

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

**ESTUDO METAGENÔMICO PARA MONITORAMENTO DE VÍRUS EM  
AMOSTRAS DE MORCEGOS DO PROGRAMA DA RAIVA DO RIO GRANDE DO SUL**

**Aline Alves Scarpellini Campos**

**Porto Alegre**

**2018**

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

**ESTUDO METAGENÔMICO PARA MONITORAMENTO DE  
VÍRUS EM AMOSTRAS DE MORCEGOS DO PROGRAMA DA RAIVA DO  
RIO GRANDE DO SUL**

**Autora: Aline Alves Scarpellini  
Campos**

**Dissertação apresentada como  
requisito parcial para obtenção do  
grau de mestre em ciências  
veterinárias**

**Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra<sup>a</sup> Ana Cláudia  
Franco**

**Porto Alegre  
2018**

### CIP - Catalogação na Publicação

Campos, Aline Alves Scarpellini  
ESTUDO METAGENÔMICO PARA MONITORAMENTO DE VÍRUS EM  
AMOSTRAS DE MORCEGOS DO PROGRAMA DA RAIVA DO RIO  
GRANDE DO SUL / Aline Alves Scarpellini Campos. --  
2018.  
63 f.  
Orientadora: Ana Claudia Franco.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária,  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias,  
Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. Diversidade viral. 2. Metagenômica. 3. Virus de  
morcegos. I. Franco, Ana Claudia, orient. II. Título.

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

**ALINE ALVES SCARPELLINI CAMPOS**

**ESTUDO METAGENÔMICO PARA MONITORAMENTO DE VÍRUS EM AMOSTRAS  
DE MORCEGOS DO PROGRAMA DA RAIVA DO RIO GRANDE DO SUL**

Dissertação aprovada com requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela comissão formada pelos doutores:

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Ana Cláudia Franco**  
**Orientadora e Presidente da Comissão**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Frazzon**  
**Membro da Comissão**

**Dra<sup>a</sup> Helena Beatriz de Carvalho Ruthner Batista**  
**Membro da Comissão**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Juliana Comerlato**  
**Membro da Comissão**

**Porto Alegre**  
**2018**

**Aline Alves Scarpellini Campos**

**ESTUDO METAGENÔMICO PARA MONITORAMENTO DE VÍRUS EM AMOSTRAS  
DE MORCEGOS DO PROGRAMA DA RAIVA DO RIO GRANDE DO SUL**

Aprovado em 15 de Março de 2018.

APROVADO POR:

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Ana Cláudia Franco  
Orientadora e Presidente da Comissão

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Guedes Frazzon  
Membro da Comissão

---

Dra<sup>a</sup> Helena Beatriz de Carvalho Ruthner Batista  
Membro da Comissão

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Juliana Comerlato  
Membro da Comissão

# ESTUDO METAGENÔMICO PARA MONITORAMENTO DE VÍRUS EM AMOSTRAS DE MORCEGOS DO PROGRAMA DA RAIVA DO RIO GRANDE DO SUL <sup>1</sup>

## RESUMO

Morcegos são reservatórios naturais de uma grande variedade de vírus de interesse a saúde pública, incluindo vírus zoonóticos que podem causar patologias graves aos humanos. Dados epidemiológicos demonstram que o morcego é a espécie animal responsável pela maioria dos casos de raiva humana no Brasil nas últimas duas décadas. A mudança no perfil epidemiológico desta doença, que anteriormente era predominantemente transmitida por cães, gerou um aumento nas amostras de morcegos enviadas aos órgãos públicos para a vigilância do vírus rábico. No presente estudo, amostras obtidas de morcegos urbanos da espécie *Tadarida brasiliensis* monitorados no âmbito do Programa de Controle e Profilaxia da Raiva do Estado do Rio Grande do Sul foram analisadas por abordagem de metagenômica, com objetivo de identificar outros vírus, que representassem risco à saúde pública ou não, colaborando para a melhor compreensão da diversidade viral destes animais. Foram encontradas sequências relacionadas a 04 famílias virais que infectam uma ampla variedade de hospedeiros: *Anelloviridae*, *Circoviridae*, *Papillomaviridae* e *Poxviridae*. Estes achados auxiliam no melhor conhecimento sobre os vírus carregados por morcegos desta região e demonstram que o uso da metagenômica como instrumento de vigilância amplia a gama de vírus de interesse que podem ser monitorados nestas amostras.

Palavras-chave: Metagenômica, morcegos, vírus zoonóticos, vigilância.

<sup>1</sup>Dissertação de Mestrado em Ciências Veterinárias – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. Março, 2018.

# METAGENOMIC STUDY FOR MONITORING VIRUSES IN BAT SAMPLES FROM RABIES CONTROL PROGRAM <sup>1</sup>

## ABSTRACT

*Bats are natural reservoirs for a wide variety of viruses of public health concern, including zoonotic viruses that can cause severe diseases in humans. Epidemiological data revealed that bats are the animal species responsible for most cases of human rabies in Brazil in the last two decades. This change in the rabies epidemiological profile, which was previously predominantly transmitted by dogs, generated an increase in the number of bats samples sent to public organs for surveillance of rabies virus. In the present study, samples obtained from urban bats from the species Brazilian free-tailed bat, monitored under the Rio Grande do Sul State Rabies Control and Prophylaxis Program were analyzed by a metagenomic approach with the objective of identifying other viruses, that pose as a risk to public health or not, providing a better understanding of bats viral diversity locally and in the general way. Sequences related to 04 viral families that infect a wide variety of hosts have been found: Anelloviridae, Circoviridae, Papillomaviridae e Poxviridae. These findings improves the knowledege about the viruses carried by these animals and demonstrate that the use of metagenomics as a surveillance tool expand the range of viruses of public health concern investigated in these samples.*

*Keywords: Metagenomics, bats, zoonotic virus, surveillance.*

<sup>1</sup>Master of Science Thesis in Veterinarian Sciences –Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. March, 2018.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*

CAV: *chiken anemia virus*

CDC: *Centers for Disease Control and Prevention*

CEVS: Centro Estadual de Vigilância em Saúde

CV: circovírus

DNA: ácido desoxirribonucléico

dsDNA: *double stranded DNA viruses*

HPV: human papilloma virus

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

ICTV: *International Committee on Taxonomy of Viruses*

IPVDF: Instituto de Pesquisa Veterinárias Desidério Finamor

Kb: *kilo base*

kbp: *kilo base pair*

MEGA: *Molecular Evolutionary Genetics Analysis*

MERS-CoV: síndrome respiratória do oriente médio

ML: máxima verossimilhança

mRNA: ácido ribonucléico mensageiro

NCBI: *National Center for Biotechnology Information*

NIAID: *National Institute of Allergy and Infectious Diseases*

OMS: Organização Mundial de Saúde

OPAS: Organização Pan-Americana de Saúde

ORF: *open reading frame*

PAvE: *Papillomavirus Episteme*

PCR: reação em cadeia da polimerase

PCV: porcine circovirus

PECPR: Programa Estadual de Controle e Profilaxia Da Raiva

PNCPR: Programa Nacional de Controle e Profilaxia da Raiva

PV: papilomavírus

RNA: ácido ribonucléico

SARS-CoV: síndrome respiratória aguda dos humanos

ssDNA: *single stranded DNA viruses*

SUS: Sistema Único de Saúde

*T. brasiliensis: Tadarida brasiliensis*

TTV: torque teno vírus

VMC: vírus do molusco contagioso

VVAR: vírus da varíola

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição das amostras .....	20
Tabela 2 - <i>Contig</i> utilizados na predição das <i>ORF'S</i> de papilomavírus.....	22
Tabela 3 - Descrição por amostra dos resultados obtidos no sequenciamento .....	25
Tabela 4 - Descrição dos <i>hits</i> dos <i>contigs</i> virais da amostra A2.....	26
Tabela 5 - Descrição dos <i>hits</i> dos <i>contigs</i> virais da amostra A5.....	27
Tabela 6 - Descrição dos <i>hits</i> dos <i>contigs</i> virais da amostra A6.....	32
Tabela 7 - Gene L1 papilomavírus de morcegos.....	45

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Mapa dos municípios do Rio Grande do Sul que já tiveram colônias monitoradas nas atividades do Projeto de Monitoramento de Morcegos.....	5
Figura 2 <i>Tadarida brasiliensis</i> (Imagem: André Witt) .....	8
Figura 3 Mapa do Rio Grande do Sul com os locais de coleta: municípios de Tavares e São Gabriel (Fonte: CEVS, 2018).....	18
Figura 4 Coleta de urina (Imagem: Aline Campos).....	19
Figura 5 Representação da classificação taxonômica das <i>reads</i> geradas baseada na análise da ferramenta <i>online</i> Taxonomer .....	24
Figura 6 Árvore filogenética da sequência de circovírus, contig 69, da amostra A2 e sua relação com outros membros representativos da família <i>Circoviridae</i> .....	35
Figura 7 Árvore filogenética das sequências TbraPV1, TbraPV2 alinhadas com sequências referências do gene L1 de papilomavírus de todas as espécies de hospedeiros conhecidas. ....	36
Figura 8 Filogenia das sequências TbraPV1, TbraPV2 alinhadas com sequências referências do gene L1 de papilomavírus de morcegos.....	37
Figura 9 Árvore filogenética gerada pelo método de <i>Maximum Likelihood</i> incluindo 17 sequências de aminoácidos do gene relacionado a RNA polimerase de poxvirus e a sequência gerada a partir do <i>contig 37</i> da amostra A5.....	38
Figura 10 Lesões cutâneas compatíveis com papilomatose em morcego <i>T. brasiliensis</i> de Tavares, RS (Imagem: Aline Campos).....	40
Figura 11 Lesões cutâneas compatíveis com papilomatose em morcego <i>T. brasiliensis</i> de Tavares, RS (Imagem: Aline Campos).....	40

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1 Objetivo Geral .....	2
1.2 Objetivos Específicos .....	3
2. O Programa da Raiva no Rio Grande Do Sul – Programa Estadual de Controle e Profilaxia da Raiva - PECPR.....	3
3. Revisão Bibliográfica .....	6
3.1 Os Quirópteros .....	6
3.2 Morcegos enviados ao PECPR .....	7
3.3 <i>Tadarida brasiliensis</i> .....	7
3.4 Vírus de potencial zoonótico detectados em Quirópteros .....	9
3.5 Famílias Virais .....	10
3.5.1 <i>Anelloviridae</i> .....	10
3.5.2 <i>Circoviridae</i> .....	11
3.5.3 <i>Papillomaviridae</i> .....	12
3.5.4 <i>Poxviridae</i> .....	13
3.6 Metagenômica .....	15
3.7 Bioinformática.....	16
4. Material e métodos.....	18
4.1 Amostras.....	18
4.2 Processamento das amostras.....	20
4.3 Enriquecimento do DNA.....	21
4.4 Verificação da qualidade dos ácidos nucleicos e sequenciamento .....	21
4.5 Bioinformática.....	21
4.6 Análises filogenéticas .....	22
5. Resultados.....	23
5.1 Resultados de metagenômica.....	23
5.1.1 Anelovírus .....	34
5.1.2 Circovírus.....	34
5.1.3 Papilomavírus .....	35
5.1.4 Poxvírus .....	37
6. Discussão.....	38

7. Conclusões.....	44
<b>Referências</b> .....	<b>46</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Dentre os animais silvestres que agem como reservatórios de vírus, os morcegos parecem ter importância destacada. Os vírus originados em morcegos são responsáveis pelos mais graves episódios de doenças zoonóticas emergentes das últimas décadas (PLOWRIGHT et al., 2014). Alguns destes vírus são conhecidamente agentes de doenças importantes para humanos e animais, como o vírus rábico, os coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda dos Humanos (SARS-CoV) e Síndrome Respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV), e o filovírus Ebola. Outros vírus tais como herpesvírus, alfavírus, flavivírus e bunivírus foram detectados, mas não se sabe qual a real importância dos morcegos como reservatórios e potenciais transmissores destes vírus (CALISHER et al., 2006; LEROY et al., 2005). No caso do coronavírus MERS-CoV, filogeneticamente relacionado ao SARS-CoV, aparentemente o reservatório intermediário são dromedários. É possível que o reservatório principal do MERS-CoV sejam espécies de morcegos que ocorrem naquela região geográfica. Desde 2012 até o momento há mais de 2140 casos confirmados de infecção por MERS-CoV (<http://www.who.int/emergencies/mers-cov/en/>) reportados em 27 países, com uma letalidade média de 30 % (LIN et al., 2014). Em 2013 foi detectado *Alphacoronavirus* em morcegos urbanos insetívoros da região urbana de Porto Alegre, no Rio Grande do Sul. Apesar dos alfacoronavirus não apresentarem risco à saúde humana, o fato de vírus desta família terem sido encontrados em morcegos urbanos aponta para a necessidade da avaliação do risco que os vírus destes animais podem representar para saúde pública e para a vigilância contínua (BONNY et al., 2017; SALES LIMA et al., 2013). Até o momento, o vírus da raiva é o único vírus de importância zoonótica associado a morcegos no Rio Grande do Sul.

Todos os anos têm sido documentados novos patógenos em morcegos, a maioria deles ainda não caracterizados (KUZMIN et al., 2011). O motivo pelo qual diferentes espécies de morcegos podem albergar tantas espécies de vírus permanece um assunto a ser elucidado. Fatos como longevidade, aspectos evolutivos, estrutura populacional, hábitos migratórios e aspectos da imunologia dos morcegos parecem contribuir para o seu papel como reservatório desta grande variedade de vírus. Além disso, são animais capazes de voar por longas distâncias e compartilhar, em alguns casos, o mesmo abrigo ou ambiente. Especula-se que estas características possam facilitar a persistência e transmissão de vírus entre morcegos (CALISHER et al., 2006).

Quirópteros, nome dado a ordem que compreende os morcegos, constitui um dos grupos mais diversificados entre todos os mamíferos e representam, por si só, mais de 20% de todas as espécies de mamíferos conhecidas (REIS et al., 2007). Pouco é conhecido sobre a ocorrência e sanidade destes animais em áreas urbanas. No Brasil, boa parte do conhecimento da biologia das espécies de morcegos que habitam nas cidades se deve as amostras enviadas ao Programa de Controle da Raiva, a título de vigilância passiva. Não obstante a diversidade biológica e constantes interações entre as pessoas e morcegos, o monitoramento dos agentes infecciosos com potencial zoonótico em morcegos é praticamente inexistente. O presente estudo, que tem em vista identificação de vírus e a vigilância preditiva de vírus de interesse em saúde pública, foi realizado em amostras de fezes e urina coletadas durante as atividades do Projeto de Monitoramento de Morcegos, realizado regularmente na rotina de atividades do Programa de Controle e Profilaxia da Raiva – PECPR. Assim sendo, a justificativa e o objeto desta pesquisa vão de encontro às diretrizes da Vigilância em Saúde no âmbito geral do SUS e do Centro Estadual de Vigilância em Saúde do Rio Grande do Sul, órgão executor das ações de vigilância ambiental e do Programa Estadual de Controle e Profilaxia da Raiva no Rio Grande do Sul, que tem entre seus objetivos estabelecer os principais parâmetros, atribuições, procedimentos e ações relacionadas à vigilância ambiental em saúde nas diversas instâncias de competência, identificando riscos, divulgando informações referentes a fatores ambientais condicionantes e determinantes que interfiram na saúde humana em especial as relativas a vetores, reservatórios e hospedeiros. Para realização deste estudo foram utilizadas amostras coletadas em dois municípios do Rio Grande do Sul, em abrigos monitorados, utilizados pela espécie *Tadarida brasiliensis*, animais considerados sinantrópicos e por isso de grande interesse para a saúde pública.

A pesquisa foi realizada através da extração de ácidos nucléicos, submetidos a análise através da metagenômica para identificação de sequências genômicas de vírus potencialmente patogênicos ou não que estivessem presentes nas amostras.

### 1.1 Objetivo Geral

Contribuir para a identificação e monitoramento viral em morcegos, visando uma vigilância preditiva, através de amostras do Programa de Controle e Profilaxia da Raiva

## 1.2 Objetivos Específicos

Realizar o sequenciamento de alto desempenho visando identificar genomas de vírus a partir de amostras biológicas de morcegos *Tadarida brasiliensis* coletados no Rio Grande do Sul;

Analisar, por meio de ferramentas de bioinformática, os dados provenientes do sequenciamento das amostras;

Identificar vírus conhecidos e novos encontrados nas amostras, comparando com populações virais já descritas nas diferentes espécies de morcegos;

## 2. O Programa da Raiva no Rio Grande Do Sul – Programa Estadual de Controle e Profilaxia da Raiva - PECPR

O Programa Estadual de Controle e Profilaxia da Raiva (PECPR) foi implantado no Rio Grande do Sul em 1976, seguindo as diretrizes do Programa Nacional de Controle e Profilaxia da Raiva (PNCPR). Desde o início do programa nos anos 70 até o ano de 1995, foram realizadas campanhas massivas de vacinação canina e felina. Anos de trabalho com bom índice de cobertura vacinal aliado a outras tantas atividades de prevenção e controle levaram o estado do Rio Grande do Sul ao controle da Raiva Urbana. A partir de 1995, após decisão conjunta entre Secretaria Estadual de Saúde, Ministério da Saúde e Organização Pan-americana de Saúde (OPAS), o Rio Grande do Sul deixou de realizar campanhas públicas de vacinação contra raiva em cães e gatos, permanecendo a indicação de vacinação individual, realizada por conta do proprietário ou tutor do animal (DIEDRICH et al., 2007).

Foram então instituídas Normas Técnicas e Operacionais para implementar o sistema de vigilância epidemiológica e ambiental, no intuito de prontamente identificar casos de recorrência da doença ao Estado. Essas ações normatizadas, que incluíam medidas como envio de amostras de 0,2% da população canina estimada anualmente, recolhimento de amostras de animais mortos em vias públicas e envio de amostras de animais com sintomas neurológicos, aumentaram significativamente o número de amostras biológicas de cães e gatos enviadas para o diagnóstico da raiva.

A partir de 2003, os morcegos passaram a ser o principal vetor dos casos de

Raiva Humana no Brasil. Registrou-se também o aumento de casos relacionados a animais silvestres (BEATRIZ DE CARVALHO et al., 2007; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). Esta mudança no perfil epidemiológico despertou as autoridades de saúde para a necessidade de atividades distintas para o monitoramento do vírus rábico no ciclo silvestre e gerou o aumento do número de amostras de morcegos recebidas através da vigilância passiva.

Para melhor compreender este complexo ciclo epidemiológico no Rio Grande do Sul surgiram dois projetos com ações voltadas especificamente para o ciclo silvestre do vírus rábico:

- *Projeto de Fauna Atropelada e Capturada*, que encaminha para diagnóstico de identificação do vírus rábico os animais silvestres encontrados mortos em rodovias e também realiza pesquisa de anticorpos antirrábicos em animais silvestres que foram recolhidos ou capturados em atividades de monitoramento e resgate do IBAMA.
- *Projeto de Monitoramento de Morcegos*, onde se executam ações de mapeamento e monitoramento das colônias, principalmente as urbanas e periurbanas, identificadas pelos técnicos responsáveis pelo PECPR nas 19 Coordenadorias Regionais de Saúde, que regionalizam as ações e serviços de saúde por todo estado. As atividades deste projeto incluem o anilhamento dos indivíduos, com vistas a melhor compreender a movimentação e dispersão destes animais, e coleta regular de amostras destas colônias.

Desde 2014, ano de início do *Projeto de Monitoramento de Morcegos*, até a presente data, já foram mapeadas 21 colônias em 15 municípios e anilhados 1879 morcegos (Figura 1). As atividades de coleta desenvolvidas nestes dois projetos são complexas e envolvem grande quantidade de materiais, tempo, deslocamento, além da mão de obra especializada, devidamente vacinada e de diferentes expertises.

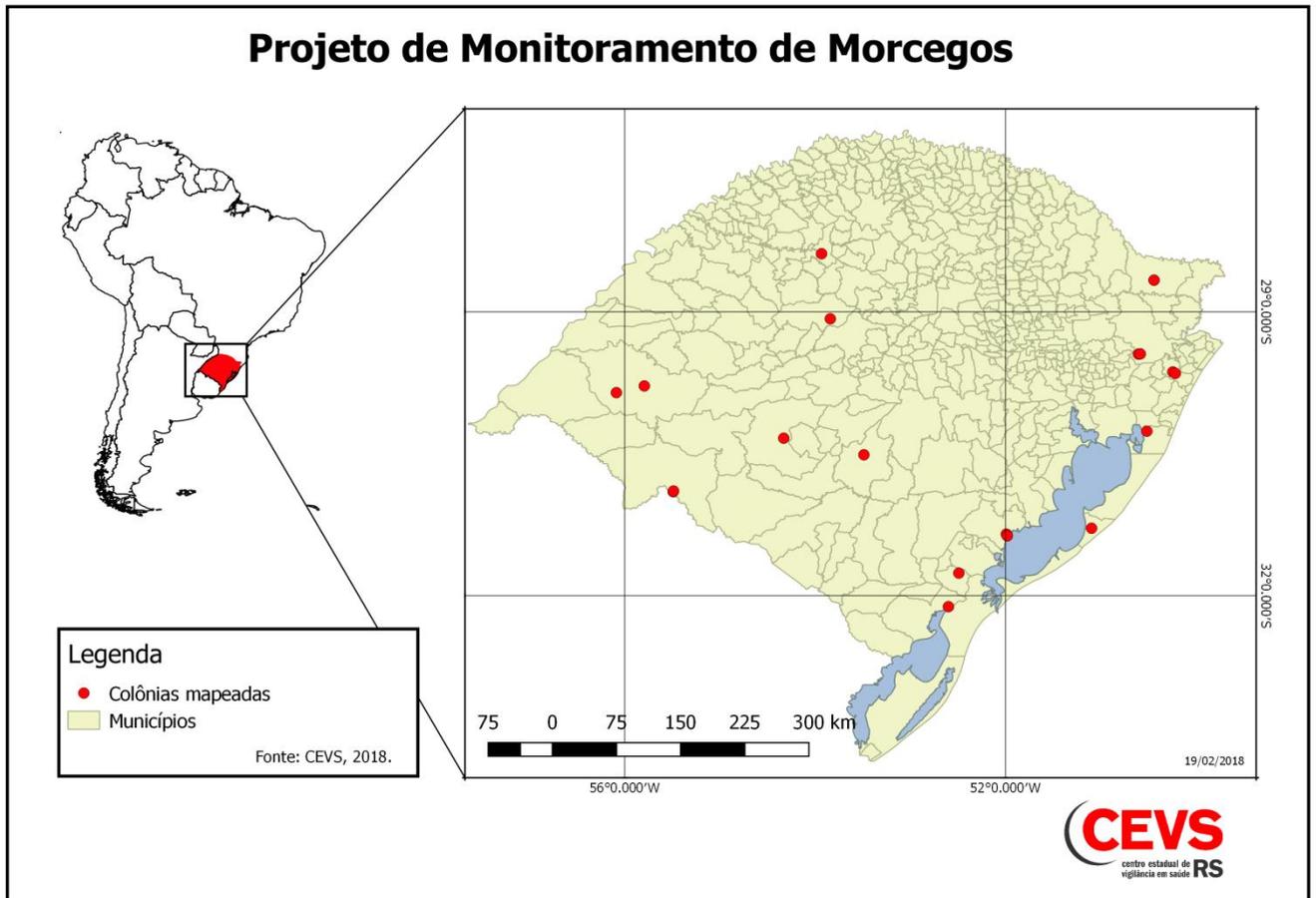


Figura 1 Mapa dos municípios do Rio Grande do Sul que já tiveram colônias monitoradas nas atividades do Projeto de Monitoramento de Morcegos

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Os Quirópteros

Morcegos são mamíferos pertencentes à ordem Chiroptera (cheir=mão; pteron=asa /grego). A capacidade de vôos autônomos é exclusiva aos morcegos entre os mamíferos. Esta característica única dos morcegos se deve ao fato de possuírem membros anteriores adaptados como asas membranosas. O polegar é livre e os demais dedos e metacarpos são revestidos por membrana que forma a superfície das asas. Atualmente a ordem Chiroptera é composta por 20 famílias, 209 gêneros e 1142 espécies, representando a segunda maior diversidade dentre os mamíferos, atrás somente da ordem Rodentia (IUCN 2016).

Há duas subordens clássicas de morcegos: a Megachiroptera, as raposas voadoras, que tem a família Pteropodidae como a única representante desta subordem; são morcegos exclusivos aos trópicos e subtropicais do “velho mundo” e que, portanto, não ocorrem no Brasil; e a Microchiroptera, os morcegos verdadeiros, composta por 19 famílias e mais de 900 espécies. Os microquirópteros ocorrem em todo planeta, à exceção dos pólos. Estes morcegos têm a dieta mais variada entre os mamíferos, podendo se alimentar de frutos, sementes, folhas néctar, pólen, artrópodes, pequenos vertebrados, peixes e sangue (CALISHER et al., 2006; NOGUEIRA et al., 2007; REIS et al., 2007).

Cerca de 70% dos morcegos são insetívoros, sendo estes os de maior ocorrência. Existem apenas três espécies hematófagas e sua existência se dá apenas nas Américas, na Região Neotropical. Das três espécies de hematófagos existentes, duas se alimentam do sangue de aves (*Diphylla ecaudata* e *Diaemus youngii*) e uma se alimenta também de sangue de mamíferos, além de sangue de aves (*Desmodus rotundus*). Os quirópteros são animais de distribuição, hábitos e dieta variados, todavia, todos têm um importante papel biológico, seja na dispersão de sementes, polinização de plantas ou controle de insetos ou até mesmo de animais (REIS et al., 2007). Existem no Brasil 9 famílias de morcegos de ocorrência documentada, divididas em 68 gêneros e 178 espécies (NOGUEIRA et al., 2014).

### 3.2 Morcegos enviados ao PECPR

O estado do Rio Grande do Sul apresenta uma ampla diversidade de morcegos, com pelo menos 40 espécies identificadas. Estas espécies são pertencentes a quatro famílias: *Molossidae*, *Noctilionidae*, *Phyllostomidae* e *Vespertilionidae* (CEVS 2012; NORONHA, 2016). Quanto às espécies hematófagas, pertencentes à família *Phyllostomidae* e de grande relevância para dispersão do vírus rábico, no Rio Grande do Sul há o registro documentado de apenas uma delas, o *Desmodus rotundus*. Em 2017 foram registrados rumores, ainda não documentados, da ocorrência da espécie *Diphylla ecaudata* no estado.

No país, mais de 40 espécies de morcegos já foram encontradas infectadas pelo vírus da raiva (SODRE et al. 2010), sendo assim, todas as espécies de morcego são de interesse para o PECPR para o monitoramento do vírus rábico, já que o maior conhecimento das espécies envolvidas permite a elaboração de um melhor perfil epidemiológico regional. Em razão do Programa de Controle da Raiva dos Herbívoros, executado pela Secretaria Estadual da Agricultura, realizar atividades específicas ao controle dos morcegos hematófagos (MAPA, 2009), não são executadas ações com estas espécies no Projeto de Monitoramento de Morcegos.

São da família *Molossidae* a maioria das amostras encaminhadas pela população para a vigilância passiva da raiva. Os membros desta família são exclusivamente insetívoros (REIS et al., 2007).

### 3.3 *Tadarida brasiliensis*

O *Tadarida brasiliensis* é um morcego insetívoro, da família *Molossidae*, amplamente distribuído nos países da América do Sul, incluindo Brasil, Uruguai, Chile e Argentina. Ocorre também na América do Norte e América Central. No Brasil, sua distribuição não é uniforme, não havendo ocorrência na Amazônia, baixa densidade na região sudeste e centro oeste e alta densidade na região sul. A época de reprodução ocorre no final da primavera e início do verão, quando se formam grandes colônias maternidades, onde os filhotes permanecem todos juntos com fêmeas adultas em seu entorno (REIS et al., 2007). Apresentam marcada flutuação sazonal no número de indivíduos ao longo do ano (FÁBIAN & MARQUES, 1996) e são animais com capacidade de alçar vôos longos e em alta velocidade, podendo percorrer mais de 100

quilômetros em um único dia (MCCRACKEN et al., 2016). É considerado um animal comum nos municípios do Rio Grande do Sul, onde também é conhecido como “Morcego das Casas” ou “Morceguinho do Telhado”. Apresentam grande adaptação às cidades (FRANCO & RUI, 2011), aproveitando-se da abundância de insetos atraídos pelas diversas fontes de luz e ocupando variados tipos de abrigos nos centros urbanos e peri urbanos, onde geram colônias com grande número de indivíduos, podendo chegar aos milhares. Por essa proximidade ao homem, são considerados animais sinantrópicos(CEVS, 2012) e, portanto, de grande interesse para atividades de vigilância. Nas colônias em centros urbanos se aglomeram próximos ao telhado formando grandes grupamentos. Também se adaptam bem a frestas, preferindo os locais altos e seguros como abrigo. São animais pequenos(Figura 2) com massa corporal média de 11 gramas (FÁBIAN & MARQUES, 1996).

As amostras utilizadas nesta pesquisa foram coletadas em colônias monitoradas de *T. brasiliensis* localizadas em duas cidades gaúchas - Tavares e São Gabriel.



Figura 2 - Imagem de um *Tadarida brasiliensis* (Imagem André Witt)

### 3.4 Vírus de potencial zoonótico detectados em Quirópteros

Os morcegos apresentam uma grande diversidade viral quando comparados a outros animais (SALMIER et al., 2017). Até o início de 2016, 248 vírus pertencentes a 24 famílias virais já haviam sido descritos em morcegos (YOUNG; OLIVAL, 2016). Esta diversidade sugere que o papel desses animais como reservatório de uma ampla gama de vírus não se dá ao acaso (MORATELLI; CALISHER, 2015). Aparentemente, aspectos da biologia, diversidade de espécies e evolução dos morcegos permitiram ao longo dos anos uma eficiente coespeciação entre os morcegos e os vírus (CALISHER et al., 2006).

Apesar do grande número de vírus isolados ou detectados em morcegos, a transmissão da maioria deles para outros animais ou humanos ainda não foi demonstrada (CALISHER et al., 2006; MORATELLI; CALISHER, 2015). Existem porém importantes zoonoses virais que têm o morcego como seu reservatório e que já tiveram transmissão ao homem e a outras espécies caracterizadas, a começar pela raiva que foi o primeiro vírus de interesse reconhecido em morcegos (MORATELLI; CALISHER, 2015). Outros *Lyssavirus* associados a manifestações clínicas semelhantes as da raiva em humanos já foram isolados de morcegos na Ásia Central, Austrália, África do Sul, Rússia e China (CALISHER et al., 2006; KUZMIN et al., 2011). *Filovirus* como o Marburg e o Ebola vírus, que causam uma grave febre hemorrágica em humanos com uma alta taxa de letalidade, também já foram associados aos morcegos, os quais durante o surto de Ebola no Congo representavam uma importante fonte de alimentação para o povo local (KUZMIN et al., 2011). Vírus capazes de induzir quadros respiratórios graves tais como *Henipavirus* (Hendra e Nipah virus), da família dos *Paramyxovirus*, e os coronavírus SARS-CoV e MERS-CoV, que apresentam potencial pandêmico pela fácil disseminação, também estão associados a morcegos (PLOWRIGHT et al., 2014). *Alphacoronavirus*, da família dos *Coronavirus*, foram recentemente identificados em morcegos da Flórida, nos Estados Unidos e em Porto Alegre, no Brasil (BONNY et al., 2017; SALES LIMA et al., 2013).

Na China, com emprego da técnica de metagenômica, foram detectados *Papillomavirus* e Influenza A, ambos com alta identidade aos vírus de humanos, e um novo tipo de papilomavírus de morcegos foi descrito (TSE et al., 2012; ZHENG et al., 2017).

A diversidade viral encontrada nos morcegos varia em função do tipo de

amostra, da taxonomia do hospedeiro e da família viral estudada. Esta oscilação pode ser influenciada também pela abundância e facilidade de captura de alguns indivíduos (YOUNG; OLIVAL, 2016).

### 3.5 Famílias Virais

#### 3.5.1 *Anelloviridae*

Os anelovírus são vírus DNA, de fita simples e simetria icosaédrica, não envelopados, com tamanho aproximado de 30 a 32nm. O seu genoma é circular e possui por volta de 3.8kb. Eles se replicam no núcleo da célula, onde o DNA de fita simples é convertido em dupla fita para dar origem ao RNA mensageiro. Os componentes desta família possuem um dos menores genomas de vertebrados documentados. A família possui 68 espécies e 12 gêneros conhecidos e a sua taxonomia é determinada através de estudos comparativos das sequências de nucleotídeos da região codificante que compõe a ORF1 (*INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES* (ICTV), 2017). Os anelovírus já foram encontrados em diversas espécies de hospedeiros, incluindo primatas, cães, felinos, suínos, pinípedes e mosquitos (NISHIYAMA et al., 2014). Recentemente foram descritas novas espécies de anelovírus em morcegos de Porto Alegre (CIBULSKI et al., 2014) e em roedores e morcegos da cidade de São Paulo (DE SOUZA et al., 2018).

A transmissão dos anelovírus se dá principalmente por contato oral/fecal e pouco ainda é conhecido sobre a patogenia deste vírus. Essa falta de dados é devida em parte a ausência de células e modelos animais apropriados, o que tem dificultado o estudo dos anelovírus em laboratório (DE SOUZA et al., 2018; NISHIYAMA et al., 2014).

Estes vírus são associados a infecções crônicas e de grande prevalência na população mundial. Estima-se que mais de 90% dos humanos estejam infectados de forma assintomática pelo torque teno vírus (TTV) do gênero *Alphatorquevirus* (FLINT et al., 2015).

### 3.5.2 *Circoviridae*

A família *Circoviridae* é composta por vírus DNA de fita simples (ssDNA), simetria icosaédrica e que inclui o menor vírus de vertebrados conhecido. Seu genoma é circular e possui por volta de 1.8 a 3.8kb. Membros desta família são classificados em dois gêneros: *Circovirus* e *Cyclovirus*. A distribuição é mundial e seus hospedeiros naturais são os vertebrados. Membros desta família são conhecidos principalmente por causar doença em aves e suínos. Até pouco tempo atrás esta família era dividida em dois gêneros: *Circovirus*, que contem patógenos bem documentados de aves e suínos, e *Gyrovirus*, que incluía uma única espécie, o vírus da anemia das galinhas. Com a difusão do uso da metagenômica, membros da família *Circoviridae* foram detectados em uma diversificada gama de hospedeiros, incluindo peixes, diversas espécies de mamíferos e invertebrados. Desta forma foi possível identificar um distinto grupo de vírus relacionados ao gênero *Circovirus* que foram caracterizados em um novo gênero, os *Cyclovirus*. Desde 2016 a taxonomia foi retificada pelo *International Committee on Taxonomy of Viruses - ICTV*, e os *Gyrovirus* passaram a fazer parte da família dos *Anelloviridae*, também de genoma DNA circular de fita simples (ROSARIO et al., 2017). Dentro de cada gênero a classificação das espécies é realizada pela análise do genoma completo de nucleotídeos, particularmente pela posição de origem da região codificadora (*ori*), sendo 80% o limiar mínimo de identidade dentro de uma mesma espécie (LIAN et al., 2014; BREITBART et al., 2017)

Já foi demonstrado que os circovírus, e os genomas relacionados nesta família, têm um antepassado comum. Elementos virais endógenos destes vírus foram encontrados nos cromossomos de diversos mamíferos, indicando que possivelmente estes genomas já se replicam nestes hospedeiros há 100 milhões de anos ou mais (KATZOURAKIS et al., 2010; DELWART & LI, 2012).

Os circovírus infectam diferentes espécies de aves, incluindo psitacídeos - espécie acometida pela doença de bico e penas, e galinhas (DELWART & LI, 2012; LIAN et al., 2014; HAKIMUDDIN et al., 2016). Nos aviários industriais a ocorrência da anemia infecciosa das galinhas (CAV, do inglês *chicken anemia virus*) leva os animais a apresentar retardo de crescimento e sintomas secundários associados a imunodeficiência, resultando em grandes perdas econômicas (CHACÓN et al., 2010). Em mamíferos, apenas duas espécies de circovírus tiveram a sua ocorrência amplamente documentada, o circovírus suíno 1 e 2 (PCV1 e PCV2 do inglês *porcine circovirus*). O

PCV1 é considerado não patogênico, já no PCV2 a infecção pode variar de assintomática a uma infecção sistêmica severa, também gerando grandes perdas quando da ocorrência em criatórios industriais (DELWART & LI, 2012; LIAN et al., 2014). Apesar do constante contato entre homens e suínos, não há evidência de que PCV1 e PCV2 possa infectar humanos (DELWART & LI, 2012; GILLILAND et al., 2012). Genoma de espécies virais do gênero *Cyclovirus* já foram encontradas em fezes de chimpanzés e humanos. Em humanos, um estudo indicou a presença de cyclovírus no líquido de pacientes com paraplegia, porém onexo causal não foi claramente comprovado (SMITS et al., 2010; DELWART & LI, 2012; LIAN et al., 2014). Em morcegos, cyclovírus já foram encontrados na fezes e no tecido muscular, demonstrando não se tratar apenas de um achado do trato gastro intestinal devido a contaminação derivada da alimentação destes animais (DELWART & LI, 2012). A distribuição destes vírus é mundial e as vias de transmissão horizontal e vertical já foram demonstradas (CHACÓN et al., 2010).

### 3.5.3 *Papillomaviridae*

Os papilomavírus são vírus DNA de fita dupla (dsDNA), circulares, com simetria icosaédrica e genoma que varia por volta de 8kbp. Esses vírus se replicam no núcleo de células epiteliais em diferenciação e apresentam modos distintos de síntese de DNA de acordo com o estágio de diferenciação da célula, apresentando uma replicação de manutenção quando a célula está menos diferenciada, passando para replicação produtiva nos estágios finais de diferenciação da célula epitelial (FLINT et al., 2015). São vírus pertencentes à família *Papillomaviridae* que está dividida em 49 gêneros (*International Committee on Taxonomy of Viruses ICTV 9th Report, 2011*). Estes vírus apresentam tropismo por células epiteliais da pele e de membranas mucosas e ampla diversidade de hospedeiros, infectando diversas espécies de mamíferos, mas também já foram encontrados em aves, tartarugas e cobras. Ainda que a maioria dos papilomavírus cause infecções assintomáticas, alguns podem causar lesões neoplásicas malignas (GARCÍA-PÉREZ et al., 2014). Apresentam distribuição mundial e estão associados à ocorrência de papilomas - popularmente conhecidos como "verrugas" e tumores que podem ter malignidade variável. Por ser a espécie mais estudada, são de humanos a maioria dos papilomas descritos, mas um número crescente de papilomas de animais tiveram seu genoma descrito na última década (RECTOR & RANST, 2013). As espécies

de papilomavírus são classificadas com base na comparação de sequências do gene L1; membros do mesmo gênero devem compartilhar mais que 60% de identidade na sequência de nucleotídeos da ORF do gene L1 (BERNARD et al., 2010). No caso do vírus do papiloma humano - HPV, em inglês *human papilloma virus*, eles ainda podem ser classificados de acordo com seu potencial oncogênico em papilomas de alto e baixo risco. Tanto o de alto como o de baixo risco podem causar o crescimento anormal de células, mas somente os de alto risco codificam as proteínas oncogênicas E6 e E7, associadas a modulação da apoptose e do ciclo celular, levando à imortalização das células e, conseqüentemente, ao câncer (MANNARINI et al., 2009; SCHIFFMAN et al., 2016). Já existe mais de 200 tipos de HPV conhecidos, cada um deles adaptados a um específico tecido epitelial humano. Os de alto risco do gênero *Alphapapillomavirus* são sexualmente transmissíveis e causam o câncer cervical em mulheres (SCHIFFMAN et al., 2016). Nas mulheres o HPV responde por mais de 50% dos cânceres de origem infecciosa, nos homens esse índice não chega a 5% (MANNARINI et al., 2009). Se considerarmos apenas o câncer cervical, este índice sobe para 90%, ou seja, quase a totalidade deste tipo de câncer é causada por HPV (SCHIFFMAN et al., 2016).

A transmissão do papiloma se dá através do contato físico direto com pele ou mucosa infectada. Esta necessidade de contato direto e a natureza espécie específica destes vírus, associada a estabilidade característica dos genomas DNA de dupla fita, contrariam o princípio de que a transmissão inter espécies seja responsável pela plethora de papilomavírus mundialmente disseminada nas variadas espécies de hospedeiros. A hipótese mais aceita é que os antepassados dos papilomas já infectavam os primeiros vertebrados e que vírus e hospedeiros co-evoluíram ao longo do tempo, fazendo da *Papillomaviridae* uma das maiores famílias virais existentes (RECTOR&RANST, 2013).

#### 3.5.4 *Poxviridae*

Poxvírus são vírus DNA de dupla fita, lineares, com genoma de até 300kbp, pertencentes a família *Poxviridae*. Diferentemente da maioria dos outros vírus DNA, os poxvirus se replicam no citoplasma das células.

A família é dividida nos que infectam os invertebrados, *Entomopoxvirinae*, e os que infectam os vertebrados, *Chordopoxvirinae*. A subfamília dos vertebrados é ainda dividida em 11 gêneros (*International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV),

2016). São importantes patógenos que acometem ao homem e diversas espécies de animais, domésticos e silvestres. Dentre os poxvírus destaca-se o vírus da varíola (VVAR), vírus do gênero *Orthopoxvirus*, mundialmente erradicado. O último caso humano de infecção natural de varíola ocorreu na Somália em 1977. A doença foi declarada erradicada em 1980 devido à vacinação massiva realizada sob a forma de campanha mundial liderada pela Organização Mundial de Saúde – OMS. Existem apenas dois laboratórios que tem permissão para manter estoque de vírus vivo de varíola, a saber: *Centers for Disease Control and Prevention* – CDC, nos Estados Unidos e o *Russian State Research Centre of Virology and Biotechnology*, na Rússia (<http://www.who.int/csr/disease/smallpox/en/>, 2017).

O genoma destes vírus é composto por grande moléculas de DNA que contem todos os genes necessários para síntese de DNA e produção de mRNA, o que faz sua replicação depender muito pouco do hospedeiro quando comparado a outros vírus (FLINT et al., 2015).

As manifestações clínicas dos poxvírus possuem um amplo espectro, que podem variar de uma infecção localizada autolimitada até uma infecção generalizada com comprometimento de diversos órgãos. A severidade do quadro clínico é influenciada pela da natureza do vírus e também do hospedeiro. A transmissão se dá por contato direto via aerossóis primários ou através de fômites contaminados. A via de infecção também pode variar em função do vírus e do hospedeiro, no caso do varíola vírus por exemplo o sistema respiratório é a porta de entrada nos humanos, já o vaccínia vírus e o vírus da varíola bovina utilizam abrasões na pele como porta de entrada em humanos (CIESIELSKI, 2008).

Os poxvírus apresentam uma diversificada gama de hospedeiros. O vírus da varíola (VVAR), do gênero *Orthopoxvirus*, e o vírus do molusco contagioso (VMC), do gênero *Molluscipoxvirus*, são específicos de humanos. Já o vírus da varíola bovina, pode infectar roedores, cães, gatos, cavalos, bovinos, primatas e humanos. O vírus da varíola dos macacos, em inglês *monkeypox virus*, tem capacidade de infectar também os humanos e desde 1970 é reconhecido com alto potencial zoonótico e classificado como possível agente de bioterrorismo (BAKER; MURCIA, 2014). A maioria dos poxvírus tem a capacidade de invadir variados tipos de células de diferentes espécies de hospedeiros, esta peculiaridade independe de receptores espécies específicos e está relacionada a proteínas conservadas encontradas em todos os poxvírus (HALLER et al., 2014). A diversidade de hospedeiros infectados de forma produtiva pode variar

drasticamente mesmo entre espécies virais intimamente relacionadas dentro do mesmo gênero (HALLER et al., 2014).

Muitos poxvírus são nomeados de acordo com a espécie do hospedeiro em que esses vírus foram isolados pela primeira vez, mas nem sempre este é o seu reservatório natural, caso do vírus da varíola bovina, que suspeita-se ser disseminado por roedores e possivelmente por outros pequenos mamíferos (TU et al., 2017) .

Em humanos, desde a erradicação da varíola, o molusco contagioso tem sido a principal causa da ocorrência de infecções causadas por poxvírus (Chen, Anstey, & Bugert, 2013).

Sequências de poxvírus relacionadas ao VMC foram encontradas em morcegos na África, e também em cavalos, burros, cangurus, cães, pombos e chipanzés (FOX et al., 2012). Nos Estados Unidos, poxvírus foram isolados da articulação de morcegos do gênero *Eptesicus*, alojados um centro de conservação da vida selvagem, que apresentaram severo quadro clínico articular (EMERSON et al., 2013). São desconhecidas a prevalência e as implicações que as doenças causadas por poxvírus podem representar para a população de morcegos (BAKER; MURCIA, 2014).

### 3.6 Metagenômica

O diagnóstico das infecções virais pode ser feito por duas abordagens: por métodos diretos, identificando a presença do vírus propriamente dito, ou por métodos indiretos através da detecção de anticorpos vírus-específicos.

Considerando a abordagem direta, o uso do isolamento viral em cultivo de células permite a detecção e identificação dos vírus, mas para tanto é necessário um laboratório equipado e adequado ao nível de biossegurança exigido, o que pode se tornar muito oneroso. Quando se trata da pesquisa de amostras que podem conter vírus desconhecidos ou até mesmo ainda não descritos, normas ainda mais rigorosas de biossegurança devem ser seguidas, o que limita muito este tipo de abordagem. Existem ainda as particularidades individuais e inerentes ao cultivo dos diferentes microrganismos estudados, que podem dificultar e comprometer o entendimento mais amplo da comunidade microbiana da amostra pesquisada (QUINCE et al., 2017). A evolução da biologia molecular, com o uso de técnicas tais como a reação em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciamento, que amplificam o material genético e independem de cultivo, facilitou muito a identificação de espécies virais, representando um grande

avanço nesta área e iniciando uma nova era da microbiologia.

A palavra metagenoma foi primeiramente utilizada em 1998 para se referir a todos os genomas microbianos encontrados em uma amostra de solo. Desde então o termo metagenômica é utilizado para descrever a análise genômica de uma população de microorganismos encontrados em uma amostra ambiental ou clínica, sem a necessidade de seu cultivo (HANDELSMAN, 2004; PALLEN, 2014). Existem diferentes plataformas para realização do seqüenciamento de alto desempenho, utilizado na análise metagenômica, dentre as principais podemos citar a Illumina, Ion Torrent e mais recentemente Oxford Nanopore MinIon e Pacific Biosciences Sequel (QUINCE et al., 2017).

Comparado aos primeiros métodos de seqüenciamento, o seqüenciamento de alto desempenho gera um maior volume de dados em menor tempo e com custo reduzido (ESCOBAR-ZEPEDA; VERA-PONCE DE LEÓN; SANCHEZ-FLORES, 2015). Os seqüenciadores de alto desempenho realizam um processo paralelo massivo de milhões de moléculas de material genético (potencialmente bilhões), gerando os fragmentos curtos de seqüências- as *reads*, seguido da etapa de montagem (*assembly*), que realiza a sobreposição das *reads* gerando seqüências consenso de bases contíguas denominados *contigs*. Tanto as *reads* como os *contigs* podem ser utilizados para a predição da composição taxonômica da amostra (THOMAS; GILBERT; MEYER, 2012).

Esta facilidade de gerar dados através de uma tecnologia com custos reduzidos levou a um rápido crescimento das pesquisas de metagenômica, tanto quantitativamente quanto qualitativamente, porém a análise desses dados através de ferramentas de bioinformática apropriadas às questões biológicas envolvidas na amostra analisada ainda é um limitante (BRAGG; TYSON, 2014).

Dada a dificuldade, ou até impossibilidade de cultivar a maioria dos vírus, os virologistas foram um dos primeiros a adotar a ferramenta da metagenômica para a identificação vírus (PALLEN, 2014).

### 3.7 Bioinformática

A produção massiva de dados brutos obtidos através das técnicas moleculares de alto desempenho torna imprescindível o uso de ferramentas de bioinformática para análise das seqüências geradas. Após a geração das *reads* pelo sequenciamento, uma

série de passos de normalização das amostras "*in silico*" são realizados. As diferentes plataformas de seqüenciamento disponíveis usualmente compartilham esta etapa (DILLIES et al., 2013).

Os escores de qualidade das *reads* indicam a probabilidade de que uma base nitrogenada tenha sido corretamente identificada durante o seqüenciamento, este parâmetro é denominado nota *Phred* de qualidade, em inglês *Phred Quality Score*. Uma nota *Phred* de 20 indica que uma base a cada 100 pode estar incorreta (99% de acurácia), nota 30 indica um erro a cada 1000 bases (99,9% de acurácia) e assim sucessivamente.

A limpeza e o preparo das seqüências antes de serem analisadas é uma etapa necessária para retirada dos adaptadores, que são pequenas seqüências utilizadas para a amplificação dos genomas e que podem posteriormente comprometer a análise, e também para retirada das seqüências de baixa qualidade, seja por alta probabilidade de erro ou tamanho muito reduzido, que podem interferir na montagem dos genomas e na identificação das seqüências de interesse.

Tanto as *reads* quanto os *contigs* podem ser confrontados a um banco de genomas de referência, este processo de classificação taxonômica é denominado *binning* (THOMAS et al., 2012; BRAGG&TYSON, 2014).

Os resultados dos alinhamentos locais entre as seqüências geradas confrontadas a um banco de genomas apresentam valores de pontuação e a esses valores é associado um valor chamado de *expected-value* (*E value*), que tem seu valor de corte determinado pelo pesquisador. O *E value* é o parâmetro de confiança do alinhamento local e permite avaliar o quão significativos são esses resultados, indicando o número de alinhamentos que seriam esperados apresentando valores de *score* iguais ou melhores que o encontrado por acaso, isso demonstra a probabilidade do alinhamento ter ocorrido por acaso. Quanto maior o valor do *e-value*, menor a restrição a seqüências alinhadas ao acaso. O tamanho do banco de dados e da seqüência pesquisada interferem nestes parâmetros.

Há uma serie de ferramentas de bioinformática, ou seja, programas, para realização destas etapas, cada programa utiliza algoritmos diferentes para obter seu objetivo. Cabe ao pesquisador escolher o que lhe for mais adequado.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Amostras

As amostras foram coletadas em colônias de morcegos da espécie *Tadarida brasiliensis*, previamente mapeadas e que fazem parte do Projeto de Monitoramento de Morcegos do PECPR. A identificação da espécie de morcegos que habitam as colônias foi baseada nas características morfológicas destes animais. As coletas foram realizadas em Julho de 2016 no município de São Gabriel e em Janeiro de 2017 no município de Tavares. As localidades de coleta nestas cidades foram: São Gabriel - construção desativada do Posto Saúde - coordenada geográfica 30°20'10"S / 54°19'43"W e Tavares - construção desativada do Hospital - coordenada geográfica 31°17'16"S / 51° 5'26"O (Figura 3).

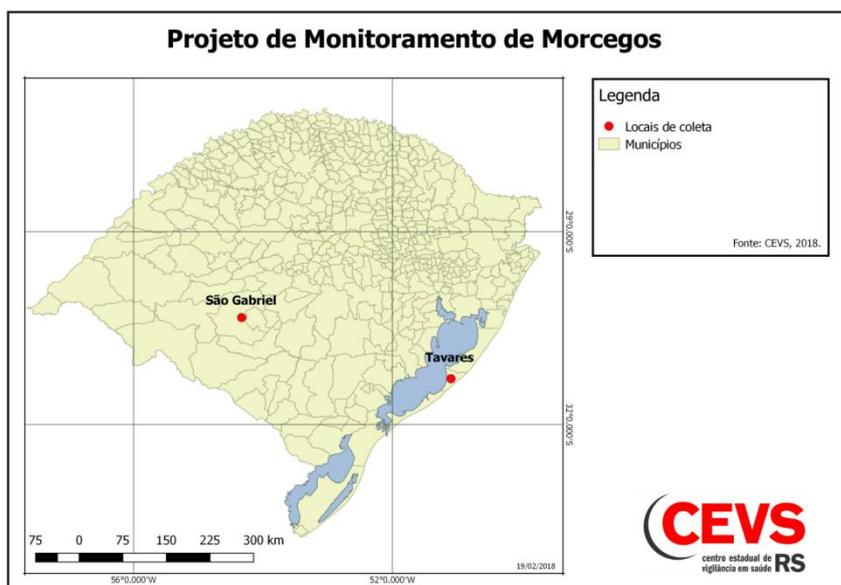


Figura 3 Mapa do Rio Grande do Sul com os locais de coleta, nos municípios de Tavares e São Gabriel (Fonte: CEVS, 2018).

Para este estudo foram utilizados 01 *pool* de urina de São Gabriel (identificação da amostra: A6), 01 *pool* de urina de Tavares (identificação da amostra: A5) e 01 *pool* de fezes de Tavares (identificação da amostra: A2). Para o procedimento de coleta das fezes e da urina, uma lona plástica descartável foi posicionada abaixo da colônia por aproximadamente 45 minutos. As fezes e gotículas de urina depositadas sobre esta lona foram recolhidas com auxílio de pinças e micropipetadores e imediatamente armazenadas em frascos estéreis, que foram acondicionados em botijão com nitrogênio líquido para transporte até o laboratório de virologia (UFRGS). Amostras de urina também foram coletadas diretamente no animal durante a manipulação dos morcegos, já que é comum este animal urinar em situação de stress (Figura 4). A captura dos animais para as demais atividades do projeto de monitoramento é feita com auxílio de uma armadilha do modelo "*HarpTrap*", apropriada para captura de morcegos. Durante a coleta de Tavares, realizada em Julho de 2016, foram recolhidos dois animais com comportamento atípico (caídos ao chão, hiporresponsivos) para o diagnóstico da raiva por imunofluorescência direta. O resultado foi negativo para raiva em ambas amostras.



Figura 4 -Coleta de urina (Imagem: Aline Campos)

Tabela 1 - Descrição das amostras

<b>Nome da Amostra</b>	<b>Município</b>	<b>Tipo de amostra</b>	<b>Tipo edificação</b>	<b>Quantidade estimada de animais na colônia</b>
<b>A2</b>	Tavares	Fezes	Ampliação do posto de saúde	2.000 a 3.000
<b>A5</b>	Tavares	Urina	Ampliação do posto de saúde	2.000 a 3.000
<b>A6</b>	São Gabriel	Urina	Ampliação do posto de saúde	Por volta de 10.000

#### 4.2 Processamento das amostras (Juliana pediu para melhorar, não sei como)

Foram pesados 0,2 mg de fezes, adicionadas a um tubo cônico com capacidade de 50 mL contendo *beads* de vidro até a marca de 5mL seguidos de 20 mL da solução de Hank's (1x (1,261 mM CaCl<sub>2</sub>; 0,49 mM MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O; 0,406mM MgSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O; 5,33 mM KCl; 0,441 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 137,93 mM NaCl; 0,336 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O; 5,55 mM dextrose). O tubo foi agitado por 4 minutos em vortex e centrifugado a 2500 x g por 90 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para tubos de 1,5 mL e novamente centrifugado por 10 minutos à 10 000 rotações por minuto-rpm). Foi realizada a filtração do sobrenadante final em um filtro-seringa com membrana de 0,22µm. As amostras obtidas desta etapa foram armazenadas em freezer -80°C. As amostras de urina coletadas foram acondicionadas em um único tubo, totalizando 200 µL. Esta amostra foi centrifugada a 14 000 rpm por 10 min, após, o sobrenadante foi coletado, filtrado a 0,22 µm e tratado com clorofórmio para remoção de bactérias. As amostras de fezes após processamento inicial, previamente descrito, foram submetidas a uma etapa de ultracentrifugação em colchão de sacarose, 25% em TNE (25 g em 100 mL de TNE - 50 mM Tris, 140 mM NaCl, 5 mM EDTA, pH 8), a 190000 x g (40000 rpm) por 4 horas a 4°C (ultra centrífuga Sorvall ODT Combi, rotor AH-650). Os *pellets* obtidos foram suspensos em 500 µL de TE (Tris 1M-EDTA 0,5M pH 8.0) 1 X e agitados vigorosamente. Com a finalidade de remover os ácidos nucleicos não protegidos por capsídeos, 400 µL desta preparação foi tratada com 100 U de DNase I (ROCHE) e 100 U de RNase (Invitrogen) a 37°C em banho-maria por 1 hora. Após o tratamento, o DNA foi extraído conforme

Sambrook& Russel, com pequenas modificações.

#### 4.3 Enriquecimento do DNA

Após a extração do DNA as amostras foram submetidas a amplificação isotérmica (30°C) com a enzima DNA *Phi29*. O mix de volume final de 20µL contém 1X BSA, hexâmeros iniciadores randômicos (6pb), DNA molde, enzima e *buffer*. Os tubos foram incubados por 18 horas e após 2µL foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1% por 30 minutos a 90 volts.

#### 4.4 Verificação da qualidade dos ácidos nucleicos e sequenciamento

O material foi checado em gel de agarose 0,7% quanto a sua qualidade e quantificado em *QUBIT* para sequenciamento.

O sequenciamento foi realizado em plataforma IlluminaMiSeq, utilizando o kit de reagentes Illumina v2(2x150 paired-end), no Instituto de Pesquisa Veterinárias Desidério Finamor - IPVDF, pertencente à Secretaria Estadual de Agricultura Pecuária e Irrigação - SEAPI RS.

#### 4.5 Bioinformática

As *reads paired-end* geradas foram pré processadas para remoção dos adaptadores e das seqüências de baixa qualidade, para isso foram utilizados os programas Prinseq (SCHMIEDER; EDWARDS, 2011) e FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Seqüências com *Phred quality score* <20 foram desprezadas. As *reads* foram montadas em *contigs* através do método "*de novo*" com SPAdes 3.5 (NURK et al., 2013). A conferência e mapeamento das *reads* utilizadas na montagem dos *contigs* foi realizada no Geneious versão 9.1.5 (<http://www.geneious.com>, Kearse et al., 2012). Os *contigs* encontrados com tamanho superior a 100 nucleotídeos foram submetidos ao BLASTx e BLASTN - *Basic Local Alignment Search Tool* ([blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)), programa que busca regiões de similaridade entre seqüências biológicas, contra o banco de dados não redundantes de proteínas do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI - [www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)). Para identificação das proteínas também foi utilizado o

Blast2go (GÖTZ et al., 2008). Sequências com  $E\text{-value} < 10^{-3}$  foram classificados como vírus de eucariotos, bacteriófagos, bactérias e desconhecidos, baseado na origem taxonômica da sequência referência correspondente com melhor  $E\text{-value}$  e percentual de similaridade (Altschul et al. 1990). A predição das *ORF's* foi realizada no programa ORFinder ([www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/)).

#### 4.6 Análises filogenéticas

Para a análise das sequencias de papilomavirus, sequências com identidade ao Gene L1 do papilomavírus foram submetidos ao ORFinder seguido de BLAST específico para papilomavírus contra o banco de dados não redundantes do Papillomavirus Episteme, programa desenvolvido pelo National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID - [pave.niaid.nih.gov/](http://pave.niaid.nih.gov/)). As sequências escolhidas foram alinhadas com sequências referencias de gene L1. Foram utilizadas sequências referência de papilomavirus do gene L1 disponíveis no banco de dados do PAVe e do GenBank. Foi utilizado o método de alinhamento múltiplo MUSCLE através do programa MEGA7: *Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets* (Kumar, Stecher, and Tamura 2015). A escolha do modelo de cálculo das substituições e construção das árvores foi feita através de inferência de máxima verossimilhança (ML) com auxílio do MEGA7 e do PhyML (LEFORT; LONGUEVILLE; GASCUEL, 2017). As árvores foram visualizadas e editadas no programa FigTree ([tree.bio.ed.ac.uk/](http://tree.bio.ed.ac.uk/)) e no MEGA7. A partir dos maiores *contigs* que cobriram a maior parte do gene L1 das amostras A2 e A5, foram preditas ORFs que alinhadas com as sequências referências de L1 de todas as espécies de hospedeiro conhecidas deram origem as árvores filogenéticas. As *ORF* preditas a partir das amostras A2 e A5 foram respectivamente denominadas TbraPV1 e TbraPV2.

Tabela2-*Contigs* utilizados na predição das *ORF's* dos papilomavírus

<b>Amostra</b>	<b>Contig</b>	<b>Acrônimo</b>	<b>Tamanho da Sequencia (NT)</b>	<b>Tamanho da ORF (nt)</b>
<b>A5</b>	32	TbraPV1	1259	777
<b>A6</b>	13	TbraPV2	1386	1305

Para as demais famílias virais, genomas de referência ou sequências parciais de nucleotídeos de vírus, previamente identificados e classificados, foram obtidas do *GenBank* e alinhadas com as sequências pesquisadas. O número de acesso junto ao *GenBank* das sequências virais de referência baixadas foi mantido para a elaboração das árvores. A edição das sequências de aminoácidos e nucleotídeos foi realizada no MEGA7 e também no Geneious R9.15. O alinhamento foi realizado com auxílio do MEGA7 através do método de alinhamento múltiplo MUSCLE e "trimadas" previamente a análise filogenética. A geração e edição das árvores seguiram o mesmo tratamento dado aos papilomavírus.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Resultados de metagenômica

Um total de 4.218.727 *reads paired-end* foram geradas e deram origem a 8.726 *contigs*. As *reads* obtidas a partir das 03 amostras foram analisadas através do *Taxonomer*, ferramenta online de classificação taxonômica de dados de metagenômica (disponível em <https://www.taxonomer.com/>) (FLYGARE et al., 2016). Na amostra A2 uma fração de 0,4% das *reads* foi classificada com origem humana, 3,8% com origem bacteriana, 5,3% de origem viral, 30,9% teve origem em fagos, 36,1% teve origem ambígua (*reads* classificadas em duas ou mais categorias) e 23,5% teve origem desconhecida. Na amostra A5 a fração de 0,9% das *reads* foi classificada com origem humana, 2,5% com origem bacteriana, 7,2% de origem viral, 1,3% teve origem em fagos, 22,5% teve origem ambígua e 65,1% teve origem desconhecida. A amostra A6 foi a que apresentou maior fração de *reads* com origem desconhecida, 99,3%, apenas 0,1% teve origem viral (Figura 5). A maior diversidade viral foi obtida nas amostras de urina.

A maior quantidade de *reads* foi obtida na amostra A2 de fezes de Tavares. Porém, a quase totalidade dos *contigs* gerados nesta amostra apresentou identidade a bactérias. Vírus de insetos também foram recuperados nesta amostra.

Para este estudo foram utilizados apenas os *contigs* relacionados aos vírus de vertebrados.

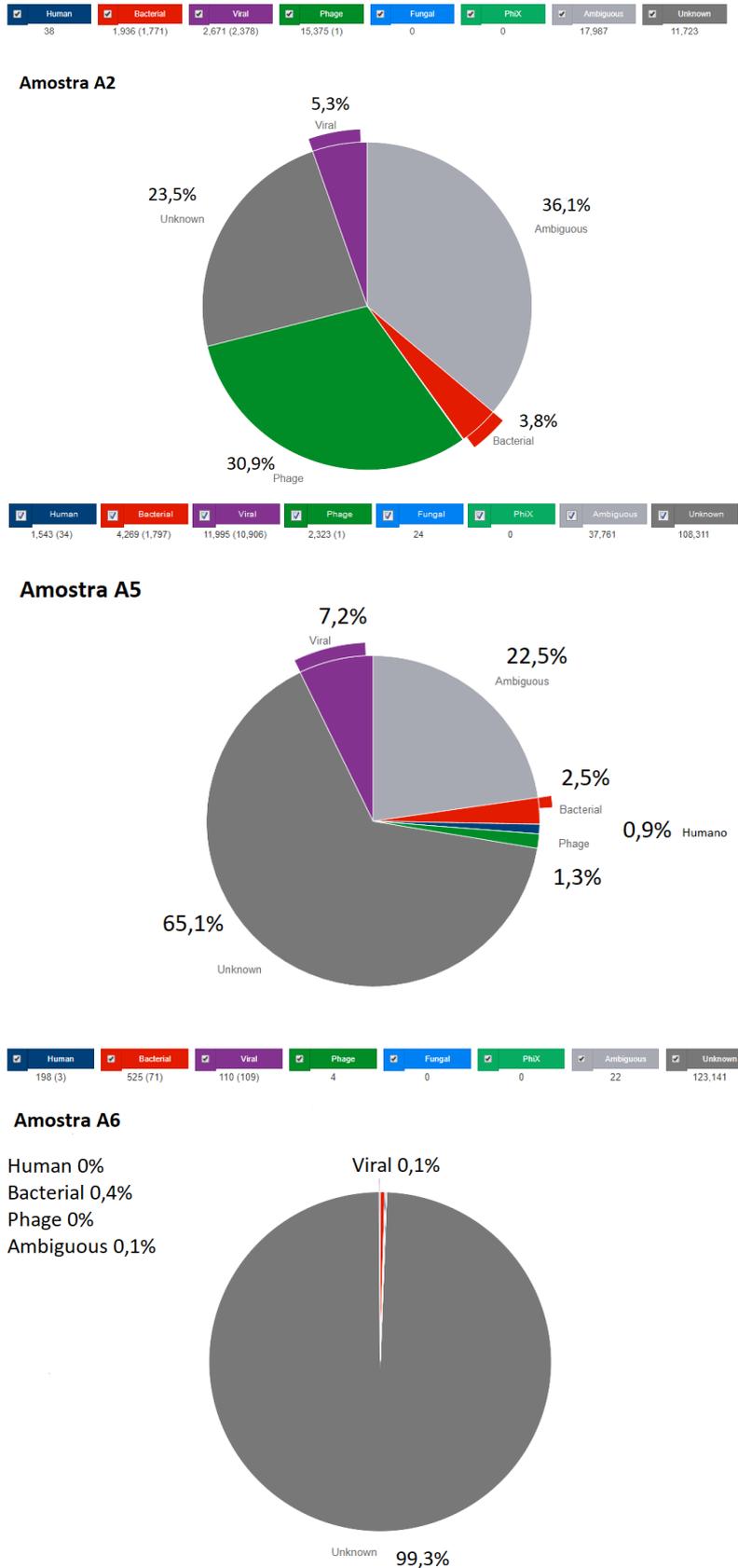


Figura 5 Representação da classificação taxonômica das *reads* geradas baseada na análise da ferramenta *online* Taxonomer (FLYGARE et al., 2016)

A quantidade de *reads* e *contigs* variou entre as 03(três) amostras conforme descrito na Tabela 3.

Tabela 3 - Descrição por amostra dos resultados obtidos no sequenciamento com plataforma Illumina

<b>Localidade/ amostra</b>	<b>Tipo de amostra</b>	<b>Quantidade de <i>reads</i></b>	<b>Tamanho médio <i>reads</i></b>	<b>Quantidade de <i>contigs</i> &gt;100 nt*</b>
<b>Tavares A2</b>	Fezes	2.191.178	100nt	2
<b>Tavares A5</b>	Urina	1.141.594	151nt	24
<b>São Gabriel A6</b>	Urina	885.955	122nt	13

\**Contigs* com identidade a vírus de vertebrados

A amostra A2, *pool* de fezes coletada em Tavares, originou apenas 02 *contigs*, acima de 100nt, com identidade viral classificados na mesma família viral: *Circoviridae* (Tabela 4).

A amostra A5, *pool* de urina coletada em Tavares, originou 24 *contigs*, acima de 100nt, com identidade viral classificados em 02 famílias virais: *Papillomaviridae* e *Poxviridae* (Tabela 5).

A amostra A6, *pool* de urina coletada em São Gabriel, originou 13 *contigs*, acima de 100nt, com identidade viral classificados em 03 famílias virais: *Anelloviridae*, *Papillomaviridae* e *Circoviridae* (Tabela 6).

A família viral que apresentou maior número de *contigs* foi a *Papillomaviridae*. Adicionalmente, foram obtidos *contigs* com semelhança a vírus circular de cadeia simples DNA ainda não identificados.

Tabela 4 - Descrição dos *hits* dos *contigs* virais obtidos a partir da amostra A2 do município de Tavares

Tipo de amostra: *Pool* de fezes

Procedência: Tavares

Nº Contig/ Tamanho (nucleotídeos)	Família	Descrição - BLASTx	Nome da Seq	Organismo	Identidade de aminoácidos (%)	Tamanho da Sequência (nucleotídeos)	<i>E</i> -value	Genoma
69/873nt	<i>Circoviridae</i>	unknown [Po-Circo-like virus 21]	YP_009109618	<i>Po-Circo-like virus</i>	37.2%	516	4.06e-14	ssDNA
		unknown [Po-Circo-like virus 22]	AER30025	<i>Po-Circo-like virus</i>	37.2%	516	2.11e-14	
132/451nt	<i>Circoviridae</i>	replicase [Bat circovirus POA/2012/V]	AIX11629	<i>Bat circovirus</i>	97.9%	141	3.84e-22	ssDNA
		capsid [Bat circovirus POA/2012/V]	AIX11628	<i>Bat circovirus</i>	97.1%	141	6.53e-13	

Tabela5- Descrição dos *hits* dos *contigs* virais obtidos a partir da amostra A5 do município de TavaresTipo de Amostra: *Pool* de urina

Procedência: Tavares

N° Contig/ Tamanho (nucleotídeos)	Família	Descrição - BLASTx	Nome da Seq	Organismo	Identidade de aminoácidos (%)	Tamanho da Sequência (nucleotídeos)	<i>E -value</i>	Genoma
6/2891nt	<i>Papillomaviridae</i>	E1 protein [Talpa europaea papillomavirus 1]	AGM75105	<i>Talpa europaea</i>	56.1%	1326	3.55e-156	dsDNA
		early protein E1 [Human papillomavirus type 31]	AEI60976	<i>Human papillomavirus</i>	45.0%	1227	1.38e-149	
26/1473nt	<i>Papillomaviridae</i>	putative E2 early protein [Rhinolophus ferrumequinum papillomavirus 1]	AHJ81405	<i>Rhinolophus ferrumequinum</i>	47.5%	549	8.28e-49	dsDNA
		E2 [Miniopterus schreibersii papillomavirus 1]	AFR33946	<i>Miniopterus schreibersii</i>	44.3%	549	7.60e-43	
29/1316nt	<i>Papillomaviridae</i>	hypothetical protein [Human papillomavirus type 41]	NP_040287	<i>Human papillomavirus</i>	61.0%	423	1.62e-22	dsDNA
		E6 [Erethizon dorsatum papillomavirus 1]	YP_224221	<i>Erethizon dorsatum</i>	34.6%	381	5.27e-15	
32/1259nt	<i>Papillomaviridae</i>	major capsid protein, partial [Eidolon helvum papillomavirus 5]	AGL97797	<i>Eidolon helvum</i>	57.8%	732	1.52e-83	dsDNA
		putative late L1 protein [Eptesicus serotinus papillomavirus type 3]	AHJ81401	<i>Eptesicus serotinus</i>	55.4%	726	4.67e-80	
81/553nt	<i>Papillomaviridae</i>	hypothetical protein [Human papillomavirus type 41]	NP_040293	<i>Human papillomavirus</i>	56.1%	471	2.98e-40	dsDNA
		L2 protein [Bovine papillomavirus type 10]	AGT95860	<i>Bovine papillomavirus</i>	44.9%	381	8.47e-20	

(Continua)

Tabela5 - Descrição dos *hits* dos *contigs* virais obtidos a partir da amostra A5 do município de Tavares

(continuação)

Nº Contig/ Tamanho (nucleotídeos)	Família	Descrição - BLASTx	Nome da Seq	Organismo	Identidade de aminoácidos (%)	Tamanho da Sequência (nucleotídeos)	<i>E</i> -value	Genoma
95/502nt	<i>Papillomaviridae</i>	putative late L1 protein [Eptesicus serotinus papillomavirus type 3]	AHJ81401	<i>Eptesicus serotinus</i>	48.6%	426	7.48e-45	dsDNA
		putative late L1 protein [Eptesicus serotinus papillomavirus 1]	AHJ81389	<i>Eptesicus serotinus</i>	50.0%	432	9.47e-45	
140/383nt	<i>Papillomaviridae</i>	L2 protein [Panthera leo persica papillomavirus type 1]	AAX86631	<i>Panthera leo</i>	88.4%	129	1.82e-15	dsDNA
		L2 [Canis familiaris papillomavirus 6]	YP_003204680	<i>Canis familiaris</i>	82.2%	135	2.30e-15	
170/330nt	<i>Papillomaviridae</i>	putative late L2 protein [Eptesicus serotinus papillomavirus 2]	AHJ81394	<i>Eptesicus serotinus</i>	50.5%	279	5.36e-10	dsDNA
		L2 [Human papillomavirus RTRX7]	AAB61645	<i>Human papillomavirus</i>	47.4%	291	3.90e-09	
233/295nt	<i>Papillomaviridae</i>	L1 protein [Human papillomavirus type 72b]	AHZ58195	<i>Human papillomavirus</i>	59.2%	294	6.74e-28	dsDNA
		L1 [Human papillomavirus type 62]	ALT54932	<i>Human papillomavirus</i>	57.1%	294	1.45e-27	
240/291nt	<i>Papillomaviridae</i>	putative late L1 protein [Rhinolophus ferrumequinum papillomavirus 1]	AHJ81407	<i>Rhinolophus ferrumequinum</i>	70.5%	132	4.39e-13	dsDNA
		major capsid protein, partial [Eidolon helvum papillomavirus 5]	AGL97797	<i>Eidolon helvum</i>	70.5%	132	5.16e-13	
250/282	<i>Papillomaviridae</i>	hypothetical protein [Human papillomavirus type 41]	NP_040294	<i>Human papillomavirus</i>	70.6%	153	6.20e-20	dsDNA
		hypothetical protein HpV63gp7 [Human papillomavirus type 63]	NP_040902	<i>Human papillomavirus</i>	75.5%	147	2.52e-17	

(continua)

Tabela5 – Descrição dos *hits* dos *contigs* virais obtidos a partir da amostra A5 do município de Tavares

(continuação)

Nº Contig/ Tamanho (nucleotídeos)	Família	Descrição - BLASTx	Nome da Seq	Organismo	Identidade de aminoácidos (%)	Tamanho da Sequência (nucleotídeos)	<i>E -value</i>	Genoma
293/252nt	<i>Papillomaviridae</i>	hypothetical protein [Human papillomavirus type 41]	NP_040293	<i>Human papillomavirus</i>	66.7%	189	1.03e-13	dsDNA
		L2 protein [Felis domesticus papillomavirus type 1]	NP_848024	<i>Felis domesticus</i>	44.7%	228	4.29e-08	
307/245nt	<i>Papillomaviridae</i>	E1 [Miniopterus schreibersii papillomavirus 1]	AFR33945	<i>Miniopterus schreibersii</i>	59.3%	243	5.07e-28	dsDNA
		E1 [Human papillomavirus type 57c]	BAF80482	<i>Human papillomavirus</i>	60.5%	243	1.91e-27	
325/234nt	<i>Papillomaviridae</i>	hypothetical protein [Human papillomavirus type 41]	NP_040293	<i>Human papillomavirus</i>	60.3%	234	4.26e-22	dsDNA
		minor capsid protein [Erethizon dorsatum papillomavirus 1]	YP_224226	<i>Erethizon dorsatum</i>	59.2%	213	1.34e-16	
328/233nt	<i>Papillomaviridae</i>	E2 protein [Bos taurus papillomavirus 17]	YP_009272590	<i>Bos taurus</i>	41.5%	159	2.25e-04	dsDNA
		regulatory protein E2 [Mupapillomavirus 1]	NP_597740	<i>Human papillomavirus</i>	46.2%	156	7.52e-04	
341/224nt	<i>Papillomaviridae</i>	E6 [Human papillomavirus type 39]	AGU90527	<i>Human papillomavirus</i>	37.7%	183	1.42e-06	dsDNA
		E6 [Human papillomavirus type 39]	AGU90567	<i>Human papillomavirus</i>	37.7%	183	4.89e-06	
363/217nt	<i>Papillomaviridae</i>	E1 [Kappapapillomavirus 1]	NP_057843	<i>Kappapapillomavirus 1</i>	37.0%	219	3.47e-07	dsDNA
		E1 [Human papillomavirus]	AQM73657	<i>Human papillomavirus</i>	33.8%	222	1.42e-06	

(continua)

Tabela 5 - Descrição dos *hits* dos *contigs* virais obtidos a partir da amostra A5 do município de Tavares

(continuação)

Nº Contig/ Tamanho (nucleotídeos)	Família	Descrição - BLASTx	Nome da Seq	Organismo	Identidade de aminoácidos (%)	Tamanho da Sequência (nucleotídeos)	<i>E -value</i>	Genoma
383/211nt	<i>Papillomaviridae</i>	E1 protein [Human papillomavirus type 105]	CAW42263	<i>Human papillomavirus</i>	50.0%	150	9.81e-06	dsDNA
		E1 [Canis familiaris papillomavirus 6]	YP_003204677	<i>Canis familiaris</i>	55.6%	162	7.90e-05	
387/210nt	<i>Papillomaviridae</i>	hypothetical protein [Human papillomavirus type 41]	NP_040285	<i>Human papillomavirus</i>	46.0%	189	2.65e-10	dsDNA
		putative E6 oncogenic protein [Eptesicus serotinus papillomavirus 1]	AHJ81384	<i>Eptesicus serotinus</i>	42.6%	183	4.30e-05	
395/207nt	<i>Papillomaviridae</i>	E2 protein [Crocota crocuta papillomavirus 1]	YP_006666517	<i>Crocota crocuta</i>	52.9%	210	9.69e-16	dsDNA
		putative E2 early protein [Rhinolophus ferrumequinum papillomavirus 1]	AHJ81405	<i>Rhinolophus ferrumequinum</i>	51.4%	210	1.42e-14	
402/206nt	<i>Papillomaviridae</i>	L1, partial [Human papillomavirus type 1a]	ANN81187	<i>Human papillomavirus</i>	54.8%	186	6.25e-16	dsDNA
		L1 [Miniopterus schreibersii papillomavirus 1]	AFR33949	<i>Miniopterus schreibersii</i>	53.2%	186	1.83e-15	
419/178nt	<i>Papillomaviridae</i>	late protein L1 [Human papillomavirus type 32]	NP_041806	<i>Human papillomavirus</i>	54.2%	177	1.47e-16	dsDNA
		major capsid protein L1, partial [Human papillomavirus type 53]	AMN09999	<i>Human papillomavirus</i>	50.8%	177	2.43e-16	

(continua)

Tabela5 - Descrição dos *hits* dos *contigs* virais obtidos a partir da amostra A5 do município de Tavares

(continuação)

N° Contig/ Tamanho (nucleotídeos)	Família	Descrição - BLASTx	Nome da Seq	Organismo	Identidade de aminoácidos (%)	Tamanho da Sequência (nucleotídeos)	<i>E -value</i>	Genoma
37 /1058nt	<i>Poxviridae</i>	similar to variola and vaccinia E4L, partial [Molluscum contagiosum virus subtype 1]	AAB57949	<i>Molluscum contagiosum</i>	78.0%	300	1.84e-48	dsDNA
		MC034 [Molluscum contagiosum virus subtype 2]	AQY16607	<i>Molluscum contagiosum</i>	79.0%	300	1.22e-47	
		MC034L [Molluscum contagiosum virus subtype 1]	NP_043985	<i>Molluscum contagiosum</i>	78.0%	300	2.22e-46	
		MC034 [Molluscum contagiosum virus subtype 1]	AQY16958	<i>Molluscum contagiosum</i>	78.0%	300	3.17e-46	
		CNPV127 RNA polymerase subunit RPO30 [Canarypox virus]	NP_955150	<i>Canarypox virus</i>	76.8%	297	6.65e-46	
116 /433nt	<i>Unind Circular</i>	hypothetical protein [unidentified circular ssDNA virus]	APG55805	<i>unidentified circular</i>	39.1%	192	4.32e-05	ssDNA

Tabela6 - Descrição dos *hits* dos *contigs* virais obtidos a partir da amostra A6 do município de São GabrielTipo de Amostra: *Pool* de Urina

Procedência: São Gabriel

Nº Contig/ Tamanho (nucleotídeos)	Família	Descrição - BLASTx	Nome da Seq	Organismo	Identidade de aminoácidos (%)	Tamanho da Sequência (nucleotídeos)	<i>E</i> -value	Genoma
86/271nt	<i>Anelloviridae</i>	ORF1 [Torque teno Tadarida brasiliensis virus]	YP_009058944	<i>Torque teno</i>	37.1%	186	4.48e-04	ssDNA
		ORF1 [SEN virus]	AAS18428	<i>SEN virus</i>	38.7%	186	2.10e-02	
114/220nt	<i>Circoviridae</i>	hypothetical protein [unidentified circular ssDNA virus]	APG55805	<i>unidentified circular</i>	40.6%	207	6.69e-04	ssDNA
		capsid protein [Porcine serum-associated circular virus]	ANB82427	<i>Porcine serum-associated</i>	36.6%	123	5.19e-02	
11/1698nt	<i>Papillomaviridae</i>	E6 protein [Mupapillomavirus 1]	NP_040305	<i>Mupapillomavirus 1</i>	31.2%	414	1.63e-06	dsDNA
		early protein E6 [Human papillomavirus type 209]	AQT33337	<i>Human papillomavirus</i>	30.8%	133	8.66e-06	
13/1386nt	<i>Papillomaviridae</i>	putative late L1 protein [Rhinolophus ferrumequinum papillomavirus 1]	AHJ81407	<i>Rhinolophus ferrumequinum</i>	56.8%	1311	0	dsDNA
		hypothetical protein [Human papillomavirus type 41]	NP_040294	<i>Human papillomavirus</i>	72.2%	1317	0	
15/1282nt	<i>Papillomaviridae</i>	hypothetical protein [Human papillomavirus type 41]	NP_040293	<i>Human papillomavirus</i>	53.6%	1164	1.16e-102	dsDNA
		putative late L2 protein [Rhinolophus ferrumequinum papillomavirus 1]	AHJ81406	<i>Rhinolophus ferrumequinum</i>	37.7%	1224	1.48e-38	
16/1264nt	<i>Papillomaviridae</i>	hypothetical protein [Human papillomavirus type 41]	NP_040285	<i>Human papillomavirus</i>	48.2%	411	3.10e-31	dsDNA
		putative E6 oncogenic protein [Eptesicus serotinus papillomavirus 1]	AHJ81384	<i>Eptesicus serotinus</i>	38.5%	390	1.71e-13	

(continua)

Tabela 6 - Descrição dos hits dos *contigs* virais obtidos a partir da amostra A6 do município de São Gabriel

(continuação)

Nº Contig/ Tamanho (nucleotídeos)	Família	Descrição - BLASTx	Nome da Seq	Organismo	Identidade de aminoácidos (%)	Tamanho da Sequência (nucleotídeos)	<i>E</i> -value	Genoma
23/968nt	<i>Papillomaviridae</i>	E1 protein [Talpa europaea papillomavirus 1]	AGM75114	<i>Talpa europaea</i>	44.3%	522	2.21e-43	dsDNA
		E1A [Human papillomavirus]	AKZ17780	<i>Human papillomavirus</i>	45.7%	492	9.91e-43	
28/780nt	<i>Papillomaviridae</i>	hypothetical protein [Human papillomavirus type 41]	NP_040294	<i>Human papillomavirus</i>	80.1%	423	1.23e-74	dsDNA
		putative late L1 protein [Rhinolophus ferrumequinum papillomavirus 1]	AHJ81407	<i>Rhinolophus ferrumequinum</i>	65.0%	420	2.29e-61	
31/652nt	<i>Papillomaviridae</i>	hypothetical protein [Human papillomavirus type 41]	NP_040294	<i>Human papillomavirus</i>	56.9%	654	7.82e-72	dsDNA
		putative late L1 protein [Rhinolophus ferrumequinum papillomavirus 1]	AHJ81407	<i>Rhinolophus ferrumequinum</i>	54.5%	633	2.44e-67	
50/392nt	<i>Papillomaviridae</i>	putative E6 oncogenic protein [Eptesicus serotinus papillomavirus 1]	AHJ81384	<i>Eptesicus serotinus</i>	40.2%	366	6.51e-17	dsDNA
		E6 [Eidolon helvum papillomavirus 1]	AGB34175	<i>Eidolon helvum</i>	40.2%	366	1.13e-13	
77/281nt	<i>Papillomaviridae</i>	hypothetical protein [Human papillomavirus type 41]	NP_040294	<i>Human papillomavirus</i>	70.1%	261	1.89e-34	
		L1, partial [Eidolon helvum papillomavirus]	AQA28207	<i>Eidolon helvum</i>	56.7%	270	4.20e-30	
81/276nt	<i>Papillomaviridae</i>	hypothetical protein [Human papillomavirus type 41]	NP_040286	<i>Human papillomavirus</i>	46.6%	264	7.08e-08	dsDNA
82/275nt	<i>Papillomaviridae</i>	truncated E1 [Deltapapillomavirus 4]	ACR78110	<i>Deltapapillomavirus 4</i>	49.3%	201	2.42e-04	dsDNA
		E1 [Procyon lotor papillomavirus 1]	YP_249600	<i>Procyon lotor</i>	50.0%	204	7.93e-04	

### 5.1.1 Anelovírus

Uma sequência de 186 nucleotídeos com identidade para anelovírus foi encontrada na urina da colônia de morcegos de São Gabriel (A6). Tal sequência foi recuperada do *contig* 86 e apresentou um percentual de identidade de aminoácidos de 37% com a ORF1 do vírus Torque teno *Tadarida brasiliensis*.

### 5.1.2 Circovírus

Membros da família *Circoviridae* são encontrados principalmente nas fezes, em nossa pesquisa foram encontradas sequências com identidade a esta família nas fezes e, em menor proporção, em uma das amostras de urina (A6). Dentre as amostras de urina, somente a amostra de São Gabriel retornou sequências com identidade a circovírus, apresentando 37% de identidade a proteína do capsídeo do vírus associado ao soro de suínos. Na amostra de fezes (A2), a partir do *contig* 69 foi obtida uma sequência de 516 nucleotídeos que apresentou 37% de identidade de aminoácidos ao Po-Circo Like virus, descrito anteriormente em granjas de suínos (SHAN et al., 2011). Esta foi a maior sequência recuperada desta família viral. A árvore filogenética gerada demonstrou que o CV encontrado no presente estudo está filogeneticamente relacionado a circovírus encontrados em fezes de aves, não agrupando com outros circovírus previamente descritos em morcegos, incluindo um CV de *Tadarida brasiliensis* (Figura 6).

Adicionalmente, o *contig* 132, encontrado na amostra de fezes (A2), apresentou 98% de similaridade com a replicase do Bat-Circovirus POA, um circovírus identificado em 2012 em morcegos da espécie *Tadarida brasiliensis* na cidade de Porto Alegre.

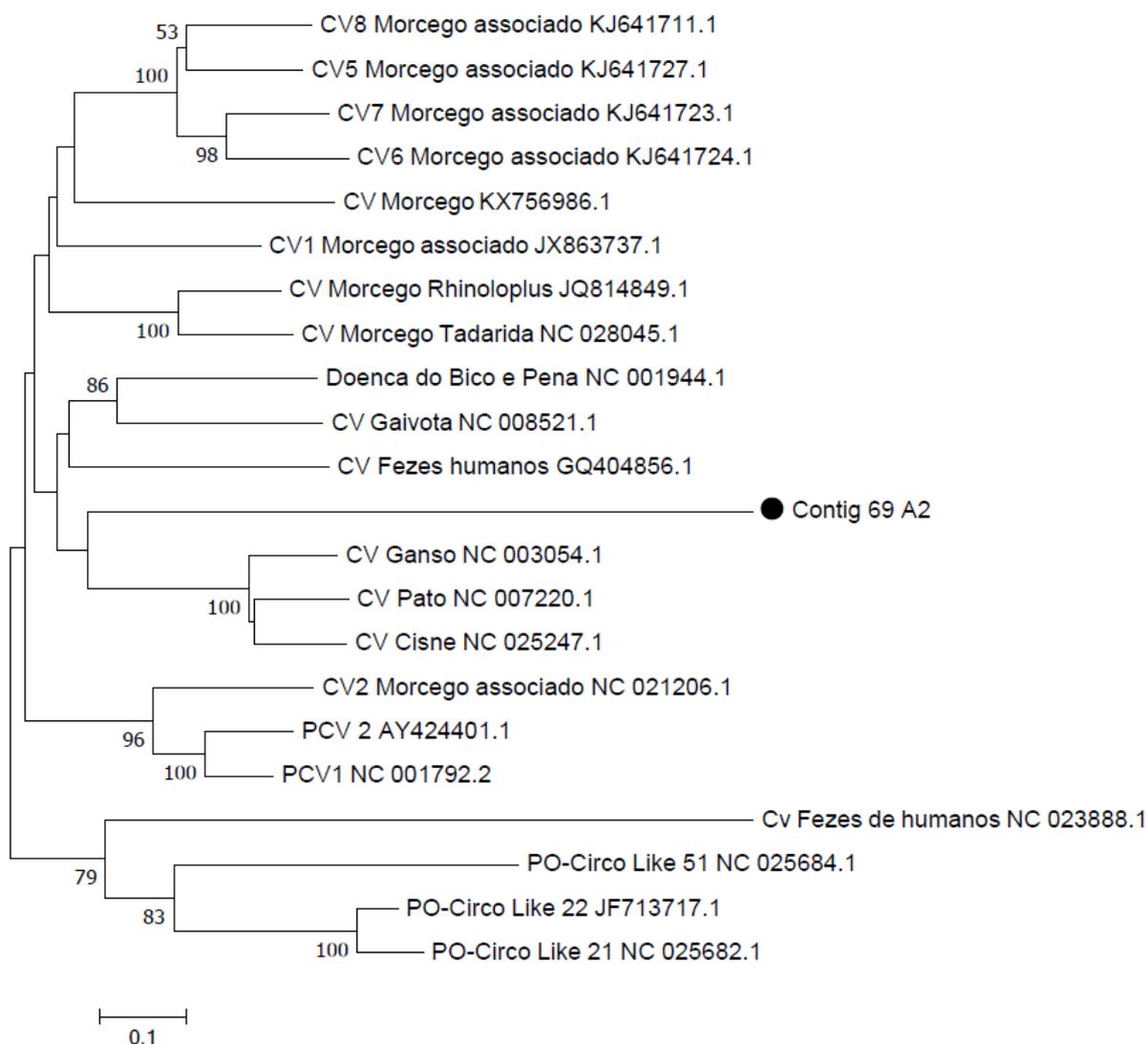


Figura 6- Árvore filogenética da sequência de circovírus, *contig* 69, da amostra A2 e sua relação com outros membros representativos da família *Circoviridae*. A árvore foi gerada pelo método de *Neighbour-Joining*, modelo estatístico de distância posterior (*p-distance*) com 1000 réplicas de *bootstrap* a partir do alinhamento de nucleotídeos utilizando MUSCLE.

### 5.1.3 Papilomavírus

Um total 33 *contigs* com identidade a PV foram identificados nas amostras de urina. Não foram recuperadas sequências de papilomavírus na amostra de fezes. O maior *contig* obtido, TbraPV2, com 1386 nucleotídeos cobriu 84% da região codificante do gene L1 e apresentou *E-value* de zero, o que demonstra a pouca probabilidade deste resultado ter se dado ao acaso. A árvore filogenética gerada com

todas as espécies de hospedeiros conhecidas indicou que as sequências TbraPv1 e TbraPV2 agruparam em um único clado, porém em ramos distintos. O *cluster* onde ambas as amostras foram posicionadas abrange as seguintes espécies de papilomavírus: *Nupapillomavirus*, *Dyochipapillomavirus*, *Dyousilonpapillomavirus*, *Dyokappapapillomavirus*, *Deltapapillomavirus* e *Sigmapapillomavirus* PV de morcegos ainda não classificados (Figura 7).

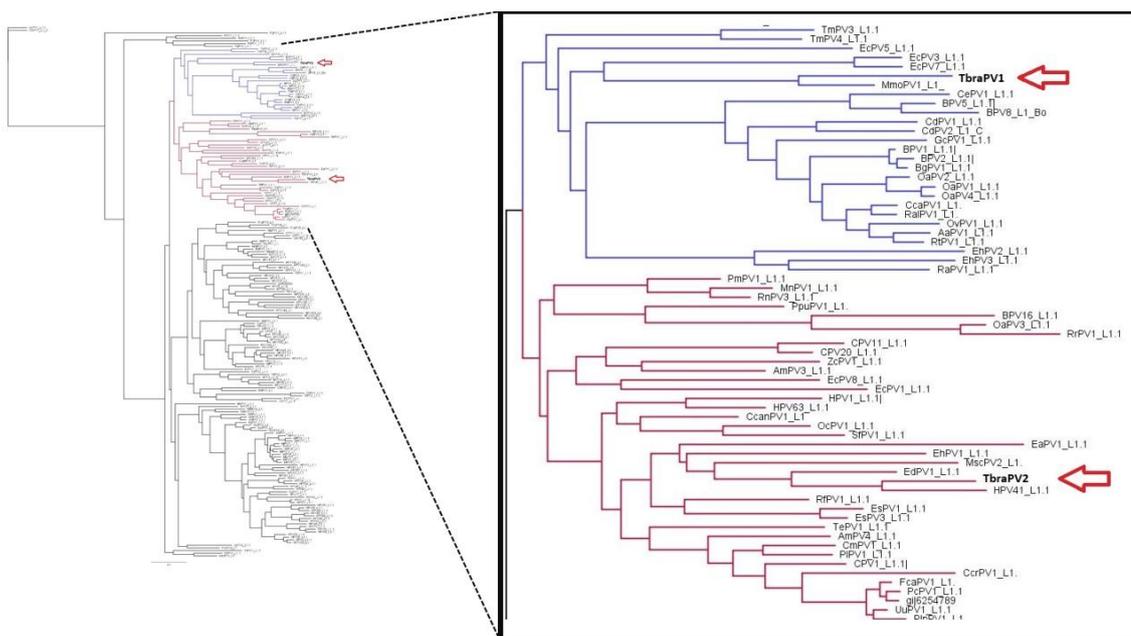


Figura 7 Árvore filogenética das sequências TbraPV1, TbraPV2 alinhadas com sequências referências do Gene L1 de papilomavírus de todas as espécies de hospedeiros conhecidas. A árvore foi gerada pelo método *Maximum Likelihood* a partir do alinhamento MUSCLE de aminoácidos com modelo estatístico LG+G+I+F. O nível de confiança foi obtido pela análise de 1000 réplicas de *bootstrap*. As setas indicam as sequências obtidas neste estudo.

A árvore gerada incluindo somente sequências obtidas de morcegos mostrou o agrupamento da sequência TbraPV1, proveniente da amostra A5, com o PV de gênero e espécie ainda não classificados, descrito em morcegos da família *Molossidae*, da espécie *Molossus molossus*. Já a sequência TbraPV2 agrupou em um outro cluster incluindo as seguintes espécies de papilomavírus de morcegos: *Dyopsipapillomavirus 1*, *Treisdeltapapillomavirus 1*, *Dyousilonpapillomavirus 1* e *Dyotaupapillomavirus 1* (Figura 8).

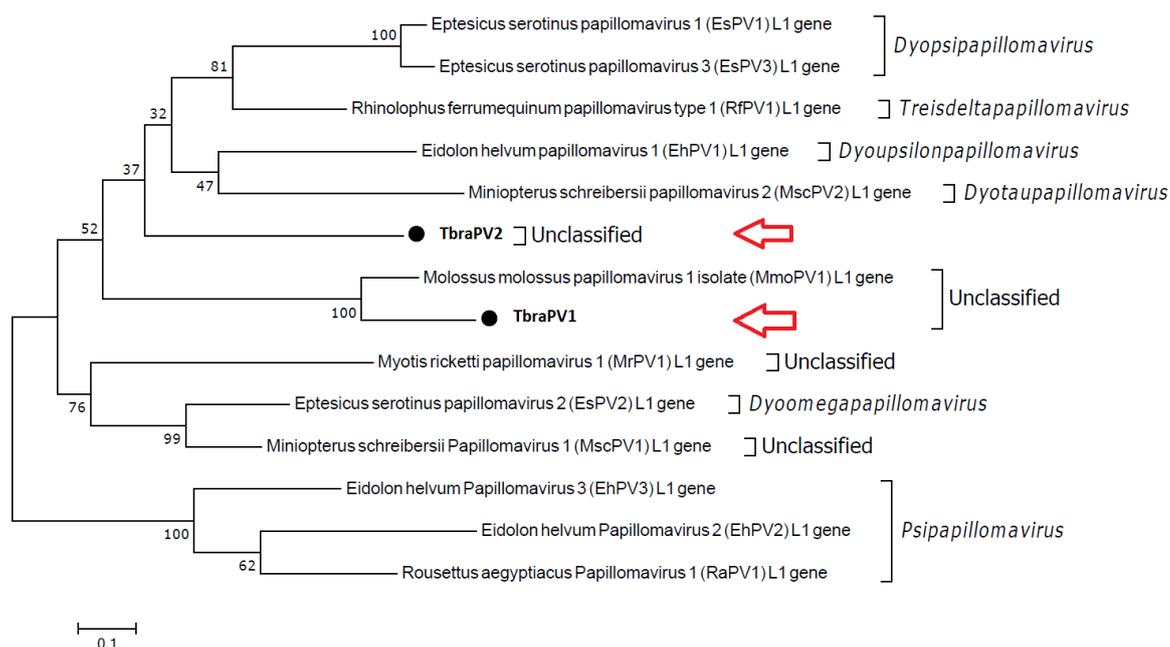


Figura 8 - Filogeniadas sequências TbraPV1, TbraPV2 alinhadas com sequências referências do Gene L1 de papilomavírus de morcegos. A árvore foi gerada pelo método Maximum Likelihood a partir do alinhamento MUSCLE de aminoácidos com modelo estatístico LG+G+I. O nível de confiança foi obtido pela análise de 1000 réplicas de bootstrap. As setas indicam as sequências obtidas neste estudo.

#### 5.1.4 Poxvírus

O contig 37, contendo 1058 nucleotídeos e pertencente a amostra A5 de urina de Tavares, retornou uma sequência de 300 nucleotídeos com identidade de 79% ao vírus *Molluscum contagiosum* (VMC), vírus reconhecido como exclusivo de humanos, da família *Poxviridae*. A sequência obtida teve identidade com superfamília das RNA polimerases DNA dependentes dos poxvírus. Proteínas desta família tem entre 193 e 259 aminoácidos (MARCHLER-BAUER, 2017). A análise filogenética mostrou que a sequência recuperada está filogeneticamente relacionada às sequências do gênero *Molluscipoxvirus*, no entanto a mesma se posicionou em um ramo distinto (Figura 9).

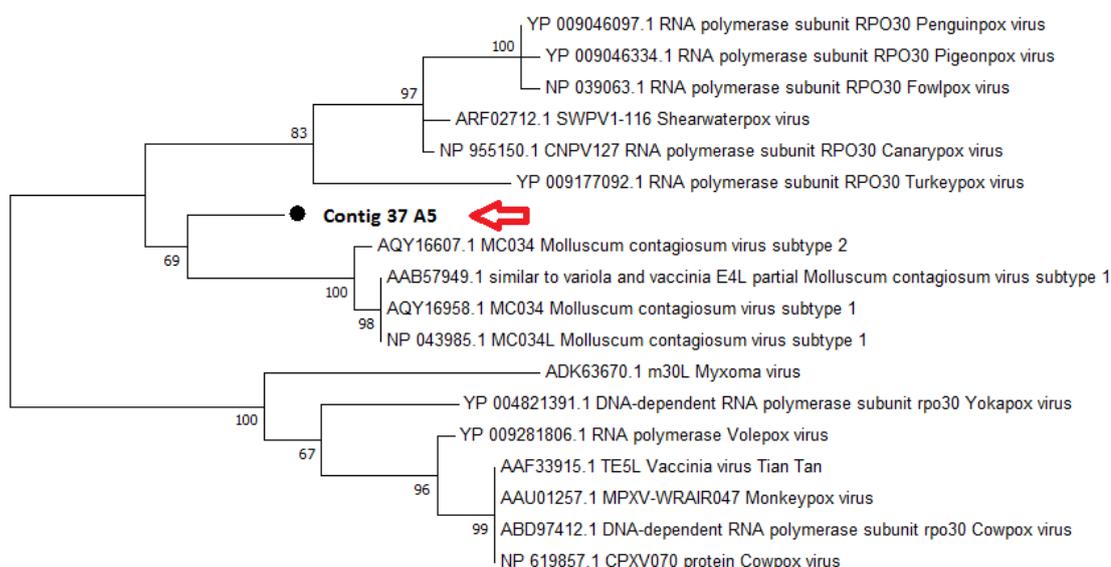


Figura 9.Árvore filogenética gerada pelo método de *Maximum Likelihood* incluindo 17 sequências de aminoácidos do gene relacionado a RNA polimerase de poxvírus e a sequência gerada a partir do *contig* 37 da amostra A5. Foi utilizado *bootstrap* de 1000 réplicas.

## 6. Discussão

A presente pesquisa teve como objetivo a análise do uso da metagenômica em amostras de morcego da rotina do PECPR como instrumento de monitoramento e vigilância para vírus de interesse. Com este objetivo, foram utilizadas amostras de fezes e urina coletadas em duas colônias perenes da espécie *Tadarida brasiliensis*, considerada sinantrópica no Rio Grande do Sul (CEVS, 2012), localizadas nas cidades de Tavares (região Litorânea) e São Gabriel (região da Campanha Central).

Seqüências relacionadas a quatro famílias virais foram identificadas. Na cidade de Tavares foram encontradas as famílias *Circoviridae*, *Papillomaviridae* e *Poxviridae* e em São Gabriel foram encontradas *Anelloviridae*, *Circoviridae* e *Papillomaviridae*. Adicionalmente, foram identificados na amostra de fezes (amostra A2) *contigs* referentes à vírus que infectam insetos, provavelmente esse achado se deve a dieta insetívora da espécie de morcego analisada.

A família *Papillomaviridae*, identificadano maior número de sequências do presente estudo, está subdividida em 49 gêneros já classificados, 34 deles (69%) são gêneros com uma única espécie viral. Apesar da ampla diversidade de gêneros, há pouca disponibilidade de dados sobre a ocorrência de papilomas em morcegos,

tornando mais complexa a avaliação dos resultados encontrados. As análises filogenéticas dos papilomavírus desta pesquisa foram feitas com base no conceito de taxonomia empregado para classificação dos papilomavírus, que prevê análise na sequência de DNA do gene L1 (*International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV), 2017). Membros do mesmo gênero compartilham mais que 60% de identidade na sequência de nucleotídeos da ORF do L1. Membros da mesma espécie compartilham entre 71% e 89% de identidade na sequência total do gene L1. Novos tipos devem divergir em mais que 10% do tipo conhecido mais próximo e novas variantes em menos que 2% do tipo mais próximo conhecido (BERNARD et al., 2010). Como o objetivo deste estudo visa a vigilância para vírus de interesse e identificação de vírus emergentes que possam representar risco a saúde humana, a abordagem escolhida consistiu na comparação das sequências de papilomavírus identificadas na pesquisa, com identidade ao gene L1, com todos os HPV (*human papilloma virus*) disponíveis, bem como representantes de todas as espécies de hospedeiros conhecidas. Isso gerou uma extensa árvore filogenética que permitiu visualizar que as amostras TbraPv1 e TbraPV2 agruparam em um único clado, porém se posicionaram em ramos distintos.

Interessantemente, a TbraPV2 de São Gabriel, maior sequência de L1 obtida e que por isso permitiu uma análise mais robusta, apresentou 72,2% de identidade de aminoácidos com o HPV41, pertencente a espécie *Nupapillomavirus 1*, único representante do gênero *Nupapillomavirus*. Buscando avaliar se a sequência em questão tratava-se de um novo PV foi feito uso da ferramenta *L1 Taxonomy Tool* do NCBI (disponível em [https://pave.niaid.nih.gov/#analyze/l1\\_taxonomy\\_tool](https://pave.niaid.nih.gov/#analyze/l1_taxonomy_tool)) obtendo-se o resultado de 67% de identidade, o que segundo os conceitos de taxonomia utilizados indica ser uma nova espécie de papilomavírus do gênero *Nupapillomavirus*. Apesar da identidade a uma espécie de PV humano, este resultado deve ser avaliado considerando a diferença do tamanho do banco de dados disponível de sequências do gene L1, sendo 183 sequências oriundas de humanos e apenas 12 sequências de morcegos. Dentre as sequências de morcegos disponíveis nos banco de dados, apenas nove estão classificadas (Tabela 7). A análise filogenética das sequências deste estudo comparando apenas com sequências de morcegos, demonstrou que a TbraPV1 está fortemente relacionada ao PV ainda não classificado descrito em morcegos *Molossus molossus* da Guiana Francesa, espécie pertencente a mesma família do *Tadarida brasiliensis*: família *Molossidae* (SALMIER et al., 2017). Possivelmente a amostra TbraPV1 trata-se de uma espécie deste novo gênero ainda não classificado. Há registros dessas duas espécies

compartilhando o mesmo abrigo em cidades do Rio Grande do Sul.

Durante a coleta em Tavares, foram observados alguns morcegos com lesões cutâneas semelhantes a hiperqueratose, que é uma lesão histopatológica compatível com a ocorrência de papilomatose. O registro fotográfico das lesões pode ser observado nas figuras 10 e 11.



Figura 10 - Lesões cutâneas compatíveis com papilomatose em morcego *T. brasiliensis* de Tavares, RS (Imagem: Aline Campos, 2017)



Figura 11 - Lesões cutâneas compatíveis com papilomatose em morcego *T. brasiliensis* de Tavares, RS (Imagem: Aline Campos, 2017)

A ocorrência de papilomavírus em quirópteros já foi descrita em sete espécies de morcegos, seis delas no continente europeu e uma no continente americano (SALMIER et al., 2017; PAvE, Papillomavirus Episteme Database, <http://pave.niaid.nih.gov/>, ultimo acesso Fevereiro 2018). As manifestações clínicas do papilomavírus em morcegos variaram do assintomático a ocorrência de carcinoma basoescamoso. Apesar de não ter sido realizado o isolamento viral e nem o exame histopatológico das lesões encontradas nos animais de Tavares, é provável que tais lesões estejam associadas ao papilomavírus encontrado em nossas amostras. Os dados não foram suficientes para avaliar se a presença destes vírus representa algum risco a conservação das espécies de morcegos.

A importância destes achados de papilomavirus em morcegos reside principalmente no fato de que pouco é conhecido sobre os mecanismos que determinam a diversificação desta grande família viral. Nesse sentido, as informações obtidas neste estudo poderão auxiliar na compreensão da evolução viral e das interações vírus-hospedeiro. Ainda que esteja convencionado que os papilomavírus co-evoluíram com seus hospedeiros ao longo do tempo, que eles são altamente espécie específica, que a probabilidade de recombinações seja pequena e que provavelmente a capacidade zoonótica desta família seja de baixa importância, estes dados colaboram para o melhor entendimento das relações filogenéticas entre a ampla gama de hospedeiros dos PV. (GARCÍA-PÉREZ et al., 2014).

Em relação as sequências de circovirus, a ocorrência de sequências desta família viral em amostra de urina provavelmente se deveu ao método de coleta ambiental, que possibilita a contaminação da amostra com as fezes. As relações filogenéticas observadas na sequência obtida a partir do *contig* 69 da amostra A2 estão de acordo com os resultados de metagenômica obtidos em morcegos *Molossus molossus* da Guiana Francesa (SALMIER et al., 2017). Em ambos os estudos as sequências de CV obtidas estão mais relacionadas a sequências anteriormente identificadas em aves. Curiosamente, tais sequências não agruparam com os CV já encontrados em morcegos, incluindo circovírus de *T. brasiliensis* descrito na cidade de Porto Alegre (LIMA et al., 2015; WU et al., 2016). Este achado pode estar relacionado ao fato que próximo ao local de coleta, no município de Tavares, encontra-se o Parque Nacional da Lagoa do Peixe, o local é abrigo para grandes concentrações de aves migratórias do Hemisfério Norte (no verão) e Sul (no inverno) e recebe aves como gansos marinhos, cisnes, marrecos, flamingos, maçaricos, gaivotas entre outros, que habitam nesta parte do ano o mesmo

território dos morcegos.

A análise metagenômica permitiu também a identificação de poxvírus na amostra A5. Existem pelo menos cinco registros anteriores da ocorrência de poxvirus em morcegos de ambas as subordens - megachiroptera e microchiroptera, distribuídos em quatro diferentes continentes( EMERSON et al., 2013;BAKER; MURCIA, 2014; O 'DEA et al., 2016; TU et al., 2017).Em 2009 foram encontradas através da análise de metagenômica sequências de poxvírus relacionadas a MOCV em suabes orais de *Eidolon helvum* em Ghana, África ocidental. A baixa similaridade da sequência de poxvírus aqui encontrada com outros genomas de poxvírus de morcegos já caracterizados em outros países pode ser justificada pela pouca quantidade de sequências obtida somada a diversidade genética e as barreiras geográficas que separam as espécies (O 'DEA et al., 2016).Esta quantidade considerável de registros anteriores de poxvirus em morcegos, relatados em curto espaço de tempo,demonstra que não se trata de um achado isolado. Uma ampla gama de hospedeiros silvestres de poxvírus já foi descrita, assim como as características espécie específicas destes vírus (p. ex.poucos genes não essenciais compartilhados e especificidade de hospedeiro dentro do mesmo gênero). Não há indícios até o momento de que os morcegos abriguem poxvírus com maior potencial zoonótico ou epidêmico que as demais espécies de animais (BAKER; MURCIA, 2014; O 'DEA et al., 2016).

No que se refere às sequências das famílias *Anelloviridae* e *Circoviridae* encontradas na amostra A6, de urina de São Gabriel, a pouca quantidade não permitiu uma análise da filogenia que produzisse resultados consistentes, já que similaridade não significa necessariamente relacionamento evolutivo.

Para que se obtenham resultados relevantes em estudos desta natureza, que buscam os poucos vírus potencialmente zoonóticos já descritos e prospecta novos vírus emergentes ainda desconhecidos, as análises realizadas e os resultados obtidos devem estar de acordo ao contexto da hipótese e à biologia do organismo avaliado.

A identificação das espécies virais que infectam os morcegos de colônias urbanas representa uma forma efetiva de vigilância e fornece subsídios para a elaboração de contramedidas. Além disso, a descoberta de novos agentes virais de morcegos amplia o conhecimento sobre a diversidade viral associada a estes animais (TSE et al., 2012). Porém, conclusões precipitadas podem por em risco a conservação de diversas espécies de morcegos já impactadas pelo aumento das diversas interações antrópicas, resultado das recentes mudanças ecológicas e demográficas. A detecção do

genoma de vírus zoonóticos em morcegos contribui para o melhor entendimento do papel desses animais como reservatório de doenças importantes, mas não gera dados suficientes para construção de informações a respeito do potencial epidêmico destes vírus. Mais estudos devem ser feitos para que seja possível avaliar o risco representado pelos vírus oriundos de morcegos, como por exemplo a recuperação do genoma completo dos vírus encontrados, vigilância clínica e sorológica da população residente próximo ao local de detecção do vírus, bem como estudos moleculares e sorológicos também dos morcegos naturalmente infectados (BAKER; MURCIA, 2014).

Finalizando, a complexidade para a realização das coletas de morcegos e animais silvestres realizadas regularmente pelo PECPR torna estas amostras em um valioso material de pesquisa. As várias parcerias desenvolvidas e os resultados já obtidos, demonstram que a colaboração e o compartilhamento desse material biológico com grupos de pesquisa possibilitam a otimização de custos, o melhor aproveitamento de recursos públicos e o mais importante: possibilita a ampliação da vigilância para outros vírus de interesse, além do vírus rábico, que também podem representar risco a saúde pública.

## 7. Conclusões

Foram encontradas 33 sequências com identidade a família *Papillomaviridae*.

Foram encontradas 3 sequências com identidade a família *Circoviridae*.

Foi encontrada uma sequência com identidade a família *Poxviridae*.

Foi encontrada uma sequência com identidade a família *Anelloviridae*.

Duas sequências apresentaram identidade a virus circulares DNA de cadeia simples ainda não identificados.

A análise das sequências com identidade a genes L1 dos papilomavírus encontrados sugerem que uma nova espécie do gênero *Nupapillomavirus* foi identificada.

O compartilhamento das amostras obtidas através do Programa de Vigilância e Controle da Raiva amplia a pesquisa de vírus de interesse em saúde pública.

O uso da metagenômica como ferramenta molecular para monitoramento dos vírus pode agregar informações importantes a elaboração de medidas de vigilância e resposta em saúde pública.

Tabela 7 - Gene L1 papilomavírus de morcegos

Acrônimo	Nome da sequência	Espécie do vírus	Referencia Bibliografica	Espécie hospedeiro	Tamanho sequência nucleotideos L1	Identificação no Genbank
EhPV1	Eidolon helvum papillomavirus 1	<i>Dyousilonpapillomavirus 1</i>	Garcia-Perez et al., Unpublished	<i>Eidolon helvum</i>	1542	<a href="#">JX123128</a>
EhPV2	Eidolon helvum papillomavirus 2	<i>Psipapillomavirus 1</i>	Yinda et al., Unpublished	<i>Eidolon helvum</i>	1560	<a href="#">KX276957</a>
EhPV3	Eidolon helvum papillomavirus 3	<i>Psipapillomavirus 1</i>	Yinda et al., Unpublished	<i>Eidolon helvum</i>	1542	<a href="#">KX276956</a>
EsPV1	Eptesicus serotinus papillomavirus 1	<i>Dyopsipapillomavirus 1</i>	Garcia-Perez et al., 2014	<i>Eptesicus serotinus</i>	1542	<a href="#">KC858263</a>
EsPV2	Eptesicus serotinus papillomavirus 2	<i>Dyomegapapillomavirus 1</i>	Garcia-Perez et al., 2014	<i>Eptesicus serotinus</i>	1500	<a href="#">KC858264</a>
EsPV3	Eptesicus serotinus papillomavirus 3	<i>Dyopsipapillomavirus 1</i>	Garcia-Perez et al., 2014	<i>Eptesicus serotinus</i>	1521	<a href="#">KC858265</a>
MrPV1	Myotis ricketti papillomavirus 1	Unclassified	Wu et al., 2012	<i>Myotis ricketti</i>	1503	<a href="#">JQ814847</a>
MscPV1	Miniopterus schreibersii papillomavirus 1	Unclassified	Wu et al., 2012	<i>Miniopterus schreibersii</i>	1509	<a href="#">JQ814848</a>
MscPV2	Miniopterus schreibersii papillomavirus 2	<i>Dyotaupapillomavirus 1</i>	Tse et al., 2012	<i>Miniopterus schreibersii</i>	1506	<a href="#">JQ692938</a>
RaPV1	Rousettus aegyptiacus Papillomavirus 1	<i>Psipapillomavirus 1</i>	Rector et al., 2006	<i>Rousettus aegyptiacus</i>	1572	<a href="#">DQ366842</a>
RfPV1	Rhinolophus ferrumequinum papillomavirus type 1	<i>Treisdelatapapillomavirus 1</i>	Garcia-Perez et al., 2014	<i>Rhinolophus ferrumequinum</i>	1530	<a href="#">KC858266</a>
MmoPV1	Molossus molossus PV1	Unclassified	Salmier et al, 2017	<i>Molossus molossus</i>	1689	<a href="#">KX812447</a>

## Referências

- ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, v. 215, n. 3, p. 403–410, 1990.
- BAKER, K. S.; MURCIA, P. R. Poxviruses in bats ... so what? *Viruses*, v. 6, n. 4, p. 1564–77, 3 abr. 2014.
- BEATRIZ DE CARVALHO, H. et al. Raiva: uma breve revisão Rabies: a brief review. v. 35, n. 2, p. 125–144, 2007.
- BERNARD, H.-U. et al. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology*, v. 401, n. 1, p. 70–9, 25 maio 2010.
- BONNY, T. et al. Detection of Alphacoronavirus vRNA in the Feces of Brazilian Free-Tailed Bats (*Tadarida brasiliensis*) from a Colony in Florida, USA. *Diseases*, v. 5, n. 1, p. 7, 27 fev. 2017.
- BRAGG, L.; TYSON, G. W. *Environmental Microbiology: Methods and Protocols*. [s.l: s.n.]. v. 1096
- BREITBART, M. et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Circoviridae. *Journal of General Virology*, v. 98, n. 8, p. 1997–1998, 1 ago. 2017.
- CALISHER, C. H. et al. Bats: important reservoir hosts of emerging viruses. *Clinical microbiology reviews*, v. 19, n. 3, p. 531–45, 1 jul. 2006.
- CEVS, C. E. DE V. EM S. S. R. *Guia de Manejo e Controle de Morcegos*. [s.l: s.n.]. Disponível em:  
 <[http://www.canoas.rs.gov.br/uploads/midia/404893/guia\\_manejo\\_controle\\_morcegos.pdf](http://www.canoas.rs.gov.br/uploads/midia/404893/guia_manejo_controle_morcegos.pdf)>. Acesso em: 22 jan. 2018.
- CHACÓN, J. L. et al. Detection of chicken anemia virus and infectious bursal disease virus co-infection in broilers. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 47, n. 4, p. 293–297, 2010.
- CIBULSKI, S. P. et al. A Novel Anelloviridae Species Detected in *Tadarida brasiliensis* Bats: First Sequence of a Chiropteran Anellovirus. *Genome announcements*, v. 2, n. 5, 30 out. 2014.
- CIESIELSKI, L. *POXVIRUS E SUA UTILIZAÇÃO COMO FERRAMENTA BIOLÓGICA*. [s.l: s.n.]. Disponível em:  
 <[http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/bitstream/handle/1843/BUBD-ADBMS/monografia\\_de\\_especializa\\_\\_o\\_\\_leandro.pdf?sequence=1](http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/bitstream/handle/1843/BUBD-ADBMS/monografia_de_especializa__o__leandro.pdf?sequence=1)>. Acesso em: 17

nov. 2017.

DE SOUZA, W. M. et al. Discovery of novel anelloviruses in small mammals expands the host range and diversity of the Anelloviridae. *Virology*, v. 514, n. July 2017, p. 9–17, 2018.

DELWART, E.; LI, L. Rapidly expanding genetic diversity and host range of the Circoviridae viral family and other Rep encoding small circular ssDNA genomes. *Virus research*, v. 164, n. 1–2, p. 114–21, mar. 2012.

DILLIES, M.-A. et al. A comprehensive evaluation of normalization methods for Illumina high-throughput RNA sequencing data analysis. *Briefings in Bioinformatics*, v. 14, n. 6, p. 671–683, 1 nov. 2013.

EMERSON, G. L. et al. Novel Poxvirus in Big Brown Bats, Northwestern United States. *Emerging infectious diseases*, v. 19, n. 6, 2013.

ESCOBAR-ZEPEDA, A.; VERA-PONCE DE LEÓN, A.; SANCHEZ-FLORES, A. The Road to Metagenomics: From Microbiology to DNA Sequencing Technologies and Bioinformatics. *Frontiers in genetics*, v. 6, p. 348, 2015.

FLINT, J. et al. *Principles of Virology* 4th Edition. [s.l: s.n.].

FLYGARE, S. et al. Taxonomer: an interactive metagenomics analysis portal for universal pathogen detection and host mRNA expression profiling. *Genome Biology*, v. 17, n. 1, p. 111, 26 dez. 2016.

FOX, R. et al. *Molluscum contagiosum* in two donkeys. *The Veterinary record*, v. 170, n. 25, p. 649, 23 jun. 2012.

GARCÍA-PÉREZ, R. et al. Novel papillomaviruses in free-ranging Iberian bats: No virus-host co-evolution, no strict host specificity, and hints for recombination. *Genome Biology and Evolution*, v. 6, n. 1, p. 94–104, jan. 2014.

GILLILAND, S. M. et al. Investigation of porcine circovirus contamination in human vaccines. *Biologicals*, v. 40, n. 4, p. 270–277, 2012.

GÖTZ, S. et al. High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. *Nucleic acids research*, v. 36, n. 10, p. 3420–35, jun. 2008.

HAKIMUDDIN, F. et al. Incidence and detection of beak and feather disease virus in psittacine birds in the UAE. *Biomolecular detection and quantification*, v. 6, p. 27–32, jan. 2016.

HALLER, S. L. et al. Poxviruses and the Evolution of Host Range and Virulence Poxvirus host range factors. *Infect Genet Evol.*, 2014.

HANDELSMAN, J. Metagenomics: application of genomics to uncultured

microorganisms. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR, v. 68, n. 4, p. 669–85, dez. 2004.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES (ICTV). *Virus Taxonomy: The Classification and Nomenclature of Viruses The Online (10th) Report of the ICTV, 2017*. Disponível em: <[https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_online\\_report/](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/)>

KATZOURAKIS, A. et al. Endogenous Viral Elements in Animal Genomes. *PLoS Genetics*, v. 6, n. 11, p. e1001191, 18 nov. 2010.

KUZMIN, I. V. et al. Bats, emerging infectious diseases, and the rabies paradigm revisited. *Emerging Health Threats Journal*, v. 4, n. 1, p. 1–17, 2011.

LEFORT, V.; LONGUEVILLE, J.-E.; GASCUEL, O. SMS: Smart Model Selection in PhyML. *Molecular Biology and Evolution*, v. 34, n. 9, p. 2422–2424, 1 set. 2017.

LEROY, E. M. et al. Fruit bats as reservoirs of Ebola virus. *Nature*, v. 438, n. 7068, p. 575–576, 1 dez. 2005.

LIAN, H. et al. Novel circovirus from mink, China. *Emerging infectious diseases*, v. 20, n. 9, p. 1548–50, set. 2014.

LIMA, F. E. S. et al. A Novel Chiropteran Circovirus Genome Recovered from a Brazilian Insectivorous Bat Species. *Genome Announcements*, v. 3, n. 6, p. e01393-15, 31 dez. 2015.

MANNARINI, L. et al. Human Papilloma Virus (HPV) in head and neck region: review of literature. *Acta otorhinolaryngologica Italica : organo ufficiale della Societa italiana di otorinolaringologia e chirurgia cervico-facciale*, v. 29, n. 3, p. 119–26, jun. 2009.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2009.

MARCHLER-BAUER, A. NCBI Conserved Domain Search. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi?RID=9ATCUGC1014&mode=all>>. Acesso em: 27 fev. 2018.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Situação Epidemiológica da Raiva no Brasil*. [s.l.: s.n.].

MORATELLI, R.; CALISHER, C. H. Bats and zoonotic viruses: Can we confidently link bats with emerging deadly viruses? *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2015.

NISHIYAMA, S. et al. Identification of novel anelloviruses with broad diversity in UK rodents. *The Journal of general virology*, v. 95, n. Pt 7, p. 1544–53, jul. 2014.

NOGUEIRA, M. R. et al. Checklist of Brazilian bats, with comments on original records. *Check List*, v. 10, n. 4, p. 808–821, set. 2014.

NORONHA, B. T. *Análise dos registros de Chiroptera no Rio Grande do Sul - métodos*

empregados e distribuição de espécies por municípios , com ênfase em áreas de parques eólicos. 2016.

NURK, S. et al. Assembling Genomes and Mini-metagenomes from Highly Chimeric Reads. In: [s.l.] Springer, Berlin, Heidelberg, 2013. p. 158–170.

O'DEA, M. A. et al. Genomic characterization of a novel poxvirus from a flying fox: evidence for a new genus? *Journal of General Virology*, v. 97, p. 2363–2375, 2016.

PALLEN, M. J. Diagnostic metagenomics: potential applications to bacterial, viral and parasitic infections. *Parasitology*, v. 141, n. 14, p. 1856–62, dez. 2014.

PLOWRIGHT, R. K. et al. Ecological dynamics of emerging bat virus spillover. 2014.

QUINCE, C. et al. Shotgun metagenomics, from sampling to analysis. *Nature Biotechnology*, v. 35, n. 9, p. 833–844, 2017.

RECTOR, A.; RANST, M. VAN. Animal papillomaviruses. *Virology*, v. 445, p. 213–223, 2013.

REIS, N. R. DOS et al. Morcegos do Brasil. [s.l.: s.n.].

ROSARIO, K. et al. Revisiting the taxonomy of the family Circoviridae: establishment of the genus Cyclovirus and removal of the genus Gyrovirus. *Archives of Virology*, v. 162, n. 5, p. 1447–1463, 2017.

SALES LIMA, F. E. et al. Detection of Alphacoronavirus in velvety free-tailed bats (*Molossus molossus*) and Brazilian free-tailed bats (*Tadarida brasiliensis*) from urban area of Southern Brazil. 2013.

SALMIER, A. et al. Virome analysis of two sympatric bat species (*Desmodus rotundus* and *Molossus molossus*) in French Guiana. *PLOS ONE*, v. 12, n. 11, p. e0186943, 8 nov. 2017.

SCHIFFMAN, M. et al. Carcinogenic human papillomavirus infection. *Nature Reviews Disease Primers*, v. 2, 2016.

SCHMIEDER, R.; EDWARDS, R. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics (Oxford, England)*, v. 27, n. 6, p. 863–4, 15 mar. 2011.

SHAN, T. et al. The fecal virome of pigs on a high-density farm. *Journal of virology*, v. 85, n. 22, p. 11697–708, nov. 2011.

SMITS, S. L. et al. Novel Cyclovirus in Human Cerebrospinal Fluid. 2010.

SODRE, M. M.; GAMA, ADRIANA RUCKERT ALMEIDA, M. UPDATED LIST OF BAT SPECIES POSITIVE FOR RABIES IN BRAZIL. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, v. 52, n. 2, p. 75–81, 2010.

THOMAS, T.; GILBERT, J.; MEYER, F. Metagenomics - a guide from sampling to

data analysis. *Microbial informatics and experimentation*, v. 2, n. 1, p. 3, 9 fev. 2012.

TSE, H. et al. Identification of a novel bat papillomavirus by metagenomics. *PloS one*, v. 7, n. 8, p. e43986, 2012.

TU, S.-L. et al. Characterization of Eptesipoxvirus, a novel poxvirus from a microchiropteran bat. *Virus Genes*, p. 1–12, 6 jul. 2017.

WU, Z. et al. Deciphering the bat virome catalog to better understand the ecological diversity of bat viruses and the bat origin of emerging infectious diseases. *The ISME journal*, v. 10, n. 3, p. 609–20, mar. 2016.

YOUNG, C. C. W.; OLIVAL, K. J. Optimizing Viral Discovery in Bats. *PLOS ONE*, v. 11, n. 2, p. e0149237, 11 fev. 2016.

ZHENG, X. et al. Viral metagenomics of six bat species in close contact with humans in southern China. *Archives of Virology*, p. 1–16, 5 out. 2017.