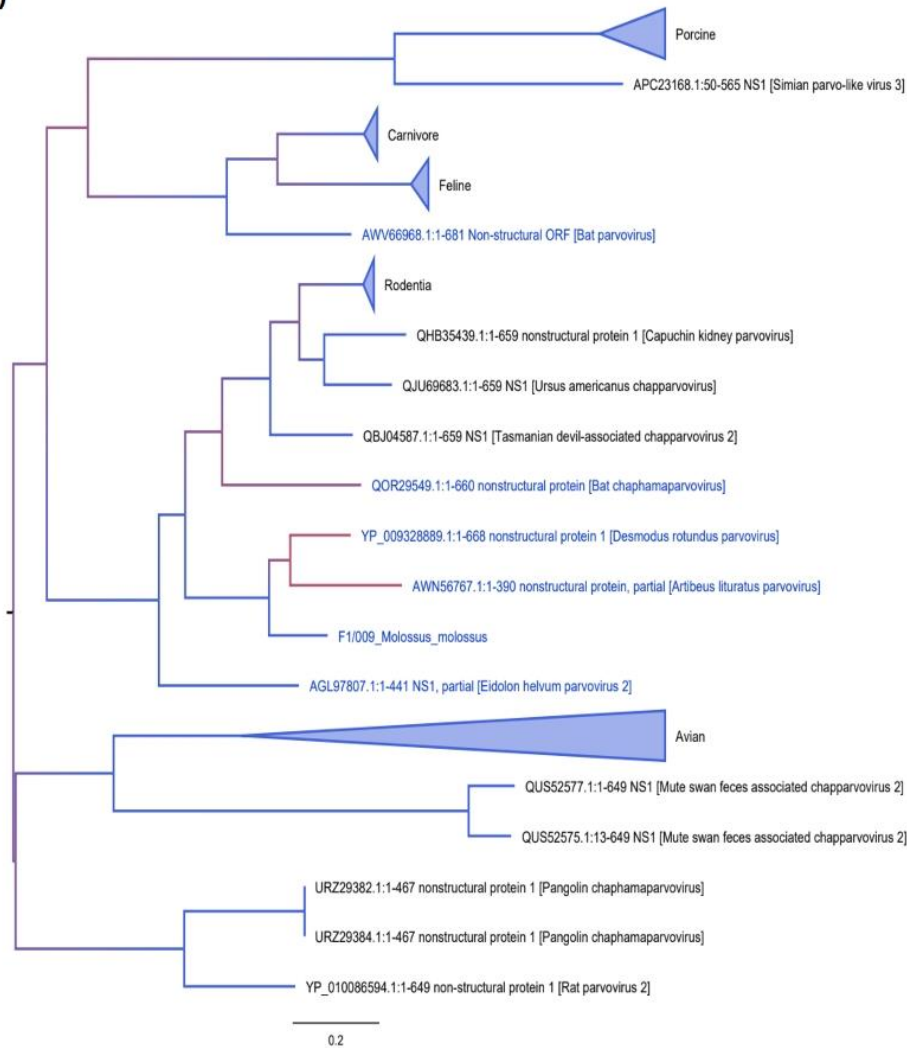


Figura 17 – A – Matrizes de distância em aminoácidos; B – Árvores filogenéticas construídas com fragmentos de Proteína não estrutural (NS1) da sequência F1009 *Molossus molossus* em relação as sequências de referência de outros parvovírus. A árvore foi construída usando o critério de verossimilhança máxima e o modelo evolutivo selecionado foi o modelo GTR. Todas as árvores foram feitas usando o programa FastTree.

4.1.3.3 – *Contigs* relacionados à Família

Os vírus da família são envelopados com um tamanho de vírion de 120–160 nm para morfologia esférica e de 75–90 nm x 170–200 nm para morfologia baciliforme. O genoma do coronavírus consiste em um único segmento linear de 26 a 32 kb de + RNA (KING 2011).

Os Coronavírus de morcego têm sido estudados extensivamente desde o surto de doença global causado por coronavírus de síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV) (DREXLER *et al.* 2010; LAU *et al.* 2010). Em nosso estudo, as leituras reunidas da família Coronaviridae foram identificadas em amostras de sangue, intestino, rins e baço.

No sequenciamento de B3 (*pool* de baço 3), identificamos um fragmento de 141 nucleotídeos que apresentou 100% de similaridade com a proteína ORF1ab para SARS-CoV-2 (nº Acesso [UJU94448.1](#)). Já em intestino e sangue (*pools* I3, I9 e S1) os números de nucleotídeos recuperados foram maiores, com 202, 212 e 251 fragmentos respectivamente, que compartilharam identidade de 98.41 %, 98.95% e 100% (nº Acessos [P0DTD3.1](#), [UEF20961.1](#) e [UQC18417.1](#)), respectivamente, para a ORF1ab de SARS-CoV-2. Porém, como essa ORF é compartilhada por diferentes coronavírus, entedemos que as sequências podem se tratar de um CoV de morcego, que não seja o SARS-CoV-2, uma vez que esse vírus ainda não foi descrito em quirópteros.

Em intestino e sangue (*Pool* I9 e S1) também mineramos um *contig* com homologia de 97.14% para o gene RdRp (RNA polimerase dependente de RNA) para um *Betacoronavirus* de *Rhinolophus hipposideros* identificado na Itália em 2012 (nº acesso [GA88252.1](#)). No mesmo *pool* de sangue (*pool* S1), identificamos ainda, uma leitura com comprimento de 205 nt com identidade de 100% para a proteína de superfície de *Bat coronavirus BM48 31 BGR 2008* (nº Acesso [URN32356.1](#)), um CoV identificado em *Rhinolophus blasii* na Europa e que é responsável por causar síndrome respiratória.

4.1.3.4- *Contigs* relacionados à Família

Os Adenovirus (AdV) são vírus icosaédricos não envelopados com cerca de 70 a 90 nm de diâmetro. O genoma é composto por DNA de fita dupla linear, que varia em comprimento de 26 a 48 kb (TAN *et al.* 2017). O genoma dos adenovírus está organizado em pelo menos 16 genes comuns de gênero claramente definidos, incluindo a polimerase, e em um conjunto de genes mais variáveis, gênero-específicos, localizados principalmente perto das extremidades do genoma (DAVISON *et al.* 2013).

Contigs de AdV foram identificadas em quase todas amostras biológicas, exceto em fígado (Figuras 6 e 7), e incluíram percentual de similaridade e sequência referência no Blast, respectivamente para: *Bat mastadenovirus A* de 75% para a sequência nº Acesso [BBE29305.1](#),

Bovine mastadenovirus A de 62.2% para sequência nº Acesso [YP_094041.1](#), *Canine mastadenovirus A* de 50.88% a 77.63% para sequência nº Acesso [UKI59076.1](#), *Human mastadenovirus C* de 96.10% a 100% para a sequência nº Acesso [UAW96081.1](#), *Ovine mastadenovirus A* de 92.77% para a sequência nº Acesso [ABG22143.2](#), *Porcine mastadenovirus A* de 83.13% para a sequência nº Acesso [YP_009205.1](#), *Adenovirus squirrel 96 29 KOR* de 80.49% a 98.36% para a sequência nº Acesso [QPI12650.1](#), *Cervid adenovirus 1* de 46.91% para a sequência nº Acesso [YP_009373235.1](#), *Bat mastadenovirus E* de 73.47% para a sequência nº Acesso [YP_009272877.1](#), *Bat mastadenovirus B* de 65.38% para a sequência nº Acesso [YP_004782113.1](#) e *Equine mastadenovirus A* de 66.27% a 72.29% para a sequência nº Acesso [E29307.1](#).

As similaridades com sequências de referências no Blastx foram para genes que codificam a proteína hexon, proteína de ligação ao DNA (DBP), proteína terminal (TP), proteína IIIa (proteína que interage com a proteína L1-52/55Kin e associa-se ao domínio de empacotamento viral), poliproteína (pol), ORF 26 e proteína não-estrutural (Quadro 1 a-f)

4.1.3.5 – Contigs relacionados à Família *Papillomaviridae*

Os membros da família *Papillomaviridae* são vírus dsDNA epiteliotróficos pequenos, sem envelope. O genoma é composto de aproximadamente 8.000 pb e inclui uma região reguladora de leitura aberta (ORFs) nomeados após seu tempo de expressão, com uma codificação de região inicial para as proteínas envolvidas na replicação viral e imunomodulação e uma codificação de região tardia para as proteínas do capsídeo (BRAVO *et al.* 2010).

Do total de amostras de *pools* sequenciadas, obtivemos uma expressiva quantidade de *contigs* para a família *Papillomaviridae* em todas as amostras biológicas, com sequências para dezesseis Papilomavírus (PVs), que compartilharam homologia com proteínas de diferentes espécies de mamíferos e ave, no Blastx (Figura 18).

Além dos PVs da figura 17, outros cinco tiveram leituras e apresentaram percentual de similaridade no Blastx e Blastn para: *Alphapapillomavirus 3* - 53.57% para a sequência referência nº Acesso [ACS72928.1](#), *Betapapillomavirus* - 68.75% para a sequência referência nº Acesso [UJQ88222.1](#), *Nupapillomavirus 1* – 58.02% para a sequência referência nº Acesso [NP_040287.1](#), *Lambdapapillomavirus* - 64.71% para a sequência referência nº Acesso [AOI33384.1](#), *Pipapillomavirus 1* – 83.75% para a sequência referência nº Acesso [UJQ88223.1](#) e *Kappapapillomavirus 1* – 51.43% para a sequência referência nº Acesso [YP_249604.1](#).

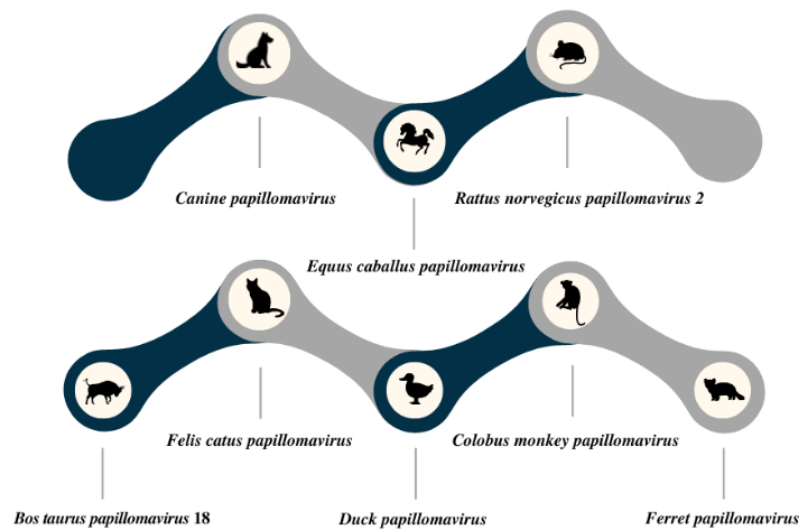


Figura 18- Papilomavirus de outras espécies de mamíferos e em ave, que apresentaram sequências de nucleotídeos em amostras biológicas de morcegos e que tiveram homologia com diferentes proteínas de PVs no Blastx. As referências mapeadas para as sequências foram: *Bos taurus papillomavirus 18* – Acesso nº [YP_009272595.1](#), *Colobus monkey papillomavirus* – Acesso nº [YP_004646340.1](#), *Canine papillomavirus 14* – Acesso nº [YP_007195267.1](#), *Ferret papillomavirus* - Acesso nº [YP_008519310.1](#), *Equus caballus papillomavirus* – Acesso nº [YP_009315925.1](#), *Duck papillomavirus* – nº Acesso [ANN29877.1](#), *Felis catus papillomavirus* – Acesso nº [AAA43022.1](#) e *Rattus norvegicus papillomavirus 2* – Acesso nº [AXZ95699.1](#).

As leituras dos *contigs* de PVs compartilharam identidades para o gene que codifica as proteínas L1 e L2, proteínas do capsídeo, responsáveis pelas etapas finais da replicação do vírus, como a síntese de proteínas estruturais (FINNEN *et al.* 2003). E ainda, haviam fragmentos de nucleotídeos que tiveram homologia com as proteínas E1, E7 que são responsáveis pela replicação do DNA e controle da transcrição viral (SANTOS *et al.* 2002) e poliproteína (*pol*).

4.1.3.6 - *Contigs* relacionados à Família *Picornaviridae*

Os Picornavírus (PiVs) são vírus RNA de fita simples de sentido positivo encontrados em humanos e uma diversidade de animais, e podem causar doenças respiratórias, cardíacas, hepáticas, neurológicas, mucocutâneas e sistêmicas de vários níveis de gravidade (TRACY *et al.* 2006). Os picornavírus atualmente são divididos em 12 gêneros, sendo eles: *Enterovirus*, *Cardiovirus*, *Aphthovirus*, *Hepatovirus*, *Parechovirus*, *Erbovirus*, *Kobuvirus*, *Teschovirus*, *Sapelovirus*, *Senecavirus*, *Tremovirus* e *Avihepatovirus* (LAU *et al.* 2011).

Em nossa triagem, identificamos leituras para amostragem, exceto em *pools* de *swab* anal e fígado, de diferentes gêneros de PiVs. Montamos *contigs* com percentual de semelhança e sequência referência do GenBank respectivamente para poliproteínas (*pol*) de: *Bat fusalivirus*

- 67.74% (Acesso nº [AQP31137.1](#)), *Bat criparvirus* - 45.21% (Acesso nº [ULF99871.1](#)), *Bat iflavirus* - 66.15% (Acesso nº [YP_009345906.1](#)), *Bovine rhinitis B virus* - 73.08% (Acesso nº [ANN02879.1](#)), *Chicken picornavirus 1* - 42.19% (Acesso nº [YP_009054898.1](#)), *Bat hepatovirus* - 51.22% (Acesso nº [YP_009505614.1](#)), *Bat badicivirus 1* - 57.38% (Acesso nº [YP_009345910.1](#)), *Rhinovirus C* 38.46% (Acesso nº [ANI70116.1](#)), *Enterovirus B* - 47.73% (Acesso nº [QTM69012.1](#)), *Canine kobuvirus* - 100.00% (QXR02152.1), *Bat posalivirus* - 37.68% (Acesso nº [AQP31136.1](#)) e *Rhinovirus A* - 48.08% (Acesso nº [QIM74092.1](#)).

4.1.3.7 – *Contigs* de baixa abundância

a) *Anelloviridae*

Os Anellovirus (AVs) são uma família de pequenos vírus ssDNA circulares com uma vasta diversidade genética (NISHIYAMA *et al.* 2014). O genoma de DNA completo varia de 2 a 3,9 kb de tamanho (KACZOROWSKA *et al.* 2020).

Leituras de cinco AVs em *pools* de *swabs* oral e anal, bço e intestino foram obtidos na metagenômica empregada nessas amostras. As sequências com percentual de similaridade no Blastn e percentual de homologia de proteínas no Blastx foram para: *Giant panda anellovirus* (nº Acesso [QZE11973.1](#) - 52.27 % para ORF 1), *Torque teno canis virus* (nº Acesso [QCQ29650.1](#) - 65.91% para ORF2), *Tupaia hepatovirus A* (nº Acesso [YP_009215780.1](#) - 76.56% para poliproteína – pol), *Torque teno sus virus 1a* (nº Acesso [AFS64006.1](#) - 49.09% para ORF1), *Feline anellovirus* (nº Acesso [QYD02374.1](#) – 53.33% para ORF 1).

b) *Astroviridae*

Os Astrovírus são pequenos vírus icosaédricos não envelopados com genoma de RNA de fita simples de sentido positivo. Eles têm de 6,4 a 7,3 kb de comprimento e consistem em três quadros de leitura abertos (ORF1a, ORF1b e ORF2). A família Astroviridae inclui dois gêneros principais: *Mamastroviruses* que infectam mamíferos e *Avastroviruses* que infectam hospedeiros aviários (MENDEZ *et al.* 2014).

Montamos um *contig* de com similaridade para sequência referência para *Canine astrovirus* (nº Acesso [AEL28798.1](#)) em *pool* de bço, onde continham apenas amostras de *M. molossus*. O fragmento mostrou similaridade de 95.38% para protease, no Blastx.

c) *Bornaviridae*

Os Bornavírus são vírus de RNA de fita negativa não segmentados, pertencentes à ordem *Mononegavirales* (TOMONAGA *et al.* 2002). Em nosso estudo, pudemos identificar um *contig* em *pool* de *swab* oral, que mostrou similaridade de 50% para a polimerase de da sequência no Blastx (nº Acesso [BBL33072.1](#)) para o *Bat bornavirus*.

d) *Circoviridae*

Os vírus da família *Circoviridae* infectam uma ampla gama de vertebrados. Os vírions consistem em nucleocapsídeos nus de cerca de 20 nm de diâmetro, com um genoma circular de DNA de fita simples (ssDNA) de aproximadamente 2,0 kb (DELWART *et al.* 2012). Por serem um dos menores vírus conhecidos, enfatiza-se mais uma vez, que com o aumento de abordagens de sequenciamento de alto rendimento, a identificação de pequenos genomas circulares de DNA (Circovirus - CiVs) puderam ser detectados em amostras fecais de mamíferos selvagens e em insetos (LI *et al.* 2010).

Nos resultados obtidos por nós, todas as amostras biológicas tiveram sequenciados *contigs* para seis CiVs. Os percentuais de identidade para proteína replicase correspondente no Genbank foram para: *Bat circovirus* (nº Acesso - [AIF76270.1](#) - 54.00%), *Porcine circovirus 2* (nº Acesso ADF80773.1 - 62.16%), *Bat circovirus ZS China* (nº Acesso - [QTM69012.1](#) - 79.52%), *Bat associated cyclovirus 16* (nº Acesso - [UJO02085.1](#) - 65.62%), *Columbid circovirus* (nº Acesso - [ASX95448.1](#) - 45.83%) e *Duck associated cyclovirus 1* (nº Acesso [AZQ25380.1](#) - 50.60%).

e) *Genomoviridae*

Obtivemos ainda duas leituras em sangue e *pool* de *swab* oral para sequência referência depositada no GenBank (nº Acesso [ASM93483.1](#)) da proteína replicase de *Canine feces-associated gemycircularvirus*, membro da família *Genomoviridae*, que inclui vírus com pequenos genomas circulares de DNA de fita simples (ss) (~1,8-2,4 kb) que codificam uma proteína de iniciação de replicação de círculo rolante (Rep) e uma proteína do capsídeo (CP) em uma orientação ambisense (KRUPOVIC *et al.* 2016).

f) *Hesperiviridae*

Os Herpesvírus (HVs) são vírus grandes, envelopados, de DNA de fita dupla que infectam a pele, membrana mucosa, sistema linfático e sistema nervoso de animais, disseminando-se em vários hospedeiros vertebrados, incluindo humanos. A família Herpesviridae é dividida em três subfamílias: *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* e *Gammapherpesvirinae* (ZHENG e XY *et al.* 2016).

Em relação a sequência referência para HVs (nº de Acesso [BAI22794.1](#)), obtivemos uma leitura em amostras de *swab* anal de *M. mollosus*, com 50.57% para glicoproteína B de *Bat betaherpesvirus 2*. O baixo percentual de similaridade da sequência, pode sugerir que se trata de um fragmento de HVs novo, contudo, como foi apenas um *contig* de 251nt, não conseguimos fazer uma análise mais robusta, incluído a Filogênia da mesma.

g) *Paramyxoviridae*

Os membros da família *Paramyxoviridae* são vírus de RNA de sentido negativo envelopado. Existem duas subfamílias e seis gêneros dentro da família *Paramyxoviridae*. Os gêneros *Morbillivirus*, *Respirovirus*, *Rubulavirus* e *Henipavirus*, compõem a subfamília *Paramyxovirinae*, e os gêneros *Pneumovirus* e *Metapneumovirus* constituem a subfamília *Pneumovirinae*. Cada um dos seis gêneros contém patógenos humanos e animais altamente contagiosos (VAN REGENMORTEL *et al.* 2000).

Um *contig* montado de 185 nt de *Morbillivirus* foi obtido em *pool* de intestino de *M. molossus*. O Blastx mostrou similaridade de 85.71% para a hemaglutinina de *Canine morbillivirus*. Confirmamos a sequência com a de referência do Genbank (nº Acesso [ABX84034.1](#)).

h) *Picobirnaviridae*

Os Picobirnavírus são vírus de RNA de fita dupla pequenos (pico), bi-segmentados (bi), e estão associados a gastropatias e diarreia. Inicialmente descoberto em amostras fecais de humanos e ratos pigmeus no Brasil, o vírus não é envelopado e contém dois segmentos de RNA que podem diferir em tamanho dependendo se são Genogrupo I (2,3–2,6 kb e 1,5–1,9 kb) ou Genogrupo II (1,75 e 1,55 kb) estirpes (PEREIRA *et al.* 1988, PEREIRA *et al.* 1988).

Sequenciamos cinco *contigs* de picobirnavírus em *pools* de baço, intestino e rins, que apresentaram similaridade para as sequências de referências e percentual para proteína correspondente no Blastx, respectivamente para: *Picobirnavirus PREDICT PbV-87* (Acesso nº [ALA11508.1](#)) com 61.90% para a proteína RdRp, *Fox picobirnavirus* - (Acesso nº [AGK45555.1](#)) com 75.51% para proteína RdRp, *Feline picobirnavirus* (nº Acesso [ASK85695.1](#)) com 80.70% para proteína RdRp, *Turkey picobirnavirus* (nº Acesso [AHY84711.1](#)) com 45.21% para proteína de capsídeo, *Ovine picobirnavirus* (nº Acesso [ALX37974.1](#)) com 78.43% para proteína RdRp.

i) *Polyomaviridae*

Os Polyomavírus (PyVs) são vírus tumorais de DNA icosaédrico não envelopados com genomas circulares de fita dupla altamente estáveis de ~5000 pb. A família *Polyomaviridae* é dividida em quatro gêneros (*Alphapolyomavirus*, *Betapolyomavirus*, *Gammapolyomavirus* e *Deltapolyomavirus*) que atualmente contêm mais de 100 espécies de PyVs formalmente reconhecidas (MOENS *et al.* 2017).

Assim como outros vírus circulares já mencionados, obtivemos dois *contigs* de PyVs. A similaridade para proteína antigênia das sequências de referência (nº Acesso [ACF15354.1](#) e [YP_0091750.1](#), respectivamente) foi de 100 % para *Human polyomavirus 2* e 53.85%

para *Bat polyomavirus*. Os fragmentos de nucleotídeos para o PyVs humano estavam em *pools* de sangue, *swab* anal, baço e fígado, já os de morcego, estavam apenas em *pool* de intestinos, onde tinham apenas amostras de *M. molossus* (Quadro 1 a-f).

j) *Rhabdoviridae*

A família *Rhabdoviridae*, dentro da ordem *Mononegavirales*, é uma das famílias de vírus mais ecologicamente diversas e com alta importância clínica. Os *Rabdo*virus têm uma ampla distribuição geográfica e podem infectar uma grande variedade de plantas e animais, incluindo mamíferos, aves, répteis e peixes. Além disso, pode infectar artrópodes, que podem atuar como vetores para a transmissão viral. O genoma de RNA de fita simples não segmentado de 11-16 Kb e as partículas virais distintas são contidas no envelope (DIETZGEN *et al.* 2017).

Dois *contigs* em *pool* de *swab* oral de *Myotis* sp. foram montados para *Bat rhabdovirus* com similaridade de 42.03% para Polimerase da sequência referência depositada no Genbank (nº Acesso [AIF74284.1](#)) e para *Piry vesiculovirus* (51.81% de similaridade para RdRp da sequência referência nº Acesso YP_009505536.1).

4.5 – Identificação de “novos” vírus

4.5.1 – Novo vírus da Família *Totiviridae*

A família *Totiviridae* é caracterizados por virions icosaédricos, variando entre 30 e 40 nm de diâmetro, que normalmente encapsida genomas de RNA de fita dupla (dsRNA) monossegmentados (ou seja, não segmentados) com quadros de leitura aberta sobrepostos que codificam uma proteína do capsídeo (CP) e uma RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) (GHABRIAL 2008).

São reconhecidas pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) mais de 25 espécies da família *Totiviridae*. Esses vírus são conhecidos por mediar infecções persistentes e não citopáticas de uma gama diversificada de fungos e protozoários. A família é atualmente classificada em cinco gêneros: *Totivirus*, *Victorivirus*, *Giardiavirus*, *Trichomonasvirus* e *Leishmanivirus*. Apenas os gêneros *Totivirus* e *Victorivirus* possuem espécies que infectam fungos; os três gêneros restantes incluem membros que infectam protozoários (GOODMAN *et al.* 2011).

Alguns estudos revelaram a presença de vírus RNA (similar aos totivirus) nos parasitas humanos *Trichomonas vaginalis*, *Giardia lamblia* e *Leishmania* spp. (WANG *et al.* 1993, GRYBCHUK *et al.* 2018). Esses vírus afetam as interações entre hospedeiro e parasita: o *Trichomonavirus* e o *Leishmanivirus* exacerbam a virulência de seus hospedeiros parasitas, enquanto o *Giardiavirus* está associado a uma diminuição na virulência do parasita

(GOMEZ-ARREAZ *et al.* 2017). O *Trichomonavirus* e *Leishmanivirus* induzem interferon Tipo I (IFN) e resposta pró-inflamatória elevada que controla a gravidade das doenças (FICHOROVA *et al.* 2012 , BOURREAU *et al.* 2016).

Na metagenômica realizada nas amostras de nosso estudo, uma variedade de leituras de *Totivírus* foram encontrados no conjunto de *Pools* de fígado de *M. molossus* e a maioria parece estar relacionada ao vírus *Schistocephalus solidus toti-like virus 3* (virus de parasita de peixe - *Schistocephalus solidus* (HAHN *et al.* 2020). As sequências virais mostraram identidades com a sequência de RNA polimerase dependente de RNA (RdRp), com percentuais que variaram de 25.25% a 88.73% em relação as sequências referências depositadas no GenBank (Apêndice e).

Análises filogenéticas revelaram que as sequências de *Totivirus* deste estudo se agrupam e estão relacionados a vírus descobertos em outros invertebrados, incluindo *Trichomonasvirus*, *Leishmanivirus*, *Victovirus*, *Giardiavirus* e mais intimamente relacionado a vírus descobertos em insetos (*Artivirus*), sendo que grande parte das sequências está em um clado que tem como base um vírus isolado em verme *Schistocephalus solidus*, como anteriormente mencionado, porém não afirmamos que as sequências são do mesmo verme. (Figura 19).

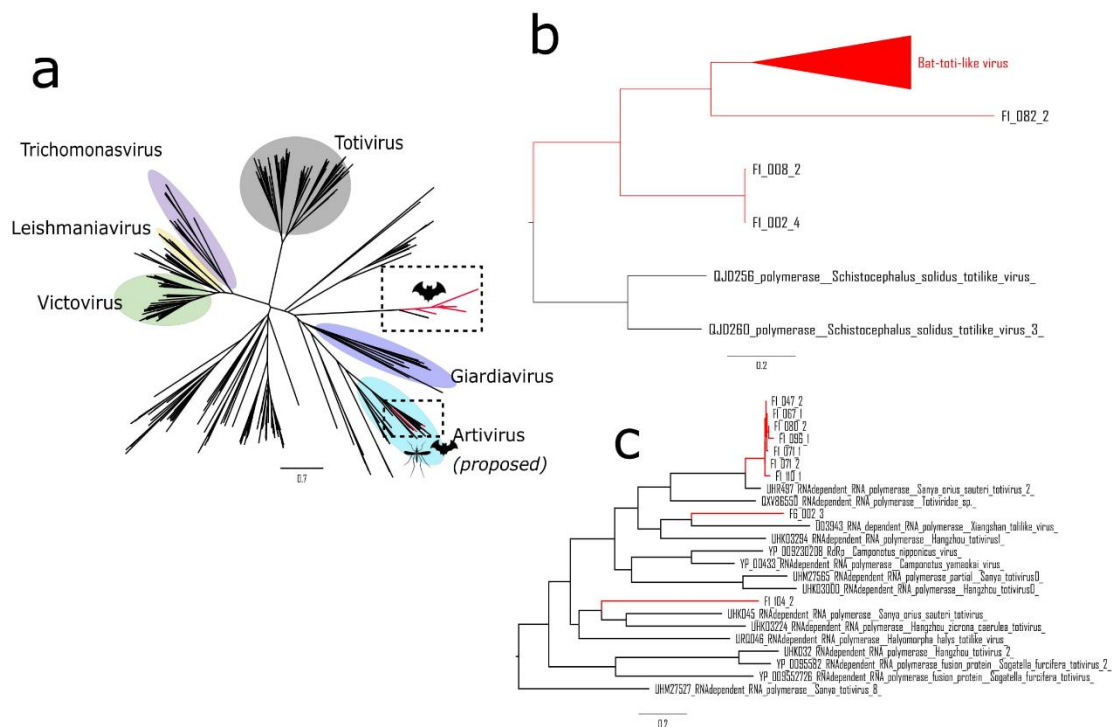


Figura 19 -a) Relações filogenéticas entre os *Totiviris* identificados nas amostras de fígado de *M. molossus* e outros gêneros aprovados da família Totiviridae. b) As árvores de probabilidade máxima foram derivadas das sequências de Polymerase e c) RdRp concatenadas e completas de cada vírus analisado.

As novas espécies de *Totivirus* são definidas com base em critérios biológicos e moleculares. Os vírus encontrados em hospedeiros distintos são de espécies diferentes, e os

vírus que compartilham menos de 50% da identidade da sequência de aminoácidos (aa) também são considerados espécies diferentes (WICKNER *et al.* 2012). Assim, como em nosso estudo, os percentuais de identidade estavam dentro dessa faixa, e com base nas análises filogenéticas e características distintas das sequências obtidas, propomos que os Totivirus identificados, são de novas espécies, uma vez que como em outros totivírus, o Em todos os casos para sugerir que estes eram provavelmente novos vírus fragmentos minerados codificam RNA polimerase dependente de RNA (RdRp), que se trata de um gene extremamente conservado de totivirus (BRUENN 1993).

Apesar da árvore filogenética indicar a proximidade do parasita *S. solidus* como um dos hospedeiros para os Totivirus no viroma dos morcegos aqui estudados, não observamos evidências do transcriptoma desse parasita para julgar se há presença dele nas amostras de fígado, o que nos dá a hipótese de que possa haver novos hospedeiros para esses vírus nos quirópteros da região. Sabemos ainda que a necessidade de caracterizar esses Totivirus e organismos que eles parasitam, nos possibilita entender o papel dos parasitas na evolução do vírus e nas interações hospedeiro-microorganismos, determinando o papel dos vírus na adaptação do parasita e nas doenças do hospedeiro e por fim, nos auxilia identificar os padrões e processos de coevolução hospedeiro-parasita-vírus. Esta é uma questão que deve ser respondida em estudos futuros.

Também, pretendemos expandir o conhecimento da diversidade de *Totivirus* em morcegos e mostrar que estudos adicionais são necessários para elucidar o papel desses vírus como possíveis patógenos humanos ou veterinários, especialmente porque a interação entre ambiente silvestre e urbano, expõe tanto o homem como os animais domésticos a importantes doenças transmitidas por esses quirópteros.

4.5.2 – Identificação de um novo *Chaphamaparvovirus* (CHPV)

Ainda sobre os *Parvovirus*, durante a análise metagenômica dos *pools*, em 5 morcegos *M. molossus*, identificamos CHPV. Estas sequências de CHPV apresentaram o genoma com um tamanho que variou entre 3797 e 4284 pb. A análise filogenética baseada em nucleótidos e em sequências de aminoácidos do domínio VP1, NS1, e SF3 Helicase, mostrou que todas as sequências de CHPV são monofiléticas.

Para tanto, como determina os critérios de classificação do Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) para esta espécie (a região do gene CHPV NS1 deve ter 85% de identidade para ser classificada na mesma espécie), as nossas sequências são provavelmente uma nova espécie dentro do gênero *Chaphamaparvovirus*.

5- DISCUSSÃO

Neste estudo, obtivemos a análise metagenômica da diversidade viral encontrada nas 5 espécies de morcegos capturadas na região urbana de Santarém-PA, Brasil. As amostras biológicas foram analisadas em *pools*. A extração de RNA total seguido por amplificação por PCR independente de sequência foi realizada, e o sequenciamento de alto rendimento foi conduzido com tecnologia de SNG Illumina. Todas as etapas seguiram-se como indicado para análises metagenômicas, incluindo as de concentração viral (centrifugação, filtração ou uso de nuclease) (GE *et al.* 2012; ZHENG *et al.* 2018; FILHO *et al.* 2019). Os viromas das diferentes amostras analisadas, incluíam várias famílias de vírus de RNA, como esperado, uma vez que nosso estudo metagenômico foi realizado em extratos de RNA total, porém, também foram encontrados nucleotídeos de DNA vírus.

O sequenciamento de alto rendimento é uma ferramenta de pesquisa, que permite “descobrir” uma grande diversidade de novos vírus, aos quais não podem ser identificados por métodos tradicionais como de cultura de vírus em amostras coletadas de água, de humanos e de animais (DELWART, 2007). Esse método, assim como aqui descrito, também foi usado com sucesso para demonstrar viromas de quirópteros na África, Ásia e América do Norte, (DONALDSON *et al.* 2010; LI *et al.* 2010; GE *et al.* 2012; WU *et al.* 2012; BAKER *et al.* 2013).

Em similaridade com outras pesquisas (LI *et al.* 2010; GE *et al.* 2012), uma quantidade expressiva de leituras de sequências virais pôde ser identificada em nosso estudo. Como nosso foco esteve direcionado a morcegos e seu envolvimento na transmissão de doenças zoonóticas, apenas *contigs* de vírus de mamíferos foram analisados e/ou aqueles que contribuíram para relatar novos vírus.

Assim como resultados anteriores, parte dos vírus identificados, foram classificados em famílias de vírus típicos e de interesse em saúde pública e medicina veterinária, incluindo vírus classificáveis como os retrovirus e também os da família *Papillomaviridae*, *Flaviviridae*, *Coronaviridae*, *Rhabdoviridae*, *Paramyxoviridae*, *Herperviridae* e *Parvoviridae*, dentre outras. Nossas análises mostraram-se alinhadas com outros estudos de metagenômica, que identificaram sequências completas de papilomavírus (GE *et al.* 2012; WU *et al.* 2012), parvovírus (LI *et al.* 2010; GE *et al.* 2012), circovírus (LIMA *et al.* 2015) e picornavirus (WU *et al.* 2012).

Também, constatamos similaridade de resultados, obtidos em um estudo conduzido na França, onde embora o número de famílias de vírus, estivesse parcialmente diferentes daquelas detectados em nossa pesquisa, e tenha sido inferior, ele incluiu muitas famílias de vírus que não foram detectadas em nosso estudo, como *Bunyaviridae* e *Orthomyxoviridae* (DACHEUX *et al.*

2014). Além disso, potenciais vírus zoonóticos em morcegos foram relatados em morcegos europeus e incluíram vírus das famílias *Astroviridae*, *Coronaviridae* e *Retroviridae* (KOHL e KURTH, 2014), que também foram detectados em nosso estudo.

Sabemos ainda, que as comparações diretas de nossos resultados, com outras publicações podem ser variáveis, em decorrência das diferentes fatores, como: 1- diferença nas espécies e na origem geográfica dos espécimes de morcegos analisados; 2- das amostras utilizadas e das metodologias empregadas para cada estudo; como por exemplo, o tipo de amostra (ex: guano fresco, urina, sangue ou outra amostra biológica); 3- dos procedimentos que viabilizem o enriquecimento de vírus (ex: tratamento com nuclease, centrifugação e filtração) e 4- dos métodos de amplificação e de plataformas de sequenciamento de nova geração (DALI *et al.* 2011).

Além disso, conforme relatado anteriormente, os potenciais vírus zoonóticos em morcegos europeus incluem vírus das famílias *Adenoviridae*, *Astroviridae*, *Coronaviridae*, *Herpesviridae*, *Reoviridae* e *Retroviridae* (SONNTAG *et al.* 2009; KOHL *et al.* 2012; DACHEUX *et al.* 2014; KOHL *et al.* 2014), que também foram detectados nos quirópteros da região que conduzimos o estudo.

Sabemos ainda, que os morcegos são os únicos mamíferos capazes de voar ativamente, o que lhes permite atravessar barreiras físicas e se adaptar em paisagens de grande heterogeneidade ambiental, tais como áreas urbanas conectadas por ambientes seminaturais como parques, praças, quintais e jardins, o que pode formar um potencial elo de transmissão viral entre várias espécies de animais, selvagens e domésticos (HAYWARD e TACHEDJIAN, 2021). Tal assertiva pode amparar os registros virais na diversidade das amostras de morcegos que analisamos, uma vez que, os morcegos são particularmente susceptíveis a receber vírus de outros mamíferos (HAYWARD *et al.* 2015).

Retrovirus

Sabe-se que a infecção de células germinativas pode levar à transmissão vertical de retrovírus de pais para filhos na forma de alelos Mendelianos. Esses provírus, agora integrados, são conhecidos como retrovírus endógenos (ERVs) (WEISS, 2006; GIFFORD *et al.* 2008) e podem ocorrer em formas expressas ou silenciosas, e como genomas completos ou parciais (defeituosos) em várias espécies de mamíferos.

Os ERVs podem influenciar a evolução do hospedeiro, seja por meio de rearranjos genômicos (HUGHES e COFFIN, 2001) ou por meio da regulação da expressão gênica (JERN e COFFIN, 2008). Filho *et al.* (2019), registrou os retrovírus *Desmodus rotundus endogenous retrovirus* (DrERV) em amostras de tecido cerebral de morcegos hematófagos (*Desmodus*

rotundus) obtidos na floresta amazônica. Em nossa análise, diversos retrovírus foram abundantes nas amostras analisadas.

Retrovírus infecciosos, também chamados de Exó-retrovírus (XRV) circulantes em morcegos foram relatados apenas recentemente (HAYWARD *et al.* 2020). Esse achado é de fato relevante, dado que os retrovírus modernos são conhecidos por infectar uma ampla gama de vertebrados e que os morcegos (ordem Chiroptera) representam coletivamente mais de 20% de todas as espécies de mamíferos (TEELING *et al.* 2018).

Os retrovírus (REVs) também foram detectados por Yuan *et al.* (2014), onde esses vírus foram comumente encontrados em morcegos *Rousettus leschenaultii*, e a análise filogenética demonstrada nessa pesquisa, sugeriu que os morcegos podem ser vetores adequados para a transmissão de retrovírus (CHUA *et al.* 2007; GIFFORD *et al.* 2008).

De acordo com estudos anteriores em transcriptoma de sete espécies de morcego (*Rhinolophus ferrumequinum*, *R. pusillus*, *R. pearsoni*, *R. megaphyllus*, *R. affinis*, *Myotis ricketti* e *Pteropus alecto*), o registro de *Gammaretrovirus* que exibem um padrão filogenético consistente, cogitou a possibilidade de que os *Gammaretrovirus* existentes em mamíferos, podem ter sido originado de morcegos (CUI *et al.*, 2012). Todavia, os *contigs* gerados nos morcegos amostrados em Santarém-PA, para esses retrovírus, por apresentarem poucas pares de base, impossibilitou que os mesmos fossem submetidos as análises filogenéticas para que essa teoria precise claramente ser verificada em nosso estudo, e para que pudessemos definir se nosso achado pode ser devido à integração de material genômico retroviral nos genomas do quirópteros, ao invés de uma indicação de infecção viral.

Os retrovírus mais recentemente associados a doenças humanas são os *Betaretrovirus*. A regulação positiva de produtos gênicos derivados do grupo de *Retrovírus-K endógeno humano* (HERV-K) de *Betaretrovirus* tem sido associada ocorrência de cânceres, como os de mama, ovários e próstata, juntamente com outras doenças significativas em humanos (SUBRAMANIAN *et al.* 2011).

O gênero *Betaretrovirus* consiste nos grupos Tipo B e Tipo D de retrovírus exógenos e endógenos e no grupo HERV-K de retrovírus endógenos. Entre os membros exógenos infecciosos do gênero estão o *Vírus do tumor mamário de camundongo tipo B* (MMTV), o *Retrovírus de ovelha Jaagsiekte do tipo D* (JSRV), que causa carcinoma pulmonar em ovelhas, e o *Vírus de macaco Mason-Pfizer Tipo D* (MPMV), que causa definhamento e imunossupressão em macacos *Rhesus* recém-nascidos (WOOTTON *et al.* 2005; CADIEUX *et al.* 2009). Neste estudo, relatamos uma série de β ERVs, inclusive *contigs* de MPMV em diferentes amostras sequenciadas.

Relatamos aqui, sequências relacionadas a *Gammaretrovirus* de morcego em todas espécies estudadas (*M. molossus*, *A. lituratus*, *Myotis* sp., *N. leporinus* e *N. albiventris*). Os *Gammaretrovirus* também foram detectados anteriormente em 10 outras espécies de morcegos, na China, Austrália e em Gana (BAKER *et al.* 2013; CUI *et al.* 2012; CUI *et al.* 2012).

É importante ressaltar que os REVs fornecem uma oportunidade única para estudar a história evolutiva dessa família de vírus, pois eles são essencialmente "fósseis" genéticos de infecções retrovirais anteriores (STOYE 2012). Como tal, sua existência serve como uma indicação da gama potencial de hospedeiros de uma dada linhagem retroviral e pode ser interpretada como evidência da possível existência de retrovírus exógenos que ainda não foram isolados. De fato, estudos anteriores relataram uma série de betaretrovírus endógenos (β ERVs) em espécies para as quais nenhum *Betaretrovirus* exógeno foi ainda identificado. Isso inclui espécies de mamíferos tão diversas quanto primatas, cavalos, ratos, lêmures e um marsupial australiano (BAILLIE *et al.* 2004, VAN der KUYL, 2011).

Acrescentamos ainda que, embora existam muitas sequências de retrovírus de morcego depositadas a partir de estudos metagegômicos, nem sempre está claro se essas sequências são derivadas de um ERV ou de um XRV devido aos desafios de distinção entre os dois. Isso porque a integração do DNA retroviral no genoma do hospedeiro é um aspecto padrão do ciclo de replicação retroviral, o que significa que tanto o DNA de ERV quanto o de XRV podem ser detectados em amostras de hospedeiros individuais (HAYWARD e TACHEDJIAN, 2021). Assim, nosso estudo registrou e classificou as sequências dos diferentes retrovirus detectadas na quiropteroфаuna da região de Santarém-PA, e por causa da dificuldade em distinguir entre ERVs e XRVs, não definimos de fato conclusivamente que elas seriam de ERV ou XRV.

Parvovírus

A família *Parvoviridae* foi originalmente dividida em duas subfamílias de vírus que infectam hospedeiros invertebrados (*Densovirinae*) ou vertebrados (*Parvovirinae*), e essas subfamílias foram então divididas em gêneros com base em sua organização genômica e identidade de aminoácidos (aa) das proteínas virais (COTMORE e TATTERSALL *et al.* 2014).

De acordo com o ICTV, a subfamília *Hamaparvovirinae* inclui cinco gêneros, onde os *Chaphamaparvovirus*, incluem os chapparvovírus anteriormente não classificados. Esta subfamília é caracterizada por uma média de 30% de aminoácidos com identidade para proteína NS1, e todas as espécies carecem do domínio da fosfolipase A2 conservada na proteína viral de superfície (VP) (PÉNZES *et al.* 2020).

Grande parte das pesquisas de metagenômica de morcegos usam fezes como amostra. Nós utilizamos diferentes amostras biológicas, inclusive sangue. Um estudo conduzido por

Canuti *et al.* (2011), com amostras sanguíneas de duas espécies de morcegos, mostraram uma prevalência relativamente baixa de parvovírus em morcegos da África Ocidental e América Central. Já em nosso estudo, obtivemos em *pools* de sangue, leituras montadas de *Parvovirus* de morcegos e de outras espécies de mamíferos.

Vários outros Parvovírus foram detectados e pertencentes aos gêneros *Bocaparvovirus*, *Dependoparvovirus*, *Protoparvovirus* e *Tetraparvovirus*, com sequências genômicas disponíveis em morcegos (CANUTI *et al.* 2011; WU *et al.* 2011; HE *et al.* 2013; SASAKI *et al.* 2016; LAU *et al.* 2017). No Brasil, Parvovírus foram sequenciados em *pools* de swab anal e orofaríngeos de *A. lituratus* coletados na região su do país (FINOKETTI *et al.* 2019).

Os *Chaphamaparvovirus*, conhecidos anteriormente como *Chapparvoviruse*, é um gênero cujos membros foram identificados em numerosos animais vertebrados, incluindo ratos e camundongos, morcegos, macacos rhesus, cães, porcos e diabos da Tasmânia, bem como pássaros e peixes (LI *et al.* 2020). Em nosso estudo, obtivemos um genoma quase completo de um CHPV, onde após a análise filogenética se mostrou próximo a três parentes, detectados em morcegos anteriormente relatados, inclusive em *D. rotundus* no Brasil (SOUZA *et al.* 2017).

Coronavírus

A descoberta de vírus tem sido tradicionalmente motivo de estudos genômicos em morcegos. Em nossa pesquisa, detectamos sequências tipo Coronavirus, incluindo aqueles associados as síndromes respiratórias. Essas sequências de CoVs pertencem apenas aos betacoronavírus. Nossos achados alinharam-se aos resultados de estudos anteriores em outras localizações geográficas (KOHL e KURT, 2014, HAN *et al.* 2017, FAN *et al.* 2019, KIVISTÖ *et al.* 2020). E embora a recente doença pandêmica tenha sido ocasionada por um CoV (SARS-CoV-2) (ZHOU *et al.* 2020), e esse vírus não tenha sido identificada em nenhuma espécie de morcego, vários coronavírus intimamente relacionados à SARS foram encontrados em morcegos *Rhinolophus affinis*, com 96% de identidade do genoma (BONI *et al.* 2020). Outros coronavírus também foram identificados em *Molossus rufus*, *M. molossus*, *A. lituratus* e *A. planirostris* (23,1% cada) (BITTAR *et al.* 2020).

Sabemos que um estudo realizado por Wacharapluesadee *et al.* (2021), forneceu evidências moleculares e sorológicas que indicaram que SC2r-CoVs estão em circulação em morcegos no sudeste da Ásia. Embora na pesquisa, o local de amostragem (apenas na Tailândia) e o tamanho da amostra fossem limitados, os resultados demonstraram que os CoVs com alto grau de parentesco genético com o SARS-CoV-2 estão amplamente presentes em morcegos em muitas nações e regiões da Ásia. Desta maneira, enfatizamos novamente que os *contigs* montados para os CoVs associados a SARS, por mais que tenham apresentado identidade de

100% para a ORF1ab de SARS-CoV-2, precisaríamos de fragmentos maiores de aminoácidos para uma análise mais robusta, caso contrário, assumimos a possibilidade das leituras obtidas nas amostras, serem de outros CoVs circulantes nos morcegos da região.

Adenovirus

As infecções por Adenovírus (AdV) quase sempre são assintomáticas ou resultam em doenças com sintomatologia leve. Porém, em cães, infecções pelo *adenovírus canino 1* (CAdV-1) pode causar hepatite ou doença respiratória (CAdV-2) (WONG *et al.* 2017). Já em humanos, a adenovirose causa distúrbios respiratórios (LEWIS *et al.* 2009), conjuntivite (WALSH *et al.* 2009), hepatite (SAAD *et al.* 1997), miocardite (Treacy *et al.* 2010) e gastroenterite (Jones *et al.* 2007). Apesar do HAdV-C estar relacionado com infecções do trato respiratório, ele pode ser detectado nas fezes, provavelmente pela ingestão de secreções do trato respiratório, uma vez que eles não replicam no trato gastrointestinal (LENAERTS *et al.* 2008). Dessa forma, em nosso estudo, detectamos AdV em *swabs* oral e anal, reforçando o potencial de transmissão desses vírus via ingestão oral ou de aerossóis de material fecal de morcegos (BENKŐ *et al.* 2014).

Identificamos o material genético de uma variedade de Adenovírus, que também puderam ser detectados em morcegos na Itália, Alemanha, China, Hungria e aqui no Brasil (SONNTAG *et al.* 2009, JÁNOSKA *et al.* 2011, HAN *et al.* 2017, OGAWA *et al.* 2017, VIDOVSZKY *et al.* 2015, DIAKOUDI *et al.* 2019, FINOKETTI *et al.* 2019). Estudos apontam que o gênero *Mastadenovirus* infecte apenas mamíferos, incluindo humanos, no entanto, a transmissão entre espécies foi observada com adenovírus, e a circulação entre diferentes espécies animais e a transmissão de animais para humanos é possível (DAVISON *et al.* 2003, DIAKOUDI *et al.* 2019).

Curiosamente, os *contigs* AdV identificados em nossa pesquisa, representam mais genes que compartilharam identidade de sequência de aminoácidos com adenovírus humanos, bovino, cães e outros mamíferos, do que de AdVs de morcego relatados anteriormente. Isso pode indicar a possível evolução de novas cepas virais. Porém, devido os tamanhos limitados e números de fragmentos gerados pelo sequenciamento Illumina, precisaríamos adotar ensaios convencionais de PCR para gerar sequências mais longas e abundantes para uma análise filogenética de qualidade (DREXLER *et al.* 2012; BAKER *et al.* 2013).

Em resumo, o conhecimento sobre a diversidade de AdV abrigados em morcegos, mostra que os resultados obtidos em nossa análise nos dão novos *insights* sobre o papel dos morcegos como reservatórios, bem como o papel dos quirópteros na co-evolução desses AdVs,

uma vez que o comportamento de poleiro, pode desempenhar uma estratégia importante na epidemiologia e na evolução desses vírus (NTUMVI *et al.* 2021).

Papillomavirus

Os papilomavírus (PVs) infectam a pele e a mucosa dos mamíferos, mas também foram encontrados em pássaros, tartarugas e cobras e provavelmente infectam todos os amniotas (BRAVO *et al.* 2010). A maioria dos PVs foram isolados de humanos e recentemente, muitos grupos de pesquisadores, identificaram com sucesso, PVs com alta especificidade de hospedeiro em outras espécies, incluindo os morcegos (TSE *et al.* 2012; GARCÍA-PÉREZ *et al.* 2014, SALMIER *et al.* 2017), entretanto, os relatos de PVs em morcegos do Brasil são escassos, o que faz de nossos achados, uma ampliação de registros de PVs em morcegos no país.

Sobre os PVs, sabe-se que a proteína L1 ORF, proteína identificada nos morcegos dos *pools* das diferentes amostras submetidas a metagenômica em nossa pesquisa, é caracterizada como a região mais conservada no genoma PVs e é utilizada como critério de classificação taxonômicos para os diferentes gêneros de PV a partir do percentual de compartilhamento de identidade da sequência de nucleotídeos em toda a L1 ORF (DE VILLIERS *et al.* 2004) e do status taxonômico dos tipos, subtipos e variantes de PV, baseado no critério convencional de que a sequência de seus genes para L1.

Como obtivemos percentuais variados de identidade de papilomavirus que compartilharam similaridade para o gene que codifica a proteína L1 ORF de diferentes espécies de mamíferos, e mesmo que não tenhamos obtido sequências maiores para montagem de genomas e uma análise filogenética mais robusta, os nossos resultados mostram que a teoria dominante de que os PVs são altamente específicos da espécie e co-evoluem com seu hospedeiro, pode conter exceções, como descreveram ZHENG *et al.* (2018). Observamos ainda que proteína putativa E – presente em outros PVs de morcego filogeneticamente intimamente relacionados (TSE *et al.* 2012; BACER, 2013), estavam presentes em alguns *contigs* montados de PVs dos morcegos estudados.

Papilomavirus foram detectados em morcegos de espécies distintas em estudos de metagenômica com amostras oronasais (WU *et al.* 2012, GARCÍA-PÉREZ *et al.* 2014, WANG *et al.* 2015). A variedade de *contigs* de PVs de outras espécies de mamíferos identificadas nas amostras sequenciadas em nosso estudo pode estar diretamente associada a alta diversidade genômica desses vírus e às características ecológicas dos morcegos, que podem intensificar a disseminação desses vírus e aumentar as chances de transmissão interespecies (FINOKETTI *et al.* 2019).

Picornavirus

A família *Picornaviridae* consiste em cerca de 80 espécies de vírus agrupadas em 35 gêneros, e destes, são conhecidos vários patógenos humanos e animais que causam doenças com sintomas que vão desde doença febril leve até doenças graves do coração, fígado ou mesmo do sistema nervoso central (YU *et al.* 2013).

Os picornavírus (PiVs) descobertos em morcego (BtPVs) estão associados aos gêneros *Mischivirus*, *Hepatovirus*, *Crohivirus*, *Kunsagivirus*, *Kobuvirus* e *Shanbavirus* ou permanecem sem atribuição (ZELL *et al.* 2017, KING *et al.* 2018). Em nosso estudo, identificamos alguns destes gêneros

Notavelmente, a detecção de PiVs nas espécies de morcegos estudadas foi expressiva, com uma diversidade de sequências correspondentes a outras espécies de PiVs, como bovinos, aves e canídeos, além daqueles identificados em quirópteros. Os PiVs também foram identificados em diferentes espécies de morcegos, com diferentes taxas de detecção como verificados nos estudos de Li *et al.* (2010), Kemenesi *et al.* (2014) e Yinda *et al.* (2017) com morcegos frugívoros. Outro estudo sobre o viroma de guano de morcego nos Estados Unidos identificou sequências virais pertencentes a diversas famílias, incluindo *Picornaviridae* (LI *et al.* 2010).

Ressaltamos ainda, que a diversidade de leituras para PiVs identificadas em nosso estudo, pode estar diretamente associado a outros hospedeiros eucariotas da dieta dos morcegos ou a localização geográfica destes (ZEGHBIB *et al.* 2019), uma vez que as os quirópteros estudados, tinham hábitos alimentares distintos (frugívoro, insetívoro e piscívoro) e foram obtidas em diferentes localizações.

Assim, registros recentes têm mostrado que os PiVs previamente não reconhecidos, estão presentes em morcegos, e vem sendo descobertos em diversos estudos metagenômicos (LAU *et al.* 2011; KEMENESI *et al.* 2015; YINDA *et al.* 2017). Portanto, as sequências obtidas de PiVs em nosso estudo, embora saibamos que seja necessária uma caracterização molecular adicional para análises filogenéticas, contribuem como registros desses vírus em morcegos da pesquisa e podem fornecer informações para compreender os potenciais fatores de surgimento de doença causadas por PiVs na região de estudo.

Anellovirus, *Astrovirus*, *Bornaviridae*, *Circovirirus*, *Genomovirus*, *Herpesvirus*, *Paramyxovirus*, *Picobirnavirus*, *Polyomavirus* e *Rabdovirus*.

Esta análise metagenômica revelou ainda, sequências que tiveram baixo registro de material genético para vírus de dez famílias virais diferentes. E apesar de obtermos poucas sequências, a diversidade de *contigs* virais obtidas são comparáveis a vírus de importância e

saúde pública e veterinária, como já mencionado anteriormente. Aachamos que a baixa frequência pode estar associada a diversos fatores como os diferentes tipos de amostras, tamanhos de amostras, espécies de morcegos, estratégias de agrupamento e condições fisiológicas e imunológicas dos animais capturados.

Muitos estudos têm associado diversas enfermidades aos Anellovírus, incluindo hepatite, esclerose múltipla, carcinomas hepatocelulares, infecções respiratórias, distúrbios sanguíneos e doenças autoimunes (MANCUSO *et al.* 2013; SPANDOLE *et al.* 2015; MASOURIDI-LEVRAT *et al.* 2016; TYSCHIK *et al.* 2017). Esses virus têm sido identificados em diversos mamíferos, como primatas, cães, gatos, porcos, roedores, morcegos e focas (OKAMOTO, 2009; CIBULSKI *et al.* 2014;; NG *et al.* 2011; NISHIYAMA *et al.* 2014; SHI *et al.* 2015; HRAZDILOVA *et al.* 2016).

No Brasil, entre os vários vírus de RNA e DNA detectados em morcegos *Tadarida brasiliensis*, um novo Anellovirus foi identificado, sendo considerado a primeira descrição desse virus em morcegos (CIBULSKI *et al.* 2014). Somando-se ainda as descobertas de *Anellovirus* em morcegos, Souza *et al.* (2018), também detectaram duas novas espécies de *Anellovírus* em *Carollia perspicillata* e *Desmodus rotundus*. Em nosso estudo, todas as sequências para este vírus apresentaram identidades para *Anellovírus* de outras espécies de vertebrados, mostrando assim, a necessidade de estudos adicionais para entender a dinâmica de transmissão na natureza desses virus, e a caracterização abrangente de seus hospedeiros na região de nossa pesquisa.

Os *Astrovírus* (AstVs) são patógenos comuns de animais e humanos que causam doenças gastrointestinais, principalmente gastroenterite e diarreia. Eles provocam problemas de saúde significativos em recém-nascidos e crianças pequenas e perdas econômicas no setor avícola (DUFKOVA *et al.* 2015). Sobre os reservatórios dos AstVs, os morcegos são altamente permissivos à infecção por AstVs, podendo transportar tanto AstVs restritos ao hospedeiro quanto cepas mais diversas intimamente relacionadas a outros membros do gênero *Mamastrovirus*, como raposa, murino, ovino, vison e humano AstVs e até astrovírus aviários do gênero *Avastrovirus* (LACROIX *et al.* 2017).

O RNA de diversos AstVs foi detectado em amostras de colônias de morcegos na China, por Zhu *et al.* (2009). Esses mesmos pesquisadores detectaram várias cepas desses vírus dentro de um poleiro em uma única caverna. Em nossa pesquisa, identificamos apenas uma sequência de AstVs intimamente relacionado ao AstVs detectado em canídeos, o que sugere que os morcegos podem desempenhar um papel fundamental para a diversidade de *Astrovírus* e na transmissão interespecies.

Durante o estudo, observamos também, que muitos vírus identificados em morcegos, são vírus emergentes e que representam virus RNA da ordem *Mononegavirales*. Nesta ordem, a família de vírus *Bornaviridae* vem crescendo notavelmente nos últimos anos devido à descoberta de várias novas espécies e gêneros. A partir de 2019, a taxonomia denominou três gêneros dessa família: *Carbovirus*, *Cultervirus* e *Orthobornavirus* (AMARASINGHE *et al.* 2019). Destes, gêneros, duas espécies, *Ortobornavírus de mamífero 1* e *Ortobornavírus de mamífero 2*, são conhecidas por afetar mamíferos, sendo o BoDV-1 bem conhecido por causar doença neurológica grave e fatal de Borna em uma variedade de mamíferos, principalmente cavalos e ovelhas e recentemente, o BoDV-1 foi identificado como agente causal em casos fatais de encefalite humana (KORN *et al.* 2018; LIV *et al.* 2022).

Em estudos anteriores, *Elementos endógenos do tipo Bornavirus* (EBL) foram detectados no genoma de várias espécies de morcegos (CUI e WANG, 2015; MUKAI *et al.* 2018). Esses EBL são sequências de DNA em genomas de morcegos que exibem identidades de sequência consideráveis para genes bornavirais atuais em nível de aminoácidos de cerca de 30 a 50% (BELYI *et al.* 2010]. Em algumas espécies de morcegos, a transcrição de EBL semelhante à RNA-polimerase dependente de RNA bornaviral foi relatada (HORIE *et al.* 2016).

A análise BLASTx mostrou que o *contig* montado nas amostras de swab oral de *Bat bornavirus* em nossa pesquisa, correspondiam à região da polimerase viral. Contudo, por ser uma sequência curta (137 nt), apenas registramos e não realizamos a análise filogenética, para saber se a mesma seria idêntica ou semelhante às sequências relacionadas ao Bornavírus descoberta no genoma de outros quirópteros, como por exemplo o de *Myotis lucifugus* (DACHEUX *et al.* 2014). Portanto, sugerimos que a sequência aqui identificada, possa ser endógena, uma vez que sequências endógenas relacionadas a *Bornavírus* podem ser expressas como mRNAs em outros modelos de vertebrados (HORIE *et al.* 2010) e já haviam sido identificadas em outros estudos de viroma de quirópteros, como mencionamos anteriormente.

Alguns Circovírus (CVs) tiveram leituras virais registradas nos morcegos aqui estudados. Os CVs são os principais patógenos de suínos, por exemplo, *Circovírus suíno 2* (PCV2) que causa infecções assintomáticas ou doença claramente aparente que pode ser responsável por perdas econômicas significativas (FIRTH *et al.* 2009; GRAU-ROMA *et al.* 2011). Em aves, circovírus aviários, dentro do gênero *Gyrovirus*, foram identificados em uma ampla gama de espécies aviárias; um deles, o *Vírus da anemia das galinhas* (CAV), é uma das principais causas de doença, associada à depleção linfóide, imunossupressão e anormalidades do desenvolvimento (STEWART *et al.* 2006).

Comparando em detalhes as sequências virais de nossa pesquisa com os outros viromas de morcegos publicados, apesar das baixas frequências, obtivemos *contigs* amostrais de CVs,

incluindo aqueles registrados em quirópteros. Quando buscamos registros destes vírus, observamos que outros circovírus já foram descritos anteriormente, em amostras fecais de humano e de tecido muscular de bovinos e galinhas, em fezes de chimpanzés selvagens (LI *et al.* 2010), e também em amostras de fezes de morcego da Califórnia (LI *et al.* 2010) e de fluido respiratório de *T. brasiliensis* (LIMA *et al.* 2015). Nossos achados indicam que os CVs podem de fato infectar morcegos, e que também possam ser considerados como potenciais reservatórios e dispersores desse gênero viral.

Ainda dentre os vírus com genoma circular identificados no sequenciamento, montamos um *contig* em amostras de sangue e *swab* oral, para um Genomovirus, que teve identidade para *Canine feces-associated gemycircularvirus*. Virus da família Genomoviridae também foram identificados em fezes e saliva de morcegos dos gêneros *Myotis* e *Pipistrellus* na Suíça e em *Tadarida brasiliensis* na Argentina (BOLATTI *et al.* 2020; HARDMEIER *et al.* 2021).

Herpesvírus (HVs) foram descobertos em mamíferos, aves, répteis, anfíbios, peixes e moluscos e, até o momento, o número de herpesvírus distintos conhecidos excede 200 (EHLERS, 2008). Em quirópteros, os HVs também foram detectados em vários países da América do Sul e Ásia, e em morcegos europeus, onde os gamas e betaherpesvírus foram detectados por PCR (MOLNÁR *et al.* 2008; RAZAFINDRATSIMANDRESY *et al.* 2009; WIBBELT *et al.* 2009; WATANABE *et al.* 2010, WADA *et al.* 2018).

Similaridade sobre indícios de HVs em *M. molossus* que registramos, também pode ser constatado em viroma dessa mesma espécie de morcego na Guiana Francesa (SALMIER *et al.* 2017). Quando observamos a sequência de herpesvírus identificada em *pool* de *swab* anal de nossa pesquisa, notamos que ela estava mais intimamente relacionada ao HVs detectado em baço da espécie de morcego *Hipposideros diadema* nas Filipinas (WATANABE *et al.* 2009).

Nosso registro sugere que a via de transmissão fecal pode ser importante para a transmissão de HVs em morcegos, assim como pode ser visto em outros estudos que relataram a detecção de herpesvírus esses vírus em amostras de fezes, *swabs* anais, trato digestivo e saliva de morcegos (WIBBELT *et al.* 2007; GE *et al.* 2011; WU *et al.* 2016; HU *et al.* 2017).

A vigilância aprimorada de patógenos associados a morcegos levou à descoberta de vários novos paramixovírus (BAKER *et al.* 2012; WILKINSON *et al.* 2012; MORTLOCK *et al.* 2015). Aqui, registramos sequência viral de um importante gênero da família Paramyxoviridae, o *Morbillivirus* que causa doença com alta morbidade e mortalidade em população de cães e outros mamíferos. E assim como em nosso estudo, membros do gênero *Morbillivirus*, conforme atualmente definido pelo ICTV, foram detectados em morcegos vampiros neotropicais (DREXLER *et al.* 2012).

Acreditamos que o registro do *Canine morbillivirus* mostra a necessidade de investigar a participação dos morcegos como reservatórios desse *Paramyxovirus*, e mesmo com apenas uma leitura sequenciada, sabemos que as propriedades únicas entre os mamíferos em termos de grandes tamanhos de grupos sociais, interação social intensa e altas densidades populacionais, os estudos mais criterioso dos quirópteros podem fornecer dados epidemiológicos mais precisos sobre a cadeia da doença, induzida por este vírus, na população canina da região.

Além dos vírus já mencionados, indícios de *Picobirnavirus* com identidade para diferentes espécies de mamíferos e *Polyomavirus* (PyVs) associado a morcegos e humanos foram mineradas nos *pools* das espécies de morcegos da região de Santarém. Leituras de *Picobirnavirus* também foram identificadas em morcegos frugívoros das espécies *Eidolon helvum* e *Epomophorus gambinus* em Camarões (YINDA *et al.* 2018). Da mesma maneira, os PyVs, tanto o *Alphapolyomaviruse* quanto o *Betapoliomavírus* também foram detectados em morcegos-ferradura (gênero *Rhinolophus*) na Europa (VIDOVSKY *et al.* 2020).

Por fim, assim como registramos, sequências da família *Rabdoviridae* foram detectadas anteriormente em morcegos *Myotis daubentonii* na Suíça, embora em baixa prevalência (0,36%) (MEGALI *et al.* 2010). Os rabdovírus, especialmente os vírus do gênero *Lyssavirus*, são zoonoses. Na Europa, vários lyssaviruses foram detectados em morcegos, incluindo o europeu *Lyssavirus 1 e 2* (EBLV-1/2) (KOHL *et al.* 2014). No Brasil, muitos estudos têm demonstrado a presença do vírus da raiva em diferentes amostras biológicas de diferentes espécies de morcegos (CIFUENTES *et al.* 2017; FINOKETTI, 2018; ABREU e RODRIGUES, 2022)

6 – CONCLUSÕES

Este estudo é o primeiro a explorar o viroma de diferentes amostras biológicas obtidas de 5 espécies de morcegos da Amazônia: *N. albiventris*, *N. leporinus*, *A. lituratus*, *Myotis* sp. e *M. molossus*, e forneceu informações importantes sobre a diversidade viral dessas espécies, registrando dezesseis famílias virais que apresentam vírus classificados e de interesse tanto em saúde pública, como veterinária, sendo alguns leituras associadas a vírus que causam doenças fatais em seus hospedeiro.

Todas as amostras biológicas foram promissoras para o estudo metagenômico viral nos morcegos estudados e, entendemos também que apesar de algumas limitações sobre esta metodologia, em especial pelos tamanhos das sequências geradas, nossos achados mostram que é interessante estudar a dinâmica viral em morcego da região amazônica e monitora-los em futuras pesquisas de longo prazo, afim de entender se a variação e diversidade viral, observada nas espécies de quirópteros, mostrará se esses mamíferos podem ser reservatórios ou meros hospedeiros acidentais.

A alta diversidade de vírus nos morcegos, aqui registrada, pode ser resultado das interações intra-espécies de quirópteros e seus hábitos alimentares, e também, das pressões ambientais que esses mamíferos vêm sofrendo ao longo dos tempos.

Algumas descobertas mais interessantes neste estudo foram as presenças de genomas quase completo do *Retrovirus* causador da Anemia Infecciosa Equina em *M. molossus*. E ainda, nessa mesma espécie, também obtivemos uma nova espécie de *Chaphamaparvovirus* e genomas completos de novos *Totivirus*.

E por fim, mostramos que alguns dos vírus que tiveram leituras sequenciadas são particularmente interessantes, pois estão filogeneticamente e intimamente relacionados a vírus que podem causar doenças em humanos e animais o que mostra que no futuro, precisaremos considerar os desafios envolvidos em desvendar o papel dos morcegos e seus vírus, na região estudada e propôr a vigilância contínua desses quirópteros para a presença de novas estirpes virais e investigações subsequentes das características biológicas e potencial infeccioso de tais vírus, facilitando portanto, uma abordagem proativa no caso de um transbordamento zoonótico envolvendo a diversidade viral identificadas nas espécies de morcego estudadas.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, W.U.; RODRIGUES, L.R.R. Diversidade viral em morcegos no Brasil: Uma revisão sistemática do período 2000 a 2020 / Viral diversity in bats in Brazil: A systematic review from 2000 to 2020. **Brazilian Journal of Development**. n. 8, v1, p579–592., 2022. <https://doi.org/10.34117/bjdv8n1-038>.

ADJEMIAN, J.; FARNON, E.C.; TSCHIOKO, F.; WAMALA, J. F.; BYARUHANGA, E.; BWIRE, G.S.; *et al.* Outbreak of Marburg hemorrhagic fever among miners in Kamwenge and Ibanda districts, Uganda. **J. Infect. Dis.** n.204, p.796–799, 2011. <https://doi.org/10.1093/infdis/jir312>.

AGÜERO, M.; FERNÁNDEZ, J.; ROMERO, L.J.; ZAMORA, M.J.; SÁNCHEZ, C.; BELÁK, S.; ARIAS, M.; SÁNCHEZ-VIZCAÍNO, J.M. A highly sensitive and specific gel-based multiplex RT-PCR assay for the simultaneous and differential diagnosis of African swine fever and Classical swine fever in clinical samples. **Vet. Res.** n. 35, v.5, p551-563, 2004. <https://doi.org/10.1051/vetres:2004031>.

AGUILAR-SETIÉN, A.; ROMERO-ALMARAZ, M.L.; SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ, C.; FIGUEROA, R.; JUÁREZ-PALMA, L.P.; GARCÍA-FLORES, M.M.; VÁZQUEZ-SALINAS, C.; SALAS-ROJAS, M.; HIDALGO-MARTÍNEZ, A.C.; PIERLÉ, S.A.; GARCÍA-ESTRADA, C.; RAMOS, C. Dengue virus in Mexican bats. **Epidemiol. Infect.** n.136, v.12, p.1678-1683, 2008. <https://doi.org/10.1017/S0950268808000460>.

AMARASINGHE, G.K.; AYLLON, M.A.; BAO, Y.; BASLER, C.F.; BAVARI, S.; BLASDELL, K.R.; BRIESE, T.; BROWN, P.A.; BUKREYEV, A.; BALKEMA-BUSCHMANN, A; *et al.* Taxonomy of the order Mononegavirales: update 2019. **Arch. Virol.** n164, p1967–80, 2019. <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04247-4>.

AMMAN, B. R.; ALBARIÑO, C. G.; BIRD, B. H.; NYAKARAHUKA, L.; SEALY, T. K.; BALINANDI, S.; SCHUH, A.J.; CAMPBELL, S.M.; STRÖHER, U.; JONES, M.E.; VODZACK, M.E.; REEDER, D.M.; KABOYO, W.; NICHOL, S.T.; TOWNER, J.S. A Recently Discovered Pathogenic *Paramyxovirus*, Sosuga Virus, is Present in *Rousettus aegyptiacus* Fruit Bats at Multiple Locations in Uganda. **J. Wildl. Dis.** n. 51, v. 3, p. 774-779, 2015. <https://doi.org/10.7589/2015-02-044>.

- ANTHONY, S.J; EPSTEIN, J.H; MURRAY, K.A; NAVARRETE-MACIAS, I; ZAMBRANA-TORRELIO, C.M; SOLOVYOV, A. A Strategy to estimate unknown viral diversity mammals. **mBio**. v. 4, n. 5, 2013. <https://doi.org/10.1128/mBio.00598-13>.
- ARAUJO, J.; THOMAZELLI, L. M.; HENRIQUES, D. A.; LAUTENSCHLAGER, D.; OMETTO, T.; DUTRA, L. M.; AIRES, C. C.; FAVORITO, S.; DURIGON, E. L. Detection of hantavirus in bats from remaining rain forest in São Paulo, Brazil. **Research Notes**, v. 5, n. 5, p. 690. 2012. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-690>.
- ASANO, K.M.; HORA, A.S.; SCHEFFER, K.C.; FAHL, W.O.; IAMAMOTO, K.; MORI, E.; BRANDÃO, P.E. *Alphacoronavirus* in urban Molossidae and Phyllostomidae bats, Brazil. **Virol. J.** n.24 p.103:110, 2016. <https://doi.org/10.1186/s12985-016-0569-4>.
- ACHARYA, T.; KENNEDY, R.; DAAR, A.S; SINGER, P.A. Biotechnology to improve health in developing countries: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. n. 99, v.4, p.341–350. 2013. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762004000400001>.
- ATMAR, R.L.; OPEKUN, A.R.; GILGER, M.A.; ESTES, M.K.; CRAWFORD, S.E.; NEILL, F.H.; *et al.* Determination of the 50% human infectious dose for Norwalk virus. **J. Infect. Dis.**n.209, p.1016-22. 2014. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit620>.
- BAILLIE, G.J.; VAN-DE-LAGEMAAAT, L.N.; BAUST, C.; MAGER, D.L. Multiple groups of endogenous betaretroviruses in mice, rats, and other mammals. **J. Virol.** n.78 p.5784, 2004. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.11.5784-5798.2004>.
- BAKER, K.S.; TODD, S.; MARSH, G.; FERNANDEZ-LORAS, A.; SUU-IRE, R.; WOOD, J.L.N.; WANG, L.F.; MURCIA, P.R.; CUNNINGHAM, A.A. Co-circulation of diverse paramyxoviruses in an urban African fruit bat population. **J. Gen. Virol.** n.93, v.4, p850-856, 2012. <https://doi.org/10.1099/vir.0.039339-0>.
- BAKER, K.S.; LEGGETT, R.M.; BEXFIELD, N.H.; ALSTON, M.; DALY, G.; *et al.* (2013) Metagenomic study of the viruses of African straw-coloured fruit bats: Detection of a chiropteran poxvirus and isolation of a novel adenovirus. **Virology**. n.441, p.95–106, 2013. <https://doi.org/10.1099/vir.0.043760-0>.
- BANYARD, A. C.; HAYMAN, D.; JOHNSON, N.; MCELHINNEY, L. M.; FOOKS, A. R. Bats and Lyssaviruses. **Advances in Virus Research**, v. 79, p. 239-289, 2011. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387040-7.00012-3>.

BARCELLOS, C.; MONTEIRO, A.M.V.; CORVALÁN, C.; GURGEL, H.C.; CARVALHO, M.S.; ARTAXO, P.H.; SANDRA, E.; RAGONI, V. Mudanças climáticas e ambientais e as doenças infecciosas: cenários e incertezas para o Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**. n.18, v. 3, p. 285-304. 2009. <https://dx.doi.org/10.5123/S1679-49742009000300011>.

BARROS, R.S.M.; BISAGGIO, E.L.; BORGES, R. Morcegos (Mammalia, Chiroptera) em fragmentos florestais urbanos no município de Juiz de Fora, Minas Gerais, sudeste do Brasil. **Biota Neotropica**. n.6, p. 1-6, 2006. <https://doi.org/10.1590/S1676-06032006000100012>.

BARR, J.A.; SMITH, C.; MARSH, G.A.; FIELD, H.; WANG, L-F. Evidence of bat origin for Menangle virus, a zoonotic *Paramyxovirus* first isolated from diseased pigs. **J. Gen. Virol.** n.93, p. 2590-2594, 2012. <https://doi.org/10.1099/vir.0.045385-0>.

BECHERER, L.N.; BORST, M.; BAKHEIT, S.; FRISCHMANN, R.; ZENGERLE, A. F.; VON, S. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) - Review and classification of methods for sequence specific detection. **Analytical Methods**, n.6, v. 12, p. 717–746, 2020.

BELÁK, A. Molecular diagnosis of viral diseases, present trends and future aspects: A view from the OIE Collaborating Centre for the Application of Polymerase Chain Reaction Methods for Diagnosis of Viral Diseases in Veterinary Medicine. **Vaccine**. n.30, v.25, p. 5444-5452, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.11.068>.

BELYI, V.A.; LEVINE, A.J.; SKALKA, A.M. Unexpected inheritance: multiple integrations of ancient bornavirus and ebolavirus/marburgvirus sequences in vertebrate genomes. **PLoS Pathog**. n.6, 2010. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001030>.

BENKŐ, M.; HARRACH, B.; KREMER, E.J. Do nonhuman primate or bat adenoviruses pose a risk for human health? **Future Microbiol.** n. 9, v. 3, p. 269-72, 2014. <https://doi.org/doi:10.2217/fmb.13.170>.

BETKE, M.; DIANE, E.H., NICHOLAS, C.M.; MCCracken, G.F.; PROCOPIO, M.; HRISTOV, N.I.; SHUANG, T.; ANGSHUMAN, B.; JONATHAN, D.R.; JASON, W. HORN, S.C.; CUTLER, J.; CEVELAND, T.H. Thermal Imaging Reveals Significantly Smaller Brazilian Free-Tailed Bat Colonies Than Previously Estimated. **Journal of Mammalogy**. v. 89, 18–24, 2008. <https://doi.org/10.1644/07-MAMM-A-011.1>.

BITTAR, C.; MACHADO, R.R.G.; COMELIS, M.T.; BUENO, L.M.; BEGUELINI, M.R.; MORIELLE-VERSUTE, E.; NOGUEIRA, M.L.; RAHAL, P. *Alphacoronavirus* Detection in

Lungs, Liver, and Intestines of Bats from Brazil. **Microb. Ecol.** n.79, v.1, p.203-212, 2020. <https://doi.org/10.1007/s00248-019-01391-x>.

BOLATTI, E. M.; ZOREC, T.M.; MONTANI, M.E.; HOSNJAK, L.; CHOUHY, D.; *et al.* A Preliminary Study of the Virome of the South American Free-Tailed Bats (*Tadarida brasiliensis*) and Identification of Two Novel Mammalian Viruses. **Viruses**. n. 12, v. 4, p.1-23, 2020. <https://doi.org/10.3390/v12040422>.

BOURREAU, E.; GINOUVES, M.; PRÉVOT, G.; HARTLEY, M.A.; GANGNEUX, J.P.; ROBERT-GANGNEUX, F.; DUFOUR, J.; SAINTE-MARIE, D.; BERTOLOTTI, A.; PRATLONG, F.; MARTIN, R.; SCHÜTZ, F.; COUPPIÉ, P.; FASEL, N.; RNET, C. Presence of *Leishmania* RNA Virus 1 in *Leishmania guyanensis* Increases the Risk of First-Line Treatment Failure and Symptomatic Relapse. **J. Infect. Dis.** n. 213, v, 1, p. 105-11, 2016. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiv355>.

BRAVO, I.G.; DE SANJOSÉ, S.; GOTTSCHLING, M. The clinical importance of understanding the evolution of papillomaviruses. **Trends Microbiol.** n.18, v.10, p.432-438, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2010.07.008>.

BRIESE, T.; KAPOOR, A.; MISHRA, N.; JAIN, K.; KUMAR, A.; JABADO, O. J.; *et al.* Virome capture sequencing enables sensitive viral diagnosis and comprehensive virome analysis. **MBio**. n.6, 2015. <https://doi.org/10.1128/mBio.01491-15>.

BRIERLEY, L.; VONHOF, M. J.; OLIVAL, K. J.; DASZAK, P.; JONES K. E. Quantifying global drivers of zoonotic bat viruses: A process-based perspective. **The American Naturalist**, n. 2, v.187, p.53-64, 2016. <https://doi.org/10.1086/684391>.

BRUENN, J. A. A closely related group of RNA-dependent RNA polymerases from double-stranded RNA viruses. **Nucleic Acids Res.** n. 21, p. 5667–5669, 1993. <https://doi.org/10.1093/nar/21.24.5667>.

BURDON, F.J.; ANGUS R.M.; JON, S.H. Mechanisms of Trophic Niche Compression: Evidence from Landscape Disturbance. **J. of An. Ecology.** v.89, 2019. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.13142>.

BURGIN, C.J.; COLELLA, J.P., KAHN, P.L.; UPHAM, N.S. How many species of mammals are there? **J. Mammalogy**. n.99, p. 1–14, 2018. <https://doi.org/10.1093/jmammal/gyx147>.

CADIEUX, C.; KEDINGER, V.; YAO, L.; VADNAIS, C.; DROSSOS, M.; PAQUET, M.; NEPVEU, A. Mouse mammary tumor virus p75 and p110 CUX1 transgenic mice develop

mammary tumors of various histologic types. **Cancer Res.** n.69, p.7188–7197, 2009. <https://doi.org/10.1158/0008-547>.

CALISHER, C.H.; CHILDS, J.E.; FIELD, H.E.; HOLMES, K.V.; SCHOUNTZ, T. Bats: Important reservoir hosts of emerging viruses. **Clin. Microbiol. Rev.** n.19, p. 531–545, 2006. <https://doi.org/10.1128/CMR.00017-06>.

CAMPOS, A.C.A.; GÓES, L.G.B.; MOREIRA-SOTO, A.; CARVALHO, C.; AMBAR, G.; SANDER, A.L.; FISCHER, C.; RUCKERT, DA ROSA A.; CARDOSO, O.D.; KATAOKA, A.P.G.; PEDRO, W.A.; MARTORELLI, L.F.A.; QUEIROZ, L.H.; CRUZ-NETO, A.P.; DURIGON, E.L.; DREXLER, J.F. Bat influenza A(HL18NL11) virus in fruit bats, Brazil. **Emerg. Infect. Dis.** n.25, v.2, p.333-337, 2019. <https://doi.org/10.3201/eid2502.181246>.

CANUTI, M.; EIS-HUEBINGER, A.M.; DEIJS, M.; DE VRIES, M.; DREXLER J.F.; *et al.* Two novel parvoviruses in frugivorous New and Old World bats. **PLoS One.** n.6, pe29140, 2011. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029140>.

CASSEB, A.D.R.; CASSEB, L.M.N.; SILVA, S.P.; VASCONCELOS, P.F.D.C. Arbovírus: Importante Zoonose na Amazônia Brasileira. **Veterinária e Zootec.** n.20, p.391–403, 2013.

CARINI, A. Sur une grande épizootie de rage. ed. **Ann de L'Inst Pasteur.** n. 25, p843-46, 1911.

CEBALLOS, G.; EHRLICH, P.R. Global mammal distributions, biodiversity hotspots and conservation. **Proc. Natl. Acad Sci.** n.103, p.19374-19379, 2006.

CHAN, E.H.; TIMOTHY, F.; BREWER, L. C.; MADOFF, M. P.; POLLACK, A.M.Y. L.; SONRICKER, M. K.; CLARK, C. F.; MICHAEL, B.; ABLA, M.; JOHN, S. B. Global capacity for emerging infectious disease detection. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** n.107, v.21 p.701–21, 2010. <https://doi.org/10.1073/pnas.1006219107>.

CHIANG, J.O.; DE SOUZA, W.M.; NUNES, M.R.T.; ACRANI, G.O.; DE FREITAS, N.M.; DA SILVA, S.P.; DA SILVA, P.H.D.; DE SOUSA, A.W.; RODRIGUES, S.G.; QUARESMA, J.A.S. Characterization of the *Gamboa virus* sorogroup (*Orthobunyavirus* genus, Peribunyaviridae family). **J. Trop. Med. Hyg.** n. 98, p.1502–1511, 2018. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0810>.

CHUA, K.B.; CRAMERI, G.; HYATT, A.; YU, M.; TOMPANG, M.R.; *et al.* A previously unknown reovirus of bat origin is associated with an acute respiratory disease in humans. **Proc Natl Acad Sci U S A.** n.104, v.27, p.11424-9, 2007. <https://doi.org/10.1073/pnas.0701372104>.

- CIBULSKI, S.P.; TEIXEIRA, T.F.; DE SALES, L.F.E.; DO SANTOS, H.F.; FRANCO, A.C.; ROEHE, P.M. A Novel Anelloviridae Species Detected in *Tadarida brasiliensis* Bats: First Sequence of a Chiropteran *Anellovirus*. **Genome Announc.** n. 30, v. 5, 2014. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01028-14>.
- CIFUENTES, J.; JIMMY, F.; PÉREZ, L.; RUBÉN, D.; VERJAN, G.N. Bat Reservoirs for Rabies Virus and Epidemiology of Rabies in Colombia: a review. **CES Medicina Veterinaria y Zootecnia**, n. 12, v. 2, p. 134-150, 2017. <https://doi.org/10.21615/cesmvz.12.2.5>.
- COFFIN, J.M.; HUGHES, S.H.; VARMUS, H.E. Retroviruses. Cold Spring Harbor (NY): **Cold Spring Harbor Laboratory Press**; 1997.
- COSTA, A.C.; LUCHS, A.; MILAGRES, F.A.D.P.; *et al.* Near full length genome of a recombinant (E/D) cosavirus strain from a rural area in the central region of Brazil. **Sci. Rep.** n. 8, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30214-1>.
- COTMORE, S.F.; TATTERSALL, P. Parvoviruses: Small Does Not Mean Simple. **Annu. Rev. Virol.** n. 1, v. 5, p. 17-37, 2014. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-031413-085444>.
- COUTINHO, S. Redução do desmatamento e do tráfico de animais pode evitar pandemias. 2020 – Conexão UFRJ. Disponível em: <https://conexao.ufrj.br>. Acesso: 02/02/2021.
- CORMAN, V.M.; LANDT, O.; KAISER, M.; MOLENKAMP, R.; MEIJER, A.; CHU, D.K.; *et al.* Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. **Euro Surveill.** n.25, p.1560-7917, 2020. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045>.
- CUI, J.; TACHEDJIAN, G.; TACHEDJIAN, M.; HOLMES, E.C.; ZHANG, S.; *et al.* Identification of diverse groups of endogenous gammaretroviruses in mega- and microbats. **J. Gen. Virol.** n. 93, p.2037–2045, 2012. <https://doi.org/10.1099/vir.0.043760-0>.
- CUI, J.; TACHEDJIAN, M.; WANG, L.; TACHEDJIAN, G.; WANG, L.F.; *et al.* Discovery of retroviral homologs in bats: implications for the origin of mammalian gammaretroviruses. **J. Virol.** n.86, p.4288–4293, 2012. <https://doi.org/10.1128/JVI.06624-11>.
- CUI, J.; WANG, L.F. Genomic mining reveals deep evolutionary relationships between Bornaviruses and bats. **Viruses.** n. 7, p. 5792–800. 2015. <https://doi.org/10.3390/v7112906>.
- DACHEUX, L.; CERVANTES-GONZALEZ, M.; GUIGON, G.; THIBERGE, J-M.; VANDENBOGAERT, M.; MAUFRAIS, C.; *et al.* A Preliminary Study of Viral Metagenomics of French Bat Species in Contact with Humans: Identification of New Mammalian Viruses. **PLoS ONE.** n.9, v.1, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087194>.

- DALY, G.M.; BEXFIELD, N.; HEANEY, J.; STUBBS, S.; MAYER, A.P; PALSER, A.; *et al.* A viral discovery methodology for clinical biopsy samples utilising massively parallel next generation sequencing. **PLoS One**. n.6, v.12, 2011. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028879>.
- DAVISON, A.J.; BENKO, M.; HARRACH, B. Genetic content and evolution of adenoviruses. **J. Gen. Virol.** n. 84 p. 2895–2908. 2003. <https://doi.org/10.1099/vir.0.19497-0>.
- DELWART E. L. Viral metagenomics. **Reviews in medical virology**. n.17, v.2, p.115–131, 2007. <https://doi.org/10.1002/rmv.532>.
- DENG, X.; NACCACHE, S.N.; NG, T.; FEDERMAN, S.; LI, L.; CHIU, C.Y.; DELWART, E.L. An ensemble strategy that significantly improves de novo assembly of microbial genomes from metagenomic next-generation sequencing data. **Nucleic Acids Res.** n. 43, v. 7, 2015. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv002>.
- DEURENBERG, R.H.; BATHOORN, E.; CHLEBOWICZ, M.A.; COUTO, N.; FERDOUS, M.; *et al.* Application of next generation sequencing in clinical microbiology and infection prevention. **J. Biotechnol.** n.10, p.16-24, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.12.022>.
- DE VILLIERS, E.M.; FAUQUET, C.; BROKER, T.R.; BERNARD, H.U.; ZUR HAUSEN, H. Classification of papillomaviruses. **Virology**. n.324, v.1, p.17-27, 2004. doi: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.03.033>.
- DIAKOUDI, G.; LANAVE, G.; MORENO, A.; CHIAPPONI, C.; SOZZI, E.; PROSPERI, A.; LAROCCA, V.; LOSURDO, M.; DECARO, N.; MARTELLA, V.; LAVAZZA, A.; LELLI, D. Surveillance for Adenoviruses in Bats in Italy. **Viruses**. n. 11, v. 6, 2019. <https://doi.org/10.3390/v11060523>.
- DIETZGEN, R.G.; KONDO, H.; GOODIN, M.M.; KURATH, G.; VASILAKIS, N. The family *Rhabdoviridae*: mono- and bipartite negative-sense RNA viruses with diverse genome organization and common evolutionary origins. **Virus Res.** n. 227, p. 158-170, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2016.10.010>.
- DIZNEY, L.J.; RUEDAS, L.A. Increased host species diversity and decreased prevalence of Sin Nombre virus. **Emerg. Infect. Dis.** n. 15, v. 7, p. 1012-8, 2009. <https://doi.org/10.3201/eid1507.081621>.
- DREXLER, J.F.; GLOZA-RAUSCH, F.; GLENDE, J.; CORMAN, V.M.; MUTH, D.; GOETTSCHE, M.; SEEBENS, A.; NIEDRIG, M.; PFEFFERLE, S.; YORDANOV, S.;

ZHELYAZKOV, L.; HERMANN, U.; VALLO, P.; LUKASHEV, A.; MÜLLER, M.; DENG, H.; HERRLER, G.; DROSTEN, C. Genomic characterization of severe acute respiratory syndrome-related coronavirus in European bats and classification of coronaviruses based on partial RNA-dependent RNA polymerase gene sequences. **J. Virol.** n.84, v.21, p11336-49, 2010. <https://doi.org/10.1128/JVI.00650-10>.

DREXLER, J.F.; CORMAN, V.M.; MÜLLER, M.A.; MAGANGA, G.D.; VALLO, P.; BINGER, T.; GLOZA-RAUSCH, F.; COTTONTAIL, V.M.; RASCHE, A.; YORDANOV, S.; SEEBENS, A.; KNÖRNSCHILD, M.; OPPONG, S.; ADU, S.Y.; *et al.* Bats host major mammalian paramyxoviruses. **Nat. Commun.** n. 24, 2012. <https://doi.org/10.1038/ncomms1796>.

DONALDSON, E. F.; HASKEW, A. N.; GATES, J. E.; HUYNH, J.; MOORE, C. J.; FRIEMAN, M. B. Metagenomic analysis of the viromes of three North American bat species: viral diversity among different bat species that share a common habitat. **Journal of virology.** n. 84, v.24, p.13004–13018, 2010. <https://doi.org/10.1128/JVI.01255-10>.

DUFKOVA, L.; STRAKOVÁ, P.; ŠIRMAROVÁ, J.; SALÁT, J.; MOUTELÍKOVÁ, R.; CHRUDIMSKÝ, T.; BARTONIČKA, T.; NOWOTNY, N.; RŮŽEK, D. Detection of Diverse Novel Bat Astrovirus Sequences in the Czech Republic. **Vector Borne Zoonotic Dis.** n. 15, p. 518-521, 2015. <https://doi.org/10.1089/vbz.2015.1813>.

EHLERS, B. Discovery of herpesviruses. **Encyclopedia of Virology.** 3rd edn. Edited by MAHY W.J; VAN REGENMORTEL, M.H.V. Amsterdam, Elsevier, 2008.

ELNIFRO, E.M.; ASHSHI, A.M.; COOPER, R.J.; KLAPPER, P.E. Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology. **Clinical Microbiology Reviews.** n. 13, v. 4, p. 559-70, 2000. <https://doi.org/10.1128/CMR.13.4.559>.

ENGVAL, E. The ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay. **Clin. Chem.** n. 56, v. 2, p. 319-20, 2010. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2009.127803>.

ESPY, M. J.J.R.; UHL, L.M.; SLOAN, S.P.; BUCKWALTER, M.F.; JONES, E.A.; VETTER, J.D.C.; YAO, N.L.; WENGENACK, J.E.; ROSENBLATT, F.R.; COCKERILL, T. F. Real-Time PCR in Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing. **Clinical Microbiology Reviews.** n.19, p.165-256, 2006. <https://doi.org/10.1128/CMR.19.1.165-256.2006>.

FAHRIG L.; ARROYO, V. R.; JOSEPH, R.B.; VÉRONIQUE, B.L.; *et al.* Is Habitat Fragmentation Bad for Biodiversity? **Biological Conservation**, v.230, 2019.

FAN, Y.; ZHAO, K.; SHI, Z.L.; ZHOU, P. Bat Coronaviruses in China. **Viruses**. n. 11, v. 3, p. 210, 2019. <https://doi.org/10.3390/v11030210>.

FENTON, M.B.; SIMMONS, N.B. **BATS: A World of Science and Mystery**. Ed. University of Chicago Press, Chicago, p.p. 303, 2015.

FICHOROVA, R.N.; LEE, Y.; YAMAMOTO, H.S.; TAKAGI, Y.; HAYES, G.R.; GOODMAN, R.P.; CHEPA-LOTREA, X.; BUCK, O.R.; MURRAY, R.; KULA, T. Endobiont viruses sensed by the human host—beyond conventional antiparasitic therapy. **PLoS ONE** n. 7, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048418>.

FIGUEIREDO, L.T.M. Emergent arboviruses in Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** n. 40: p. 224–229, 2007. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822007000200016>.

FILHO F. L.C; BARATA R.R.; CARDOSO, J.F.; MASSAFRA, J.M.V.; LEMOS, P.D.S.; CASSEB, L.M.N.; CRUZ, A.C.R.; NUNES, M.R.T. Complete Endogenous Retrovirus Genome Sequence from a Brazilian Vampire Bat (*Desmodus rotundus*). **Microbiol. Resour. Announc.** n.8, 2019. <https://doi.org/10.1128/MRA.01497-18>.

FINNEN, R.L.; ERICKSON, K.D.; CHEN, X.S.; GARCEA, R.L. Interactions between papillomavirus L1 and L2 capsid proteins. **J. Virol.** n.77, p.10-26. 2003, <https://doi.org/10.1128/JVI.77.8.4818-4826.2003>.

FINOKETTI, F.; DOS SANTOS, R.N.; CAMPOS, A.A.S. *et al.* Detection of adenovirus, papillomavirus and parvovirus in Brazilian bats of the species *Artibeus lituratus* and *Sturnira lilium*. **Arch. Virol.** n.164, p1015–1025, 2019. <https://doi.org/10.1007/s00705-018-04129-1>.

FIRTH, C.; CHARLESTON, M.A.; DUFFY, S.; SHAPIRO, B.; HOLMES, E.C. Insights into the evolutionary history of an emerging livestock pathogen: porcine circovirus 2. **J. Virol.** n. 83, p. 12813–12821, 2009. <https://doi.org/10.1128/JVI.01719-09>.

FLETCHER, R. J., JR.; DIDHAM, R. K.; BANKS-LEITE, C.; BARLOW, J.; EWERS, R. M.; ROSINDELL, J.; HOLT, R. D; GONZALEZ, A.; *et al.* Is Habitat Fragmentation Good for Biodiversity? **Biol.Conserv.** v.226, 2018.

GAISLER, J.; ZUKAL, J.; REHAK, Z.; HOMOLKA, M. Habitat preference and flight activity of bats in a city. **J. Zool. (Lond)**. n.244, p. 439–445, 1998.

GARBINO, G.S.T.; GREGORIN, R.; LIMA, I.P. Lista atualizada de morcegos brasileiros: versão 2020. Comitê da Lista de Morcegos do Brasil. **CLMB. Sociedade Brasileira para o**

Estudo de Quirópteros (SBEQ). 2020. Disponível em: <https://www.sbeq.net>. Acesso: 12/05/2021.

GARCÍA-PÉREZ, R.; IBÁÑEZ, C.; GODÍNEZ, J.M.; ARÉCHIGA, N.; GARIN, I.; *et al.* Novel papillomaviruses in free-ranging Iberian bats: no virus-host co-evolution, no strict host specificity, and hints for recombination. **Genome Biol. Evol.** n.6, p.94-104, 2014. <https://doi.org/10.1093/gbe/evt211>.

GE, X.; LI, J.; PENG, C.; WU, L.; YANG, X.; WU, Y.; ZHANG, Y.; SHI, Z. Genetic diversity of novel circular ssDNA viruses in bats in China. **J. Gen. Virol.** n. 92, p. 2646-2653, 2011. <https://doi.org/10.1099/vir.0.034108-0>.

GE, X.; LI, Y.; YANG, X.; ZHANG, H.; ZHOU, P.; ZHANG, Y.; SHI, Z. Metagenomic analysis of viruses from bat fecal samples reveals many novel viruses in insectivorous bats in China. **Journal of virology.** n.86, v.8, p.4620–4630, 2012. <https://doi.org/10.1128/JVI.06671-11>.

GE, X.Y.; LI, J.L.; YANG, X.L. Isolation and characterization of a bat SARS-like coronavirus that uses the ACE2 receptor. **Nature.** n.503, p.535–538, 2013. <https://doi.org/10.1038/nature12711>.

GHABRIAL, S.A. TOTIVIRUSES. IN: MAHY BWJ, VAN REGENMORTELMHV (eds) **Encyclopedia of Virology.** vol 5, 3rd edn. Elsevier, San Diego, 2008. p.p 163–174. <https://doi.org/10.1016/B978-012374410-4.00518-5>.

GIFFORD, R.J.; KATZOURAKIS, A.; TRISTEM, M.; PYBUS, O.G.; WINTERS, M.; SHAFER, R.W. A transitional endogenous lentivirus from the genome of a basal primate and implications for lentivirus evolution. **Proc. Natl. Acad Sci USA.** n.105, p.20362-7, 2008. <https://doi.org/10.1073/pnas.0807873105>.

GOODMAN, R.P.; GHABRIAL, S.A.; FICHOROVA, R.N.; NIBERT, M.L. Trichomonasvirus: a new genus of protozoan viruses in the family Totiviridae. **Arch. Virol.** n. 156, p. 171–179, 2011. <https://doi.org/10.1007/s00705-010-0832-838>.

GÓES, L.G.B.; CAMPOS, A.C.A.; CARVALHO, C.; AMBAR, G., QUEIROZ, L.H., CRUZ-NETO, A.P.; MUNIR, M.; DURIGON, E.L. Genetic diversity of bats coronaviruses in the Atlantic Forest hotspot biome, Brazil. **Infect. Genet. Evol.** n.44, p.510-513, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.07.034>.

GOLDSMITH, C.S.; MILLER, S.E. Modern Uses of Electron Microscopy for Detection of Viruses. **Clin. Microbiol. Rev.** n.22, v.4 p.552–563, 2009. <https://doi.org/10.1128/CMR.00027-09>.

GOMEZ-ARREAZA A, HAENNI A-L, DUNIA I, AVILAN L. Viruses of parasites as actors in the parasite-host relationship: A “ménage à trois”. **Acta tropica**. n. 166, p. 126–132, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.11.028>.

GRAU-ROMA, L.; FRAILE, L.; SEGALÉS, J. Recent advances in the epidemiology, diagnosis and control of diseases caused by porcine circovirus type 2. **Vet. J.** n. 187, p. 23–32, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.01.01>.

GREGER, M. The human/animal interface: emergence and resurgence of zoonotic infectious diseases. **Crit. Rev. Microbiol.** n.33, v.4, p.243-299, 2007. <https://doi.org/10.1080/10408410701647594>.

GREGORY A. Storch, **Diagnostic Virology, Clinical Infectious Diseases**. v.31, p. 739–75, 2000.

GRYBCHUK, D.; AKOPYANTS, N.S.; KOSTYGOV, A.Y.; KONOVALOVAS, A.; LYE, L.F.; DOBSON, D.E.; ZANGGER, H.; FASEL, N.; BUTENKO, A.; FROLOV, A.O. Viral discovery and diversity in trypanosomatid protozoa with a focus on relatives of the human parasite *Leishmania*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. n. 115, p. 506-515, 2018. <https://doi.org/10.1073/pnas.1717806115>.

HAN, H. J.; WEN, H. L.; ZHOU, C. M.; CHEN, F. F.; LUO, L. M.; LIU, J. W.; YU, X. J. Bats as reservoirs of severe emerging infectious diseases. **Virus research**. n. 205, p. 1–6, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2015.05.006>.

HAN, H.J.; WEN, H.L.; ZHAO, L.; LIU, J.W.; LUO, L.M.; ZHOU, C.M.; QIN, X.R.; ZHU, Y.L.; LIU, M.M.; QI, R.; LI, W.Q.; YU, H.; YU, X.J. Novel coronaviruses, astroviruses, adenoviruses and circoviruses in insectivorous bats from northern China. **Zoonoses Public Health**. n. 64, p. 636-646, 2017. <https://doi.org/10.1111/zph.12358>.

HAHN, M.A.; ROSARIO, K.; LUCAS, P.; DHEILLY, N.M. Characterization of viruses in a tapeworm: phylogenetic position, vertical transmission, and transmission to the parasitized host. **ISME J.** n. 14, v. 7, p. 1755-1767, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41396-020-0642-2>.

HARDMEIER, I.; AEGERHARD, N.; QI, W.; SCHOENBAECHLER, K.; KRAETTLI, H. *et al.* Metagenomic analysis of fecal and tissue samples from 18 endemic bat species in

Switzerland revealed a diverse virus composition including potentially zoonotic viruses. **PLOS ONE**. n. 16, v. 6, 2021. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0252534>.

HAYWARD, A.; CORNWALLIS, C.K.; JERN, P. Pan-vertebrate comparative genomics unmasks retrovirus macroevolution. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**. n. 13, v.112, p.464-9, 2015. <https://doi.org/10.1073/pnas.1414980112>.

HAYWARD, J. A.; E TACHEDJIAN, G. Retroviruses of Bats: a Threat Waiting in the Wings? **Sociedade Americana de Microbiologia mBio**. n. 26, v. 5, p. 19-41, 2021. <https://doi.org/10.1128/mBio.01941-21>.

HAYDON, D.T.; CLEAVELAND, S.; TAYLOR, L.H.; LAURENSEN, M.K. Identifying reservoirs of infection: a conceptual and practical challenge. **Emerg. Infect. Dis.** n.8, v.12, p1468-1473, 2002. <https://doi.org/10.3201/eid0812.010317>.

HAYWARD, J.A.; TACHEDJIAN, M.; KOHL, C.; JOHNSON, A.; DEARNLEY, M.; JESAVELUK, B.; LANGER, C.; SOLYMOSI, P.D.; HILLE, G.; NITSCHKE, A.; SÁNCHEZ, C.A.; WERNER, A.; KONTOS, D.; CRAMERI, G.; MARSH, G.A.; BAKER, M.L.; et al. Infectious KoRV-related retroviruses circulating in Australian bats. **Proc. Natl. Acad. Sci. US A**. n. 117, v. 17, p. 9529-9536, 2020. <https://doi.org/10.1073/pnas.1915400117>.

HE, B.; LI, Z.; YANG, F.; ZHENG, J.; FENG, Y.; GUO, H.; Li, Y.; *et al.* ‘Virome Profiling of Bats from Myanmar by Metagenomic Analysis of Tissue Samples Reveals More Novel Mammalian Viruses’, **PLoS ONE**. n.8, v.4, p. e61950, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061950>.

HODINKA, R.L.; KAISER, L. Is the Era of Viral Culture over in the Clinical Microbiology Laboratory? **Journal of Clinical Microbiology**, 51, 2-8, 2013. <https://doi.org/10.1128/JCM.02593-12>.

HORIE, M.; HONDA, T.; SUZUKI, Y.; KOBAYASHI, Y.; DAITO, T. *et al.* Endogenous non-retroviral RNA virus elements in mammalian genomes. **Nature**. n. 463, p. 84–87, 2010. <https://doi.org/10.1038/nature08695>.

HORIE, M.; KOBAYASHI, Y.; HONDA, T.; FUJINO, K.; AKASAKA, T.; KOHL, C.; WIBBELT, G.; MUHLDOERFER, K.; KURTH, A.; MULLER, M.A.; et al. An RNA-dependent RNA polymerase gene in bat genomes derived from an ancient negative-strand RNA virus. **Sci. Rep.** n. 6, 2016. <https://doi.org/10.1038/srep25873>.

- HUDSON, P.; PERKINS, S.; CATTADORI, I. Infectious Disease Ecology: Effects of Ecosystems on Disease and of Disease on Ecosystems. **ed. STOR**. p347–367, 2008.
- HU, B.; GE, X.; WANG, L.F.; SHI, Z. Bat origin of human coronaviruses. **Viol. J.** n.12. v.221, 2015. <https://doi.org/10.1186/s12985-015-0422-1>.
- HU, D.; ZHU, C.; WANG, Y.; AI, L.; YANG, L.; YE, F.; DING, C.; CHEN, J.; HE, B.; ZHU, J.; QIAN, H.; XU, W.; FENG, Y.; TAN, W.; WANG, C. Virome analysis for identification of novel mammalian viruses in bats from Southeast China. **Sci. Rep.** n. 7, v. 1, p. 109-17, 2017. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11384-w>.
- HUGHES, J.F.; COFFIN, J.M. Evidence for genomic rearrangements mediated by human endogenous retroviruses during primate evolution. **Nat. Genet.** n.29, v.4, p.487-489, 2001. doi: <https://doi.org/10.1038/ng775>.
- HRAZDILOVA K., E. SLANINKOVA, K. BROZOVA, D. MODRY, R. VODICKA, V. CELER New species of Torque Teno miniviruses infecting gorillas and chimpanzés. **Virology**, 487 (2016), pp. 207-214. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.10.016>.
- IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Disponível em: ibge.gov.br/cidades-e-estados/pa/santarem.html. Acesso em 25Fev.2023.
- JAIN, M.; KOREN, S.; MIGA, K.; *et al.* Nanopore sequencing and assembly of a human genome with ultra-long reads. **Nat. Biotechnol.** n.36, p.338–345, 2018. <https://doi.org/10.1038/nbt.4060>.
- JÁNOSKA, M.; VIDOVSZKY, M.; MOLNÁR, V.; LIPTOVSKY, M.; HARRACH, B.; BENKO, M. Novel adenoviruses and herpesviruses detected in bats. **Vet. J.** n. 189, v.1, p. 118-21, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.06.020>.
- JERN, P.; COFFIN, J.M. Effects of retroviruses on host genome function. **Annu. Rev. Genet.** n.42: p.709-732, 2008. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.42.110807.091501>.
- JOFFRIN, L.; DIETRICH, M.; MAVINGUI, P.; LEBARBENCHON, C. Bat pathogens hit the road: But which one? **PLoS Pathog.** n.14, v.8, 2018. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007134>.
- JONES, K.E.; PATEL, N.G.; LEVY, M.A; STOREYGARD, A.; BALK, D.; GITTLEMAN, J.L.; DASZAK, P. Global trends in emerging infectious diseases. **Nature**. n. 451, v. 7181, p.990-993. 2008. <https://doi.org/10.1038/nature06536>.

JONES, M.S.; HARRACH, B.; GANAC, R.D.; GOZUM, M.M.; DELA CRUZ, W.P.; RIEDEL, B.; PAN, C.; DELWART, E.L.; SCHNURR, D.P. New adenovirus species found in a patient presenting with gastroenteritis. **J. Virol.** n. 81, v. 11, p. 5978-84, 2007. <https://doi.org/10.1128/JVI.02650-06>.

KACZOROWSKA, J.; VAN DER HOEK, L. Human anelloviruses: diverse, omnipresent and commensal members of the virome. **F.E.M.S Microbiol. Rev.** n. 44, p. 305–13, 2020. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuaa007>.

KADING, R.C; KITYO, R.M; MOSSEL, E.C; BORLAND, E.M; NAKAYIKI, T.; NALIKKA, B.; NYAKARAHUKA, L.; LEDERMANN, J.P; PANELLA, N.A; GILBERT, A.T. Neutralizing anticorpos contra flavivírus, vírus Babanki e vírus da febre do Vale do Rift em morcegos de Uganda. **Infectar. Ecol. Epidemiol.** n.8, v.1, 2018. <https://doi.org/10.1080/20008686.2018.1439215>.

KEMENESI, G.; ZHANG, D.; MARTON, S.; DALLOS, B.; GÖRFÖL, T.; *et al.* Genetic characterization of a novel picornavirus detected in *Miniopterus schreibersii* bats. **J. Gen. Virol.** n.96, p.815-821, 2015. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000028>.

KING, A.M.; LEFKOWITZ, E.; ADAMS, M.J.; CARSTENS, E.B. Virus taxonomy: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. **Ed. Elsevier.** P. 1344, 2011.

KING, A.M.Q.; LEFKOWITZ, E.J.; MUSHEGIAN, A.R.; ADAMS, M.J.; DUTILH, B.E.; GORBALENYA, A.E.; HARRACH, B.; HARRISON, R.L.; JUNGLEN, S.; KNOWLES, N.J.; KROPINSKI, A.M.; *et al.* Changes to taxonomy and the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2018). **Arch. Virol.** n. 163, v. 9, p. 2601-2631, 2018. <https://doi.org/10.1007/s00705-018-3847-1>.

KIVISTÖ, I.; TIDENBERG, E.M.; LILLEY, T.; SUOMINEN, K.; FORBES, K.M.; VAPALAHTI, O.; HUOVILAINEN, A.; SIRONEN, T. First Report of Coronaviruses in Northern European Bats. **Vector Borne Zoonotic Dis.** n. 20, v. 2, p. 155-158, 2020. <https://doi.org/10.1089/vbz.2018.2367>.

KOHL, C.; KURTH, A. European bats as carriers of viruses with zoonotic potential. **Viruses.** n.13, p.3110-28, 2014. <https://doi.org/10.3390/v6083110>.

KOHL, C.; LESNIK, R.; BRINKMANN, A.; EBINGER, A.; RADONIĆ, A.; NITSCHKE, A.; MÜHLDORFER, K.; WIBBELT, G.; KURTH, A. Isolation and characterization of three

mammalian orthoreoviruses from European bats. **PLoS One**. n. 7, v. 8, p. 43106, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043106>.

KOHL, C.; LESNIK, R.; BRINKMANN, A.; EBINGER, A.; RADONIĆ, A.; NITSCHKE, A.; MÜHLDORFER, K.; WIBBELT, G.; KURTH, A. The virome of German bats: comparing virus discovery approaches. **Sci. Rep.** n. 11, p. 7430, 2021. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-86435-4>.

KORN, K.; CORAS, R.; BOBINGER, T.; HERZOG, S.M.; LUCKING, H.; STOHR, R.; HUTTNER, H.B.; HARTMANN, A.; ENSSER, A. Fatal encephalitis associated with Borna disease virus 1. **N. Engl. J. Med.** n. 379, p. 1375–7, 2018. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1800724>.

KRUPOVIC, M.; GHABRIAL, S.A.; JIANG, D.; VARSANI, A. Genomoviridae: a new family of widespread single-stranded DNA viruses. **Arch. Virol.** n. 161, v. 9, p. 2633-43, 2016. <https://doi.org/10.1007/s00705-016-2943-3>.

KRUSE, H.; KIRKEMO, A.M.; HANDELAND, K. Wildlife as source of zoonotic infections. **Emerg. Infect. Dis.** n.10, p.2067–2072, 2004. <https://doi.org/10.3201/eid1012.040707>.

KUIKEN, T.; LEIGHTON, F. A.; FOUCHIER, R. A.; LEDUC, J. W.; PEIRIS J. S.; SCHUDEL, D. Pathogen surveillance in animals. **Science**. n. 309. p. 1680 – 1681, 2005. <https://doi.org/10.1126/science.1113310>.

KUMAR, A.; MURTHY, S.; KAPOOR, A. Evolution of selective-sequencing approaches for virus discovery and virome analysis. **Virus Res.** n.239, p.172–179, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.06.005>.

KUNO, G.; MACKENZIE, J.S.; JUNGLEN, S.; HUBÁLEK, Z.; PLYUSNIN, A.; GUBLER, D.J. Vertebrate reservoirs of arboviruses: Myth, synonym of amplifier, or reality? **Viruses**. n.13, v.9, 2017. <https://doi.org/10.3390/v9070185>.

KUZMIN, I.V.; MAYER, A.E.; NIEZGODA, M.; MARKOTTER, W.; AGWANDA, B.; BREIMAN, R.F.; RUPPRECHT, C.E. Shimon bat virus, a new representative of the Lyssavirus genus. **Virus Res.** n.149, v.2, p. 197-210, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2010.01.018>.

LACROIX, A.; DUONG, V.; HUL, V.; SAN, S.; DAVUN, H.; OMALISS, K.; CHEA, S.; HASSANIN, A.; THEPPANGNA, W.; SILITHAMMAVONG, S.; *et al* Bat astrovirus diversity

in Laos PDR and Cambodia. **Infect. Genet. Evol.** n. 47 p. 41-50, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.11.013>.

LARKIN, M.A.; BLACKSHIELDS, G.N.P.; BROWN, R.; CHENNA, P.A.; MCGETTIGAN, H.; MCWILLIAM, F.; *et al.* Clustal W and Clustal X version 2.0, **Bioinformatics**. n.21, v. 23, 2007, p. 2947–2948, 2007. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm404>.

LAU, S.K.; POON, R.W.; WONG, B.H.; WANG, M.; HUANG, Y.; XU, H.; *et al.* Coexistence of different genotypes in the same bat and serological characterization of Rousettus bat coronavirus HKU9 belonging to a novel Betacoronavirus subgroup. **J. Virol.** n.84, p.385-94, 2010. <https://doi.org/10.1128/JVI.01121-10>.

LAU, S.K.; WOO, P.C.; LAI, K.K.; HUANG, Y.; *et al.* Complete genome analysis of three novel picornaviruses from diverse bat species. **J. Virol.** n.85, v.17, p.8819-28, 2011. <https://doi.org/10.1128/JVI.02364-10>.

LAVER, T.J.; HARRISON, P.A.; O'NEILL, K.; MOORE, A.; FARBOS, K.; PASZKIEWICZ, D.J. Studholme, Assessing the performance of the Oxford Nanopore Technologies MinION, **Biomolecular Detection and Quantification**. v.3, p. 1-8, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2015.02.001>.

LEFTEROVA, M.I.C.J.; SUAREZ, N.; BANAEI, B.A.P. “Next-generation sequencing for infectious disease diagnosis and management,” **The Journal of Molecular Diagnostics**. n.6, v 17, p. 623–634, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2015.07.004>.

LENAERTS, L.C.; NAESENS, L. Clinical features and treatment of adenovirus infections. **Rev. Med. Virol.** n. 18, v. 6, p. 357-74, 2008. <https://doi.org/10.1002/rmv.589>.

LEROY, E.M.; KUMULUNGUI, B.; POURRUT, X .; ROUQUET, P.; HASSANIN, A.; YABA, P.; DÉLICAT, A.; PAWESKA, J.T.; GONZALEZ, J.P.; SWANEPOEL, R. Fruit bats as reservoirs of Ebola virus. **Nature**. n. 438, p. 575-576, 2005. <https://doi.org/10.1038/438575a>.

LEWIS, P.F.; SCHMIDT, M.A.; LU, X.; ERDMAN, D.D.; CAMPBELL, M.; THOMAS, A.; CIESLAK, P.R.; GRENZ, L.; TSAKNARDIS, L.; GLEAVES, C.; KENDALL, B.; GILBERT, D. A communitybased outbreak of severe respiratory illness caused by human adenovirus serotype 14. **J. Infect. Dis.** n. 199, v. 10, p. 1427-34, 2009. <https://doi.org/10.1086/598521>.

LI, L.; VICTORIA, J.G.; WANG, C.; JONES, M.; FELLERS, G.M.; KUNZ, T.H.; DELWART, E. Bat guano virome: Predominance of dietary viruses from insects and plants

plus novel mammalian viruses. **J. Virol.** n.84, p.6955–6965, 2010. <https://doi.org/10.1128/JVI.00501-10>.

LI, Y.; GORDON, E.; IDLE, A.; ALTAN, E.; SEGUIN, M.A.; ESTRADA, M.; DENG, X.; DELWART, E. Virome of a Feline Outbreak of Diarrhea and Vomiting Includes Bocaviruses and a Novel Chapparvovirus. **Viruses.** n. 12, v. 5, p. 506. 2020. <https://doi.org/10.3390/v12050506>.

LIMA, F.E.; CAMPOS, F.S.; KUNERT FILHO, H.C.; BATISTA, H.B.; CARNIELLI, P. J.R.; CIBULSKI, S.P.; SPILKI, F.R.; ROEHE, P.M.; FRANCO, A.C. Detection of Alphacoronavirus in velvety free-tailed bats (*Molossus molossus*) and Brazilian free-tailed bats (*Tadarida brasiliensis*) from urban area of Southern Brazil. **Virus Genes.** n.47, v. 1, p.164-7, 2013. <https://doi.org/10.1007/s11262-013-0899-x>.

LIMA, F.E.; CIBULSKI, S.P.; DALL, B.A.G.; MAYER, F.Q.; WITT, A.A.; ROEHE, P.M.; D'AZEVEDO, P.A. A Novel Chiropteran Circovirus Genome Recovered from a Brazilian Insectivorous Bat Species. **Genome Announc.** n.3, v.6, 2015. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01393-15>.

LINDAHL, J.F.; GRACE, D. The consequences of human actions on risks for infectious diseases: A review. **Infect. Ecol. Epidemiol.** n.5, 2015. <https://doi.org/10.3402/iee.v5.30048>.

LIV, B.; YUJIE, G.; PENG, X. Molecular epidemiology of human Borna disease virus 1 infection revisited. **Emerging Microbes e Infections.** n. 11, v.1, p. 1335-1338, 2022. <https://doi.org/10.1080/22221751.2022.2065931>.

LUBY S, RAHMAN M, HOSSAIN M, BLUM L, HUSAIN M, GURLEY E, *et al.* Foodborne transmission of Nipah virus, Bangladesh. **Emerg Infect Dis.** n.12, p1888–1894, 2006. <https://doi.org/10.3201/eid1212.060732>.

LUIS, A.D.; HAYMAN, D.T.; O'SHEA, T.J.; CRYAN, P.M.; GILBERT, A.T.; PULLIAM, J.R.; MILLS, J.N.; TIMONIN, M.E.; WILLIS, C.K.; CUNNINGHAM, A.A.; FOOKS, A.R.; RUPPRECHT, C.E.; WOOD, J.L.; WEBB, C.T. A comparison of bats and rodents as reservoirs of zoonotic viruses: are bats special? **Proc. Biol. Sci.** n.280: p.1-9, 2013. <https://doi.org/10.1098/rspb.2012.2753>.

MANCUSO, R.; SARESELLA, M.; HERNIS, A.; AGOSTINI, S.; PIANCONE, F.; CAPUTO, D.; MAGGI, F.; CLERICI, M. Torque teno virus (TTV) in multiple sclerosis patients with

different patterns of disease. **J Med Virol.** n. 85, v. 12, p. 2176-83, 2013. <https://doi.org/10.1002/jmv.23707>.

MARKOTTER, W.J.; COERTSE, L.D.; VRIES, M.; GELDENHUYS, M.; MORTLOCK, M. "Bat-borne viruses in Africa: a critical review". **J. Zool.** n.2, v. 311, p.77-98, 2020. <https://doi.org/10.1111/jzo.12769>.

MARSH, G.A.; WANG, L.F. *Hendra and Nipah* viruses: why are they so deadly? **Curr Opin Virol.** n.2, v.3, p.242-247, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2012.03.006>.

MARTINEZ-HERNANDEZ, F.; FORNAS, O.; GOMEZ, M. L.; BOLDUC, B.; DE LA CRUZ PEÑA, M.J.; MARTÍNEZ, J.M.; *et al.* Single-virus genomics reveals hidden cosmopolitan and abundant viruses. **Nat. Commun.** n.8, 2017. <https://doi.org/10.1038/ncomms15892>.

MASOURIDI-LEVRAT, S.; PRADIER, A.; SIMONETTA, F.; *et al.* Torque teno virus in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for hematological malignancies. **Bone Marrow Transplant.** n. 51, p. 440–442, 2016. <https://doi.org/10.1038/bmt.2015.262>.

MCGINNIS, S.; THOMAS, L.M. "BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools." **Nucleic acids research.** v. 32, p.20-25, 2004. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh435>.

MEGALI, A.; YANNIC, G.; ZAHNO, M.L.; BRÜGGER, D.; BERTONI, G.; CHRISTE, P.; ZANONI, R. Surveillance for European bat lyssavirus in Swiss bats. **Arch Virol.** n. 155, v. 10, p. 1655-62, 2010. <https://doi.org/10.1007/s00705-010-0750-9>.

MEMISH, Z. A., MISHRA, N., OLIVAL, K. J., FAGBO, S. F., KAPOOR, V., EPSTEIN, J. H., ALHAKEEM, R., DUROSINLOUN, A., AL ASMARI, M., ISLAM, A., KAPOOR, A., BRIESE, T., DASZAK, P., AL RABEEAH, A. A., e LIPKIN, W. I. (2013). Middle East respiratory syndrome coronavirus in bats, Saudi Arabia. **Emerging infectious diseases.** n. 19, v.11, p. 1819–1823, 2013. <https://doi.org/10.3201/eid2006.140402>.

METCHNIKOFF, E.; WEINBERG, M.; POZERSKI, E.; DISTASO, A.; BERTHELOT, A. **Rousettes et microbes.** Ann. ed. Inst. Pasteur (Paris) 23, 61, 1909.

MILLER, R.R.; MONTOYA, V.; GARDY, J.L.; PATRICK, D.M.; TANG, P. Metagenômica para detecção de patógenos em Saúde Pública. **Genome Med.** n.5, v.81, 2013. <https://doi.org/10.1186/gm485>.

- MOENS, U.; CALVIGNAC-SPENCER, S.; LAUBER, C.; RAMQVIST, T.; FELTKAMP, M.C.W.; *et al.* ICTV Virus Taxonomy Profile: Polyomaviridae. **J Gen Virol.** n. 98, p. 1159–1160, 2017. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000839>.
- MOLNÁR, V.; JÁNOSKA, M.; HARRACH, B.; GLÁVITS, R.; PÁLMAI, N.; RIGÓ, D.; SÓS, E.; LIPTOVSKY, M. Detection of a novel bat gammaherpesvirus in Hungary. **Acta Vet. Hung.** n. 56, v. 4, p. 529-38, 2008. <https://doi.org/10.1556/AVet.56.2008.4.10>.
- MORATELLI, Ricardo; CALISHER, Charles H. Bats and zoonotic viruses: can we confidently link bats with emerging deadly viruses? **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v. 110, n. 1, p. 1-22, 2015. <https://doi.org/10.1590/0074-02760150048>.
- MORTLOCK, M.; KUZMIN, I.V.; WEYER, J.; GILBERT, A.T.; AGWANDA, B.; RUPPRECHT, C.E.; NEL, L.H.; KEARNEY, T.; MALEKANI, J.M.; MARKOTTER, W. Novel Paramyxoviruses in Bats from Sub-Saharan Africa, 2007-2012. **Emerg Infect Dis.** n. 21, v.10, p1840-3, 2015. <https://doi.org/10.3201/eid2110.140368>.
- MUKAI, Y.; HORIE, M.; TOMONAGA, K. Systematic estimation of insertion dates of endogenous bornavirus-like elements in vesper bats. **J. Vet. Med. Sci.** n. 80, v. 8, p. 1356-63, 2018. <https://doi.org/10.1292/jvms.18-0211>.
- MULLIS, K.B.; FALOONA, F.A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods Enzymol.** n.155, p.335-350, 1987. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)55023-6](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)55023-6).
- MUNSHI-SOUTH, J.; WILKINSON, G.S. Bats and birds: exceptional longevity despite high metabolic rates. **Ageing Res. Rev.** n.9, p. 12–19, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2009.07.006>.
- NAEEM S. Ecology: Gini in the bottle. **Nature** n.458, p.579–580, 2009. <https://doi.org/10.1038/458579>.
- NAGAMINE K., T. HASE, AND T. NOTOMI. “Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers”. **Molecular and Cellular Probes.**, n.3, v. 16, p. 223–229, 2002.
- NEWBOLD, T.; HUDSON, L.N.; HILL, S.L.; CONTU, S.; LYSENKO, I.; SENIOR, R.A.; BÖRGER, L; *et al.* Global Effects of Land Use on Local Terrestrial Biodiversity. **Nature.** v.520, 2015. <https://doi.org/10.1038/nature14324>.

- NG, T.F.; WHEELER, E; GREIG, E; WALTZEK, T.B.; GULLAND, F.; BREITBART, M. Metagenomic identification of a novel anellovirus in Pacific harbor seal (*Phoca vitulina richardsii*) lung samples and its detection in samples from multiple years. **J. General. Virol.** n. 92, p. 1318-1323, 2011. <https://doi.org/10.1099/vir.0.029678-0>
- NISHIYAMA, S.; DUTIA, B.M.; STEWART, J.P.; MEREDITH, A.L.; SHAW, D.J.; SIMMONDS, P.; SHARP, C.P. Identification of novel anelloviruses with broad diversity in UK rodents. **J. Gen. Virol.** n. 95, p. 1544–53, 2014. <https://doi.org/10.1099/vir.0.065219-0>
- NOTOMI, T. H.O.; HARUMI, M.; TOSHIHIRO, Y.; KEIKO, W.; NOBUYUKI, A.; TETSU, H. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. **Nucleic Acids Research**, v.28, p.63, 2000. <https://doi.org/10.1093/nar/28.12.e63>.
- NTZIORA, F.; PARASKEVIS, D.; HAIDA, C.; MANESIS, E. E.; *et. al.* A. Ultrasensitive amplification refractory mutation system real-time PCR (ARMS RT-PCR) assay for detection of minority hepatitis B virus-resistant strains in the era of personalized medicine. **J. Clin. Microbiol.** n.51, v9, 2013. <https://doi.org/10.1128/JCM.00936-13>.
- NTUMVI, N.F.; DIFFO, J.L.D.; TAMOUFE, U.; NDZE, V.N.; TAKUO, J.M.; MOUICHE, M.M.M.; NWOBEGAHAY, J.; LEBRETON, M.; GILLIS, A.; RIMOIN, A.W.; SCHNEIDER, B.S.; MONAGIN, C.; MCIVER, D.J.; JOLY, D.O.; WOLFE, N.D.; RUBIN, E.M.; LANGE, C.E. Evaluation of bat adenoviruses suggests co-evolution and host roosting behaviour as drivers for diversity. **Microb. Genom.** n. 7, v. 4, p. 000561, 2021. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000561>.
- OGAWA, H.; KAJIHARA, M.; NAO, N.; SHIGENO, A.; FUJIKURA, D.; HANG'OMBE, B.M.; MWEENE, A.S.; MUTEMWA, A.; SQUARRE, D.; YAMADA, M.; HIGASHI, H.; SAWA, H.; TAKADA, A. Characterization of a novel bat adenovirus isolated from straw-colored fruit bat (*Eidolon helvum*). **Viruses.** n.9, v. 12, p. 1–16, 2017. <https://doi.org/10.3390/v9120371>.
- OKAMOTO, H. TT Viruses in Animals. In: de Villiers, EM., Hausen, H.z. (eds) **TT Viruses. Current Topics in Microbiology and Immunology.** V. 331. Springer, Berlin, Heidelberg, 2009. https://doi.org/10.1007/978-3-540-70972-5_3
- OLIVAL KJ, HAYMAN DT. Filoviruses in bats: current knowledge and future directions. **Viruses.** n. 6, v. 4, p. 1759-88, 2014. <https://doi.org/10.3390/v6041759>.

OLSEN, B.; MUNSTER, V.J.; WALLENSTEN, A.; WALDENSTRÖM, J.; OSTERHAUS, A.D.; FOUCHIER, R.A. Global patterns of influenza A virus in wild birds. **Science**. n.21, v. 312(5772). p. 384-388. 2006. <https://doi.org/10.1126/science.1122438>.

O'SHEA, T. J.; CRYAN, P. M.; CUNNINGHAM, A. A.; FOOKS, A. R.; HAYMAN, D. T. S.; LUÍS, A. D.; PEEL, A. J.; PLOWRIGHT, R. K.; WOOD, J. L. N. Bat flight and zoonotic viruses. **Emerging Infectious Diseases**, n. 5, v. 20, 2014. <https://doi.org/10.3201/eid2005.130539>.

PAPAFRAGKOU, E.; HEWITT, J.; PARK, G.W.; GREENING, G.; VINJÉ, J. Challenges of Culturing Human Norovirus in Three-Dimensional Organoid Intestinal Cell Culture Models. **PLoS ONE**. n.8, v.6, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063485>.

PATZ, J.A.; DASZAK, P.; TABOR, G.M.; AGUIRRE, A.A.; PEARL M.; EPSTEIN, J.; WOLFE, N.D.; KILPATRICK, A.M.; FOUFOPOULOS, J.; MOLYNEUX, D.; BRADLEY, D.J. Unhealthy landscapes: Policy recommendations on land use change and infectious disease emergence. **Environ Health Perspect**. n.112, v.10, p.1092-1098, 2004 <https://doi.org/10.1289/ehp.6877>.

PEREIRA, H.G.; FIALHO, A.M.; FLEWETT, T.H.; TEIXEIRA, J.M.; ANDRADE, Z.P. Novel viruses in human faeces. **Lancet**. n. 2, p. 103–104, 1988. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(88\)90032-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(88)90032-3).

PEREIRA, H.G.; FLEWETT, T.H.; CANDEIAS, J.A.; BARTH, O.M. A virus with a bisegmented double-stranded RNA genome in rat (*Oryzomys nigripes*) intestines. Pt 11J. **Gen. Virol**. n. 69 p. 2749–2754, 1988. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-69-11-2749>.

PÉNZES, J.J.; SÖDERLUND-VENERMO, M.; CANUTI, M.; EIS-HÜBINGER, A.M.; HUGHES, J.; COTMORE, S.F.; HARRACH, B. Reorganizing the family Parvoviridae: a revised taxonomy independent of the canonical approach based on host association. **Arch. Virol**. n. 165, v. 9, p. 2133-2146, 2020. <https://doi.org/10.1007/s00705-020-04632-4>.

PIRES, E. R. B.; CESÁRIO, K. P. M.; CEREJA, S. S. dos A.; ALVES, A. H. R. Análise Espaço-temporal da Expansão Urbana de Santarém – Pará. In: **Anais do COBRAC 2018** – Florianópolis: UFSC, 2018.

PLOWRIGHT, R.K.; COLIN, R.; PARRISH, H.M.; PETER, J.H.; ALBERT, I.K.; ANDREA, L.G.; JAMES, O. L. Pathways to Zoonotic Spillover. **Nature Reviews Microbiology**, v.15, 2017. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.45>.

PRENDERGAST, B.J.; FREEMAN, D.A.; ZUCKER, I.; NELSON, R.J. Periodic arousal from hibernation is necessary for initiation of Immune responses in ground squirrels. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.** n. 282, p.1054–R1062 2002. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00562.2001>.

QUAN, P.L.; FIRTH, C.; CONTE, J.M.; WILLIAMS, S.H.; ZAMBRANA-TORRELIO, C.M.; *et al.* Bats are a major natural reservoir for hepaciviruses and pegiviruses. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.** n.110, v.20, p.8194-9, 2013. <https://doi.org/10.1073/pnas.1303037110>.

QUICK, J.; GRUBAUGH, N.D.; PULLAN, S.T.; CLARO, I.M.; SMITH, A.D.; GANGAVARAPU, K.; *et al.* PCR method for MinION and Illumina sequencing of Zika and other virus genomes directly from clinical samples. **Nat. Protoc.** n.12, p.1261–1276, 2017. <https://doi.org/10.1038/nprot.2017.066>.

RAZAFINDRATSIMANDRESY, R.; JEANMAIRE, E.M.; COUNOR, D.; VASCONCELOS, P.F.; SALL, A.A.; REYNES, J.M. Partial molecular characterization of alphaherpesviruses isolated from tropical bats. **J. Gen. Virol.** n. 90, p. 44-7. 2009. <https://doi.org/10.1099/vir.0.006825-0>.

ROBBINS, F.C.; ENDERS, J.F.; WELLER, T.H. Cytopathogenic effect of poliomyelitis viruses in vitro on, human embryonic tissues. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** n.75, v.2, p.370-374, 1950. <https://doi.org/10.3181/00379727-75-18202>.

SAAD, R.S.; DEMETRIS, A.J.; LEE, R.G.; KUSNE, S.; RANDHAWA, P.S. Adenovirus hepatitis in the adult allograft liver. **Transplantation.** n. 64, p. 1483–1485 1997. <https://doi.org/10.1097/00007890-199711270-00021>.

SALMIER, A.; TIRERA, S.; DE THOISY, B.; FRANC, A.; DARCISSAC, E.; DONATO, D.; *et al.* Virome analysis of two sympatric bat species (*Desmodus rotundus* and *Molossus molossus*) in French Guiana. **PLoS One.** n.12, v.11, 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.018694>.

SANTOSM, N.S.O.; ROMANOS, M.T.V.; WIGG, M.D. **Introdução à virologia humana.** Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2002, p.p. 204-211.

SASAKI, M.; GONZALEZ, G.; WADA, Y.; SETIYONO, A.; HANDHARYANI, E.; RAHMADANI, I.; TAHA, S.; *et al.* Divergent bufavirus harboured in megabats represents a new lineage of parvoviruses. **Sci. Rep.** n.26, v.6, p.242572016. <https://doi.org/10.1038/srep24257>.

SAXENA, P.; DASH, P.K.; SANTHOSH, S.; AMBUJ, S.; MANMOHAN, P.; LAKSHMANA, R. Development and evaluation of one step single tube multiplex RT-PCR for rapid detection and typing of dengue viruses. **Virol. J.** n. 5, v. 20, 2008. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-5-20>.

SCHLABERG, R.; CHIU, C.Y.; MILLER, S.; PROCOP, G.W.; WEINSTOCK, G. Comitê de Prática e Comitê de Práticas de Laboratório da Sociedade Americana de Microbiologia Validação de testes de Sequenciamento Metagenômico de Última Geração para detecção universal de patógenos. **Arco. Pathol. Lab. Med.** n. 141, p. 776-786, 2017. <https://doi.org/10.5858/arpa.2016-0539-RA>.

SIBNARAYAN, D.; RAGHVENDRA, B.; VIJAY V. Next-generation sequencing in clinical virology: Discovery of new viroses. **World. J. Virol.** n.4, v.3, p.265–276, 2015. <https://doi.org/10.5501/wjv.v4.i3.265>.

SIDDHARTA, A.; PFAENDER, S.; VIELLE, N.J.; DIJKMAN, R.; FRIESLAND, M.; BECKER, B.; YANG, J.; ENGELMANN, M.; TODT D. *et al.* Virucidal Activity of World Health Organization-Recommended Formulations Against Enveloped Viruses, Including Zika, Ebola, and Emerging Coronaviruses. **J. Infect. Dis.** n.15, v.6, p.902-906, 2017. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix046>.

SIMAS, P.V.; BARNABÉ, A.C.; DURÃES-CARVALHO, R.; NETO, D.F.; CASERTA, L.C.; ARTACHO, L.; JACOMASSA, F.A.; MARTINI, M.C.; BIANCHI DOS SANTOS, M.M. FELIPPE, P.A.; FERREIRA, H.L.; ARNS, C.W. Bat *coronavirus* in Brazil related to appalachian ridge and porcine epidemic diarrhea viruses. **Emerg. Infect. Dis.** n.21, v.4, p.729-731, 2015. <https://doi.org/10.3201/eid2104.141783>.

SIMMONS, N.B.; CIRRANELLO, A.L. **Bat Species of the World: A taxonomic and geographic database.** 2020. Disponível em: <https://batnames.org>. Acesso em 02/27/2021.

SINGH, J.; JAIN, D.C.; BHATIA, R.; ICHHPUJANI, R.L.; HARIT, A.K.; PANDA, R.C.; TEWARI, K.N.; SOKHEY, J. Epidemiological characteristics of rabies in Delhi and surrounding areas, 1998. **Indian. Pediatr.** n.38, v.12, p. 1354-60, 2001.

SMITH I, WANG LF. Bats and their virome: an important source of emerging viruses capable of infecting humans. **Curr. Opin. Virol.** n.3, v.1, p.84-91, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2012.11.006>.

SONNTAG, M.; MÜHLDOERFER, K.; SPECK, S.; WIBBELT, G.; KURTH, A. New adenovirus in bats, Germany. **Emerg. Infect. Dis.** n. 15, v. 12, p. 2052-5, 2009. <https://doi.org/10.3201/eid1512.090646>.

SOUF, S. “Recent advances in diagnostic testing for viral infections,” **Bioscience Horizons**, v. 9, p. 1–11, 2016. <https://doi.org/10.1093/biohorizons/hzw010>.

SOUZA W. M.; ROMEIRO M. F.; FUMAGALLI M. J.; MODHA S.; ARAUJO J.; QUEIROZ L. H.; DURIGON E. L.; FIGUEIREDO L. T.; MURCIA P. R.; GIFFORD R. J. Chapparrvoviruses occur in at least three vertebrate classes and have a broad biogeographic distribution. **Journal of General Virology.** v. 98, n. 2, p. 225-229, 2017. <http://dx.doi.org/10.1099/jgv.0.000671>.

SPANDOLE, S.; CIMPONERIU, D.; BERCA, L.M.; *et al.* Human anelloviruses: an update of molecular, epidemiological and clinical aspects. **Arch. Virol.** n. 160, p. 893–908, 2015. <https://doi.org/10.1007/s00705-015-2363-9>.

STEWART, M.E; PERRY, R.; RAIDAL, S.R. Identification of a novel circovirus in Australian ravens (*Corvus coronoides*) with feather disease. **Avian. Pathol.** n. 35, v. 2, p. 86-92, 2006. <http://dx.doi.org/10.1080/03079450600597345>.

STREICKER, D.G.; TURMELLE, A.S.; VONHOF, M.J.; KUZMIN, I.V.; MCCracken, G.F.; RUPPRECHT, C.E. Host phylogeny constrains cross-species emergence and establishment of rabies virus in bats. **Science.** n.6, v.329, p.676-679, 2010. <https://doi.org/10.1126/science.1188836>.

SUBRAMANIAN, R.P.; WILDSCHUTTE, J.H.; RUSSON, C.; COFFIN, J.M.; Identification, characterization, and comparative genomic distribution of the HERV-K (HML-2) group of human endogenous retroviruses. **Retrovirology.** n.8, v.1, 2011. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-8-1>.

- TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA 4: software Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) versão 4.0. **Mol. Biol. Evol.** n.24, p1596–1599, 2007. <https://doi.org/10.1093/molbev/msm092>.
- TAN, B.; YANG, X.L.; GE, X.Y.; PENG, C.; LIU, H.Z.; ZHANG, Y.Z.; ZHANG, L.B.; SHI, Z.L. Novel bat adenoviruses with low G+C content shed new light on the evolution of adenoviruses. **J. Gen. Virol.** n. 98, p. 739–748, 2017. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000739>.
- TANG, Y.W.; SCHMITZ, J.E.; PERSING, D.H.; STRATTON, C.W. Laboratory Diagnosis of COVID-19: Current Issues and Challenges. **J. Clin. Microbiol.** n.58, v.6, p:e00512-20, 2020. <https://doi.org/10.1128/JCM.00512-20>.
- TAKAOKA, N. Y. Raiva Humana. In: Martins HS, Damasceno MCT, Awada SB. Pronto Socorro: **Diagnóstico e Tratamento em Emergência**. 2. Ed. Barueri: Manole, p. 1083-118. 2008.
- TEELING, E.C.; VERNES, S.C.; DÁVALOS, L.M.; RAY, D.A.; GILBERT, M.T.P.; MYERS, E.; BAT1K, C. Bat Biology, Genomes, and the Bat1K Project: To Generate Chromosome-Level Genomes for All Living Bat Species. **Annu. Rev. Anim. Biosci.** n. 15, v. 6, p. 23-46, 2018. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-022516-022811>.
- THOISY, B; LACOSTE, V.; GERMAIN, A.; MUÑOZ-JORDÁN, J.; COLÓN, C.; MAUFFREY, J.F.; DELAVAL, M.; CATZEFLIS, F.; KAZANJI, M.; MATHEUS, S.; DUSSART, P.; MORVAN, J.; SETIÉN, A.A.; DEPARIS, X.; LAVERGNE, A. Dengue infection in neotropical forest mammals. **Vector Borne Zoonotic Dis.** n.9, v.2, p.157-70, 2009. <https://doi.org/10.1089/vbz.2007.0280>.
- TOMONAGA, K.; KOBAYASHI, T., IKUTA K. Molecular and cellular biology of Borna disease virus infection. **Microbes Infect.** n. 4, p. 491–500, 2002. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(02\)01564-2](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(02)01564-2).
- TONG, S.; LI, Y.; RIVAILLER, P.; CONRARDY, C.; CASTILLO, D.A; CHEN, L.M.; RECUENCO, S.; ELLISON, J.A.; DAVIS, C.T.; YORK, I.A.; TURMELLE, A.S.; MORAN, D.; ROGERS, S.; SHI, M.; TAO, Y.; WEIL, M.R; TANG, K.; ROWE, L.A.; SAMMONS, S.; XU, X.; FRACE, M.; LINDBLADE, K.A.; COX, N.J.; ANDERSON L.J.; RUPPRECHT, C.E.; DONIS, R.O. A distinct lineage of influenza A virus from bats. **Proc. Natl. Acad. Sci.** n.13 v. 109. p.4269-4274, 2012. <https://doi.org/10.1073/pnas.1116200109>.

TRACY, S.; CHAPMAN, N.M.; DRESCHER, K.M.; KONO, K.; TAPPRICH, W. Evolution of virulence in picornaviruses. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.** n. 299, p. 193-209, 2006. https://doi.org/10.1007/3-540-26397-7_7.

TREACY, A.; CARR, M.J.; DUNFORD, L.; PALACIOS, G.; CANNON, G.A.; O'GRADY, A.; MORAN, J.; HASSAN, J.; LOY, A.; CONNELL, J.; DEVANEY, D.; KELEHAN, P.; HALL, W.W. First report of sudden death due to myocarditis caused by adenovirus serotype 3. **J. Clin. Microbiol.** n. 48, p.642– 645, 2010. <https://doi.org/10.1128/JCM.00815-09>.

TSE, H.; TSANG, A.K.; TSOI, H.W.; LEUNG, A.S.; HO, C.C.; LAU, S.K; WOO, P.C.; YUEN, K.Y. Identification of a novel bat papillomavirus by metagenomics. **PLoS One.** n.7, v.8, pe43986, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043986>.

TURNER, M. G. Disturbance and Landscape Dynamics in a Changing World. **Ecology**, v.91, n.10, 2010. <https://doi.org/10.1890/10-0097.1>.

TYSCHIK, E.A.; SHCHERBAKOVA, S.M.; IBRAGIMOV, R.R.; *et al.* Transplacental transmission of torque teno virus. **Virol. J.** n. 14, v. 92, 2017. <https://doi.org/10.1186/s12985-017-0762-0>

VAN DER KUYL, A.C. Characterization of a full-length endogenous beta-retrovirus, EqERV-beta1, in the genome of the horse (*Equus caballus*). **Viruses.** n.3, v.6, p.620-8, 2011. <https://doi.org/10.3390/v3060620>.

VAN REGENMORTEL, M.H.V.; FAUQUET, C.M.; BISHOP, D.H.L. Virus taxonomy: the classification and nomenclature of viruses, Seventh Report of International Committee on Taxonomy of Viruses. **Academic. Press.** San Diego: 2000.

VASCONCELOS, P.F.C.; AZEVEDO, R.S.S; RODRIGUES, S.G.; MARTINS, L.C.; CHIANG, J.O.; TRAVASSOS, D.A.; ROSA, A.P.A. Arboviroses. In: LEÃO, R.N. Q.; BICHARA, C.N. C.; FRAIHA, N. H.; Vasconcelos, P.F.C. **Medicina tropical e infectologia na Amazônia.** Vol. 1. Belém: Samauma, 2011. p. 481-503.

VIDOVSKY, M.Z.; KOHL, C.; BOLDOGH, S.; GÖRFÖL, T.; WIBBELT, G.; KURTH, A.; HARRACH, B. Random sampling of the Central European bat fauna reveals the existence of numerous hitherto unknown adenoviruses. **Acta Vet. Hung.** N. 63, V. 4, P. 508-25, 2015. <https://doi.org/10.1556/004.2015.047>.

VOIGT, C.C.; KINGSTON, T. **Bats in the Anthropocene.** ed. Springer International, 2015.

WACHARAPLUESADEE, S.; TAN, C.W.; MANEEORN, P.; *et al.* Evidence for SARS-CoV-2 related coronaviruses circulating in bats and pangolins in Southeast Asia. **Nat. Commun** n.12, v.972, 2021. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21240-1>.

WADA, Y.; SASAKI, M.; SETIYONO, A.; HANDHARYANI, E.; RAHMADANI, I.; TAHA, S.; ADIANI, S.; LATIEF, M.; KHOLILULLAH, Z.A.; SUBANGKIT, M.; KOBAYASHI, S.; NAKAMURA, I.; KIMURA, T.; ORBA, Y.; SAWA, H. Detection of novel gammaherpesviruses from fruit bats in Indonesia. **J. Med. Microbiol.** n. 67, v. 3, p.415-422, 2018. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000689>.

WALSH, A. L.; HARRIS, S. Factors determining the abundance of vespertilionid bats in Britain: Geographical, land class and local habitat relationships. **J. Appl. Ecol.** n.33: p.519-529,1996.

WALSH, M.P.; CHINTAKUNTLAWAR, A.; ROBINSON, C.M.; MADISCH, I.; HARRACH, B.; HUDSON, N.R.; SCHNURR, D.; HEIM, A.; CHODOSH, J.; SETO, D.; JONES, M.S. Evidence of molecular evolution driven by recombination events influencing tropism in a novel human adenovirus that causes epidemic keratoconjunctivitis. **PLoS One.** n. 4, v. 6, p. e5635, 2009. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005635>.

WANG, J.I.; YUE, H.K.; YONG, Z.K.Q.; HUANG, L.W.; *et al.* Rapid and Accurate Sequencing of Enterovirus Genomes Using MinION Nanopore Sequencer, **Biomedical and Environmental Sciences.** v.30, p. 718-726, 2017. <https://doi.org/10.3967/bes2017.097>.

WANG, J.; MOORE, N.E.; MURRAY, Z.L.; MCINNES, K.; WHITE, D.J.; TOMPKINS, D.M.; HALL, R.J. Discovery of novel virus sequences in an isolated and threatened bat species, the New Zealand lesser short-tailed bat (*Mystacina tuberculata*). **J. Gen. Virol.** n. 96, p. 2442–2452, 2015. <https://doi.org/10.1099/vir.0.000158>.

WANG, A.L.; YANG, H-M.; SHEN, K.A.; WANG, C.C. Giardiavirus double-stranded RNA genome encodes a capsid polypeptide and a gag-pol-like fusion protein by a translation frameshift. **Proceedings of the National Academy of Sciences.** n. 90, p. 8595–8599, 1993. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.18.8595>.

WATANABE, S.; UEDA, N.; IHA, K.; MASANGKAY, J.S.; FUJII, H.; ALVIOLA, P.; MIZUTANI, T.; MAEDA, K.; YAMANE, D.; WALID, A. KATO, K.; KYUWA, S.; TOHYA, Y.; YOSHIKAWA, Y.; AKASHI, H. Detection of a new bat gammaherpesvirus in the Philippines. **Virus Genes.** n. 39, v. 1, p. 90-3, 2009. <https://doi.org/10.1007/s11262-009-0368-8>

WATANABE, S.; MAEDA, K.; SUZUKI, K.; UEDA, N.; IHA, K.; TANIGUCHI, S.; SHIMODA, H.; KATO, K.; YOSHIKAWA, Y.; MORIKAWA, S.; KURANE, I.; AKASHI, H.; MIZUTANI, T. Novel betaherpesvirus in bats. **Emerg. Infect. Dis.** n. 16, v. 6, p.986-8. 2010. <https://doi.org/10.3201/eid1606.091567>.

WEISS, R.A.; MCMICHAEL, A.J. Social and environmental risk factors in the emergence of infectious diseases. **Nat. Med.** n.10, p.70-76, 2004. <https://doi.org/10.1038/nm1150>.

WEISS, R.A. The discovery of endogenous retroviruses. **Retrovirology.** n.3, v.67, 2006. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-3-67>.

WHO updates on MERS. **World Health Organization 2012.** Disponível em: www.who.int/emergencies/mers-cov/en. Acesso: 05/06/2021.

WIBBELT, G.; KURTH, A.; YASMUM, N.; BANNERT, M.; NAGEL, S.; NITSCHKE, A.; EHLERS, B. Discovery of herpesviruses in bats. **J. Gen. Virol.** n. 88, p. 2651-2655, 2007. <https://doi.org/10.1099/vir.0.83045-0>.

WILKINSON, D.A.; TEMMAM, S.; LEBARBENCHON, C.; LAGADEC, E.; CHOTTE, J.; GUILLEBAUD, J.; RAMASINDRAZANA, B.; HÉRAUD, J.M.; DE LAMBALLERIE, X.; GOODMAN, S.M.; DELLAGI, K.; PASCALIS, H. Identification of novel paramyxoviruses in insectivorous bats of the Southwest Indian Ocean. **Virus. Res.** n. 170, p. 159-63, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.08.022>.

WILKINSON, D.A.; MARSHALL, J.C.; FRENCH NIGEL, P.; HAYMAN, D.T.S. *Habitat fragmentation, biodiversity loss and the risk of novel infectious disease emergence.* **J. R. Soc. Interface.** n.5, v.15, 2018. <https://doi.org/10.1098/rsif.2018.0403>.

WONG, M.; WOOLFORD, L.; HASAN, N.H.; HEMMATZADEH, F. A Novel Recombinant Canine Adenovirus Type 1 Detected from Acute Lethal Cases of Infectious Canine Hepatitis. **Viral Immunol.** n. 30, v. 4, p. 258-263, 2017. <http://doi.org/10.1089/vim.2016.0041>.

WOOD, J. L. N.; LEACH M.; WALDMAN L.; MACGREGOR H.; FOOKS A. R.; JONES K. E. A framework for the study of zoonotic disease emergence and its drivers: spillover of bat pathogens as a case study. **Philos. Trans. R. Soc. B. Biol. Sci.** n.367, p.2881–2892, 2012. <http://doi.org/10.1098/rstb.2012.0228>.

WOO, P.C.Y.; LAU, S.K.P.; TSOI, H.W.; PATTERIL, N.G.; *et al.* Two novel dromedary camel bocaparvoviruses from dromedaries in the Middle East with unique genomic features. **J. Gen. Virol.** n.98, v.6, p.1349-1359, 2017. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000775>.

- WOOTTON SK, HALBERT CL, MILLER AD. Sheep retrovirus structural protein induces lung tumours. **Nature**. n. 434, v.7035, p.904-907, 2005. <http://doi.org/10.1038/nature03492>.
- WOLFE, N.D.; DUNAVAN, C.P.; DIAMOND, J. Origins of major human infectious diseases. **Nature**. n.17, 279-283, 2007. <https://doi.org/10.1038/nature05775>.
- WOOLHOUSE, M.E.; GOWTAGE-SEQUERIA, S. Host range and emerging and reemerging pathogens. **Emerg. Infect. Dis.** n.11, v.12, p.1842-1847, 2005. <https://doi.org/10.3201/eid1112.050997>.
- WU Z.; REN, X.; YANG, L.; HU, Y.; YANG, J.; *et al.* Virome analysis for identification of novel mammalian viruses in bat species from Chinese provinces. **J. Virol.** n.86, v.20 p10999-1012, 2012. <https://doi.org/10.1128/JVI.01394-12>.
- WU, F.; ZHAO, S.; YU, B.; CHEN, Y-M; WANG, W.; SONG, Z-G.; HU, Y.; TAO, Z-T.; TIAN, J-H.; PEI, Y-Y.; YUAN, M-L.; ZHANG, Y-L.; DAI, F-H.; LIU, Y.; WANG, Q-M.; ZHENG, J-J.; XU, L.; HOLMES, E.C.; ZHANG, Y.Z. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. **Nature**. n.579, p.265-269, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2008-3>.
- WU, Z.; YANG, L.; REN, X.; HE, G.; ZHANG, J.; YANG, J.; QIAN, Z.; DONG, J.; SUN, L.; ZHU, Y.; DU, J.; YANG, F.; ZHANG, S.; JIN, Q. Deciphering the bat virome catalog to better understand the ecological diversity of bat viruses and the bat origin of emerging infectious diseases. **I.S.M.E. J.** n. 10, v. 3, p. 609-20, 2016. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.138>.
- YINDA, C.K., ZELL, R., DEBOUTTE, W. *et al.* Highly diverse population of Picornaviridae and other members of the Picornavirales, in Cameroonian fruit bats. **B.M.C Genomics**. n.18, p.249, 2017. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3632-7>.
- YINDA, C.K.; GHOGOMU, S.M.; CONCEIÇÃO-NETO, N.; BELLER, L.; DEBOUTTE, W.; VANHULLE, E.; MAES, P.; VAN RANST, M.; MATTHIJNSSENS, J. Cameroonian fruit bats harbor divergent viruses, including rotavirus H, bastroviruses, and picobirnaviruses using an alternative genetic code. **Virus Evol.** n. 30, p. 008, 2018. <https://doi.org/10.1093/ve/vey008>.
- YANG, Y.; DU, L.; LIU, C.; WANG, L.; MA, C.; TANG, J.; BARIC, R. S.; JIANG, S.; LI, F. Receptor usage and cell entry of bat coronavirus HKU4 provide insight into bat-to-human transmission of MERS coronavirus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. n.111, v.34, p.12516–12521, 2014. <https://doi.org/10.1073/pnas.1405889111>.

YU, J.M.; LI, X.Y.; AO, Y.Y.; LI, L.L.; LIU, N.; LI, J.S.; DUAN, Z.J. Identification of a novel picornavirus in healthy piglets and seroepidemiological evidence of its presence in humans. **PLoS One**. n. 8, v. 8, p. e70137, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070137>.

YUAN, L.; LI, M.; LI, L.; MONAGIN, C.; CHMURA, A.A.; *et al.* Evidence for retrovirus and paramyxovirus infection of multiple bat species in china. **Viruses**. n16, v.5, p.2138-54, 2014. <https://doi.org/10.3390/v6052138>.

ZEGHBIB, S.; HERCZEG, R.; KEMENESI, G.; *et al.* Genetic characterization of a novel picornavirus in Algerian bats: co-evolution analysis of bat-related picornaviruses. **Sci. Rep.** n.9, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52209-2>.

ZHENG, X.Y.; QIU, M.; GUAN, W.J.; LI, J.M.; CHEN, S.W.; CHENG, M.J.; HUO, S.T.; CHEN, Z.; WU, Y.; JIANG, L.N.; CHEN, Q. Viral metagenomics of six bat species in close contact with humans in southern China. **Arch. Virol.** n. 163, p. 73-88, 2018. <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3570-3>.

ZHENG, X.Y.; QIU, M.; CHEN, S.W.; XIAO, J.P.; MA, L.Z.; LIU, S.; ZHOU, J.H.; ZHANG, Q.H.; LI, X.; CHEN, Z.; WU, Y.; CHEN, H.F.; JIANG, L.N.; XIONG, Y.Q.; MA, S.J.; ZHONG, X.S.; HUO, S.T.; GE, J.; CEN, S.W.; CHEN, Q. High prevalence and diversity of viruses of the subfamily Gammaherpesvirinae, family Herpesviridae, in fecal specimens from bats of different species in southern China. **Arch. Virol.** n. 161, p. 135-40, 2016. <https://doi.org/10.1007/s00705-015-2614-9>.

ZHENG, X. Y.; QIU, M.; GUAN, W. J.; LI, J. M.; CHEN, S. W.; CHENG, M. J.; HUO, S. T.; CHEN, Z.; WU, Y.; JIANG, L. N.; CHEN, Q. Viral metagenomics of six bat species in close contact with humans in southern China. **Archives of virology**, n.163, v.1, p.73–88, 2018. <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3570-3>.

ZHOU, P.; YANG, X.L.; WANG, X.G.; HU, B.; ZHANG, L.; ZHANG, W.; SI, H.R.; ZHU, Y.; LI, B.; HUANG, C.L.; CHEN, H-D.; CHEN, J.; LUO, Y.; GUO, H.; JIANG, R-D.; LIU, M-Q.; CHEN, Y.; SHEN, X-R.; WANG, X.; ZHENG, X-S.; ZHAO, K.; CHEN, Q-J.; DENG, F.; LIU, L-L.; YAN, B.; ZHAN, F-X.; WANG, Y-Y.; XIAO, G-F.; SHI, Z-L. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. **Nature**. n.579, p.270-273. 2020. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>.

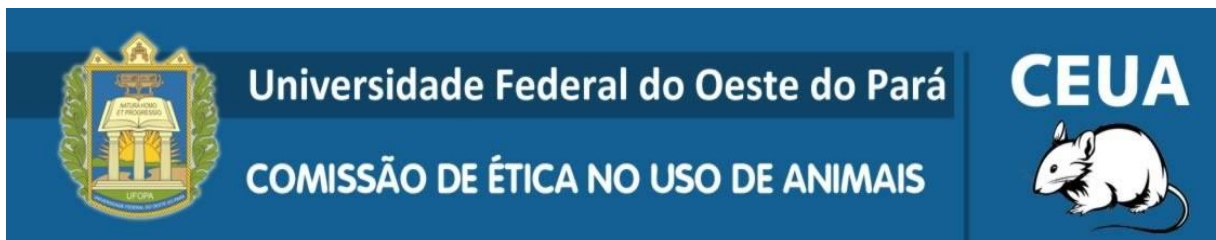
ZHU, H.C.; CHU, D.K.; LIU, W.; DONG, B.Q.; ZHANG, S.Y.; ZHANG, J.X.; LI, F.F.; VIJAYKRISHNA, D.; SMITH, G.J.; CHEN, H.L.; *et al.* Detection of several bat astroviruses in China. **J. Gen. Virol.** n. 90, p. 883-887, 2009. <https://doi.org/10.1099/vir.0.007732-0>

ZOHDY, S.; TONIA, S.; SCHWARTZ, J.; OAKS, R. The Coevolution Effect as a Driver of Spillover. **Trends in Parasitology**. v.35, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.03.010>

.

APÊNDICES

A) Certificado da Comissão de Ética no uso de Animais da Universidade Federal do Oeste do Pará (CEUA/UFOPA) com o Nº 0220220128.



CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo Nº **0220220128**, intitulado **ECOVIGILANCIA EPIDEMIOLOGICA MOLECULAR E METAGENOMICA VIRAL EM MORCEGOS DE AMBIENTES URBANOS DA**

AMAZÔNIA., sob a responsabilidade de **Luís Reginaldo Ribeiro Rodrigues**, está de acordo com os Princípios éticos na Experimentação Animal adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Oeste do Pará - UFOPA.

CERTIFICATE

We certify that the protocol Nº **0220220128**, entitled "**ECOVIGILANCIA EPIDEMIOLOGICA MOLECULAR E METAGENOMICA VIRAL EM MORCEGOS DE AMBIENTES URBANOS DA AMAZÔNIA.**", is in

agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA). This project was approved by the institutional Commission for Ethics in the Use of Animals of Universidade Federal do Oeste do Pará.

Santarém-PA, 01/06/2022

Profª. Dra. Adriana Caroprezio Morini
Presidente

Verificar a autenticidade do certificado em <http://ufopa.edu.br/ceua/validar-certificado>
01/06/2022 12:10

B) Autorização do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO – 18313-1).



Ministério do Meio Ambiente - MMA

Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Licença permanente para coleta de material zoológico

Número: 18313-1		Data da Emissão: 05/02/2009 19:09
Dados do titular		
Registro no Ibama: 1902127	Nome: luis reginaldo ribeiro rodrigues	CPF: 391.501.272-68
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ		CNPJ: 34.621.748/0001-23

Observações, ressalvas e condicionantes

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passa da, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	A licença permanente não é válida para: a) coleta ou transporte de espécies que constem nas listas oficiais de espécies ameaçadas de extinção; b) manutenção de espécimes de fauna silvestre em cativeiro; c) recebimento ou envio de material biológico ao exterior; e d) realização de pesquisa em unidade de conservação federal ou em caverna. A restrição prevista no item d não se aplica às categorias Reserva Particular do Patrimônio Natural, Área de Relevante Interesse Ecológico e Área de Proteção Ambiental constituídas por terras privadas.
3	O pesquisador titular da licença permanente, quando acompanhado, deverá registrar a expedição de campo no Sisbio e informar o nome e CPF dos membros da sua equipe, bem como dados da expedição, que constarão no comprovante de registro de expedição para eventual apresentação à fiscalização;
4	Esta licença permanente não exime o seu titular da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade.
5	Esta licença permanente não poderá ser utilizada para fins comerciais, industriais, esportivos ou para realização de atividades inerentes ao processo de licenciamento ambiental de empreendimentos.
6	Este documento NÃO exime o pesquisador titular da necessidade de atender ao disposto na Instrução Normativa Ibama nº 27/2002, que regulamenta o Sistema Nacional de Anilhamento de Aves Silvestres.
7	O pesquisador titular da licença permanente será responsável pelos atos dos membros da equipe (quando for o caso)
8	O órgão gestor de unidade de conservação estadual, distrital ou municipal poderá, a despeito da licença permanente e das autorizações concedidas pelo Ibama, estabelecer outras condições para a realização de pesquisa nessas unidades de conservação.
9	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
10	O titular da licença permanente deverá apresentar, anualmente, relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias após o aniversário de emissão da licença permanente.
11	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo Ibama e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.
12	A licença permanente será válida enquanto durar o vínculo empregatício do pesquisador com a instituição científica a qual ele estava vinculado por ocasião da solicitação.
13	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico.
14	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constantes de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexplotadas ou ameaçadas de sobreexplotação.

Táxons autorizados

#	Nível taxonômico	Táxon(s)
1	ORDEM	Chiroptera
2		

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ	colecção
2	UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ	colecção

Este documento (Licença permanente para coleta de material zoológico) foi expedido com base na Instrução Normativa Ibama nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Ibama/Sisbio na internet (www.ibama.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 34914283



Página 1/2

C) Planilha de Identificação das amostras em campo. a) Amostras de sangue e swabs oral e anal;

ESPÉCIE	AMOSTRAS	LOCAL DE CAPTURA	IDADE	SEXO	COORDENADA GEOGRÁFICA	INFORMAÇÕES DOS LOCAIS DE CAPTURA
1- <i>Molossus molossus</i>	Sangue, swab oral, swab anal	UFOPA - TAPAJÓS - SALE	Jovem	M	-2.4173436, -54.7422361	PROXIMO AO FORRO
2- <i>Molossus molossus</i>	Sangue, swab oral, swab anal	UFOPA - TAPAJÓS - SALE	Jovem	M	-2.4173436, -54.7422362	PROXIMO AO FORRO
3- <i>Molossus molossus</i>	Sangue, swab oral, swab anal	UFOPA - TAPAJÓS - SALE	Adulto	M	-2.4173436, -54.7422363	PROXIMO AO FORRO
4- <i>Molossus molossus</i>	Sangue, swab oral, swab anal	UFOPA - TAPAJÓS - SALE	Adulto	M	-2.4173436, -54.7422364	PROXIMO AO FORRO
4- <i>Molossus molossus</i>	Sangue, swab oral, swab anal	UFOPA - TAPAJÓS - SALE	Adulto	M	-2.4173436, -54.7422365	ÁREA DE ARVORES FRUTÍFERAS
6- <i>Molossus molossus</i>	Sangue, swab oral, swab anal	UFOPA - TAPAJÓS - SALE	Adulto	F	-2.4173436, -54.7422366	PROXIMO AO FORRO
7- <i>Molossus molossus</i>	Sangue, swab oral, swab anal	UFOPA - TAPAJÓS - SALE	Adulto	M	-2.4173436, -54.7422367	PROXIMO AO FORRO
8- <i>Molossus molossus</i>	Sangue, swab oral, swab anal	UFOPA - TAPAJÓS - SALE	Adulto	F	-2.4173436, -54.7422368	PROXIMO AO FORRO
9- <i>Molossus molossus</i>	Sangue, swab oral, swab anal	UFOPA - TAPAJÓS - SALE	Adulto	F	-2.4173436, -54.7422369	PROXIMO AO FORRO
10- <i>Molossus molossus</i>	Sangue, swab oral, swab anal	BAIRRO FLORESTA	Adulto	M	S 2.457059° W 54.715681°	LOCAL COM MUITA ARVORE FRUTIFERA E MATA
11 - <i>Artibeus lituratus</i>	Sangue, swab oral, swab anal	BAIRRO FLORESTA	Adulto	M	S 2.457059° W 54.715681°	LOCAL COM MUITA ARVORE FRUTIFERA E MATA
12 - <i>Artibeus lituratus</i>	Sangue, swab oral, swab anal	BAIRRO FLORESTA	Adulto	M	S 2.457059° W 54.715681°	LOCAL COM MUITA ARVORE FRUTIFERA E MATA
13 - <i>Artibeus lituratus</i>	Sangue, swab oral, swab anal	BAIRRO FLORESTA	Jovem	F	S 2.457059° W 54.715681°	LOCAL COM MUITA ARVORE FRUTIFERA E MATA
14 - <i>Artibeus lituratus</i>	Sangue, swab oral, swab anal	BAIRRO FLORESTA	Jovem	M	S 2.457059° W 54.715681°	LOCAL COM MUITA ARVORE FRUTIFERA E MATA
15 - <i>Artibeus lituratus</i>	Sangue, swab oral, swab anal	BAIRRO PRAINHA	Jovem	F	-2.4262355, -54.6971351	LOCAL COM ARVORE E BEIRA DE RIO
16 - <i>Myotis sp.</i>	Sangue, swab oral, swab anal	BAIRRO PRAINHA	Adulto	M	-2.4262355, -54.6971352	LOCAL COM ARVORE E BEIRA DE RIO
17 - <i>Myotis sp.</i>	Sangue, swab oral, swab anal	BAIRRO PRAINHA	Adulto	M	-2.4262355, -54.6971353	LOCAL COM ARVORE E BEIRA DE RIO
18 - <i>Myotis sp.</i>	Sangue, swab oral, swab anal	BAIRRO PRAINHA	Adulto	M	-2.4262355, -54.6971354	LOCAL COM ARVORE E BEIRA DE RIO
19- <i>Myotis sp.</i>	Sangue, swab oral, swab anal	BAIRRO PRAINHA	Adulto	M	-2.4262355, -54.6971351	LOCAL COM ARVORE E BEIRA DE RIO
20- <i>Myotis sp.</i>	Sangue, swab oral, swab anal	BAIRRO PRAINHA	Adulto	M	-2.4262355, -54.6971352	LOCAL COM ARVORE E BEIRA DE RIO
21- <i>Molossus molossus</i>	Sangue, swab oral, swab anal	BAIRRO PRAINHA	Adulto	F	-2.4262355, -54.6971353	LOCAL COM ARVORE E BEIRA DE RIO
22- <i>Molossus molossus</i>	Sangue, swab oral, swab anal	BAIRRO PRAINHA	Adulto	M	-2.4262355, -54.6971354	LOCAL COM ARVORE E BEIRA DE RIO
23- <i>Molossus molossus</i>	Sangue, swab oral, swab anal	BAIRRO PRAINHA	Adulto	M	-2.4262355, -54.6971355	LOCAL COM ARVORE E BEIRA DE RIO
24- <i>Molossus molossus</i>	Sangue, swab oral, swab anal	BAIRRO PRAINHA	Adulto	M	-2.4262355, -54.6971356	LOCAL COM ARVORE E BEIRA DE RIO
25- <i>Molossus molossus</i>	Sangue, swab oral, swab anal	BAIRRO PRAINHA	Jovem	M	-2.4262355, -54.6971357	LOCAL COM ARVORE E BEIRA DE RIO
26- <i>Noctilio albiventris</i>	Sangue, swab oral, swab anal	BAIRRO MARACANA	Jovem	M	-2.4383274, -54.7465779	LOCAL COM ARVORES
26- <i>Noctilio albiventris</i>	Sangue, swab oral, swab anal	BAIRRO MARACANA	Adulto	M	-2.4383274, -54.7465780	LOCAL COM ARVORES
28 - <i>Noctilio albiventris</i>	Sangue, swab oral, swab anal	BAIRRO MARACANA	Adulto	M	-2.4383274, -54.7465781	LOCAL COM ARVORES
29- <i>Noctilio albiventris</i>	Sangue, swab oral, swab anal	BAIRRO MARACANA	Adulto	M	-2.4383274, -54.7465782	LOCAL COM ARVORES
30- <i>Noctilio albiventris</i>	Sangue, swab oral, swab anal	BAIRRO MARACANA	Jovem	M	-2.4383274, -54.7465783	LOCAL COM ARVORES
31- <i>Noctilio albiventris</i>	Sangue, swab oral, swab anal	BAIRRO MARACANA	Adulto	M	-2.4383274, -54.7465784	LOCAL COM ARVORES
32- <i>Noctilio albiventris</i>	Sangue, swab oral, swab anal	BAIRRO MARACANA	Adulto	M	-2.4383274, -54.7465785	LOCAL COM ARVORES
33- <i>Noctilio leporinus</i>	Sangue, swab oral, swab anal	UFOPA - TAPAJÓS - SALE	Adulto	M	-2.4173436, -54.7422362	LOCAL COM ARVORES
34 - <i>Noctilio albiventris</i>	Sangue, swab oral, swab anal	BAIRRO CARANAZAL	Adulto	F	-2.4273440, -54.7272861	LOCAL COM ARVORES/QUINTAL
35- <i>Noctilio albiventris</i>	Sangue, swab oral, swab anal	BAIRRO CARANAZAL	Jovem	M	-2.4273440, -54.7272862	LOCAL COM ARVORES/QUINTAL
36- <i>Molossus molossus</i>	Sangue, swab oral, swab anal	BAIRRO CARANAZAL	Jovem	M	-2.4273440, -54.7272863	LOCAL COM ARVORES/QUINTAL
37- <i>Molossus molossus</i>	Sangue, swab oral, swab anal	BAIRRO CARANAZAL	Adulto	M	-2.4273440, -54.7272864	LOCAL COM ARVORES/QUINTAL
37- <i>Molossus molossus</i>	Sangue, swab oral, swab anal	BAIRRO CARANAZAL	Adulto	M	-2.4273440, -54.7272865	LOCAL COM ARVORES/QUINTAL
39- <i>Molossus molossus</i>	Sangue, swab oral, swab anal	BAIRRO CARANAZAL	Jovem	M	-2.4273440, -54.7272866	LOCAL COM AR

D) Planilha de Identificação das amostras em campo. a) Amostras de fígado, baço, rins e intestino.

ESPÉCIE	SEXO	AMOSTRAS	IDADE	LOCAL DE CAPTURA	OBSERVAÇÃO NECRÓPSIA	COORDENADA GEOGRÁFICA	INFORMAÇÕES DOS LOCAIS DE C
1-Molossus molossus	M	Fígado, intestinos, baço e rins	Jovem	CARANAZAL		-2.4173436, -54.7222634	LOCAL COM ARVORES QUINTAL
2-Molossus molossus	M	Fígado, intestinos, baço e rins	Adulto	CARANAZAL		-2.4273440, -54.7272862	LOCAL COM ARVORES QUINTAL
3-Molossus molossus	M	Fígado, intestinos, baço e rins	Adulto	CARANAZAL		-2.4273440, -54.7272863	LOCAL COM ARVORES QUINTAL
4-Molossus molossus	M	Fígado, intestinos, baço e rins	Adulto	CARANAZAL		-2.4273440, -54.7272864	LOCAL COM ARVORES QUINTAL
5-Molossus molossus	M	Fígado, intestinos, baço e rins	Adulto	CARANAZAL		-2.4273440, -54.7272865	LOCAL COM ARVORES QUINTAL
6-Molossus molossus	M	Fígado, intestinos, baço e rins	Adulto	CARANAZAL		-2.4273440, -54.7272866	LOCAL COM ARVORES QUINTAL
7-Molossus molossus	M	Fígado, intestinos, baço e rins	Adulto	CARANAZAL		-2.4273440, -54.7272867	LOCAL COM ARVORES QUINTAL
8-Molossus molossus	F	Fígado, intestinos, baço e rins	Adulto	CARANAZAL		-2.4273440, -54.7272868	LOCAL COM ARVORES QUINTAL
9-Molossus molossus	F	Fígado, intestinos, baço e rins	Adulto	CARANAZAL		-2.4273440, -54.7272869	LOCAL COM ARVORES QUINTAL
10-Molossus molossus	M	Fígado, intestinos, baço e rins	Adulto	CARANAZAL		-2.4273440, -54.7272870	LOCAL COM ARVORES QUINTAL
11-Molossus molossus	M	Fígado, intestinos, baço e rins	Adulto	UFOPA-SALE	HEPATO-ESPLENOMEGLIA	-2.4173436, -54.7222361	PROXIMO AO FORRO
12-Molossus molossus	F	Fígado, intestinos, baço e rins	Adulto	UFOPA-SALE		-2.4173436, -54.7222362	PROXIMO AO FORRO
13-Molossus molossus	M	Fígado, intestinos, baço e rins	Jovem	UFOPA-SALE		-2.4173436, -54.7222363	PROXIMO AO FORRO
14-Molossus molossus	M	Fígado, intestinos, baço e rins	Jovem	UFOPA-SALE		-2.4173436, -54.7222364	PROXIMO AO FORRO
15-Molossus molossus	M	Fígado, intestinos, baço e rins	Jovem	UFOPA-SALE		-2.4173436, -54.7222365	ÁREA DE ARVORES FRUTÍFERAS
16-Molossus molossus	M	Fígado, intestinos, baço e rins	adulto	UFOPA-SALE		-2.4173436, -54.7222366	PROXIMO AO FORRO
17-Molossus molossus	M	Fígado, intestinos, baço e rins	adulto	UFOPA-SALE		-2.4173436, -54.7222367	PROXIMO AO FORRO
18-Molossus molossus	M	Fígado, intestinos, baço e rins	adulto	UFOPA-SALE		-2.4173436, -54.7222368	PROXIMO AO FORRO
19-Molossus molossus	M	Fígado, intestinos, baço e rins	adulto	UFOPA-SALE		-2.4173436, -54.7222369	PROXIMO AO FORRO
20-Molossus molossus	M	Fígado, intestinos, baço e rins	adulto	UFOPA-SALE		-2.4173436, -54.7222370	PROXIMO AO FORRO
21-Molossus molossus	F	Fígado, intestinos, baço e rins	adulto	UFOPA-SALE		-2.4173436, -54.7222371	PROXIMO AO FORRO
22-Molossus molossus	M	Fígado, intestinos, baço e rins	adulto	UFOPA-SALE		-2.4173436, -54.7222372	PROXIMO AO FORRO
23-Molossus molossus	M	Fígado, intestinos, baço e rins	adulto	UFOPA-SALE		-2.4173436, -54.7222373	PROXIMO AO FORRO
24-Molossus molossus	M	Fígado, intestinos, baço e rins	adulto	UFOPA-SALE		-2.4173436, -54.7222374	ÁREA DE ARVORES FRUTÍFERAS
25-Molossus molossus	M	Fígado, intestinos, baço e rins	Jovem	UFOPA-SALE		-2.4173436, -54.7222375	PROXIMO AO FORRO
26-Molossus molossus	M	Fígado, intestinos, baço e rins	Jovem	UFOPA-SALE		-2.4173436, -54.7222376	PROXIMO AO FORRO
27-Molossus molossus	M	Fígado, intestinos, baço e rins	adulto	UFOPA-SALE		-2.4173436, -54.7222377	PROXIMO AO FORRO
28-Molossus molossus	F	Fígado, intestinos, baço e rins	adulto	UFOPA-SALE		-2.4173436, -54.7222378	PROXIMO AO FORRO
29-Molossus molossus	F	Fígado, intestinos, baço e rins	adulto	UFOPA-SALE		-2.4173436, -54.7222379	PROXIMO AO FORRO
30-Molossus molossus	M	Fígado, intestinos, baço e rins	Jovem	UFOPA-SALE		-2.4173436, -54.7222380	PROXIMO AO FORRO
31-Molossus molossus	M	Fígado, intestinos, baço e rins	adulto	UFOPA-SALE		-2.4173436, -54.7222381	PROXIMO AO FORRO
32-Molossus molossus	M	Fígado, intestinos, baço e rins	adulto	UFOPA-SALE		-2.4173436, -54.7222382	PROXIMO AO FORRO
33-Molossus molossus	M	Fígado, intestinos, baço e rins	adulto	UFOPA-SALE		-2.4173436, -54.7222383	ÁREA DE ARVORES FRUTÍFERAS
34-Molossus molossus	M	Fígado, intestinos, baço e rins	adulto	UFOPA-SALE		-2.4173436, -54.7222384	PROXIMO AO FORRO
35-Molossus molossus	M	Fígado, intestinos, baço e rins	Jovem	UFOPA-SALE	HEPATOMEGALIA	-2.4173436, -54.7222385	PROXIMO AO FORRO
36-Molossus molossus	M	Fígado, intestinos, baço e rins	Jovem	UFOPA-SALE		-2.4173436, -54.7222386	PROXIMO AO FORRO
37-Molossus molossus	M	Fígado, intestinos, baço e rins	adulto	UFOPA-SALE		-2.4173436, -54.7222387	PROXIMO AO FORRO
38-Molossus molossus	M	Fígado, intestinos, baço e rins	adulto	UFOPA-SALE		-2.4173436, -54.7222388	PROXIMO AO FORRO
39-Molossus molossus	M	Fígado, intestinos, baço e rins	Jovem	UFOPA-SALE		-2.4173436, -54.7222389	PROXIMO AO FORRO
40-Molossus molossus	M	Fígado, intestinos, baço e rins	adulto	UFOPA-SALE		-2.4173436, -54.7222390	PROXIMO AO FORRO
41-Molossus molossus	M	Fígado, intestinos, baço e rins	Jovem	UFOPA-SALE	HEPATOMEGALIA	-2.4173436, -54.7222391	PROXIMO AO FORRO
42-Molossus molossus	M	Fígado, intestinos, baço e rins	Adulto	UFOPA-SALE		-2.4173436, -54.7222392	ÁREA DE ARVORES FRUTÍFERAS
43-Molossus molossus	F	Fígado, intestinos, baço e rins	Adulto	UFOPA-SALE		-2.4173436, -54.7222393	PROXIMO AO FORRO
44-Molossus molossus	M	Fígado, intestinos, baço e rins	Adulto	UFOPA-SALE		-2.4173436, -54.7222394	PROXIMO AO FORRO
45-Molossus molossus	M	Fígado, intestinos, baço e rins	Jovem	UFOPA-SALE		-2.4173436, -54.7222395	PROXIMO AO FORRO
46-Molossus molossus	M	Fígado, intestinos, baço e rins	Adulto	UFOPA-SALE		-2.4173436, -54.7222396	PROXIMO AO FORRO
47-Molossus molossus	M	Fígado, intestinos, baço e rins	Adulto	UFOPA-SALE		-2.4173436, -54.7222397	PROXIMO AO FORRO
48-Artheus lituratus	F	Fígado, intestinos, baço e rins	Adulto	UFOPA-SALE		-2.4173436, -54.7222398	PROXIMO AO FORRO
49-Artheus lituratus	M	Fígado, intestinos, baço e rins	Adulto	UFOPA-SALE	HEPATOMEGALIA	-2.4173436, -54.7222399	PROXIMO AO FORRO
50-Artheus lituratus	M	Fígado, intestinos, baço e rins	Jovem	UFOPA-SALE		-2.4173436, -54.7222400	PROXIMO AO FORRO
51-Artheus lituratus	M	Fígado, intestinos, baço e rins	Adulto	UFOPA-SALE		-2.4173436, -54.722401	ÁREA DE ARVORES FRUTÍFERAS
51-Artheus lituratus	M	Fígado, intestinos, baço e rins	Adulto	UFOPA-SALE		-2.4173436, -54.722402	ÁREA DE ARVORES FRUTÍFERAS

E) Leituras de Totivirus identificadas em *pools* de Fígado (F). As colunas indicam respectivamente: o nº do *pool*, o vírus obtido na plataforma Illumina, a proteína correspondente a sequência obtida no Blastx, o percentual de cobertura, o valor de E, o percentual de similaridade e o nº de acesso do vírus correspondente no GenBank.

Pool	Proteína correspondente	Vírus correspondente	Cobertura	E-value	Identidade	Nº de acesso do Hit
>F1_102	proteína hipotética	<i>Schistocephalus solidus</i> toti-like virus 1	19%	0,002	33,71%	QJD26155.1
>F1_112	polimerase	<i>Schistocephalus solidus</i> toti-like virus 3	48%	4,00E-06	37,93%	QJD26160.1
>F1_082	polimerase	<i>Schistocephalus solidus</i> toti-like virus 3	31%	5,00E-07	59,09%	QJD26160.1
>F1_103	proteína hipotética	<i>Schistocephalus solidus</i> toti-like virus 3	34%	4,00E-07	36,13%	QJD26159.1
>F1_056	proteína hipotética	<i>Schistocephalus solidus</i> toti-like virus 1	61%	4,00E-07	27,89%	QJD26155.1
>F1_063	polimerase	<i>Schistocephalus solidus</i> toti-like virus 3	29%	2,00E-07	39,29%	QJD26160.1
>F1_059	polimerase	<i>Schistocephalus solidus</i> toti-like virus 3	18%	8,00E-09	35,48%	QJD26160.1
>F1_100	proteína hipotética	<i>Schistocephalus solidus</i> toti-like virus 1	49%	4,00E-09	27,98%	QJD26155.1
>F1_105	polimerase	<i>Schistocephalus solidus</i> toti-like virus 1	24%	3,00E-10	39,13%	QJD26156.1
>F1_035	proteína hipotética	<i>Schistocephalus solidus</i> toti-like virus 3	40%	6,00E-12	34,44%	QJD26159.1
>F1_098	proteína hipotética FZCTV1_gp1	<i>Hangzhou zicrona caerulea</i> totivirus 1	82%	1,00E-12	25,25%	UHK03223.1
>F1_093	proteína hipotética	<i>Schistocephalus solidus</i> toti-like virus 3	78%	8,00E-15	29,85%	QJD26159.1
>F1_072	proteína hipotética	<i>Schistocephalus solidus</i> toti-like virus 1	43%	6,00E-16	30,24%	QJD26155.1
>F1_017	proteína hipotética	<i>Schistocephalus solidus</i> toti-like virus 1	78%	1,00E-16	27,55%	QJD26155.1
>F1_039	proteína hipotética	<i>Schistocephalus solidus</i> toti-like virus 1	29%	9,00E-17	29,64%	QJD26155.1
>F1_050	proteína hipotética	<i>Schistocephalus solidus</i> toti-like virus 1	60%	4,00E-18	31,97%	QJD26155.1
>F1_077	proteína hipotética FZCTV1_gp1	<i>Hangzhou zicrona caerulea</i> totivirus 1	53%	4,00E-19	25,81%	UHK03223.1
>F1_022	proteína hipotética	<i>Schistocephalus solidus</i> toti-like virus 3	98%	4,00E-19	31,15%	QJD26159.1
>F1_031	proteína hipotética	<i>Schistocephalus solidus</i> toti-like virus 3	79%	2,00E-20	32,41%	QJD26159.1
>F1_078	proteína hipotética	<i>Schistocephalus solidus</i> toti-like virus 1	39%	1,00E-23	31,27%	QJD26155.1
>F1_030	proteína hipotética	<i>Schistocephalus solidus</i> toti-like virus 1	62%	1,00E-23	31,62%	QJD26155.1
>F1_090	proteína hipotética	<i>Schistocephalus solidus</i> toti-like virus 1	50%	1,00E-24	31,27%	QJD26155.1
>F1_070	polimerase	<i>Schistocephalus solidus</i> toti-like virus 1	85%	5,00E-29	31,67%	QJD26156.1
>F1_014	proteína hipotética	<i>Schistocephalus solidus</i> toti-like virus 1	34%	4,00E-29	27,53%	QJD26155.1
>F1_083	proteína hipotética	<i>Schistocephalus solidus</i> toti-like virus 3	68%	4,00E-31	33,23%	QJD26159.1
>F1_057	proteína hipotética	<i>Schistocephalus solidus</i> toti-like virus 3	81%	3,00E-33	31,81%	QJD26159.1
>F1_111	desidrina	<i>Sanya</i> totivirus 12	99%	1,00E-33	31,27%	UHK03215.1
>F6_005	RNA polimerase dependente de RNA	<i>Hangzhou</i> totivirus 10	36%	5,00E-35	45,06%	UHK03000.1
>F1_053	proteína hipotética	<i>Schistocephalus solidus</i> toti-like virus 3	89%	4,00E-36	31,44%	QJD26159.1
>F1_020	RNA polimerase dependente de RNA	<i>Hangzhou zicrona caerulea</i> totivirus 1	75%	2,00E-38	38,26%	UHK03224.1
>F4_001	proteína do capsídeo	<i>Totiviridae</i> sp.	94%	5,00E-39	30,03%	QXV86549.1
>F1_019	proteína hipotética	<i>Schistocephalus solidus</i> toti-like virus 1	68%	7,00E-43	31,05%	QJD26155.1
>F1_011	proteína hipotética	<i>Schistocephalus solidus</i> toti-like virus 1	48%	5,00E-48	28,72%	QJD26155.1
>F1_060	polimerase	<i>Schistocephalus solidus</i> toti-like virus 1	71%	6,00E-50	38,25%	QJD26156.1
>F1_042	polimerase	<i>Schistocephalus solidus</i> toti-like virus 1	48%	6,00E-52	34,96%	QJD26156.1
>F1_064	polimerase	<i>Schistocephalus solidus</i> toti-like virus 3	95%	7,00E-56	37,17%	QJD26160.1
>F1_013	proteína hipotética	<i>Schistocephalus solidus</i> toti-like virus 1	54%	4,00E-56	29,61%	QJD26155.1
>F1_007	proteína hipotética	<i>Schistocephalus solidus</i> toti-like virus 1	41%	3,00E-57	29,78%	QJD26155.1
>F1_004	proteína hipotética	<i>Schistocephalus solidus</i> toti-like virus 1	37%	3,00E-60	29,55%	QJD26155.1
>F1_005	proteína hipotética	<i>Schistocephalus solidus</i> toti-like virus 1	77%	3,00E-62	29,55%	QJD26155.1
>F6_004	proteína do capsídeo	<i>Totiviridae</i> sp.	85%	3,00E-62	31,73%	QXV86549.1
>F1_044	polimerase	<i>Schistocephalus solidus</i> toti-like virus 3	59%	3,00E-65	45,71%	QJD26160.1
>F1_079	polimerase	<i>Schistocephalus solidus</i> toti-like virus 3	80%	5,00E-66	35,73%	QJD26160.1
>F1_095	polimerase	<i>Schistocephalus solidus</i> toti-like virus 3	96%	1,00E-70	37,96%	QJD26160.1
>F6_001	desidrina	<i>Sanya</i> totivirus 12	98%	6,00E-72	29,52%	UHK03215.1
>F1_051	polimerase	<i>Schistocephalus solidus</i> toti-like virus 1	95%	5,00E-74	42,37%	QJD26156.1
>F1_081	polimerase	<i>Schistocephalus solidus</i> toti-like virus 1	80%	3,00E-81	42,14%	QJD26156.1
>F1_043	polimerase	<i>Schistocephalus solidus</i> toti-like virus 1	76%	2,00E-81	42,18%	QJD26156.1
>F1_048	polimerase	<i>Schistocephalus solidus</i> toti-like virus 1	92%	3,00E-86	42,79%	QJD26156.1
>F1_087	polimerase	<i>Schistocephalus solidus</i> toti-like virus 3	92%	1,00E-90	48,74%	QJD26160.1
>F1_069	polimerase	<i>Schistocephalus solidus</i> toti-like virus 1	64%	3,00E-91	41,69%	QJD26156.1
>F6_002	RNA polimerase dependente de RNA	<i>Sanya orius sauteri</i> totivirus 2	87%	8,00E-92	55,20%	UHR49801.1
>F1_085	proteína hipotética	<i>Sanya orius sauteri</i> totivirus 2	69%	1,00E-92	62,55%	UHR49804.1
>F1_061	polimerase	<i>Schistocephalus solidus</i> toti-like virus 3	93%	6,00E-96	48,29%	QJD26160.1
>F1_106	proteína hipotética	<i>Sanya orius sauteri</i> totivirus 2	90%	2,00E-102	76,81%	UHR49804.1
>F1_110	RNA polimerase dependente de RNA	<i>Sanya orius sauteri</i> totivirus 2	85%	1,00E-103	74,66%	UHR49805.1
>F1_099	proteína hipotética	<i>Sanya orius sauteri</i> totivirus 2	76%	2,00E-108	65,68%	UHR49804.1
>F1_104	RNA polimerase dependente de RNA	<i>Sanya orius sauteri</i> totivirus 1	97%	2,00E-109	50,90%	UHK03145.1
>F1_101	proteína hipotética	<i>Sanya orius sauteri</i> totivirus 2	82%	2,00E-113	79,75%	UHR49809.1
>F1_021	polimerase	<i>Schistocephalus solidus</i> toti-like virus 1	45%	2,00E-126	43,28%	QJD26156.1
>F1_003	polimerase	<i>Schistocephalus solidus</i> toti-like virus 3	22%	5,00E-133	46,21%	QJD26160.1
>F1_010	polimerase	<i>Schistocephalus solidus</i> toti-like virus 1	48%	2,00E-138	44,62%	QJD26156.1
>F1_088	proteína hipotética	<i>Sanya orius sauteri</i> totivirus 2	69%	7,00E-143	70,31%	UHR49804.1
>F1_094	proteína hipotética	<i>Sanya orius sauteri</i> totivirus 2	99%	5,00E-154	71,36%	UHR49804.1
>F1_080	RNA polimerase dependente de RNA	<i>Sanya orius sauteri</i> totivirus 2	78%	3,00E-154	82,65%	UHR49805.1
>F1_096	RNA polimerase dependente de RNA	<i>Sanya orius sauteri</i> totivirus 2	83%	2,00E-154	80,40%	UHR49805.1
>F1_067	RNA polimerase dependente de RNA	<i>Sanya orius sauteri</i> totivirus 2	63%	2,00E-155	80,84%	UHR49805.1
>F1_006	polimerase	<i>Schistocephalus solidus</i> toti-like virus 3	83%	2,00E-162	46,48%	QJD26160.1
>F1_062	polimerase	<i>Schistocephalus solidus</i> toti-like virus 3	72%	7,00E-166	47,42%	QJD26160.1
>F1_036	polimerase	<i>Schistocephalus solidus</i> toti-like virus 1	62%	6,00E-166	43,76%	QJD26156.1
>F1_032	polimerase	<i>Schistocephalus solidus</i> toti-like virus 1	61%	2,00E-166	44,02%	QJD26156.1
>F1_066	polimerase	<i>Schistocephalus solidus</i> toti-like virus 3	94%	2,00E-167	47,24%	QJD26160.1
>F1_045	polimerase	<i>Schistocephalus solidus</i> toti-like virus 1	67%	6,00E-169	44,18%	QJD26156.1
>F1_058	polimerase	<i>Schistocephalus solidus</i> toti-like virus 1	78%	9,00E-171	44,18%	QJD26156.1
>F1_001	polimerase	<i>Schistocephalus solidus</i> toti-like virus 1	33%	0	40,53%	QJD26156.1
>F1_002	polimerase	<i>Schistocephalus solidus</i> toti-like virus 1	35%	0	40,39%	QJD26156.1
>F1_008	polimerase	<i>Schistocephalus solidus</i> toti-like virus 1	57%	0	41,74%	QJD26156.1
>F1_047	RNA polimerase dependente de RNA	<i>Sanya orius sauteri</i> totivirus 2	62%	0	82,43%	UHR49805.1
>F1_012	polimerase	<i>Schistocephalus solidus</i> toti-like virus 1	65%	0	40,53%	QJD26156.1
>F1_046	polimerase	<i>Schistocephalus solidus</i> toti-like virus 1	84%	0	39,80%	QJD26156.1
>F1_071	RNA polimerase dependente de RNA	<i>Sanya orius sauteri</i> totivirus 2	85%	0	83,78%	UHR49805.1
>F1_040	polimerase	<i>Schistocephalus solidus</i> toti-like virus 3	86%	0	41,19%	QJD26160.1
>F1_037	proteína hipotética	<i>Sanya orius sauteri</i> totivirus 2	90%	0	75,69%	UHR49804.1
>F1_052	polimerase	<i>Schistocephalus solidus</i> toti-like virus 3	91%	0	42,97%	QJD26160.1
>F1_076	proteína hipotética	<i>Sanya orius sauteri</i> totivirus 2	93%	0	88,73%	UHR49804.1

ANEXOS

Diversidade viral em morcegos no Brasil: Uma revisão sistemática do período 2000 a 2020

Viral diversity in bats in Brazil: A systematic review from 2000 to 2020

DOI:10.34117/bjdv8n1-038

Recebimento dos originais:

07/12/2021 Aceitação para publicação:

05/01/2022

Wanderleyson Uchoa Abreu

Doutorando PPG-REDE Bionorte, Polo Pará, Universidade Federal do Oeste do Pará.
Campus Tapajós, Rua Vera Paz S/N CEP 68040-255, Salé, Santarém, PA, Brasil.
E-mail: uchoa_vet@yahoo.com.br

Luís Reginaldo Ribeiro Rodrigues

Doutor.

Laboratório de Genética e Biodiversidade, Instituto de Ciências da Educação,
Universidade Federal do Oeste do Pará. Campus Tapajós, Rua Vera Paz S/N CEP
68040-255, Salé, Santarém, PA, Brasil

RESUMO

Trata-se de uma revisão sistemática descritiva sobre a ocorrência de vírus em morcegos no território brasileiro, com base na pesquisa em bancos de dados sobre publicações científicas no período de 2000 a 2020. Foram consultadas as bases de dados: Pubmed, NCBI, ISI Web of Science, BIOSIS, Google Scholar e DbatVir. Após a seleção dos documentos obtidos, foram analisados 116 títulos que revelaram 43 espécies de morcegos do Brasil são hospedeiros de uma variedade de vírus representativa de 17 famílias. Houve maior registro do vírus rábico (Rhabdoviridae) e diversos coronavírus (Coronaviridae) isolados em morcegos de diferentes famílias. A pesquisa e o conhecimento sobre vírus de morcegos no Brasil está concentrada nas regiões sul e sudeste, o que contrasta com a baixa densidade de estudos na região norte, que por sua vez concentra a maior riqueza da quiropterofauna nacional. Os dados obtidos colocam o Brasil em destaque mundial como um *hotspot* para diversidade viral associada a morcegos e, são importantes para auxiliar políticas e programas de pesquisa visando interesse global prioritário em ecovigilância epidemiológica e saúde pública.

Palavras-chave: quirópteros, vírus, detecção viral, zoonóticos.

ABSTRACT

This is a descriptive systematic review on the occurrence of viruses in bats in Brazil, based on a database search of scientific publications from 2000 to 2020. The following databases were consulted: Pubmed, NCBI, ISI Web of Science, BIOSIS, Google Scholar and DbatVir. After selecting the documents obtained, 116 titles were analyzed, which revealed 43 species of bats in Brazil are hosts of a variety of viruses representative of 17 families. There was a greater record of rabies virus (Rhabdoviridae) and several coronaviruses (Coronaviridae) isolated in bats from different families. The research and knowledge on bat viruses in Brazil is concentrated in the southern and southeastern

regions, which contrasts with the low density of studies in the northern region, which in turn concentrates the greatest wealth of the national chiropteroфаuna. The data obtained place Brazil in global prominence as a hotspot for bat-associated viral diversity and are important to assist policies and research programs aimed at global priority interest in epidemiological surveillance and public health.

Keywords: chiroptera, viruses, viral detection, zoonotic.

1 INTRODUÇÃO

Depois dos roedores, os morcegos representam a segunda ordem de mamíferos com maior diversidade de espécies, o que proporcionalmente compreende 22% de todos mamíferos existentes (BURGIN *et al.* 2018). As notáveis adaptações que permitem aos morcegos serem os únicos mamíferos com a capacidade de voar possibilitaram a esses animais colonizar praticamente todos os ambientes terrestres, ficando ausente apenas nas regiões polares e ilhas oceânicas remotas (FINDLEY, 1993). O Brasil abriga cerca de 15% da diversidade de morcegos do mundo representada por 181 espécies distintas (NOGUEIRA *et al.* 2014).

Entre os mamíferos, os morcegos e roedores são os grupos que hospedam a maior diversidade de espécies virais com potencial zoonótico (MOLLENTZE e STREICKER, 2020). Estima-se que cerca de 75% das doenças infecciosas emergentes em humanos são zoonóticas e em grande parte associadas a hospedeiros de vida selvagem, incluindo os morcegos (OLIVAL, *et al.* 2017; BELTZ 2018; MORENS *et al.* 2020, OLIVAL *et al.* 2020). Desde a década de 1940, se observa o aumento da emergência de zoonoses ligadas a hospedeiros animais silvestres, o que tem sido considerado a maior ameaça à saúde humana em escala global (FAO, 2011). Sabe-se que esse fenômeno é complexo em sua natureza, porém está claro que pelo menos em parte, sua causa está ligada a fatores ambientais como a perda de funções ecossistêmicas, crescimento da população humana, perda da biodiversidade e mudanças climáticas (FAO, 2011).

Recentemente foram registradas importantes emergências virais associadas a reservatórios em morcegos, tais como vírus Nipah (RAHMAN *et al.* 2010; ANTHONY *et al.* 2013), vírus Marburg (TOWNER *et al.* 2009), vírus Ebola e vírus Hendra (DREXLER *et al.* 2009) e os coronavírus causadores das síndromes respiratórias agudas graves, MERS-CoV (WANG *et al.* 2014) e SARS-CoV (ZHU *et al.* 2020). A raiva é uma zoonose causada por *Lyssavirus* e sua transmissão através do contato homem- morcego é amplamente conhecida (PULLIAM *et al.* 2012).

Devido à recente onda de graves emergências virais, como por exemplo Ebola e as síndromes respiratórias (SARS e MERS), que levaram a morte de milhares de pessoas,

a imagem dos morcegos perante a sociedade tem sido fortalecida como animais hospedeiros e disseminadores de vírus mortais (LOPEZ-BAUCELLS *et al.* 2017). Entretanto, os morcegos são animais importantíssimos para o equilíbrio ecológicos dos ecossistemas e desempenham serviços ecológicos de alto valor para a humanidade, onde atuam como polinizadores, dispersores de sementes e reguladores da densidade populacional de insetos que podem se tornar pragas na agricultura (LOPEZ-BAUCELLS *et al.* 2017).

Neste trabalho desenvolvemos uma análise temporal dos últimos 20 anos sobre a identificação de vírus em morcegos no território brasileiro, visando contribuir para avançar o conhecimento sobre a diversidade e ocorrência de possíveis vírus com potencial zoonótico, assim como, na perspectiva de estudos para a descoberta de novos vírus.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 PESQUISA BIBLIOGRÁFICA

Dados sobre estudos virais em morcegos no Brasil foram extraídos de pesquisas científicas publicadas entre os anos de 2000 a 2020. As fontes foram identificadas sistematicamente usando o termo de busca "morcegos" combinado com diferentes *unitermos*, incluindo "parasita", "patógeno", "vírus", "Brasil", "América do Sul" e "países", em vários índices de periódicos e repositórios públicos (Pubmed, NCBI, ISI Web of Science, BIOSIS, Google Scholar e DbatVir) e nas respectivas vias de rastreamento de acompanhamento recursivo da literatura citada por cada fonte, evitando assim a duplicidade de informações. A estratégia de busca, adotada para cada base de dados, foi composta também por termos combinados, a partir dos operadores booleanos "AND" e "OR". Os descritores foram buscados nos idiomas em inglês e seus respectivos equivalentes em português, considerando-se título, ano e abstract das publicações.

Foram classificados dados sobre taxonomia e hábito alimentar dos morcegos, amostra biológica utilizada para o diagnóstico viral, método de detecção e tipificação de variante viral, cidade e estado de coleta do material biológico. Os resultados também foram complementados usando entradas de informações recentemente publicados de viromas de morcego (CHEN *et al.* 2014). Os nomes dos vírus seguiu-se a partir do relatório do Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus - ICTV (SIDDELL *et al.* 2020). Em seguida, obtivemos o número de vírus compartilhados com humanos, definido assim como os vírus zoonóticos, no banco de dados de taxonomia de vírus – UniProt. Fizemos uma análise comparativa dos dados obtidos no Brasil em relação aos demais países da América do Sul.

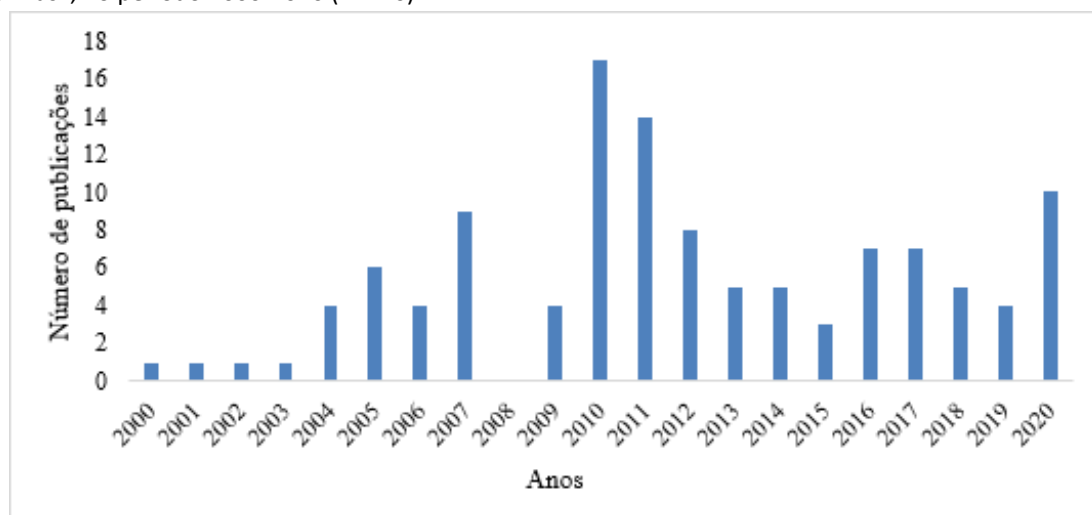
As informações coletadas foram sistematizados por meio de tabelas e gráficos para a síntese dos resultados. Para o agrupamento dos dados foram elencados, para cada estudo incluído, termos chave referentes aos seus principais achados, já citados anteriormente. A elaboração deste manuscrito obedeceu aos itens recomendados pelo CASP - Systematic Review Checklist (CASP, 2018).

3 RESULTADOS

A busca inicial identificou 623 publicações com base no título e abstract. Após a exclusão de duplicatas, por não estarem de acordo com o período proposto do estudo ou não apresentarem dados completos ao tema proposto, obteve-se a recuperação de 116 títulos, por apresentarem os critérios para a abordagem qualitativa proposta para o estudo e que, após o processo de triagem e consulta de listas de referências, todos foram selecionados por ter registro de Taxonomia, validados no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) das sequências e coleções virais.

O número de trabalhos foi heterogêneo ao longo do período, mas nota-se uma tendência de aumento nos anos entre 2010 a 2020, sendo que o maior número de trabalhos ocorreu em 2010 (n=17), enquanto que o menor (n=1) ocorreu nos anos de 2000 a 2003 (Figura 1). Em 2008, nenhum trabalho sobre isolamento viral em morcegos do Brasil foi publicado.

Figura 1: Frequência de trabalhos publicados sobre isolamento viral em amostras biológicas de morcegos do Brasil, no período 2000-2020 (n=116)



No Brasil durante o período de 2000-2020, foram isolados 17 vírus e suas variantes de 17 famílias virais obtidos de amostras biológicas de 43 espécies de morcegos coletados em 13 estados (Tabela 1). Os morcegos estudados pertencem a quatro famílias: Phyllostomidae (17 espécies), Vespertilionidae (14 espécies), Molossidae (11 espécies) e Mormoopidae (1 espécie). Essas espécies possuem os seguintes hábitos alimentares: Onívoro, Hematófago, Insetívoro, Nectarívoro e Frugívoro (Tabela 1).

Tabela 1 - Vírus isolados em morcegos do Brasil classificados de acordo com diferentes tipos de dieta. ONI

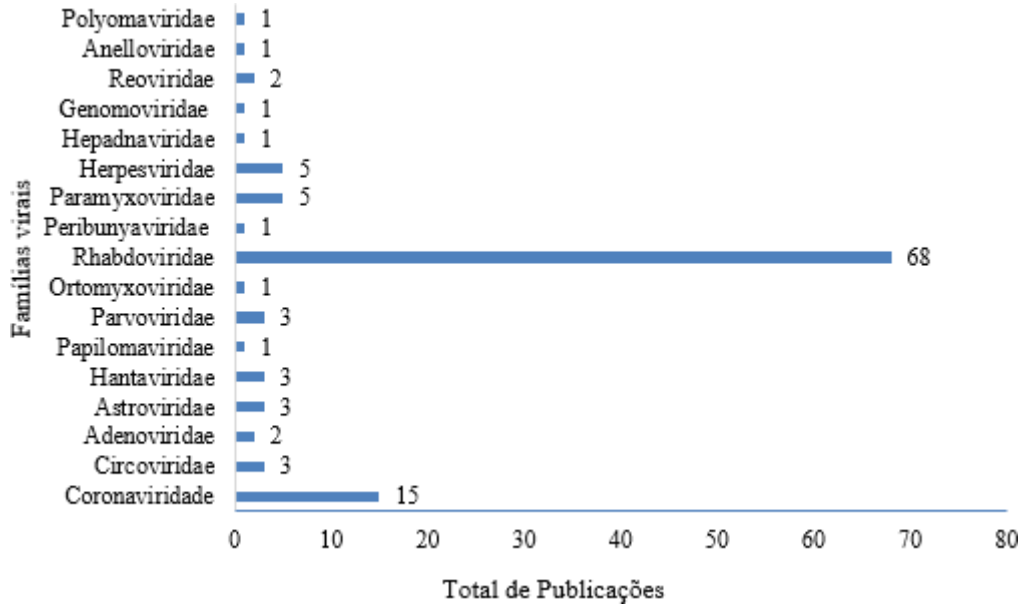
– Onívoro, HEM – hematófago, INS – insetívoro, NEC – Nectarívoro e FRU – frugívoro. Fonte: Tabela Adaptada do repositório DBatVir database (<http://www.mgc.ac.cn/DBatVir/>)

MORCEGO	DIET A	VÍRUS
<i>Anoura caudifer</i>	ON I	Bat coronavírus, Hantavírus
<i>Carollia brevicauda</i> , C.		Bat coronavírus, Paramyxovírus, Hantavírus,
<i>perspicillata</i>		Bat coronavírus, Paramyxovírus
<i>Phyllostomus discolor</i> , P.		Bat coronavírus, Vírus rábico,
<i>hastatus</i>		
<i>Glossophaga soricina</i>		
<i>Desmodus rotundus</i>	HE M	Vírus rábico, Hantavírus, Parvovírus, Bat coronavírus, Rotavírus A, Paramyxovírus
<i>Diphylla ecaudata</i>		Vírus rábico, Hantavírus,
<i>Eptesicus</i> sp. <i>E. diminutus</i> , <i>E. furinalis</i>	IN S	Bat coronavírus, Vírus rábico,
<i>Eumops auripendulus</i> , <i>E. glaucinus</i>		Bat coronavírus, Vírus rábico,
<i>Histiotus</i> sp. <i>H. velatus</i>		Vírus rábico,
<i>Lasiurus blossevillii</i> , <i>L. borealis</i> , <i>L. cinereus</i> , <i>L. ega</i>		Vírus rábico
<i>Cynomops</i> sp. <i>C. abrasus</i>		Vírus rábico, Bat coronavírus
<i>Molossops neglectus</i>		
<i>Molossus</i> sp. <i>M. abrasus</i> , <i>M. currentium</i> , <i>M. rufus</i>		Vírus rábico, Bat coronavírus
<i>Myotis albescentis</i> , <i>M. nigricans</i> , <i>M. riparius</i>		Vírus rábico
<i>Nyctinomops laticaudatus</i>		Bat coronavírus, Gemykibivirus 1
<i>Pteronotus parnellii</i>		Bat coronavírus, Astrovírus, Vírus rábico, Herpesvírus,
<i>Tadarida</i> sp. <i>T. brasiliensis</i> , <i>T. laticaudata</i>		Circovírus, Paramyxovírus, Polyomavirus
<i>Lichonycteris obscura</i>	NE C	Bat coronavírus
<i>Lonchophylla thomasi</i>		Herpesvírus
<i>Artibeus</i> sp. <i>A. lituratus</i> , <i>A. planirostris</i> , <i>A. fimbriatus</i> , <i>A. jamaicensis</i>	FR U	Vírus rábico, Bat coronavírus, Adenovírus, Papilomavírus, Parvovírus, Influenza A vírus, Astrovírus. Paramyxovírus, Paramyxovírus
<i>Mesophylla macconnelli</i>		Bat coronavírus
<i>Platyrrhinus lineatus</i>		Bat Hepatitis B vírus, Bat coronavírus, Mapuera vírus,
<i>Sturnira lilium</i>		Adenovírus.

A maior parte dos trabalhos com detecção viral em morcegos no Brasil ocorreu na família Rabdoviridae (58,6%), seguido por Coronaviridae (12,9%), Herpesviridae e

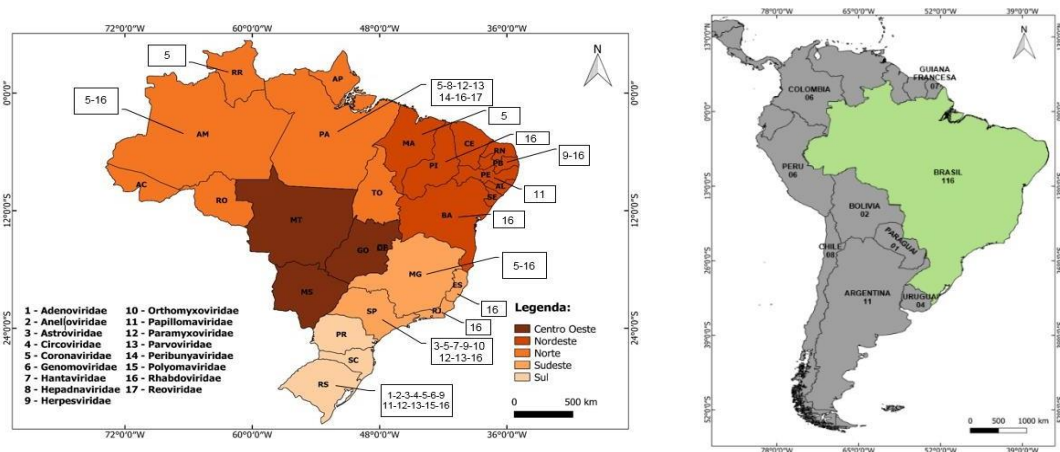
Paramyxoviridae ambas com 4,3%. Além destas, foram registrados isolados virais de outras 13 famílias (Figura 2).

Figura 2- Diversidade de Familiais de vírus isolados em morcegos no Brasil e número de publicações identificadas por família



As regiões Sul e Sudeste do Brasil foram as que mais desenvolveram estudos sobre isolamento de vírus a partir de amostras biológicas de morcegos, sendo que os estados que lideram esse campo de pesquisa são o Rio Grande do Sul com a identificação de 12 famílias virais seguido por São Paulo com 8 famílias virais (Figura 3). Na região Norte o Pará enumerou 7 diferentes tipos de Famílias virais. O Brasil obteve o maior número de pesquisas, quando comparado aos demais países da América do Sul (Figura 3).

Figura 3 - Espécies de vírus identificadas em morcegos, por estados do Brasil, no período de 2000 a 2020 (esquerda). Comparativo do N de registros nos bancos de dados de estudos virais em morcegos nos países da América do Sul, no mesmo período (direita)



A respeito dos métodos de detecção viral, observamos que os métodos moleculares de PCR e suas variações e o sequenciamento de nova geração (SNG) foram empregados na maioria dos estudos e em diferentes amostras biológicas, enquanto que técnicas sorológicas e de isolamento em células foram menos utilizadas (Tabela 2).

Tabela 2 - Vírus, amostras biológicas e métodos de detecção viral em morcegos identificados no Brasil no período de 2000 a 2020 e sua relação de ocorrência em humanos.

Vírus	Amostra Biológica	Método de Detecção	Infecção humana
Adenovírus	Swabs oral, anal, fezes e intestino	PCR, CC e SNG	Relatada
Astrovírus	Swabs oral, anal, fezes e mix de tecidos	PCR e SNG	Relatada
Bat coronavírus	Swabs oral, sangue, anal, fezes e mix de tecidos	PCR, CC e SNG	Relatada
Bat Hepatitis B vírus	Intestinos e fígado	PCR e SNG	Não relatada
Circovírus	Sangue	PCR e SNG	Não relatada
Hantavírus	Fezes	PCR	Relatada
Herpesvírus	Tecido - Intestinos	PCR	Relatada
Influenza A vírus	Saliva, fezes	PCR, SOR e SNG	Relatada
Mapuera vírus	Swab anal	PCR	Relatada
Papilomavírus	Tecidos (rins, intestinos)	PCR	Não relatada
Paramyxovírus	Fezes, urina e tecidos (intestinos, rins)	PCR e SNG	Relatada
Parvovírus	Fezes e intestinos	PCR e SNG	Relatada
Polyomavírus	Fezes e Mix de tecidos (intestinos, rins, fígado)	PCR	Relatada
Vírus rábico	Swab oral (Saliva) e Tecido - Cérebro	PCR, SOR, CC	Relatada

SNG: Sequenciamento de Nova Geração. CC: Cultura celular. SOR: Sorologia. PCR: Reação de Cadeia de Polimerase

4 DISCUSSÃO

Historicamente, a partir do isolamento do vírus da raiva em morcegos insetívoros nos Estados Unidos e com avanço dos estudos no campo da virologia ficou evidente a possibilidade de que os morcegos também seriam reservatório para outros tipos de vírus (HALPIN *et al.* 2007). Seguindo essa linha de investigação de muitos tipos virais já foram identificados em morcegos ao redor do mundo, inclusive no Brasil, como os Flavivírus, Arenavírus, Paramyxovirus e alguns vírus não classificados (SULKIN e ALLEN, 1974; HALPIN *et al.* 2007).

A noção de que os morcegos são reservatórios de grande diversidade de espécies virais, inclusive aquelas com potencial zoonótico, é bem estabelecida atualmente. A adaptabilidade dos morcegos como hospedeiros virais pode ser relacionada com vários aspectos de sua biologia e história natural, como a alta longevidade (OLIVAL *et al.* 2017), a resposta imune (O'SHEA *et al.*, 2014), a amplificação viral decorrente de fatores reprodutivos (DIETRICH *et al.*, 2015), a aglomeração em abrigos e cavernas (LUIS *et al.*, 2015). Outro ponto a se destacar é o voo autônomo, pois as grandes distâncias percorridas durante a busca por alimentos ou durante a migração, são descritos como fatores de exposição a novos vírus (WANG e POON, 2011). Os morcegos

possuem dietas muito heterogêneas, desde hábito insetívoros e fitófagos generalistas até altamente especializado como a hematofagia. O hábito alimentar está diretamente relacionada com a diversidade viral de morcegos que apresentam perfil alimentares diferentes (TEIXEIRA, 2016).

No Brasil, os morcegos das famílias Phyllostomidae e Molossidae foram os mais pesquisados para detecção viral. A família Phyllostomidae é endêmica da região Neotropical e representa o grupo mais comum de morcegos nessa região (TAVOLONI, 2006). Essas duas famílias também são muito frequentes em áreas urbanas do Brasil (PACHECO *et al.* 2010), o que pode explicar a maior densidade de estudos sobre detecção viral nesses grupos de morcegos.

Com base na análise de material genético, pelo menos 30 famílias de vírus já foram isoladas de amostras biológicas de morcegos no mundo (<http://www.mgc.ac.cn/cgi-bin/DBatVir/main.cgi>) (CHEN *et al.* 2014). Neste sentido, o Brasil com 17 famílias virais identificadas em morcegos e, considerando-se que apenas uma pequena parte (23,75%) da quiropteroфаuna brasileira foi estudada nos últimos 20 anos, pode ser considerado um *hotspot* da diversidade viral associada a morcegos. Tais informações sobre prospecção viral em morcegos no Brasil, fomentam dados para a ecovigilância epidemiológica, controle sanitário e saúde pública.

A maior parte dos estudos registrados reportam sobre a detecção do vírus rábico (família Rhabdoviridae), o que é claramente explicado pelo fato desse vírus causar a raiva, uma das mais importantes zoonoses virais, sendo responsável por perdas econômicas devido à morte de animais de produção e levar a óbito mais de 60 mil pessoas por ano em todo o mundo (WHO, 2019). Na região Neotropical, os morcegos atuam como hospedeiros do vírus rábico, sendo o Brasil um dos países mais afetados por essa zoonose (ESCOBAR *et al.* 2015, KUZMIN *et al.* 2011).

Os coronavírus foram registrados em diversas espécies de morcegos de diferentes famílias em nossa pesquisa. A família Coronaviridae abriga dois grupos *Alpha*- e *Betacoronavirus* e inclui espécies virais que infectam diferentes grupos de mamíferos, incluindo o homem, e podem ocasionar doenças como as Síndromes respiratórias agudas (WOO *et al.* 2012; FAN e ZHAO 2019). A recente emergência do coronavírus SARS-CoV2 no final de 2019, levou a uma gravíssima crise mundial devido a rápida disseminação da COVID-19, uma síndrome respiratória aguda com elevadas taxa de contágio e mortalidade (BENVENUTO *et al.* 2020). Análises filogenéticas sugerem que o SARS-CoV2 pode ter se originado a partir de um morcego (BENVENUTO *et al.*

2020), portanto a vigilância epidemiológica e pesquisa científica nesse campo tem sido tratadas como uma agenda prioritária em escala global.

O acompanhamento do processo saúde-doença no espaço, mas especificamente daquelas causadas por estipes virais que afetam o homem e animais de produção, favorece os estudos antigênicos e genéticos das espécies isoladas em morcegos, e elucida o quão importante a criação de um perfil de distribuição espacial de ocorrência desses vírus em seus reservatórios naturais, e traz ainda, embasamento para pesquisas em epidemiologia e em saúde pública (MACKENZIE e JEGGO, 2013).

Destacamos ainda, que a distribuição dos isolados virais por região brasileira tende a avançar a partir de novos estudos que abordem a modelagem espacial, a fim de esclarecer a dinâmica dentro e entre os hospedeiros de vírus potencialmente zoonóticos identificados nos morcegos, o que seria um passo promissor para o desenvolvimento de políticas e ações de vigilância epidemiológica na intenção de se prevenir o transbordamento viral para seres humanos (ANECIA et. al. 2020).

Nos últimos anos, os métodos moleculares e metagenômicos tornaram-se mais comuns no campo da descoberta de novos vírus, possivelmente por se mostrarem mais eficientes e de alta especificidade (VIGNE *et al.* 2018, CHEN *et al.* 2014), em comparação a métodos tradicionais como os ensaios sorológicos, em que a reatividade cruzada de anticorpos para vários patógenos pode levar à diminuição da especificidade e produzir resultados confusos ou inconclusivos (GILBERT *et al.* 2013). Sabe-se ainda, que o uso esporádico de isolamento viral em cultura celular é correspondente as limitações impostas por esta técnica, uma vez que, tal metodologia é trabalhosa e necessita de laboratórios limitados com capacidades de contenção, e também, não se consegue realizar a caracterização fenotípica completa de um vírus, se este for um vírus “novo” (CALISHER e TESH, 2014).

A pesquisa sobre detecção viral em morcegos no Brasil avançou nos últimos 10 anos, porém ainda representa um estágio inicial visto que apenas cerca de ¼ das espécies de morcegos registradas no país foram estudadas, além disso grande parte dos trabalhos se concentrou nas regiões sul e sudeste. O conhecimento atual sobre o tema coloca o Brasil em posição de destaque mundial, como um *hotspot* para diversidade viral associada a morcegos, visto que mais da metade das famílias de vírus que possuem morcegos como hospedeiros já foram registradas no país.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a FAPESPA pela concessão de bolsa de doutorado e ao PPG RedeBionorte – UFOPA/UFPA).

REFERÊNCIAS

ANECIA, D. G., SARAH, G., CARLY R. A Review of mechanistic Models of viral dynamics in bat reservoirs for zoonotic disease. *Pathogens and Global Health*. V 114. N 8 Pag. 407-425. 2020. <https://doi.org/10.1080/20477724.2020.1833161>.

ANTHONY, S. J., EPSTEIN, J. H., MURRAY, K. A., NAVARRETE-MACIAS, I., ZAMBRANA-TORRELIO, C. M., SOLOVYOV, A., OJEDA-FLORES, R., ARRIGO, N. C., ISLAM, A., ALI KHAN, S., HOSSEINI, P., BOGICH, T. L., OLIVAL, K. J., SANCHEZ-LEON, M. D., KARESH, W. B., GOLDSTEIN, T., LUBY, S. P., MORSE, S. S., MAZET, J. A., DASZAK, P., ... LIPKIN, W. I. A strategy to estimate unknown viral diversity in mammals. *M. Bio*, 4(5), e00598-13. .2013. <https://doi.org/10.1128/mBio.00598-13>.

BENVENUTO, D., GIOVANETTI, M., CICCOCCHI, A., SPOTO, S., ANGELETTI, S., CICCOCCHI, M. The 2019-new coronavirus epidemic: Evidence for virus evolution. *J Med Virol*. 2020;1–5. <https://doi.org/10.1002/jmv.25688>

BURGIN, C. J., COLELLA, J. P., KAHN, P. L. e UPHAM, N. S. How many species of mammals are there? *J. Mammalogy* 99, 1–14. 2018. <https://doi.org/10.1093/jmammal/gyx147>.

CALISHER, C.H., TESH, R.B. Two misleading words in reports of virus discovery: little things mean a lot. *Arch Virol*. 159(8):2189-91.2014. <https://doi.org/10.1007/s00705-014-2008-4>.

CASP (Critical Appraisal Skills Programme. Systematic). Review Checklist. 2018.

Disponível em <https://casp-uk.net/casp-tools-checklists/>. Acesso em: 09 fev. 2021.

CHEN, L., LIU, B., YANG, J., JIN, Q. DBatVir: the database of bat-associated viruses. *Database (Oxford)*. 2014. <https://doi.org/10.1093/database/bau021>.

DIETRICH, M., WILKINSON, D.A., BENLALI, A., LAGADEC, E., RAMASINDRAZANA, B., DELLAGI, K. e TORTOSA, P. Leptospira and paramyxovirus infection dynamics in a bat maternity enlightens pathogen maintenance in wildlife. *Environ. Microbiol*. 17, 4280– 4289. 2015. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12766>.

DREXLER, J. F., CORMAN, V. M., GLOZA-RAUSCH, F., SEEBENS, A., ANNAN, A., IPSEN, A., KRUPPA, T., MÜLLER, M. A., KALKO, E. K., ADU-SARKODIE, Y., OPPONG, S., e DROSTEN, C. Henipavirus RNA in African bats. *PloS one*, 4(7), 2009. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006367>.

ESCOBAR, L.E., PETERSON, A., FAVI M, YUNG, V., MEDINA-VOGEL, G. Bat-borne rabies in Latin America. *Ver. Inst. Med.Trop. São Paulo* 57:63-72. 2015. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652015000100009>.

FAN Y, ZHAO K, SHI ZL, ZHOU P. Bat Coronaviruses in China. *Viruses*.11(3):210. 2019. <https://doi.org/10.3390/v11030210>.

FAO/OIE/WHO. Joint Scientific Consultation Writing Committee. Influenza and other emerging zoonotic diseases at the human-animal interface. Proceedings of the FAO/OIE/WHO Joint Scientific Consultation, 27-29 April 2010, Verona (Italy). FAO Animal Production and Health Proceedings, No. 13. Rome, Italy. 2011.

FINDLEY, JS. Bats – a community perspective. Cambridge University Press, Cambridge. 1993

GILBERT AT, FOOKS AR, HAYMAN DT, HORTON DL, MÜLLER T, PLOWRIGHT R, PEEL AJ, BOWEN R, WOOD JL, MILLS J, CUNNINGHAM AA, RUPPRECHT CE. Deciphering serology to understand the ecology of infectious diseases in wildlife. *Ecohealth*. 201. <https://doi.org/10.1007/s10393-013-0856-0>.

HALPIN K, HYATT AD, PLOWRIGHT RK, EPSTEIN JH, DASZAK P, FIELD HE, WANG L, DANIELS PW. Henipavirus Ecology Group Emerging viruses: coming in on a wrinkled wing and a prayer. *Clin Infect Dis* 44:711-717. 2007. <https://doi.org/10.1086/511078>.

KUZMIN, I.V., BOZICK, B., GUAGLIARDO, S.A., KUNKEL, R., SHAK, J.R., TONG, S., RUPPRECHT, C.E. Bats, Emerging infectious diseases, and the Rabies Paradigm revisited. *Emerg Health Threats J*.4:7159. 2011. <https://doi.org/10.3402/ehth.v4i0.7159>.

LÓPEZ-BAUCELLS, A., R. ROCHA, Z. ANDRIATAFIKA, T. TOJOSOA, J. KEMP, K. FORBES, AND M. CABEZA. Roost Selection by Synanthropic Bats in Rural Madagascar: What Makes Non-Traditional Structures So Tempting? *Hystrix* 28:28–35. 2017. <https://doi.org/10.4404/hystrix-28.1-12046>.

LUIS, A.D., O'SHEA, T.J., HAYMAN, D.T.S., WOOD, J.L.N., CUNNINGHAM, A.A., GILBERT, A.T., MILLS, J.N. e WEBB, C.T. Network analysis of host-virus communities in bats and rodents reveals determinants of cross-species transmission. *Ecol. Lett.* **18**, 1153– 1162. 2015. <https://doi.org/10.1111/ele.12491>.

MACKENZIE, J.S., JEGGO, M. Reservoirs and vectors of emerging viruses. *Curr Opin Virol*.;3(2):170-9. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2013.02.002>.

MOLLENTZE, N., STREICKER, D.G. Viral zoonotic risk is homogenous among taxonomic orders of mammalian and avian reservoir hosts. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 117, 9423–9430. 2020. <https://doi.org/10.1073/pnas.1919176117>.

MORENS D.M. DASZAK P. TAUBENBERGER J.K. Escaping Pandora's Box - Another Novel Coronavirus. *N Engl J Med*.; 382: 1293-1295. 2020. <https://doi.org/10.1056/NEJMp2002106>.

NOGUEIRA M, GREGORIN R, DE LIMA I, TAVARES V, MORATELLI R, PERACCHI A. Checklist of Brazilian bats, with comments on original records. *Check List* 10(4): 808-821. 2014. <https://doi.org/10.15560/10.4.808>.

OLIVAL, K.J., HOSSEINI, P.R., ZAMBRANA-TORRELIO, C., ROSS, N., BOGICH, T.L., DASZAK, P. Host and viral traits predict zoonotic spillover from mammals. *Nature* 546, 646–650. 2017. <https://doi.org/10.1038/nature22975>.

OLIVAL KJ, LATINNE A, ISLAM A, EPSTEIN JH, HERSCH R, ENGSTRAND RC, GURLEY ES, AMATO G, LUBY SP, DASZAK P. Population genetics of fruit bat reservoir informs the dynamics, distribution and diversity of Nipah virus. *Mol Ecol*. Mar;29(5):970-985. 2020. <https://doi.org/10.1111/mec.15288>.

O'SHEA, T. J., CRYAN, P. M., CUNNINGHAM, A. A., FOOKS, A. R., HAYMAN, D. T., LUIS, A. D., PEEL, A. J., PLOWRIGHT, R. K., e WOOD, J. L. Bat flight and zoonotic viruses. *Emerging infectious diseases*, 20(5), 741–745. 2014. <https://doi.org/10.3201/eid2005.130539>.

PACHECO SM, SODRÉ M, GAMA AR, BREDT A, CAVALLINI EM, MARQUES RV, GUIMARÃES MM BIANCONI G Morcegos urbanos: status do conhecimento e plano de ação para a conservação no Brasil. *Chiroptera Neotropical*. 16:629-647. 2010.

PULLIAM, J. R. C., J. H. EPSTEIN, J. DUSHOFF, S. A. RAHMAN, M. BUNNING, A. A. JAMALUDDIN, A. D. HYATT, *et al.* Agricultural intensification, priming for persistence and the emergence of Nipah virus: a lethal bat-borne zoonosis. *Journal of the Royal Society Interface* 9:89–101.2012. <https://doi.org/10.1098/rsif.2011.0223>.

RAHMAN, S. A., HASSAN, S. S., OLIVAL, K. J., MOHAMED, M., CHANG, L. Y., HASSAN, L., SAAD, N. M., SHOHAIMI, S. A., MAMAT, Z. C., NAIM, M. S., EPSTEIN, J. H., SURI, A. S., FIELD, H. E., DASZAK, P. Characterization of Nipah virus from naturally infected *Pteropus vampyrus* bats, Malaysia. *Emerging infectious diseases*, 16(12), 1990–1993. 2010. <https://doi.org/10.3201/eid1612.091790>.

SIDDELL, S.G., WALKER, P.J., LEFKOWITZ, E.J. *et al.* Binomial nomenclature for virus species: a consultation. *Arch Virol* 165, 519–525. 2020. <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04477-6>.

SULKIN, SE, ALLEN R .Virus infections in bats. In: Melnick JL (ed) *Monographs in virology.*, vol 8. S. Karger, New York, pp 170-175. 1974.

TAVOLONI, P. Diversity and frugivory of phyllostomus bats (Chiroptera, Phyllostomidae) in the secondary habitats and plantations of *Pinus* spp., in the municipality of Anhembi - SP. *Mastozoologia Neotropical* 14:120-120. 2006. <https://doi.org/10.1590/S1676-06032006000200036>

TEIXEIRA, P. G. O hábito alimentar dos morcegos (Mammalia, Chiroptera) e sua relação com a diversidade viral. 2016. 87 f., il. Dissertação (Mestrado em Zoologia) - Universidade de Brasília, Brasília, 2016. <https://repositorio.unb.br/handle/10482/22270>.

TOWNER, J. S., AMMAN, B. R., SEALY, T. K., CARROLL, S. A., COMER, J. A., KEMP, A., SWANEPOEL, R., PADDOCK, C. D., BALINANDI, S., KHRISTOVA, M. L., FORMENTY, P. B., ALBARINO, C. G., MILLER, D. M., REED, Z. D., KAYIWA, J. T., MILLS, J. N., CANNON, D. L., GREER, P. W., BYARUHANGA, E., FARNON,

E. C. ROLLIN, P. E. Isolation of genetically diverse Marburg viruses from Egyptian fruit bats. *PLoS Pathogens*, 5(7), (2009). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000536>.

VIGNE E, GARCIA S, KOMAR V, LEMAIRE O AND HILY J-M Comparison of Serological and Molecular Methods With High-Throughput Sequencing for the Detection and Quantification of Grapevine Fanleaf Virus in Vineyard Samples. *Front. Microbiol.* 9:2726. 2018. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02726>.

WANG, Q., QI, J., YUAN, Y., XUAN, Y., HAN, P., WAN, Y., JI, W., LI, Y., WU, Y., WANG, J., IWAMOTO, A., WOO, P. C., YUEN, K. Y., YAN, J., LU, G., e GAO, G. F. Bat origins of MERS-CoV supported by bat coronavirus HKU4 usage of human receptor CD26. *Cell host & microbe*, 16(3), 328–337. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.08.009>.

WANG, L.F., WALKER, P.J. e POON, L.L.M. Mass extinctions, biodiversity and mitochondrial function: Are bats “special” as reservoirs for emerging viruses? *Curr. Opin. Virol.* 1, 649– 657. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2011.10.013>.

WHO Rabies Modelling Consortium. The potential effect of improved provision of rabies post-exposure prophylaxis in Gavi-eligible countries: a modelling study. *Lancet Infect Dis.* Jan;19(1):102-111. 2019. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30512-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30512-7).

WOO, P. C., LAU, S. K., LAM, C. S., LAU, C. C., TSANG, A. K., LAU, J. H., BAI, R., TENG, J. L., TSANG, C. C., WANG, M., ZHENG, B. J., CHAN, K. H., e YUEN, K. Y. Discovery of seven novel Mammalian and avian coronaviruses in the genus deltacoronavirus supports bat coronaviruses as the gene source of alphacoronavirus and betacoronavirus and avian coronaviruses as the gene source of gammacoronavirus and deltacoronavirus. *Journal of virology*, 86(7), 3995–4008. 2012. <https://doi.org/10.1128/JVI.06540-11>.

ZHU, N., ZHANG, D., WANG, W., LI, X., YANG, B., SONG, J., *et al.* A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N. Engl. J Med.* 382:727-33. 2020. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001017>.

Sequências Retrovirais de interesse em Medicina Veterinária identificadas em Morcegos urbanos da Amazônia

Retroviral Sequences of interest in Veterinary Medicine identified in urban bats from the Amazon

Secuencias retrovirales de interés en Medicina Veterinaria identificadas en murciélagos urbanos de la Amazonia

Recebido: 14/07/2022 | Revisado: 25/07/2022 | Aceito: 27/07/2022 | Publicado: 05/08/2022

Wanderleyson Uchôa Abreu

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9217-1170>

Universidade Federal do Oeste do Pará, Brasil.

E-mail: uchoa_vet@yahoo.com.br

Luis Reginaldo Ribeiro Rodrigues.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2849-0382>

Universidade Federal do Oeste do Pará, Brasil.

E-mail: luisreginaldo.ufpa@hotmail.com

Antonio Charlys da Costa

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5516-5177>

Universidade de São Paulo, Brasil.

E-mail: charlysbr@yahoo.com.br

Vanessa dos Santos Moraes

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3813-3154>

Universidade de São Paulo, Brasil.

E-mail: va.morais@usp.br

Adriane Castro de Paula

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9027-7542>

Universidade da Amazonia, Brasil.

E-mail: drianydipaula@gmail.com

Eduardo Alves Barreiros

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9922-6725>

Instituto Brasileiro de Recursos Avançados, Brasil

E-mail: medvet.rise@gmail.com

Resumo

Os morcegos são reservatórios de uma diversidade de vírus. Dentre os viromas registrados em morcegos, os retrovírus estão entre as famílias de vírus mais significativas, pois causam infecção persistente nos animais. Relatórios recentes de retrovírus circulando em populações de morcegos tem identificado vários retrovírus de outros animais nesses mamíferos. Objetivou-se a partir de Metagenômica viral, identificar sequências retrovirais de interesse em Medicina Veterinária, em espécies de morcegos urbanos da Amazônia. A partir do Sequenciamento de Nova Geração (SNG) na Plataforma Illumina e baseado no BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), analisamos 168 amostras (56 de sangue, 56 de swab oral e 56 de swab anal) de 56 morcegos das espécies *Noctilio albiventris* (n= 18), *N. leporinus* (n=1), *Artibeus lituratus* (n=13), *Myotis* sp. (n= 6) e *Molossus molossus* (n=18). Como resultado observamos que quatro gêneros de retrovírus tiveram leituras, sendo eles: Alpharetrovirus, Betaretrovirus, Gammaretrovirus e Lentivirus. Os pools de swab oral apresentaram mais número contigs virais identificados por similaridade no BLAST. As sequências retrovirais totais foram: *Duck infectious anemia virus*, *Feline leukemia virus*, *Gibbon ape leukemia virus*, *Avian leukosis virus*, *Reticuloendotheliosis virus*, *Feline immunodeficiency virus*, *Mason Pfizer monkey virus*, *Enzootic nasal tumour virus of goat* e *Simian retrovirus Y*. Mostramos a partir de nossa análise metagenômica, que há circulação de retrovírus de outros reservatórios, como felinos, ovinos e aves, na quiroptero fauna da região e reportamos tais registros com o intuito de alertar sobre a vigilância permanente de morcegos para novos retrovírus e investigações de características biológicas e potencial infeccioso de tais vírus.

Palavras-chave: Viroma; Quirópteros; Metagenômica; Illumina.

Abstract

Bats are reservoirs of a diversity of viruses. Among the viruses recorded in bats, retroviruses are among the most significant virus families because they cause persistent infection in the animals. Recent reports of retroviruses circulating in bat populations have identified several retroviruses from other animals in these mammals. We aimed from viral Metagenomics, to identify retroviral sequences of interest in Veterinary Medicine, in Amazonian urban bat species. Using Next Generation Sequencing (SNG) on

Illumina Platform and based on BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), we analyzed 168 samples (56 from blood, 56 from oral swab and 56 from anal swab) from 56 bats of the species *Noctilio albiventris* (n=18), *N. leporinus* (n=1), *Artibeus lituratus* (n=13), *Myotis* sp. (n=6) and *Molossus molossus* (n=18). As a result, we observed that four genera of retroviruses had readings, these being: Alpharetrovirus, Betaretrovirus, Gammaretrovirus and Lentivirus. The oral swab pools had more number of viral contigs identified by similarity in BLAST. The total retroviral sequences were: *Duck infectious anemia virus*, *Feline leukemia virus*, *Gibbonape leukemia virus*, *Avian leukosis virus*, *Reticuloendotheliosis virus*, *Feline immunodeficiency virus*, *Mason Pfizer monkey virus*, *Enzootic nasal tumour virus of goat* e *Simian retrovirus Y*. We show from our metagenomic analysis, that there is circulation of retroviruses from other reservoirs, such as felines, sheep and birds, in the chiroptero fauna of the region and report such records in order to warn about permanent surveillance of bats for new retroviruses and investigations of biological characteristics and infectious potential of such viruses.

Keywords: Viroma; Chiroptera; Metagenomics; Illumina.

Resumen

Los murciélagos son reservorios de una gran variedad de virus. Entre los virus registrados en los murciélagos, los retrovirus se encuentran entre las familias de virus más significativas porque causan una infección persistente en los animales. Los informes recientes sobre los retrovirus que circulan en las poblaciones de murciélagos han identificado varios retrovirus de otros animales en estos mamíferos. Este estudio tuvo como objetivo identificar secuencias retrovirales de interés en medicina veterinaria en especies de murciélagos urbanos de la región amazónica, utilizando la metagenómica viral. A partir de la secuenciación de nueva generación (NGSS) en la plataforma Illumina y basándonos en BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), analizamos 168 muestras (56 de sangre, 56 de hisopo oral y 56 de hisopo anal) de 56 murciélagos de las especies *Noctilio albiventris* (n=18), *N. leporinus* (n=1), *Artibeus lituratus* (n=13), *Myotis* sp. (n=6) y *Molossus molossus* (n=18). Como resultado observamos que cuatro géneros de retrovirus tenían lecturas, estos son: Alpharetrovirus, Betaretrovirus, Gammaretrovirus y Lentivirus. Los grupos de hisopos orales presentaron un mayor número de contigs virales identificados por similitud en BLAST. Las secuencias retrovirales totales fueron las siguientes: *Duck infectious anemia virus*, *Feline leukemia virus*, *Gibbon ape leukemia virus*, *Avian leukosis virus*, *Reticuloendotheliosis virus*, *Feline immunodeficiency virus*, *Mason Pfizer monkey virus*, *Enzootic nasal tumour virus of goat* e *Simian retrovirus Y*. Demostramos, a partir de nuestro análisis metagenómico, que hay circulación de retrovirus de otros reservorios, como felinos, ovejas y aves, en la quiroptero fauna de la región e informamos de tales registros para alertar sobre la vigilancia permanente de los murciélagos en busca de nuevos retrovirus y las investigaciones de las características biológicas y el potencial infeccioso de tales virus.

Palabras clave: Viroma; Chiroptera; Metagenómica; Illumina.

1. Introdução

Os morcegos são reservatórios de diversas famílias virais e estão implicados na transmissão de numerosos vírus altamente patogênicos para humanos e outros mamíferos (Hayman, 2016). E estudos recentes sugeriram que o número de espécies que a ordem Chiroptera (morcegos) apresenta, em relação a maioria das demais espécies entre os mamíferos, está diretamente associada a variedade de vírus encontrados nesses animais (Mollentze *et al.* 2020).

Dentre os viromas já descritos em morcegos, os retrovírus, que causaram um impacto global importante na saúde humana e animal, ainda tem seu papel pouco esclarecido em quirópteros (Hayman, 2016). Os retrovírus são vírus de RNA de sentido positivo de fita simples que incorporam seus genomas como pro-vírus em genomas cromossômicos do hospedeiro após transcrição reversa para cDNA. Membros da família Retroviridae infectam uma grande variedade de espécies hospedeiras (Goff, 2013). Quando os retrovírus se integram às células da linhagem germinativa, eles se tornam “verticalmente” transmissíveis de pais para filhos e são chamados de retrovírus endógenos (ERVs) e quando são transmitidos para outras espécies, tornando-se infecciosos, são chamados de retrovírus exógenos (XRVs) (Stoye, 2012).

Alguns retrovírus infecciosos circulantes em morcegos foram relatados recentemente (Hayward *et al.* 2020). O conhecimento sobre esses vírus em morcegos, tem crescido constantemente nas últimas duas décadas, a partir dos estudos de sequências retrovirais dentro de genomas de morcegos, que estão presentes devido às principais características do ciclo de replicação retroviral (Tachedjian *et al.* 2015).

Vários retrovírus causam imunodeficiência (por exemplo, HIV) e doenças malignas como leucemia (por exemplo, retrovírus de coala (KoRV) (Tarlinton *et al.* 2006). Em animais, são também relevantes as doenças que os retrovírus exógenos (XRV) estabelecem, sendo os principais representantes desta família na veterinária: o Vírus da Anemia Infecciosa Equina (EIAV), o Vírus da Leucose Bovina (BLV), os Lentivirus de pequenos ruminantes, incluindo os Vírus da Artrite-encefalite Caprina

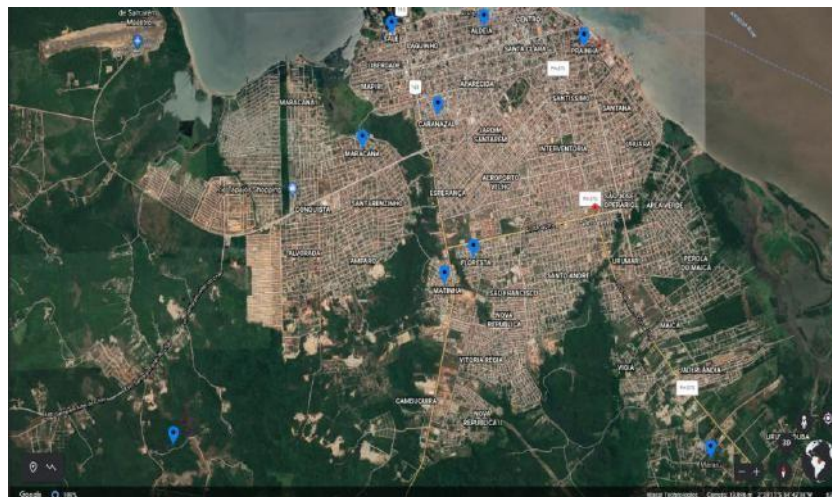
(CAEV) e o Vírus da pneumonia progressiva dos ovinos (Maedi-Visna), o Vírus da Imunodeficiência Felina (FIV), o Vírus da Leucemia Felina (FeLV) e o Vírus da Leucose aviária (Reis, 2012).

Assim, como a contínua variedade de dados em escala genômica do viroma de quirópteros gera a oportunidade para registrar a ocorrência da diversidade de retrovírus de outras espécies de mamíferos circulando em morcegos, objetivou-se, a partir do estudo de Metagenômica viral, identificar sequências de gêneros e espécies retrovirais de interesse em Medicina Veterinária em morcegos urbanos.

2. Metodologia

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Oeste do Pará (CEUA/UFOPA Nº 0220220128) e autorizado pelo Sistema de Informação e Autorização da Biodiversidade (SISBIO; Nº18313-1). Obtivemos a amostragem de material biológico (56 amostras de sangue (S) – 56 amostras de swab anal (SA) e 56 amostras de swab oral (SO), de 56 morcegos pertencentes a 4 famílias (Phyllostomidae, Molossidae, Vespertilionidae e Noctilionidae) das espécies *Noctilio albiventris* (n= 18), *N. leporinus* (n=1), *Artibeus lituratus* (n=13), *Myotis* sp. (n= 6) e *Molossus molossus* (n=18), capturados em 09 locais do Município de Santarém-PA (Latitude: 2° 26' 22" Sul, Longitude: 54° 41'55" Oeste), Mesorregião do Baixo Amazonas (Figura 1).

Figura 1. Mapa do Município de Santarém-PA-Brasil e localizações dos pontos de capturas dos morcegos (pontos em azul).

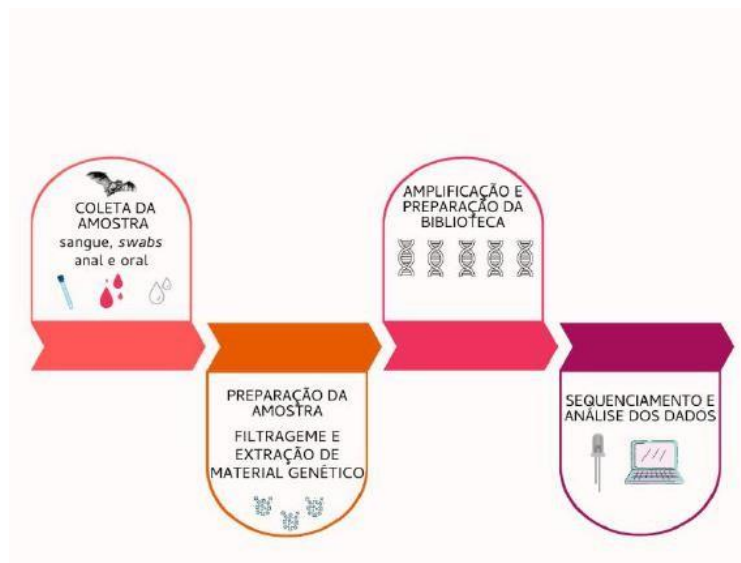


Fonte: Adaptação de imagem do earth.google.com/web/search/Santarém/Pa.

Inicialmente as amostras (sangue, swabs oral e anal) foram diluídas em 500 µL de solução salina tamponada de Hanks (HBSS), adicionada a um tubo de 2 ml contendo matriz de lise C (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, EUA) e homogeneizado em Vórtex. Em seguida foram submetidas a um “giro suave”, 8000 rpm, por 5 min para remover detritos grandes, e os sobrenadantes foram colocados através de filtros de 0,45 µm (Merck Millipore, Billerica, MA, EUA) para remover partículas do tamanho de células eucarióticas e bacterianas. As alíquotas dos filtrados foram ressuspensas com 250 µl de PBS para tratamento com enzimas nucleases.

A etapa seguinte foi a realização da extração dos ácidos nucleicos virais, realizada utilizando o QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Alemanha) que purifica o RNA e o DNA, e as etapas seguiram-se de acordo com as instruções do fabricante. O fluxo de trabalho para o sequenciamento seguiu-se das etapas de preparação das amostras, com filtragem e extração dos ácidos nucleicos virais até a etapas de sequenciamento de nova geração (SNG) e estão resumidas na Figura 2 e descritas logo em seguida.

Figura 2. Resumo em Fluxograma das atividades no estudo Metagenômico viral das amostras biológicas dos morcegos para o sequenciamento na plataforma Illumina.



Fonte: Autores.

Para a preparação das bibliotecas da plataforma Illumina, os produtos de PCR foram verificados em gel de agarose em seguida coletados fragmentos de DNA de 500-1000 pb com esferas Ampure - SAGE BluePippin Targeted Size Selection (1,5% agarose, 250bp - 1,5kb). A preparação das bibliotecas foi feita como o kit Nextera XT DNA Sample Preparation Kit (Illumina Inc.) seguindo as orientações do fabricante. O sistema Agilent 2100 Bioanalyzer e o kit KAPA foram utilizados para fazer a qualificação e quantificação da biblioteca.

Em seguida as Bibliotecas, agrupadas em *pools*, foram sequenciadas na plataforma Illumina NovaSeq-6000, para fornecer leituras emparelhadas de 100 bp, com o kit TruSeq PE Cluster v3 e o kit TruSeq SBS v3 (Illumina). As leituras brutas obtidas do sequenciamento Illumina foram pré-processadas, onde: a) os registros de sequência de extremidades emparelhadas foram removidos de ambas as extremidades, b) as sequências com baixa qualidade (dados brutos gerados de leituras com comprimento inferior a 100 bp) e as sequências do adaptador e dos *primers* foram cortadas, usando o VecScreen baseado em BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) nos parâmetros padrão (McGinnis e Thomas, 2004) e por fim, c) as leituras que continham homopolímero e leituras duplicadas foram identificadas e removidas.

Os dados de bioinformática foram analisados de acordo com o protocolo descrito em outros estudos (Denget *et al.* 2015). Os *contigs* resultantes de retrovírus de interesse em Medicina Veterinária foram comparados utilizando o BLASTx e BLASTn para pesquisar similaridade com proteínas virais e nucleotídeos, respectivamente, a partir do banco de dados de sequências genéticas GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Os melhores resultados das pesquisas no BLAST (com maior percentual de similaridade de sequência já depositada no Genbank) foram selecionados e para reduzir o número de correspondências aleatórias, os valores E (e-value) foram definidos em cada busca.

3. Resultados

A análise dos 33 pools das amostras (sangue, *swabs* oral e anal) por Illumina NovaSeq gerou cerca de 1,3 milhões de sequências de leitura bruta. E embora a plataforma apresente alto rendimento de leituras, com um grande número de resultados

para diferentes famílias virais, nos detemos neste estudo apenas a exposição de leituras para família Retroviridae. Do total de *contigs* obtidos, foram identificados 04 gêneros de retrovírus (alpha -, beta – gamma e lentivírus) registrados em todas as espécies de morcegos do estudo.

O maior número de registros de sequências virais que apresentam interesse em Medicina Veterinária, foram nas amostras de *swab* oral (nº=7), seguido das amostras de sangue (nº = 4) (Tabela 1). Dois importantes Lentivírus apresentaram leituras nas amostras de *swab* oral, sendo eles *Simian retrovirus Y* e o *Feline immunodeficiency virus* (FIV).

Tabela 1. Visão geral de retrovírus identificados nos Pools de *swab* oral, *swab* anal e Sangue.

Gênero	Pool <i>swab</i> Oral (vírus de interesse)	Pool <i>swab</i> anal de interesse)	(vírus	Pool Sangue (vírus de interesse)
	<i>Duck infectious anemia virus</i>			<i>Duck infectious anemia virus</i>
Gammaretrovirus	<i>Feline leukemia virus</i> <i>Gibbon ape leukemia virus</i>			<i>Reticuloendotheliosis virus</i>
Alpharetrovirus	<i>Avian leukosis virus</i>			
Betaretrovirus	<i>Mason Pfizer monkey virus</i>	<i>Enzootic nasal tumour virus of goat</i>		<i>Enzootic nasal tumour virus of goat</i>
Lentivirus	<i>Feline Immunodeficiency virus</i> <i>Simian retrovirus Y</i>	<i>Simian retrovirus Y</i>		

Fonte: Autores.

A Tabela 2 resume o número de leituras filtradas (comprimento/qualidade) obtidas por pool com o número de leituras virais e leituras virais correspondentes em todos os pools. As sequências retrovirais aqui identificadas representam nucleotídeos que codificam as proteínas polimerase (Pol), glicoproteínas de envelope (Env) e aquelas envolvidas no processo de replicação viral (Poliproteínas gag). Os vírus *Reticuloendotheliosis vírus*, *Duck infectious anemia vírus*, e *Feline leukemia vírus*, que causam doenças em aves e gato doméstico, respectivamente, foram os que tiveram maior número de leituras (Hits) (n=53, n=13 e n=23).

Tabela 2. Retrovírus identificados nas leituras por *pools* e o nº acesso dos melhores resultados recuperados no BLASTn eBLASTx do banco de dados NCBI e a proteína correspondente às sequências identificadas.

<i>Pools</i> *	Vírus Correspondente	Hits	Compr. (nt)*	Vírus Correspondente ^o Acesso	Proteína Correspondente	ID %*	e-value*
SO	<i>Avian leukosis virus</i>	1	251	AUT36432.1	Poliproteína (Env)	55,88	0,035
SO	<i>Mason Pfizer monkey virus</i>	2	250	AAA47711.1	Poliproteína	70,37	3e-04
SO e SA	<i>Simian retrovirus Y</i>	2	251	BAM71050.1	Poliproteína	79,52	1e-39
SO e S	<i>Duck infectious anemia virus</i>	13	251	AGV92858.1	Proteína gag	66,67	0.011
SO e S	<i>Feline immunodeficiency virus</i>	1	251	AHZ63409.1	Proteína gag	41,67	3.3e-06
SO	<i>Feline leukemia virus</i>	23	251	AYG96585.1	Poliproteína (Env)	71,19	9e-07
SO	<i>Gibbon ape leukemia virus</i>	1	251	ALV83303.1	Poliproteína	50,00	1e-05
SA e S	<i>Enzootic nasal tumour virus of</i>	2	251	ANG58663.1	Proteína gag	44,44	1e-14
S	<i>goats Reticuloendotheliosis virus</i>	53	251	YP_223871.1	Polimerase (Pol)	51,72	4e-05

*SA: *swab* anal. SO: *swab* oral. S: Sangue. Env: envelope. Compr. (nt): comprimento do nucleotídeo. ID%: percentual de similaridade/identidade com o vírus correspondente do GenBank. Fonte: Autores.

4. Discussão

Estudos anteriores revelaram a presença dos gêneros *Betaretrovirus*, *Gammaretrovirus* e *Deltaretrovirus* dentro dos genomas de morcegos (Hayward *et al.* 2013; McMichael *et al.* 2019), assim como observado em nossa pesquisa, e apesar de não termos feito a filogenia das sequências, as análises das relações evolutivas entre esses ERVs de morcegos e os de outros mamíferos, seriam de grande relevância, pois sugerem que os morcegos desempenham um papel fundamental na transmissão

deretrovírus entre diferentes espécies de mamíferos (Hayward *et al.* 2013; Cui, e al. 2015).

Relatamos aqui, sequências relacionadas a gammaretrovírus de morcego em todas espécies estudadas (*M. molossus*, *A. lituratus*, *Myotis* sp., *N. leporinus* e *N. albiventris*), tanto em amostras de swab oral quanto de sangue. Os gammaretrovírus também foram detectados anteriormente em 10 outras espécies de morcegos, na China, Austrália e em Gana (Cui *et al.* 2012a; Cui *et al.* 2012b; Baker *et al.* 2013).

Similaridade quanto a nossos resultados, sobre a presença de Betaretrovírus em morcegos, pode ser observados também a partir de análises de transcriptoma e genoma de morcegos das espécies *Pteropus alecto* (raposa voadora preta) e *Pteropus vampyrus* (raposa voadora grande), *Myotis lucifugus* (morcego marrom), *Rhinolophus megaphyllus* (morcego-ferradura oriental) e *Rhinolophus ferrumequinum* (maior morcego-ferradura) (Hayward *et al.* 2013). Nesse estudo, foram verificados uma gama diversificada de Betaretrovirus ERVs, já em nossa pesquisa, apenas EXRs foram descritos.

De acordo com estudos anteriores em transcriptoma de sete espécies de morcego (*Rhinolophus ferrumequinum*, *R. pusillus*, *R. pearsoni*, *R. megaphyllus*, *R. affinis*, *Myotis ricketti* e *Pteropus alecto*), o registro de gammaretrovírus que exibem um padrão filogenético consistente, cogitou a possibilidade de que os gammaretrovírus existentes em mamíferos, podem ter sido originado de morcegos (Cui *et al.* 2012a). Para que possamos ter dados mais robustos a respeito desse padrão, os *contigs* gerados nos morcegos amostrados em Santarém-Pa, para esses retrovírus, devem ser submetidos as análises filogenéticas para que essa teoria precise claramente ser verificada em nosso estudo, e se podemos definir se nosso achado pode ser devido à integração de material genômico retroviral nos genomas do quirópteros ou de uma indicação de infecção viral.

Os morcegos são os únicos mamíferos capazes de voar ativamente, o que lhes permite atravessar barreiras físicas e se adaptar em paisagens de grande heterogeneidade ambiental, tais como áreas urbanas conectadas por ambientes seminaturais como parques, praças, quintais e jardins, o que pode formar um potencial elo de transmissão viral entre várias espécies de animais, selvagens e domésticos (Hayward e Tachedjian, 2021). Tal assertiva pode amparar os registros retrovirais na diversidade das amostras de morcegos que analisamos, uma vez que os morcegos são particularmente susceptíveis a receber retrovírus de outros mamíferos (Hayward *et al.* 2015).

O sequenciamento de alto rendimento adotado neste estudo é uma ferramenta de pesquisa, que permite “descobrir” uma grande diversidade de novos vírus, sendo que normalmente muitos não poderiam ser identificados por métodos tradicionais como de cultura de vírus (Delwart, 2007). Embora nossa abordagem metagenômica tivesse foco na identificação de novas sequências retrovirais, mineramos *contigs* de vírus de importância veterinária, por causarem doenças crônicas graves em animais, e mesmo que as informações sobre uma região limitada do genoma retroviral e os retrovírus possam sofrer recombinação, inclusive entre diferentes gêneros, impedindo a identificação precisa ou confiável com base em sequências curtas (centenas a milhares de nucleotídeos), os resultados obtidos mostram confiabilidade das sequências correspondentes, verificadas pelo BLAST, que são relatadas como pontuações de probabilidade (*e-value*) e é uma ferramenta que utiliza o GenBank, uma confiável fonte de dados genéticos.

5. Considerações Finais

Mostramos que na área urbana de Santarém-PA, há circulação de diferentes gêneros retrovirais de ocorrência natural em animais de interesse em Medicina Veterinária, na diversidade de morcegos da região, como pode ser constatada na análise Metagenômica das diferentes amostras biológicas pelo Sequenciamento na Plataforma Illumina. Todas as amostras tiveram leituras sequenciadas e os Gammaretrovírus mostraram-se mais abundantes, bem como os *pools* de saliva (swab oral) apresentaram numericamente mais leituras. Dentre os *contigs* dos morcegos, encontramos nucleotídeos e proteínas retrovirais de felinos, de ovinos e de patos e outras aves.

Diante de nossos resultados, podemos inferir que há necessidade de estudos permanentes de ecovigilância destes

morcegos urbanos, e que a pesquisa metagenômica para novos retrovírus e investigações de características biológicas e potencial

infeccioso dos vírus de morcegos, podem promover uma abordagem proativa no que diz respeito ao transbordamento de retrovírus para outros mamíferos e o homem. Outrossim, sugerimos futuramente a realização de estudos virais nas espécies animais envolvidas na transmissão desses vírus, para ampliar o entendimento da dinâmica viral entre eles e a quiropetrofauna da região.

Agradecimentos

Este trabalho teve apoio da Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal – Bionorte, da Fundação Amazônia Paraense de Amparo à Pesquisa – Fapespa, Centro de Estudos do Genoma Humano – Instituto de Biociências – USP e do Instituto de Medicina Tropical – USP.

Referências

- Baker, K. S., Leggett, R. M., Bexfield, N. H., Alston, M., e Daly, G. (2013). Metagenomic study of the viruses of African straw-coloured fruit bats: Detection of a chiropteran poxvirus and isolation of a novel adenovirus. *Virology*, 441, 95–106.
- Cui, J., Tachedjian, G., Tachedjian, M., Holmes, E.C., e Zhang, S. (2012a). Identification of diverse groups of endogenous gammaretroviruses in mega- and microbats. *Journal of General Virology*, 93, 2037–2045. <https://doi.org/10.1099/vir.0.043760-0>.
- Cui, J., Tachedjian, G., e Wang, L.F. (2015). Bats and Rodents Shape Mammalian Retroviral Phylogeny. *Scientific Reports*, 9(5), 165561.
- Cui, J., Tachedjian, M., Wang, L., Tachedjian, G., e Wang, L. F. (2012b). Discovery of retroviral homologs in bats: implications for the origin of mammalian gammaretroviruses. *Journal of Virology*, 86, 4288–4293. <https://doi.org/10.1128/JVI.06624-11>.
- Denget, X., Naccache, S. N., Nig, T., Federman, S., Li, L., Chiu, C.Y., e Delwart, E.L. (2015). An ensemble strategy that significantly improves de novo assembly of microbial genomes from metagenomic next-generation sequencing data. *Nucleic Acids Research*, 20, 43(7), 46. 10.1093/nar/gkv002.
- Delwart, E. L. (2007). Viral metagenomics. *Reviews in medical virology*, 17 (2), 115–131. <https://doi.org/10.1002/rmv.532>.
- Goff, S. P. (2013). Retroviridae. In *Fields Virology*. (pp1424-1473). Edited by D. M. Knipe e P. M. Howley: Lippincott, Williams e Wilkins.
- Hayward, J. A., Grabherr, M., e Jern, P. (2013). Broad-scale phylogenomics provides insights into retrovirus-host evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 10(50), 20146-51. 10.1073/pnas.1315419110.
- Hayward, J. A., Tachedjian, M., Cui, J., Field, H., Holmes, E.C., Wang, L.F. e Tachedjian, G. (2013). Identification of diverse full-length endogenous betaretroviruses in megabats and microbats. *Retrovirology*, 27, 10-35. 10.1186/1742-4690-10-35.
- Hayward, J. A., Tachedjian, M., Kohl, C., Johnson, A., Dearnley, M., Jesaveluk, B., e Nitsche, A. (2020). Infectious KoRV-related retroviruses circulating in Australian bats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 28 (17), 9529-9536. 10.1073/pnas.1915400117.
- Hayward, J. A., e Tachedjian, G. (2021). Retroviruses of Bats: a Threat Waiting in the Wings? *Sociedade Americana de Microbiologia mBio*, 26(5), 19-41. 10.1128/mBio.01941-21.
- Hayman, D. T. (2016). Bats as Viral Reservoirs. *Annual Review of Virology*, 29 (1), 77-99. 10.1146/annurev-virology-110615-042203.
- McGinnis, S., e Thomas, L. M. (2004). “BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools.” *Nucleic acids research*, 32, 20-25. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh435>
- McMichael, L., Smith, C., Gordon, A., Agnihotri, K., Meers, J., e Oakey, J. (2019). A novel Australian flying-fox retrovirus shares an evolutionary ancestor with Koala, Gibbon and Melomys gamma-retroviruses. *Virus Genes*, 55(3), 421-424. 10.1007/s11262-019-01653-3.
- Mollentze, N., e Streicker, D. G. (2020). Viral zoonotic risk is homogenous among taxonomic orders of mammalian and avian reservoir hosts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 28(17), 9423-9430. 10.1073/pnas.1919176117.
- Reis, J. K. P. (2012). Retrovírus Animais. *Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia*. 64, 65-76.
- Stoye, J. P. (2012). Studies of endogenous retroviruses reveal a continuing evolutionary saga. *Nature Reviews Microbiology*, 8(6), 395-406. 10.1038/nrmicro2783.
- Tachedjian, G., Hayward, J. A., e Cui, J. (2015). Bats and reverse transcribing RNA and DNA viruses (pp 177–201. In Wang L-F. Cowled C (ed), *Bats and es: a new frontier of emerging infectious diseases*. John Wiley e Sons, Inc, Hoboken, NJ. 10.1002/9781118818824.ch7.
- Tarlinton, R. E., Meers, J., e Young, P. R. (2006). Retroviral invasion of the koala genome. *Nature*. 442, 79–81.

Article

Novel *Chaphamaparvovirus* in Insectivorous *Molossus* Bats, from the Brazilian Amazon Region

Endrya do Socorro Foro Ramos ^{1,†} , Wandercleyson Uchôa Abreu ^{2,†}, Luis Reginaldo Ribeiro Rodrigues ³, Luis Fernando Marinho ⁴, Vanessa dos Santos Moraes ⁵ , Fabiola Villanova ¹ , Ramendra Pati Pandey ⁶ , Emerson Luiz Lima Araújo ⁷ , Xutao Deng ^{7,8}, Eric Delwart ^{8,9} , Antonio Charlys da Costa ^{5,†}  and Elcio Leal ^{1,*} 

¹ Laboratório de Diversidade Viral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belem 66075-000, Pará, Brazil

² Programa de Pos-Graduação REDE Bionorte, Polo Pará, Universidade Federal do Oeste do Pará, Santarém 68040-255, Pará, Brazil

³ Laboratory of Genetics & Biodiversity, Institute of Educational Sciences, Universidade Federal do Oeste do Pará, Santarém 68040-255, Pará, Brazil

⁴ Department of Agricultural Sciences, School of Veterinary Medicine, University of Amazonia, Santarém 68040-255, Pará, Brazil

⁵ Laboratory of Virology (LIM 52), Instituto de Medicina Tropical, Universidade de São Paulo, São Paulo 05403-000, São Paulo, Brazil

⁶ Centre for Drug Design Discovery and Development (C4D), SRM University, Delhi-NCR, Rajiv Gandhi Education City, Sonapat 131029, Haryana, India

⁷ General Coordination of Public Health, Laboratories of the Strategic Articulation, Department of the Health, Surveillance Secretariat, Ministry of Health (CGLAB/DAEVS/SVS-MS), Brasília 70719-040, Distrito Federal, Brazil

⁸ Department Laboratory Medicine, University of California San Francisco, San Francisco, CA 94143, USA

⁹ Vitalant Research Institute, San Francisco, CA 94143, USA

* Correspondence: elcioleal@gmail.com

† These authors contributed equally to this work.

‡ These authors jointly supervised this work.



Citation: Ramos, E.d.S.F.; Abreu, W.U.; Rodrigues, L.R.R.; Marinho, L.F.; Moraes, V.d.S.; Villanova, F.; Pandey, R.P.; Araújo, E.L.L.; Deng, X.; Delwart, E.; et al. Novel *Chaphamaparvovirus* in Insectivorous *Molossus molossus* Bats, from the Brazilian Amazon Region. *Viruses* **2023**, *15*, 606. <https://doi.org/10.3390/v15030606>

Academic Editor: Jianming Qiu

Received: 14 January 2023

Revised: 17 February 2023

Accepted: 18 February 2023

Published: 22 February 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: *Chaphamaparvovirus* (CHPV) is a recently characterized genus of the *Parvoviridae* family whose members can infect different hosts, including bats, which constitute the second most diverse order of mammals and are described worldwide as important transmitters of zoonotic diseases. In this study, we identified a new CHPV in bat samples from the municipality of Santarém (Pará state, North Brazil). A total of 18 *Molossus molossus* bats were analyzed using viral metagenomics. In five animals, we identified CHPVs. These CHPV sequences presented the genome with a size ranging from 3797 to 4284 bp. Phylogenetic analysis-based nucleotide and amino acid sequences of the VP1 and NS1 regions showed that all CHPV sequences are monophyletic. They are also closely related to CHPV sequences previously identified in bats in southern and southeast Brazil. According to the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) classification criteria for this species (the CHPV NS1 gene region must have 85% identity to be classified in the same species), our sequences are likely a new specie within the genus *Chaphamaparvovirus*, since they have less than 80% identity with other CHPV described earlier in bats. We also make some phylogenetic considerations about the interaction between CHPV and their host. We suggest a high level of specificity of CPHV and its hosts. Thus, the findings contribute to improving information about the viral diversity of parvoviruses and show the importance of better investigating bats, considering that they harbor a variety of viruses that may favor zoonotic events.

Keywords: *Chaphamaparvovirus*; metagenomics; *Molossus*; virome; diversity; bats; Amazon

1. Introduction

Bats are the second largest order of mammals after rodents; they comprise nearly 20% of all classified mammal species worldwide, with over 1400 species. The order was divided recently into two suborders: *Yinpterochiroptera* (or *Pteropodiformes*), which has five families (i.e., *Rhinopomatidae*, *Rhinolophidae*, *Hipposideridae*, *Craseonycteridae* and *Megadermatidae*) and *Yangochiroptera* (or *Espertilioniformes*) with fourteen families (i.e., *Emballonuridae*, *Furipteridae*, *Miniopteridae*, *Molossidae*, *Mormoopidae*, *Mystacinidae*, *Myzopodidae*, *Natalidae*, *Noctilionidae*, *Nycteridae*, *Phyllostomidae*, *Thyropteridae*, *Cistugidae*, *Vespertilionidae*) [1]. Many bats are insectivores, and most of the rest are frugivores (fruit eaters) or nectarivores (nectar eaters). A few species feed on animals other than insects; for example, vampire bats feed on blood. Most bats are nocturnal, and many roost in caves or other refuges [2]. Since they can fly, it probably enabled them to spread widely into all regions [3]. Apart from the Arctic, the Antarctic and a few isolated oceanic islands, bats exist in almost every habitat on Earth. Tropical areas tend to have more species than temperate ones. They are important in their ecosystems for pollinating flowers and dispersing seeds; many tropical plants depend entirely on bats for these services [2].

Bats are widely regarded as special virus reservoirs due to their association with several important zoonoses, including severe acute respiratory syndrome-related coronavirus (SARS-CoV), Nipah henipavirus (*Paramyxoviridae*) and Ebola viruses (*Filoviridae*) [4–6]. However, transmission to humans usually involves an intermediate animal host (such as pigs, camels and horses). Besides, although there is constant contact between humans and bats in some world regions, most viral families that appear regularly in bat virome analysis have not yet spilled over into human populations [7,8].

Potentially, viruses that infect bats can be transmitted to other species by many routes, such as oral-fecal, droplets, airborne and contact with body fluids or tissues [9]. Direct transmission from bats to human has been ascertained by epidemiological and molecular evidence. This was the case of the outbreaks of Nipah virus in Bangladesh associated with the consumption of raw palm tree sap [10]. Other examples of direct bat-to-human spillovers include several Marburg virus outbreaks across Africa [11] and outbreaks of Lyssaviruses globally [12]. Likewise, retrospective serological studies revealed Henipavirus spillover among bat hunters in Cameroon [13] and Filovirus exposure of bat hunters in India [14]. There is indirect bat-to-human spillover involving intermediate hosts, including the Hendra virus in 1994 involving horses [15] and the Nipah virus in Malaysia in 1997 and 1998 related to the infection of pigs [16]. More recently, the SARS-CoV 2002–2003 outbreak in southern China and the 2019 SARS-CoV-2 emergence in central China were retrospectively connected to bat populations and appeared to involve intermediate hosts [17,18]. There is also the possibility that some viruses (arboviruses) are vectored by hematophagous insects from bats to humans and other species [19]. Despite the overlap of ecological niches of bats with many hematophagous arthropods such as *Aedes* mosquitoes, the potential role for bats as reservoirs for arboviruses is still unclear [19,20]. For example, Dengue virus nucleic acid and antibodies have been detected in wild-caught Mexican and Caribbean bats [21], but experimental infections of *Artibeus* sp. bats with DENV-2, DENV serotypes 1 and 4 resulted in low levels of viremia, low rates of seroconversion and a lack of detection of viral RNA [22,23]. In addition, an extensive survey in 205 bats captured in households from Costa Rica found low frequency and low levels of DEN [20], thus suggesting that bats have little impact as reservoir hosts for DENV.

The distinctiveness of these flying mammals contributes to the zoonotic risk posed by bat viruses. Bats have a wide range of species; they live all over the globe, and some migrate. They are social animals with very large roosting numbers and species cohabitation, which creates an ideal environment for virus transmission [8,24]. It is important to understand how the flight-adapted physiology of bats leads to a significant viral burden [7,25], because the normal pathology observed in humans and experimental animal models in response to viral infection does not appear to occur in bats [26,27]. Bats are sometimes considered silent virus carriers. This could be due to their distinct anti-inflammatory and proinflammatory

responses, as well as distinct immunological attributes such as the low number of interferon genes and the fact that interferon genes are always produced in the absence of an activated immune response [28].

In fact, about 75% of human infectious diseases are zoonoses [25–29], of which a considerable proportion are transmitted by either rodents or bats [30,31]. Although bats have more zoonotic viruses per species, the total number of zoonotic viruses found in bats is smaller than in rodents due to the fact that there are almost twice as many rodent species as bat species. As a result, rodents should remain a critical concern as new viral reservoirs [32,33]. However, bats exhibit an unusual immunological response to viral infections [28]. It has been proposed that rapidly transmitting viruses that have evolved with bat immune systems will likely cause increased pathogenicity after emergence in secondary hosts [34]. This may potentially enhance the emergence of occasional epidemics such as SarsCov2 [25,35,36]. Therefore, to further assess the zoonotic potential of virus-infecting bats, a greater understanding of their antiviral responses is required.

In this context, as Brazil is a continental country, recently experiencing vast deforestation in the Amazon region, there is also a great diversity of bats in the country. Brazil bears one of the greatest diversities of bats in the world; there are 184 species, distributed in 72 genera and 9 families [37,38]. According to the Database of bat-associated viruses (<http://www.mgc.ac.cn/cgi-bin/DbatVir>, accessed on 9 February 2023), there are 755 sequences of viruses identified in bats in Brazil. Majority of these viruses belong to the *Rhabdoviridae* family (60.5%), followed by the family (21.2%) (see Table S1 for details). There are only three sequences of viruses in the *Parvoviridae* family identified so far in Brazilian bats [39,40]. It is known that parvoviruses constitute a highly diversified group of viruses and can infect vertebrate and invertebrate hosts [41]. Therefore, the investigation of this family of viruses in different species need to be better explored [42,43].

In this study we used a metagenomic next generation (NGS) approach to analyze the diversity of viruses in the endemic insectivorous *Molossus molossus* bats captured in the municipality of Santarém, North Brazil. We found a new species of *Chaphamaparvovirus* (CHPV) *Molossus molossus* bats and performed a phylogenetic study to show that there are at least three CHPV species in Brazilian bats. We also raised some hypotheses about the interaction between CHPV and its hosts. These data contribute to improving information on viral diversity in bats and the surveillance of zoonotic diseases in North Brazil.

2. Materials and Methods

2.1. Sample Collection

Bats were captured in the municipality of Santarém, located in the state of Pará in the lower Amazon region. In total, 18 *Molossus molossus* were captured. The velvety free-tailed bat, or Pallas's mastiff bat (*Molossus molossus*), is a bat species in the family *Molossidae* [44]. They have short, velvety, very soft fur, ranging from dark brown to reddish brown; the whole body or parts of it have white spots in different parts (ears, wing membrane, fur and tail), while in the second there is a total absence of melanin. The tail is thick and free of its membrane, and for this last characteristic they are popularly known as free-tailed bats. Their weight ranges from 10 to 30 g, making them medium-sized among bats. The members of this family in turn are considered by statistics the fastest bats in flight; the females are smaller than the males; they are specialized insectivores [45]. They are found throughout the Americas, from the southern United States (Florida) to Uruguay. They are found from humid forests to urban areas, living under trees, inside caves, house linings, abandoned structures and buildings under construction; this adaptation to urban areas is due to the high presence of insects [46].

We detected in five animals CHPV sequences (i.e., CHPV_008, CHPV_B08, CHPV_R04, CHPV_F01 and CHPV_R02). Samples were taken from liver (CHPV_F01), spleen (CHPV_B08), kidney (CHPV_R02 and CHPV_R04) and the oral cavity (CHPV_008). The locations of these samples are indicated in Figure S1 (Supplementary Materials).

Animals were euthanized by intramuscular injection of xylazine hydrochloride (1

mg/kg) associated with ketamine hydrochloride (1–2 mg/kg), followed by intracardiac injection of phenobarbital (40 mg/kg).

To carry out this study, we obtained approval from the Ethics Committee on Animal Use of the Universidade Federal do Oeste do Pará (CEUA/UFOPA) under number 0220220128 and from the Biodiversity Authorization and Information System (SISBIO- 18313-1) to capture the chiropterans. The necropsy was performed in the Laboratory of Animal Morphophysiology of the Universidade Federal do Oeste do Pará, following the institutional norms of biosecurity.

2.2. Processing of the Samples

We initially performed the aliquot of the samples to have enough material to perform all steps of the sequencing protocol applied to viral metagenomics (Next Generation Sequencing) [47].

Organ fragments were first macerated in tissue disruptor, then diluted in 1 mL of Hanks buffered saline solution (HBSS), added to a 2 mL tube containing lysis matrix C (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA), followed by “rigid rotation” in a Beckman Coulter Optima LE-80 ultracentrifuge with Heraeus Maximum rotor at 32,000 rpm for 5 min to sediment the viral particles. A total of 500 µL of the supernatants was put through 0.45 µm

filters (Merck Millipore, Billerica, MA, USA) to remove particles of eukaryotic and bacterial

cells. Approximately 100 µL of PEG-it virus precipitation solution (System Biosciences, Palo Alto, CA, USA) was added to the filtrate and the contents of the tube were gently homogenized, followed by incubation at 4 °C for 24 h. After the incubation period, the mixture was centrifuged at 10,000 g for 30 min at 4 °C and the supernatant (~300 µL) was discarded. The pellet, rich in virus-like particles (VLPs), was treated with a combination of nuclease enzymes (TURBO DNase and RNase Cocktail Enzyme Mix-Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA; Baseline ZERO DNase and RNase-Epicenter, Madison, WI, USA; Benzonase-Darmstadt, Darmstadt, Germany, and RQ1 DNase-Free DNase and RNase A Solution-Promega, Madison, WI, USA) to digest unprotected nucleic acids. The resulting mixture was subsequently incubated at 37 °C for 2 h.

After incubation, viral nucleic acids were extracted using Maxwell® 16 Viral Total Nucleic Acid Purification Kit (Promega, WI, USA) according to the manufacturer’s protocol. The cDNA synthesis was performed with AMV reverse transcription (Promega, WI, USA). A second strand of cDNA synthesis was performed using DNA Polymerase I Large (Klenow) Fragment (Promega, WI, USA).

Viral DNA was enriched by rolling circle amplification (RCA) using the TempliPhi 500 Amplification Kit (Cytiva, CA, USA). Briefly, 1 µL of nucleic acid extract plus 5 µL of the kit sample buffer was heated to 95 °C for 3 min, cooled on ice, and 5 µL of the kit reaction buffer and 0.2 µL of Enzyme mix (Phi29 DNA polymerase) added. The RCA reaction was incubated at 30 °C for 24 h, followed by heat inactivation at 65 °C for 10 min.

Subsequently, duplicated sample (total nucleic acid and RCA) submitted via a Nextera XT Sample Preparation Kit (Illumina, CA, USA) was used to construct a DNA library, identified using dual barcodes. For size range selection, Pippin Prep (Sage Science, Inc.) was used to select a 600 bp insert (range 500–700 bp). The library was deep-sequenced using the NovaSeq 6000 Sequencer (Illumina, CA, USA) with 250 bp ends. Bioinformatics analysis was performed according to the protocol described by Deng et al. [48]. Contigs that shared a percent nucleotide identity of 95% or less were assembled from the obtained sequence reads by de novo assembly. Based on the bioinformatics pipeline used [48], no reads related to human, plant, fungal, or bacterial sequences were obtained. The final near complete genomes were mapped with Geneious R9. All sequences generated in this study were deposited in the Genbank with the accession numbers OQ420631–OQ420635.

2.3. Bioinformatics Analysis

The raw reads obtained from Illumina sequencing were pre-processed, where: (a) the paired-end sequence records were removed from both ends, (b) the low-quality sequences (raw data generated from reads less than 100 bp in length) and the

adapter and primer sequences were cut using the VecScreen based on BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) in the default parameters (MCGinnis and Thomas, 2004) and finally (c) the readings that contained homopolymer and duplicated readings were identified and removed. Bioinformatics data were analyzed according to the previously described protocol [47]. The contigs resulting were compared using BLASTx and BLASTn to search for similarity with viral proteins and nucleotides, respectively, from the GenBank genetic sequence database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, accessed on 21 December 2022). The best results from searches in BLAST (with the highest percentage of sequence similarity already deposited in Genbank) were selected and, to reduce the number of random matches, E values (e-value) were defined in each search.

2.4. Genome Annotation

The nucleotide sequences of the genomes and the amino acid sequences of the NS1 and VP1 proteins from the genomes of CHPV detected in this study and other related viruses were selected based on the best results (best hits) of the BLAST search. Using MAFFT tools, complete or nearly complete genomes were aligned [49]. The SF3 Helicase domain and protein motifs of conserved proteins were predicted using InterProScan (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence/>, accessed on 10 January 2023) and Motif Finder (<https://www.genome.jp/tools/motif/>, accessed on 12 January 2023), respectively.

2.5. Genetic Distance

The genetic distance and its standard error were calculated using the composite maximum likelihood model plus gamma correction and bootstrap with 1000 replications. Distances were calculated using MEGA software (Version X) [50]. To estimate sequence similarity, a pair-wise method implemented in the SDT program, version 1.2 [51], was used. Estimating the similarity alignments of each unique pair of sequences was performed using algorithms implemented in MUSCLE [52]. After calculating the identity score for each pair of sequences, the program uses the NEIGHBOR component of PHYLIP to calculate a tree. The rooted neighbor joint phylogenetic tree orders all sequences according to their probable degrees of evolutionary relatedness. The results are presented in a frequency distribution of paired identities in a graphical interface.

2.6. Phylogenetic Analysis

Phylogenetic trees were constructed using the maximum likelihood approach, and branching support was estimated using a bootstrap test with 1000 replications using the IQ-Tree tool [53]. Trees were visualized and edited using Figtree version 1.4.2 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>, accessed on 9 February 2023).

2.7. Likelihood Mapping

Likelihood mapping is an approach that explores the phylogenetic content of a set of aligned sequences [54]. The method is based on an analysis of the maximum likelihoods for the three fully resolved tree topologies that can be computed for four random sequences. The three likelihoods are represented as one point inside an equilateral triangle. The central region of the triangle represents star-like trees (unresolved), vertices represent well-resolved phylogenies and regions connecting the vertices reflect the situation where it is difficult to distinguish between two of the three trees. The location of the likelihoods in the triangle indicates the phylogenetic pattern in the alignment. Thus, likelihood mapping can be used to test a posteriori the phylogenetic signal and the confidence of an inner branch in a phylogenetic tree. The likelihood mapping was performed using the software tree-puzzle version 5.3 (Likelihood-mapping).

2.8. Phylogenetic Networks

We used phylogenetic networks to explore reticulated evolution in the CHPV sequences. Networks are graphs used to visualize evolutionary relationships when recombination events such as hybridization, horizontal gene transfer, recombination,

or gene duplication and loss are involved. They differ from traditional phylogenetic trees by the explicit modeling of richly linked networks, by means of the addition of hybrid nodes (nodes with two parents) instead of only tree nodes (a hierarchy of nodes, each with only one parent). They are more realistic models of evolution. Moreover, network methods also provide a value tool for phylogenetic inference even when reticulation events do not play an important role. The combined effect of sampling error and systematic error makes the phylogenetic inference uncertain, and network methods provide tools for representing and quantifying this uncertainty. We used the neighbor-net approach implemented in the Splitstree version 4.18.3 [55].

3. Results

3.1. Characterization of Samples

We were able to retrieve five contigs, near full-length genomes of CHPV, and blast searches indicated that the best cognate reference was NC_032097. This sequence is a CHPV previously identified in hematophagous *Desmodus rotundus* bats in southern Brazil. The genome size of our sequences ranged from 3797 to 4284 bp, consistent with other parvoviruses (<4 kb), with a GC content between 44.03 and 44.89%. BLASTn comparative analysis showed that the sequences described here had a low identity in the NCBI nucleotide database (>80.19%), with coverage of up to 91% with the NC_032097. Descriptions of size and similarity, based on BlastN searches, are summarized in Table 1.

Table 1. Nucleotide identity of CHPV sequences identified in *M. molossus*.

Name	Size (Base Pairs)	Coverage	Nucleotide Identity	E-Value
CHPV_O08	4284	89%	78.71%	0.0
CHPV_B08	3797	89%	80.19%	0.0
CHPV_R04	3800	91%	79.61%	0.0
CHPV_F01	4281	90%	78.91%	0.0
CHPV_R02	4001	90%	79.54%	0.0

ID: Percentage of identity between our CHPV sequences and the CHPV reference NC_032097.

3.2. Comparative Analysis of Genomes

In all CHPV sequences described here, the NS1 and VP1 regions were detected, as well as the SF3 Helicase protein domain, characteristic of the *Parvoviridae* family.

To analyze the differences between the sequences, we selected the region of the NS1 protein as it is the most used for taxonomic classification. We compared the amino acid region NS1 of the reference sequences (MG693107, MT734803, JX885610 and NC_032097.1) with those detected in the present study (CHPV_O08, CHPV_B08, CHPV_R04, CHPV_F01, CHPV_R02). The CHPV sequences were detected with three motifs: (I) parvovirus NS1 non-structural protein; (II) papillomavirus helicase; and (III) threonyl carbamoyl adeno-sine biosynthesis protein Tsae, besides dynein and ATPase domains (AAA7, AAA15 and AAA23). Interestingly, the CHPV sequences described here have an additional motif (DUF3648) with an unknown function (Figure 1). The DUF3648 motif is located between residues 107 and 153 of the NS1 protein of all Brazilian Molossus CHPV (i.e., 107RS-DSFKRTLRLVWQDVSIAMSDIELPDPTLEVVKCQKCHKPSSLIS153). We also found an additional ORF within the NS1 region, which seems to be a common feature of all chaphamaviruses [56]. The alignment of Brazilian CHPV identified in *Molossus molossus* is summarized in Figure S2 (Supplementary Materials).

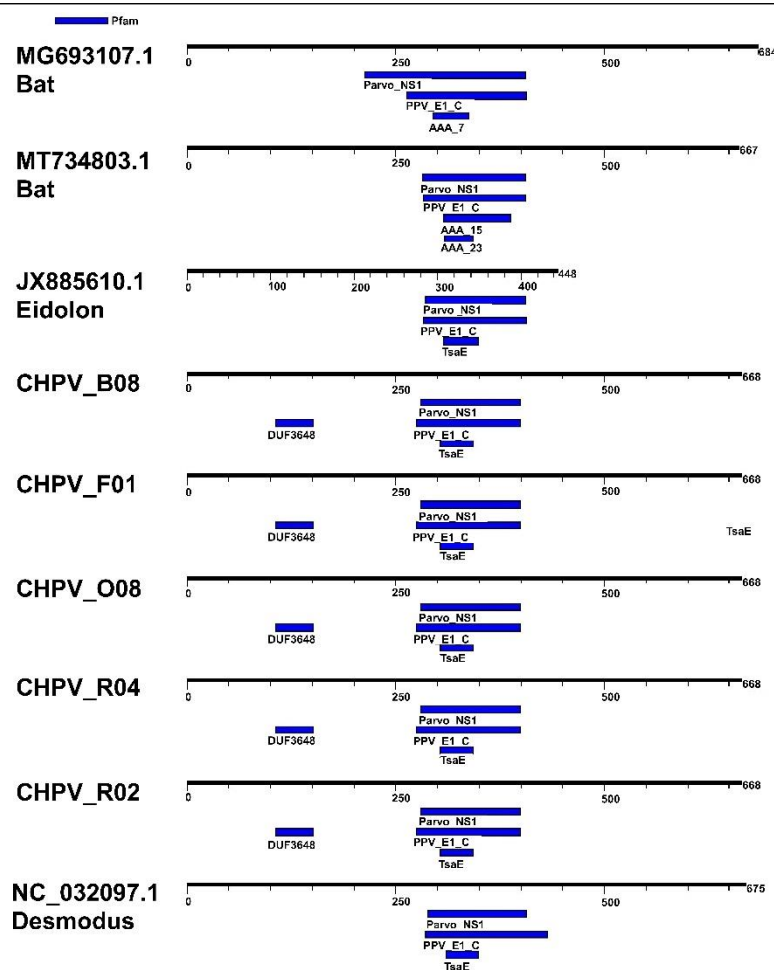


Figure 1. Motifs in the CHPV non-structural protein (NS1). Figure shows the motifs detected in the NS1 protein of CHPV. Motifs were detected using the server MotifFinder and the Pfam database was used as reference (<https://www.genome.jp/tools/motif/>, accessed on 22 January 2023).

3.3. Phylogenetic Inference

Initially, we inferred a phylogenetic tree with reference sequences of parvoviruses from the subfamilies of *Parvovirinae*, *Densovirinae* and *Hamaparvovirinae*, using complete genomes (tree not shown). The tree shows that all the CHPV sequences of this study are monophyletic and clustered in the subfamily *Hamaparvovirinae* genus *Chaphamaparvovirus*. This monophyletic group is in a clade formed by sequences identified in bats (NC_032097 identified in *Desmodus rotundus* and MH170363 identified in *Artibeus lituratus*). Next, to obtain more resolution we used only complete genomes of chaphamapavoviruses and constructed a maximum likelihood tree (Figure 2). This tree shows multiple clusters with high bootstrap support. Most of these clades composed by a unique kind of host were collapsed to facilitate the visualization (i.e., Feline, Canine and Avian). The topology of the tree also indicates that all CHPV from Molossus bats are monophyletic (delineated by a blue rectangle). Another important feature of the tree is the clade formed by CHPV identified in Brazilian bats with high support.

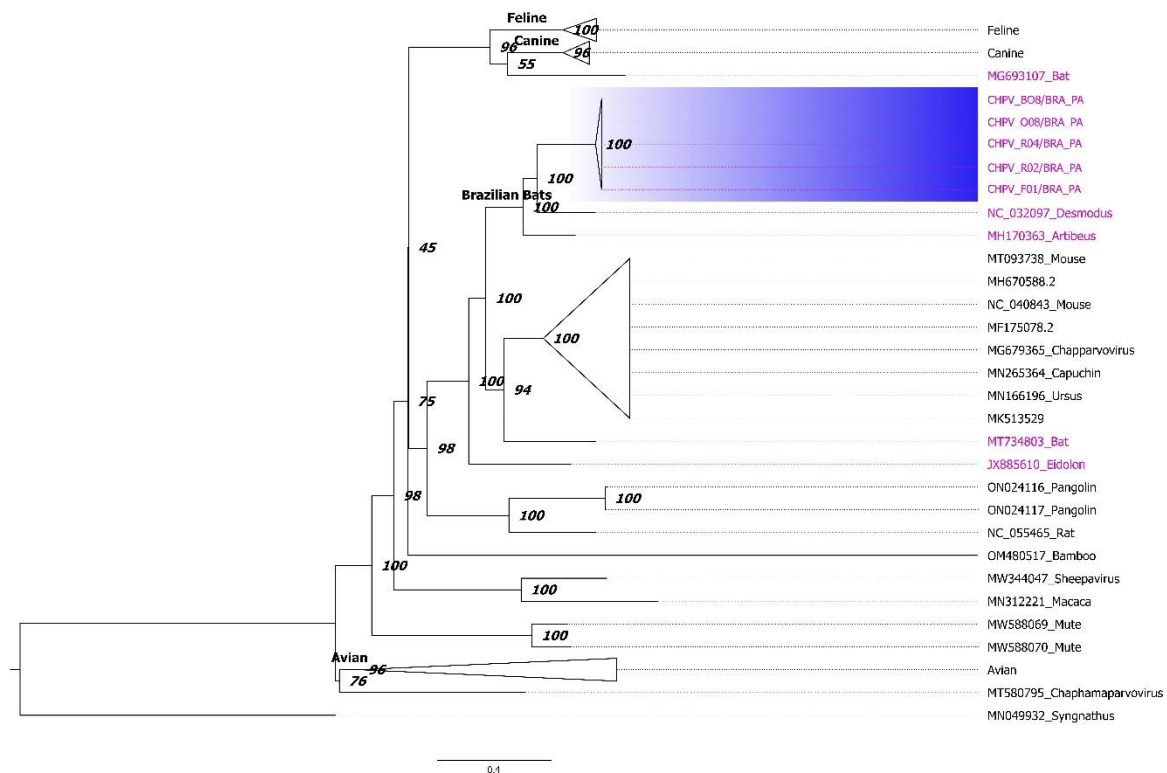


Figure 2. Maximum likelihood tree of chaphamaparvoviruses. The tree was constructed using complete CHPV. Some clades composed by sequences isolated from the same host (i.e., Feline, Canine and Avian) were collapsed to facilitate the visualization. Sequences identified in bats are indicated by magenta color. The tree is unrooted and numbers in the nodes represent bootstrap values. Horizontal line under the tree indicates the number of nucleotide substitutions per site. The tree was constructed using GTR model plus gamma correction and the proportion of invariable sites was estimated. Bootstrap values were calculated using the ultra-fast approximation approach [57].

To better clarify the relatedness of our sequences and other CHPV references, we evaluated the phylogenetic signal of the alignments and constructed trees using VP1 (Capsid) and the NS1 genomic regions. Initially, we show that the phylogenetic signal in alignment with VP1 and NS1 regions is better than the signal in the alignment of the complete genome. To obtain these results we used the likelihood mapping approach [54]. This analysis is based on the assumption that by plotting the likelihood of all possible quartets on a three-dimensional coordinate system (triangular surface) it is possible to determine the number of unresolved quartets (star-like trees). Ideally, fully resolved quartets will occupy vertices of the triangular surface whilst star-like trees will occupy the center of the triangle. In this regard, alignments containing a strong phylogenetic signal will provide likelihood maps in which the proportion of plotted likelihoods in the center of the triangle is inferior to the sum of the likelihoods plotted in the three vertices (see the diagram in Figure 3a). Our results showed that the NS1 regions are the best genomic regions for performing a phylogenetic study since they have 43.1% fully resolved quartets compared with the 42.2% of star trees (Figure 3b). This is probably because VP1 are highly variable regions with many invariable sites and some deletions/insertions.

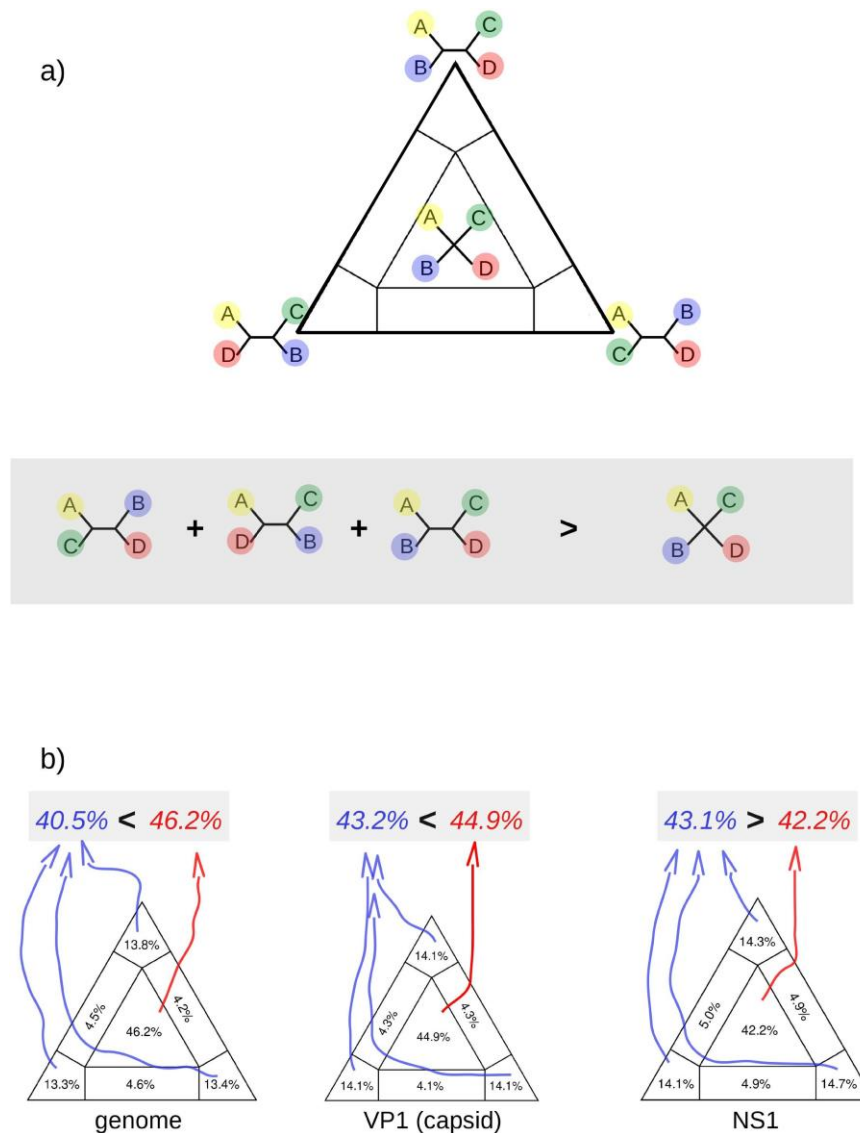


Figure 3. Maximum likelihood map. (a) Schematic representation of the maximum likelihood map approach. In the triangular surface, individual likelihoods of all possible quartets will be plotted. The likelihoods of resolved quartets occupy vertices of the triangle and the likelihoods of unresolved trees will occupy the center of the surface. Alignments with proper phylogenetic signals generate likelihood maps in which the proportion of plotted likelihoods in the center of the triangle is lower than the sum of likelihoods in all vertices (diagram in the gray area). (b) Likelihood maps of the genome, VP1 and NS1 regions of parvoviruses.

Since the NS1 regions of CHPV have the better phylogenetic signal, we used these regions and constructed a maximum likelihood tree to obtain more details about the relatedness of these viruses. Likewise, the NS1 tree shows many well supported clades are composed by CHPV identified in a same category of host (Figure 4). For example, the clade Feline is composed of sequences identified in domestic cats from distinct regions (Figure 4). In the same way, the cluster Brazilian bats is equally composed of CHPV identified in bats from Brazil. Moreover, CHPV identified in certain categories of birds tend to cluster together, such as psittacines and passerines.

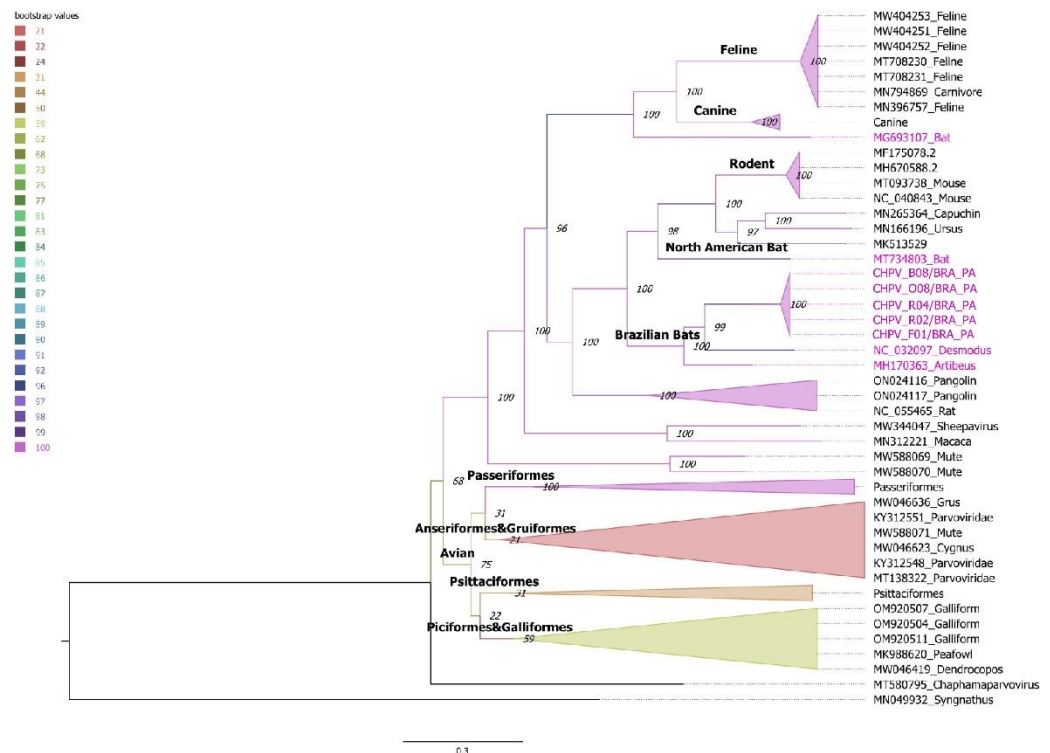


Figure 4. Maximum likelihood NS1 tree. Numbers above branches are bootstrap values. Sequences identified in bats are indicated by magenta color. The tree is unrooted and numbers in the nodes represent bootstrap values. Branches are colored according to the bootstrap support following color scale indicated in the figure. Horizontal line under the tree indicates the number of nucleotide substitutions per site. Clades in which CHPV was detected in the same category of host are indicated by names (Avian, Rodent, Bats, Feline and Canine). The tree was constructed using the GTR model plus gamma correction and the proportion of invariable sites was estimated. Bootstrap values were calculated using the ultra-fast approximation approach [57].

3.4. Reticulated Evolution of CHP

Previously, we found a high percentage of unresolved trees in CHPV sequences. This suggests that the evolutionary history of these strains is complex. Then, we decided to investigate the evolutionary scenario of CHPV sequences using a network approach. Phylogenetic analysis provides a scenario where two related sequences share a hypothetical ancestor, thus generating a bifurcating tree. The network method, on the other hand, provides a general description of the complexity of the evolutionary history of sequences; it generates reticulated graphs in which the edges represent the evolutionary connection among sequences. The results indicated by the network reveal some level of reticulated evolutionary events among the main CHPV clades (Figure 5). We found some reticulated edges (indicated by arrows) connecting the groups Bats and Rodent. There are also many reticulations among sequences in the group avian. This is in concert with the phylogenetic analysis that showed the avian clade is composed by subclusters (passeriformes, psittaciformes, piciformes, galliformes, anseriformes and gruiformes).

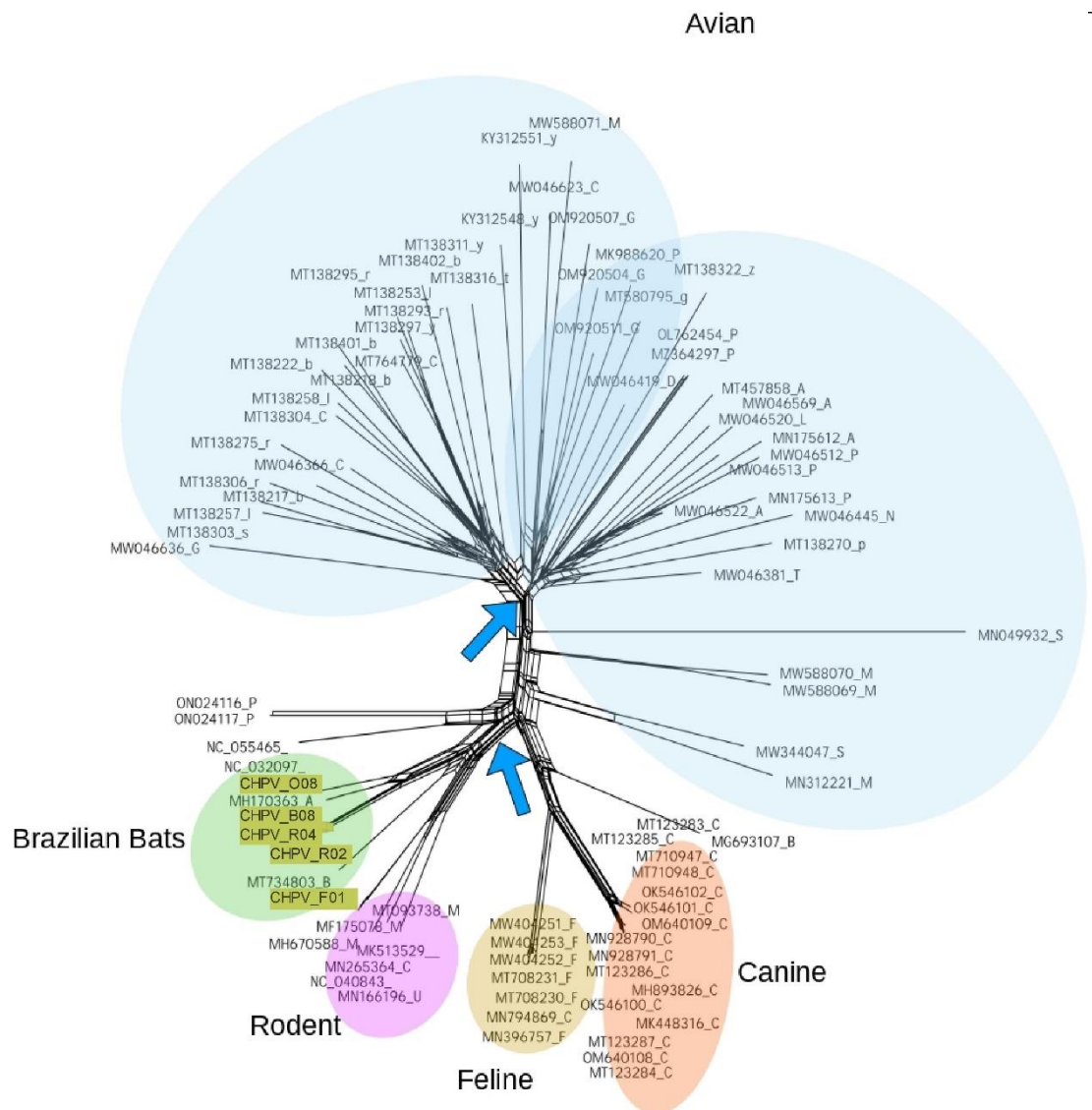


Figure 5. Network graph of the NS1 genomic region of CHPV. The diagram shows a network clustering similar sequences. The main clusters are indicated by different colors. Sequences from this study are highlighted. Arrows indicate reticulated edges connecting sequences. Distances were calculated assuming the HKY85 evolutionary model. The network was constructed using the neighbor-net approach implemented in Splitstree version 4.18.3 [55].

3.5. Genetic Diversity

We used the nucleotide similarity of NS1 to compare the variability of our sequences and some CHPV references. For this comparison we used CHPV sequences from bats plus sequences from the rodent clade: one sequence identified in capuchin kidney; one identified in *Ursus americanus*; one identified in Tasmanian devil (*Sarcophilus harrisii*) and one CHPV sequence identified in Gulf pipefish (*Syngnathus scovelli*). The pairwise identity matrix indicates that the mean identity among CHPV identified in *Molossus* bats is 96% (gray rectangle in Figure 6a). In general, the pairwise identities of CHPV from different hosts ranged from 58% to 79%. The percentage of NS1 identity between CHPV identified in *Molossus molossus* and CHPV identified in *Desmodus rotundus* is 76% while the identity with CHPV identified in *Artibeus lituratus* is 78% (Figure 6b). It is important to mention that the overall genomic nucleotide diversity among the *Molossus molossus* CHPV is 0.1%. In contrast, the general diversity of CHPV identified in bats is higher than 50%.

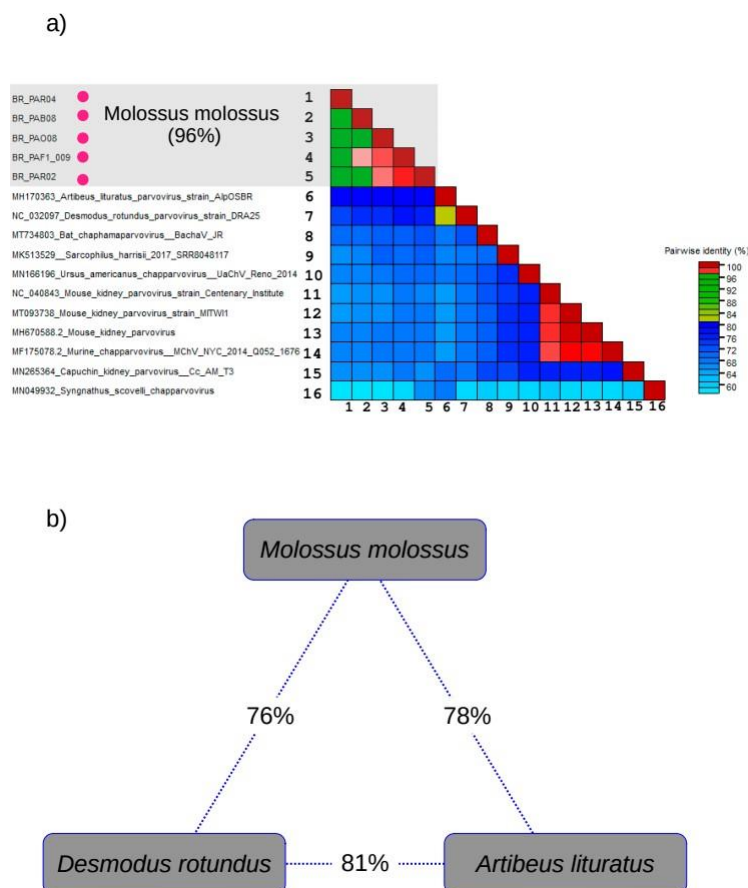


Figure 6. Nucleotide identity of NS1 of CHPV. (a) Identity matrix showing pairwise comparisons among distinct CHPV sequences. (b) Chart depicting the pairwise identity of NS1 gene in CHPV identified in Brazilian bats.

4. Discussion

Previous investigations in Brazil have already reported the identification of many viruses in bats. Most studies, however, have been performed in southern Brazil [40,42]. Viral investigations of *Molossus molossus*, *Artibeus lituratus* and *Sturnira lilium* indicated that these bats are commonly infected by Flavivirus, Coronavirus, Arenavirus, Paramyxovirus, Adenovirus, Papillomavirus and Parvovirus [42,46]. This shows the extreme importance of viral surveillance in bats [29].

Here, we report the molecular characterization of CHPV sequences identified in bats captured in the northern region of Brazil. We found five closely related CHPV sequences retrieved through the NGS of samples (oral swab, spleen, liver and kidney) from bats of the *Molossus molossus* species.

Parvoviruses have a genome consisting of linear single-stranded DNA (ssDNA) with terminal repeat structures [41]. The genome encodes two open reading frames (ORFs) that encode the NS1 proteins associated with the replication region (rep) and the Vp1 protein related to the capsid region (cap) [58]. They belong to the *Parvoviridae* family, which is subdivided into three subfamilies *Parvovirinae*, *Densovirinae* and *Hamaparvovirinae* [59,60]. The subfamily *Hamaparvovirinae* is divided into five genera: *Brevihamaparvovirus*, *Chaphamaparvovirus* (CHPV), *Hepanhamaparvovirus*, *Ichthamaparvovirus* and *Penstillamaparvovirus* [59].

The genus *Chaphamaparvovirus* contains 16 species, all described through metagenomic investigations. Members have been described since 2012 [59] in various hosts such as rodents [60], birds [61–63], reptiles [64], turkeys [65], pigs [66], fish [67], dogs and cats [68–70]. Furthermore, CHPVs have already been detected in human samples [71]. *Chaphamaparvovirus* has also been identified in different geographic regions (Australia, Brazil, Canada, China, France, Holland and Switzerland), hosts and samples, such as in human plasma samples [59–67]. Nevertheless, molecular,

epidemiological and pathogenic characteristics have not yet been fully established [65].

We performed a detailed phylogenetic analysis using the complete genome and NS1 region. The results showed that the sequences identified in this study are monophyletic and belong to the same CHPV lineage because they have 96% of identity in the NS1 generegion. Phylogenetic trees also show that the closest CHPV to our sequences are closely related with sequences previously identified in hematophagous *Desmodus rotundus* bats in southeast Brazil [40] and insectivorous *Artibeus lituratus* bats from South Brazil [72]. The median identity between our sequences and the *Desmodus rotundus* CHPV is 76%. The *Desmodus rotundus* is a hematophagous bat that is endemic in Brazil [42,48]. *Desmodus rotundus* bats have a broad distribution and can live in urban and in rural areas as well [73]. Although these bats have distinct feeding behaviors, they cohabit in many regions, and colonies of these bats can share resting places such as caves and abandoned buildings.

We found that the median identity between our sequences and the *Artibeus lituratus* CHPV was 78%. The bats are frugivorous and also endemic in Brazil [74]. It is important to mention that the NS1 nucleotide identity between *Desmodus rotundus* CHPV and *Artibeus lituratus* CHPV is 81%. Accordingly, the amino acid identities of our sequences with *Desmodus rotundus* CHPV and *Artibeus lituratus* CHPV are 76% and 69%, respectively. Likewise, the identity between *Desmodus rotundus* CHPV and *Artibeus lituratus* CHPV is 71%. The criteria adopted by the ICTV for parvovirus classification at the species level specify that amino acid identity of the NS1 protein lower than 85% is enough to define anew species [41]. Another feature of the CHPV in *Molossus molossus* bats is the presence of the DUF3648 motif, which is a unique signature of the VP1 of these bats. Consequently, the CHPV identified in *Molossus molossus* bats are indeed a new species.

Another observation of our analysis of CHPV sequences is the clustering pattern observed in trees inferred with complete genomes or the genes VP1 and NS1. In all trees, there are some phyloclades with high support, and these clades are mostly composed by CHPV identified in the same category of animals. For example, the Canine clade has 14 sequences from members of the *Canidae* family (dog, wolf and coyote) and two sequences identified in domestic cats. The same pattern is observed in the passeriforme and psittaciforme clades. In the same way, CHPV identified in Brazilian bats cluster together. Although it is not possible to determine the natural hosts of viral sequences generated by metagenomic studies, the phylogenetic evidence of host–virus association can be used as a proxy in this association. Besides, the clustering networks also indicate that CHPV isolated in certain species are closely related. Therefore, it is tempting to suggest that there is a correlation between CHPV and its hosts, with eventual cross-species transmissions. If the clustering pattern observed in CHPV is due to virus–host specificity, then it is in contrast with the plasticity of carnivorous protoparvovirus to infect multiple species. Protoparvovirus naturally infect a plethora of hosts in the order Carnivora. They share 98% identity in the nucleotide sequence and have common ancestors in the recent past. For example, the feline panleukopenia virus (FPV) infects domestic cats (*Felis catus*) and other

carnivores including the American mink (*Neovison vison*), raccoon (*Procyon lotor*) Puma

(*Puma concolor*). The FPV sequences of lineages isolated from distinct hosts intermingle in phylogenetic trees, indicating that this virus easily spreads among distinct species. In the same way, the canine parvovirus (CPV) infects domestic dogs (*Canis lupus familiaris*), wolves (*Canis lupus*) and coyotes (*Canis latrans*) [75,76]. Conversely, our phylogenetic analysis showed that evolutionary clades in CHPV are mostly structured according to the host in which this virus was identified. Although CHPV share a remote ancestry with other parvoviruses and some features of their genomes are conserved, the host adaptive evolution of CHPV might differ from other members of the *Parvoviridae* family. *Chaphamaparvovirus* was recently identified by metagenomic virus studies and there are low numbers of sequences originated from independent studies in public databases. Little is known about the life cycle, host range and cell tropism of this virus. To better understand the

evolutionary complexity of CHPV, further studies need to be performed in order to increase the number of CHPVs identified in different species.

5. Conclusions

The introduction of sequencing platforms associated with a metagenomic approach to the identification of new viruses, including potentially zoonotic ones, has become more frequent. For example, SARS-CoV-2 probably originated from a zoonotic event involving bats and other unknown species. Since bats are natural reservoirs of many pathogens and Brazil has one of the greatest bat diversities, viral surveillance, especially of bats living near humans, is extremely important to expand our epidemiological and demographic knowledge regarding viruses infecting bats.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/v15030606/s1>. Figure S1: Map showing the locations where bats were captured; Figure S2: Alignment of Molossus CHPV. Table S1: Virus families identified in Brazilian Bats.

Author Contributions: Conceptualization, W.U.A.; L.R.R.R. and L.F.M.; methodology, V.d.S.M. and A.C.d.C.; software, X.D.; formal analysis, E.d.S.F.R.; F.V. and E.L.; investigation, E.d.S.F.R.; F.V. and E.L.; resources, E.L.L.A.; data curation, V.d.S.M. and A.C.d.C.; writing—original draft preparation, E.d.S.F.R. and E.L.; writing—review and editing, R.P.P.; supervision, E.L.; E.D. and A.C.d.C.; project administration, E.L.; E.D. and A.C.d.C.; funding acquisition, W.U.A.; L.R.R.R.; L.F.M.; E.L. and A.C.d.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: EL is supported by CNPq (302677/2019-4). ESDR is supported by a scholarship provided by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—Brasil (CAPES). ACdC is supported by a scholarship from HCFMUSP with funds donated by NUBANK under the #HC- COMVIDA scheme.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the 1975 Declaration of Helsinki (<https://www.wma.net/what-we-do/medical-ethics/declaration-of-helsinki/>, accessed on 9 February 2023), revised in 2013. The project was approved by the Animal Use Ethics Committee of the Federal University of Western Pará (CEUA/UFOPA No 0220220128) and authorized by the Biodiversity Information and Authorization System (SISBIO; No 18313-1).

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: We thank the Pró-reitoria de pesquisa e pós-graduação of UFPA for supporting the publication costs.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Springer, M.S.; Teeling, E.C.; Madsen, O.; Stanhope, M.J.; de Jong, W.W. Integrated Fossil and Molecular Data Reconstruct Bat Echolocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 6241–6246. [\[CrossRef\]](#)
2. Nowak, R.M.; Walker, E.P. *Walker's Bats of the World*; Johns Hopkins University Press: Baltimore, MD, USA, 1994; ISBN 9780801849862.
3. Thomas, S.P.; Suthers, R.A. The Physiology and Energetics of Bat Flight. *J. Exp. Biol.* **1972**, *57*, 317–335. [\[CrossRef\]](#)
4. Zhou, H.; Ji, J.; Chen, X.; Bi, Y.; Li, J.; Wang, Q.; Hu, T.; Song, H.; Zhao, R.; Chen, Y.; et al. Identification of Novel Bat Coronaviruses Sheds Light on the Evolutionary Origins of SARS-CoV-2 and Related Viruses. *Cell* **2021**, *184*, 4380–4391.e14. [\[CrossRef\]](#)
5. Ithete, N.L.; Stoffberg, S.; Corman, V.M.; Cottontail, V.M.; Richards, L.R.; Schoeman, M.C.; Drosten, C.; Drexler, J.F.; Preiser, W. Close Relative of Human Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus in Bat, South Africa. *Emerg. Infect. Dis.* **2013**, *19*, 1697–1699. [\[CrossRef\]](#)
6. Šimić, I.; Zorec, T.M.; Lojkić, I.; Krešić, N.; Poljak, M.; Cliquet, F.; Picard-Meyer, E.; Wasniewski, M.; Zrnčić, V.; Čukušić, A.; et al. Viral Metagenomic Profiling of Croatian Bat Population Reveals Sample and Habitat Dependent Diversity. *Viruses* **2020**, *12*, 891. [\[CrossRef\]](#)
7. Irving, A.T.; Ahn, M.; Goh, G.; Anderson, D.E.; Wang, L.-F. Lessons from the Host Defences of Bats, a Unique Viral Reservoir. *Nature* **2021**, *589*, 363–370. [\[CrossRef\]](#)
8. Smith, I.; Wang, L.-F. Bats and Their Virome: An Important Source of Emerging Viruses

- Capable of Infecting Humans. *Curr. Opin. Virol.* **2013**, *3*, 84–91. [\[CrossRef\]](#)
9. Wu, Z.; Yang, L.; Ren, X.; He, G.; Zhang, J.; Yang, J.; Qian, Z.; Dong, J.; Sun, L.; Zhu, Y.; et al. Deciphering the Bat Virome Catalog to Better Understand the Ecological Diversity of Bat Viruses and the Bat Origin of Emerging Infectious Diseases. *ISME J.* **2016**, *10*, 609–620. [\[CrossRef\]](#)
10. Nikolay, B.; Salje, H.; Hossain, M.J.; Khan, A.K.M.D.; Sazzad, H.M.S.; Rahman, M.; Daszak, P.; Ströher, U.; Pulliam, J.R.C.; Kilpatrick, A.M.; et al. Transmission of Nipah Virus—14 Years of Investigations in Bangladesh. *N. Engl. J. Med.* **2019**, *380*, 1804–1814. [\[CrossRef\]](#)
11. Olival, K.; Hayman, D. Filoviruses in Bats: Current Knowledge and Future Directions. *Viruses* **2014**, *6*, 1759–1788. [\[CrossRef\]](#)
12. Stoner-Duncan, B.; Streicker, D.G.; Tedeschi, C.M. Vampire Bats and Rabies: Toward an Ecological Solution to a Public Health Problem. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2014**, *8*, e2867. [\[CrossRef\]](#)
13. Pernet, O.; Schneider, B.S.; Beaty, S.M.; LeBreton, M.; Yun, T.E.; Park, A.; Zachariah, T.T.; Bowden, T.A.; Hitchens, P.; Ramirez, C.M.; et al. Evidence for Henipavirus Spillover into Human Populations in Africa. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 5342. [\[CrossRef\]](#)
14. Dovih, P.; Laing, E.D.; Chen, Y.; Low, D.H.W.; Ansil, B.R.; Yang, X.; Shi, Z.; Broder, C.C.; Smith, G.J.D.; Linster, M.; et al. Filovirus-Reactive Antibodies in Humans and Bats in Northeast India Imply Zoonotic Spillover. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2019**, *13*, e0007733. [\[CrossRef\]](#)
15. Selvey, L.A.; Wells, R.M.; McCormack, J.G.; Ansford, A.J.; Murray, K.; Rogers, R.J.; Lavercombe, P.S.; Selleck, P.; Sheridan, J.W. Infection of Humans and Horses by a Newly Described Morbillivirus. *Med. J. Aust.* **1995**, *162*, 642–645. [\[CrossRef\]](#)
16. Chua, K.B.; Chua, B.H.; Wang, C.W. Anthropogenic Deforestation, El Niño and the Emergence of Nipah Virus in Malaysia. *Malays. J. Pathol.* **2002**, *24*, 15–21.
17. Snedden, C.E.; Mekanani, S.K.; Schwartz, S.T.; Gamble, A.; Blakey, R.V.; Borremans, B.; Helman, S.K.; Espericueta, L.; Valencia, A.; Endo, A.; et al. SARS-CoV-2: Cross-Scale Insights from Ecology and Evolution. *Trends Microbiol.* **2021**, *29*, 593–605. [\[CrossRef\]](#)
18. Ye, Z.-W.; Yuan, S.; Yuen, K.-S.; Fung, S.-Y.; Chan, C.-P.; Jin, D.-Y. Zoonotic Origins of Human Coronaviruses. *Int. J. Biol. Sci.* **2020**, *16*, 1686–1697. [\[CrossRef\]](#)
19. Fagre, A.C.; Kading, R.C. Can Bats Serve as Reservoirs for Arboviruses? *Viruses* **2019**, *11*, 215. [\[CrossRef\]](#)
20. Vicente-Santos, A.; Moreira-Soto, A.; Soto-Garita, C.; Chaverri, L.G.; Chaves, A.; Drexler, J.F.; Morales, J.A.; Alfaro-Alarcón, A.; Rodríguez-Herrera, B.; Corrales-Aguilar, E. Neotropical Bats That Co-Habit with Humans Function as Dead-End Hosts for Dengue Virus. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2017**, *11*, e0005537. [\[CrossRef\]](#)
21. de Thoisy, B.; Lacoste, V.; Germain, A.; Muñoz-Jordán, J.; Colón, C.; Mauffrey, J.-F.; Delaval, M.; Catzefflis, F.; Kazanji, M.; Matheus, S.; et al. Dengue Infection in Neotropical Forest Mammals. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **2009**, *9*, 157–170. [\[CrossRef\]](#)
22. Del Ángel, R.M.; Recio-Tótoro, B.; Rodríguez-Moreno, Á.; Lanz, H.; Sánchez-Cordero, V.; Cabrera-Romo, S.; Ludert, J.E.; Alcalá, A.C. Experimental Inoculation of *Artibeus jamaicensis* Bats with Dengue Virus Serotypes 1 or 4 Showed No Evidence of Sustained Replication. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2014**, *91*, 1227–1234. [\[CrossRef\]](#)
23. Perea-Martínez, L.; Moreno-Sandoval, H.N.; Moreno-Altamirano, M.M.; Salas-Rojas, M.; García-Flores, M.M.; Aréchiga-Ceballos, N.; Tordo, N.; Marianneau, P.; Aguilar-Setién, A. Experimental Infection of *Artibeus intermedius* Bats with Serotype-2 Dengue Virus. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **2013**, *36*, 193–198. [\[CrossRef\]](#)
24. Van Brussel, K.; Holmes, E.C. Doença Zoonótica e Diversidade de Virome em Morcegos. *Opinião Atual Em Virol.* **2022**, *52*, 192–202. [\[CrossRef\]](#)
25. Letko, M.; Seifert, S.N.; Olival, K.J.; Plowright, R.K.; Munster, V.J. Bat-Borne Virus Diversity, Spillover and Emergence. *Nat. Rev. Microbiol.* **2020**, *18*, 461–471. [\[CrossRef\]](#)
26. Subudhi, S.; Rapin, N.; Misra, V. Immune System Modulation and Viral Persistence in Bats: Understanding Viral Spillover. *Viruses* **2019**, *11*, 192. [\[CrossRef\]](#)
27. Schountz, T.; Baker, M.L.; Butler, J.; Munster, V. Immunological Control of Viral Infections in Bats and the Emergence of Viruses Highly Pathogenic to Humans. *Front. Immunol.* **2017**, *8*, 1098. [\[CrossRef\]](#)
28. Banerjee, A.; Baker, M.L.; Kulcsar, K.; Misra, V.; Plowright, R.; Mossman, K. Novel Insights Into Immune Systems of Bats. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 26. [\[CrossRef\]](#)
29. Wang, L.-F.; Anderson, D.E. Viruses in Bats and Potential Spillover to Animals and Humans. *Curr. Opin. Virol.* **2019**, *34*, 79–89. [\[CrossRef\]](#)
30. Han, B.A.; Schmidt, J.P.; Bowden, S.E.; Drake, J.M. Rodent Reservoirs of Future Zoonotic Diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, 7039–7044. [\[CrossRef\]](#)
31. Mollentze, N.; Streicker, D.G. Viral Zoonotic Risk Is Homogenous among Taxonomic Orders of Mammalian and Avian Reservoir Hosts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2020**, *117*, 9423–9430. [\[CrossRef\]](#)
32. Luis, A.D.; Hayman, D.T.S.; O’Shea, T.J.; Cryan, P.M.; Gilbert, A.T.; Pulliam, J.R.C.; Mills,

-
- J.N.; Timonin, M.E.; Willis, C.K.R.; Cunningham, A.A.; et al. A Comparison of Bats and Rodents as Reservoirs of Zoonotic Viruses: Are Bats Special? *Proc. R. Soc. B.* **2013**, *280*, 20122753. [[CrossRef](#)]
33. Nieto-Rabiela, F.; Wiratsudakul, A.; Suzán, G.; Rico-Chávez, O. Viral Networks and Detection of Potential Zoonotic Viruses in Bats and Rodents: A Worldwide Analysis. *Zoonoses Public Health* **2019**, *66*, 655–666. [[CrossRef](#)]
34. Brook, C.E.; Boots, M.; Chandran, K.; Dobson, A.P.; Drosten, C.; Graham, A.L.; Grenfell, B.T.; Müller, M.A.; Ng, M.; Wang, L.-F.; et al. Accelerated Viral Dynamics in Bat Cell Lines, with Implications for Zoonotic Emergence. *eLife* **2020**, *9*, e48401. [[CrossRef](#)]

35. Bernstein, A.S.; Ando, A.W.; Loch-Temzelides, T.; Vale, M.M.; Li, B.V.; Li, H.; Busch, J.; Chapman, C.A.; Kinnaird, M.; Nowak, K.; et al. The Costs and Benefits of Primary Prevention of Zoonotic Pandemics. *Sci. Adv.* **2022**, *8*, eabl4183. [\[CrossRef\]](#)
36. Keusch, G.T.; Amuasi, J.H.; Anderson, D.E.; Daszak, P.; Eckerle, I.; Field, H.; Koopmans, M.; Lam, S.K.; Das Neves, C.G.; Peiris, M.; et al. Pandemic Origins and a One Health Approach to Preparedness and Prevention: Solutions Based on SARS-CoV-2 and Other RNA Viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2022**, *119*, e2202871119. [\[CrossRef\]](#)
37. Souza, M.B.; de Souza Santos, L.R.; Borges, R.E.; Nunes, H.F.; Vieira, T.B.; Pacheco, S.M.; de Melo e Silva, D. Current Status of Ecotoxicological Studies of Bats in Brazil. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **2020**, *104*, 393–399. [\[CrossRef\]](#)
38. Nunes, H.; Rocha, F.L.; Cordeiro-Estrela, P. Bats in Urban Areas of Brazil: Roosts, Food Resources and Parasites in Disturbed Environments. *Urban Ecosyst.* **2017**, *20*, 953–969. [\[CrossRef\]](#)
39. Souza, W.; Dennis, T.; Fumagalli, M.; Araujo, J.; Sabino-Santos, G.; Maia, F.; Acrani, G.; Carrasco, A.; Romeiro, M.; Modha, S.; et al. Novel Parvoviruses from Wild and Domestic Animals in Brazil Provide New Insights into Parvovirus Distribution and Diversity. *Viruses* **2018**, *10*, 143. [\[CrossRef\]](#)
40. de Souza, W.M.; Romeiro, M.F.; Fumagalli, M.J.; Modha, S.; de Araujo, J.; Queiroz, L.H.; Durigon, E.L.; Figueiredo, L.T.M.; Murcia, P.R.; Gifford, R.J. Chapparrvoviruses Occur in at Least Three Vertebrate Classes and Have a Broad Biogeographic Distribution. *J. Gen. Virol.* **2017**, *98*, 225–229. [\[CrossRef\]](#)
41. Cotmore, S.F.; Agbandje-McKenna, M.; Canuti, M.; Chiorini, J.A.; Eis-Hubinger, A.-M.; Hughes, J.; Mietzsch, M.; Modha, S.; Ogliastro, M.; Pénzes, J.J.; et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Parvoviridae. *J. Gen. Virol.* **2019**, *100*, 367–368. [\[CrossRef\]](#)
42. Abreu, W.U.; Rodrigues, L.R.R. Diversidade Viral Em Morcegos No Brasil: Uma Revisão Sistemática Do Período 2000 a 2020/Viral Diversity in Bats in Brazil: A Systematic Review from 2000 to 2020. *BJDV* **2022**, *8*, 579–592. [\[CrossRef\]](#)
43. Epstein, J.H.; Anthony, S.J.; Islam, A.; Kilpatrick, A.M.; Ali Khan, S.; Balkey, M.D.; Ross, N.; Smith, I.; Zambrana-Torrel, C.; Tao, Y.; et al. Nipah Virus Dynamics in Bats and Implications for Spillover to Humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2020**, *117*, 29190–29201. [\[CrossRef\]](#)
44. IUCN Molossus Molossus; Barquez, R.; Rodriguez, B.; Miller, B.; Diaz, M. *The IUCN Red List of Threatened Species 2015: E.T13648A22106602*; IUCN: Fontainebleau, France, 2015.
45. Wilson, D.E.; Reeder, D.M. (Eds.) *Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference*, 3rd ed.; Johns Hopkins University Press: Baltimore, MD, USA, 2005; ISBN 9780801882210.
46. Li, Y.; Gordon, E.; Idle, A.; Altan, E.; Seguin, M.A.; Estrada, M.; Deng, X.; Delwart, E. Virome of a Feline Outbreak of Diarrhea and Vomiting Includes Bocaviruses and a Novel Chapparrvovirus. *Viruses* **2020**, *12*, 506. [\[CrossRef\]](#)
47. Abreu, W.U.; Rodrigues, L.R.R.; da Costa, A.C.; Morais, V.d.S.; de Paula, A.C.; Barreiros, E.A. Sequências Retrovirais de Interesse Em Medicina Veterinária Identificadas Em Morcegos Urbanos Da Amazônia. *RSD* **2022**, *11*, e394111032993. [\[CrossRef\]](#)
48. Deng, X.; Naccache, S.N.; Ng, T.; Federman, S.; Li, L.; Chiu, C.Y.; Delwart, E.L. An Ensemble Strategy That Significantly Improves de Novo Assembly of Microbial Genomes from Metagenomic Next-Generation Sequencing Data. *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, e46. [\[CrossRef\]](#)
49. Katoh, K. MAFFT: A Novel Method for Rapid Multiple Sequence Alignment Based on Fast Fourier Transform. *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 3059–3066. [\[CrossRef\]](#)
50. Kumar, S.; Stecher, G.; Li, M.; Knyaz, C.; Tamura, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol. Biol. Evol.* **2018**, *35*, 1547–1549. [\[CrossRef\]](#)
51. Muhire, B.M.; Varsani, A.; Martin, D.P. SDT: A Virus Classification Tool Based on Pairwise Sequence Alignment and Identity Calculation. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e108277. [\[CrossRef\]](#)
52. Edgar, R.C. MUSCLE: A Multiple Sequence Alignment Method with Reduced Time and Space Complexity. *BMC Bioinform.* **2004**, *5*, 113. [\[CrossRef\]](#)
53. Trifinopoulos, J.; Nguyen, L.-T.; von Haeseler, A.; Minh, B.Q. W-IQ-TREE: A Fast Online Phylogenetic Tool for Maximum Likelihood Analysis. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, W232–W235. [\[CrossRef\]](#)
54. Strimmer, K.; von Haeseler, A. Likelihood-Mapping: A Simple Method to Visualize Phylogenetic Content of a Sequence Alignment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 6815–6819. [\[CrossRef\]](#)
55. Huson, D.H.; Bryant, D. Application of Phylogenetic Networks in Evolutionary Studies. *Mol. Biol. Evol.* **2006**, *23*, 254–267. [\[CrossRef\]](#)
56. Pénzes, J.J.; de Souza, W.M.; Agbandje-McKenna, M.; Gifford, R.J. An Ancient Lineage of

- Highly Divergent Parvoviruses Infects Both Vertebrate and Invertebrate Hosts. *Viruses* **2019**, *11*, 525. [CrossRef]
57. Hoang, D.T.; Chernomor, O.; von Haeseler, A.; Minh, B.Q.; Vinh, L.S. UFBoot2: Improving the Ultrafast Bootstrap Approximation. *Mol. Biol. Evol.* **2018**, *35*, 518–522. [CrossRef]
 58. Mietzsch, M.; Péntzes, J.J.; Agbandje-McKenna, M. Twenty-Five Years of Structural Parvovirology. *Viruses* **2019**, *11*, 362. [CrossRef]
 59. Péntzes, J.J.; Söderlund-Venermo, M.; Canuti, M.; Eis-Hübing, A.M.; Hughes, J.; Cotmore, S.F.; Harrach, B. Reorganizing the Family Parvoviridae: A Revised Taxonomy Independent of the Canonical Approach Based on Host Association. *Arch. Virol.* **2020**, *165*, 2133–2146. [CrossRef]
 60. Walker, P.J.; Siddell, S.G.; Lefkowitz, E.J.; Mushegian, A.R.; Adriaenssens, E.M.; Alfenas-Zerbini, P.; Dempsey, D.M.; Dutilh, B.E.; Garcia, M.L.; Curtis Hendrickson, R.; et al. Recent Changes to Virus Taxonomy Ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch. Virol.* **2022**, *167*, 2429–2440. [CrossRef]
 61. Yang, S.; Liu, Z.; Wang, Y.; Li, W.; Fu, X.; Lin, Y.; Shen, Q.; Wang, X.; Wang, H.; Zhang, W. A Novel Rodent Chapparravirus in Feces of Wild Rats. *Virol. J.* **2016**, *13*, 133. [CrossRef]
 62. Vibin, J.; Chamings, A.; Klaassen, M.; Bhatta, T.R.; Alexandersen, S. Metagenomic Characterization of Avian Parvoviruses and Picornaviruses from Australian Wild Ducks. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 12800. [CrossRef]
 63. Canuti, M.; Verhoeven, J.T.P.; Munro, H.J.; Roul, S.; Ojkic, D.; Robertson, G.J.; Whitney, H.G.; Dufour, S.C.; Lang, A.S. Investigating the Diversity and Host Range of Novel Parvoviruses from North American Ducks Using Epidemiology, Phylogenetics, Genome Structure, and Codon Usage Analysis. *Viruses* **2021**, *13*, 193. [CrossRef]
 64. Sarker, S. Molecular and Phylogenetic Characterization of a Highly Divergent Novel Parvovirus (Psittaciform Chaphama- parvovirus 2) in Australian Neophema Parrots. *Pathogens* **2021**, *10*, 1559. [CrossRef]
 65. Chang, W.-S.; Li, C.-X.; Hall, J.; Eden, J.-S.; Hyndman, T.H.; Holmes, E.C.; Rose, K. Meta-Transcriptomic Discovery of a Divergent Circovirus, and a Chaphamaparvovirus in Captive Reptiles with Proliferative Respiratory Syndrome. *Viruses* **2020**, *12*, 1073. [CrossRef]
 66. Reuter, G.; Boros, A.; Delwart, E.; Pankovics, P. Novel Circular Single-Stranded DNA Virus from Turkey Faeces. *Arch. Virol.* **2014**, *159*, 2161–2164. [CrossRef]
 67. Palinski, R.M.; Mitra, N.; Hause, B.M. Discovery of a Novel Parvovirinae Virus, Porcine Parvovirus 7, by Metagenomic Sequencing of Porcine Rectal Swabs. *Virus Genes* **2016**, *52*, 564–567. [CrossRef]
 68. Du, J.; Wang, W.; Chan, J.F.-W.; Wang, G.; Huang, Y.; Yi, Y.; Zhu, Z.; Peng, R.; Hu, X.; Wu, Y.; et al. Identification of a Novel Ichthyic Parvovirus in Marine Species in Hainan Island, China. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 2815. [CrossRef]
 69. Abayli, H.; Can-Sahna, K. First Detection of Feline Bocaparvovirus 2 and Feline Chaphamaparvovirus in Healthy Cats in Turkey. *Vet. Res. Commun.* **2022**, *46*, 127–136. [CrossRef]
 70. Di Profio, F.; Sarchese, V.; Palombieri, A.; Fruci, P.; Massirio, I.; Martella, V.; Fulvio, M.; Di Martino, B. Feline Chaphamaparvovirus in Cats with Enteritis and Upper Respiratory Tract Disease. *Transboundary Emerg. Dis.* **2022**, *69*, 660–668. [CrossRef]
 71. Fahsbender, E.; da Costa, A.C.; Gill, D.E.; Milagres, P.F.A.; Brustulin, R.; Monteiro, F.J.C.; Rego, M.O.d.S.; Ribeiro, E.S.D.; Sabino, E.C.; Delwart, E. Plasma Virome of 781 Brazilians with Unexplained Symptoms of Arbovirus Infection Include a Novel Parvovirus and Denguevirus. *PLoS ONE* **2020**, *15*, e0229993. [CrossRef]
 72. Finoketti, F.; dos Santos, R.N.; Campos, A.A.S.; Zani, A.L.d.S.; Barboza, C.M.; Fernandes, M.E.S.; de Souza, T.d.C.P.; dos Santos, D.D.; Bortolanza, G.W.; Filho, H.O.; et al. Detection of Adenovirus, Papillomavirus and Parvovirus in Brazilian Bats of the Species *Artibeus lituratus* and *Sturnira lilium*. *Arch. Virol.* **2019**, *164*, 1015–1025. [CrossRef]
 73. Van de Vurst, P.; Diaz, M.M.; Rodríguez-San Pedro, A.; Allendes, J.L.; Brown, N.; Gutierrez, J.D.; Zarza, H.; Vilges de Oliveira, S.; Cárdenas-Canales, E.; Barquez, R.; et al. Desmodus Rotundus Occurrence Record Database. 2022. Available online: https://figshare.com/articles/dataset/Desmodus_rotundus_Occurrence_Record_Database/15025296 (accessed on 9 February 2023).
 74. IUCN *Artibeus lituratus*; Barquez, R.; Perez, S.; Miller, B.; Diaz, M. *The IUCN Red List of Threatened Species* 2015: E.T2136A21995720; IUCN: Fontainebleau, France, 2015.
 75. Leal, É.; Liang, R.; Liu, Q.; Villanova, F.; Shi, L.; Liang, L.; Li, J.; Witkin, S.S.; Cui, S. Regional Adaptations and Parallel Mutations in Feline Panleukopenia Virus Strains from China Revealed by Nearly-Full Length Genome Analysis. *PLoS ONE* **2020**, *15*, e0227705. [CrossRef]
 76. Pereira, C.A.D.; Leal, É.S.; Durigon, É.L. Selective Regimen Shift and Demographic Growth Increase Associated with the Emergence of High-Fitness Variants of Canine Parvovirus. *Infect. Genet. Evol.* **2007**, *7*, 399–409. [CrossRef]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.