

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

Caracterização do viroma sérico de pombos (*Columba livia*) de vida livre no Sul do Brasil

Doutoranda: Márcia Regina Loiko

Orientador: Dr. Paulo Michel Roehle

Co-orientadora: Dra. Fabiana Quoos Mayer

Porto Alegre, fevereiro de 2019

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

**Caracterização do viroma sérico de pombos (*Columba livia*) de vida
livre no Sul do Brasil**

(Tese de doutorado)

Autora: Márcia Regina Loiko

**Tese apresentada como requisito parcial
para obtenção do grau de Doutora em
Ciências Veterinárias na área de
Microbiologia Veterinária – Virologia.**

Orientador: Dr. Paulo Michel Roehle

Co-orientadora: Dra. Fabiana Quoos Mayer

Porto Alegre, fevereiro de 2019

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

CIP - Catalogação na Publicação

Loiko, Marcia Regina
Caracterização do viroma sérico de pombos (*Columba livia*) de vida livre no Sul do Brasil. / Marcia Regina Loiko. -- 2019.
92 f.
Orientador: Paulo Michel Roehé.

Coorientadora: Fabiana Quoos Mayer.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. Pombos de vida livre. 2. *Columba livia*. 3. Viroma sérico. 4. Sequenciamento de alto desempenho (HTS). 5. Pigeon Circovirus, Hepacivirus, Pegivirus e Gyrovirus.. I. Roehé, Paulo Michel, orient. II. Quoos Mayer, Fabiana, coorient. III. Título.

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

MÁRCIA REGINA LOIKO
MÉDICA VETERINÁRIA

TESE

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Faculdade de Veterinária
Porto Alegre (RS), Brasil

Avaliada em: ____ / ____ / 2019.

Pela comissão examinadora

Prof. Dr. Paulo Michel Roehle
Orientador e Presidente da comissão

Prof. Dra. Fabiana Quoos Mayer
Co-orientadora e Membro da Comissão

Prof. Dra. Ana Paula Frazzon
Membro da Comissão

Prof. Dra. Juliana Comerlato
Membro da Comissão

Prof. Dr. Vagner Ricardo Lunge
Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

Nesse momento posso dizer “Eu consegui !!”

Sempre desejei estudar, era um sonho ser Médica Veterinária, realizei!!

Mas não imaginava chegar até aqui; hoje olho para trás e vejo o quanto essa conquista é importante. Finalizo mais um ciclo em minha vida, o “Doutorado”.

Ao longo de todos esses anos de estudo, tive a sorte de contar com a colaboração de inúmeras pessoas, cuja amizade, conhecimento e apoio foram fundamentais para que eu chegasse até aqui. Por essa ajuda, apoio e amizade, sou imensamente grata as seguintes pessoas:

Ao meu esposo Tito, pois além de ser o amor da minha vida, foi e é meu amigo, minha família, companheiro de jornada em todos os momentos da minha trajetória, meu Muito obrigada!!! Você fez a diferença em muitos momentos.

À minha irmã Karina, mesmo longe, sempre esteve em meu pensamento e coração, você faz parte do meu amor.

Ao meu orientador, Prof. Paulo M. Roehe, muito obrigada por acreditar que eu podia, pelo incentivo, oportunidade, apoio e ensinamentos.

À minha co-orientadora, Dra. Fabiana Quoos Mayer pela orientação, ensinamentos, amizade e toda liberdade e confiança depositadas em mim durante todo o doutorado. Sem você tudo teria ficado muito mais difícil, tuas palavras “calma, tudo vai dar certo” sempre me ajudaram muito, não imaginas o quanto uma palavra amiga faz a diferença. Obrigada!!

Ao IPVDF pela oportunidade que tive em realizar minha pesquisa nos Laboratório de Virologia e Biologia Molecular do Instituto. A todos os amigos que lá fiz, foram alguns anos de trabalho e pesquisa na instituição que valeram muito. Agradeço, especialmente, a Angélica Bertagnolli e Thais Bueno, amigas especiais!

À Ana Paula M. Varela pela amizade, ajuda, parceria e ensinamentos. Você me ajudou muito, serei sempre grata por tudo que fizestes por mim. Minha amiga do coração, Camila M. Scheffer, você foi um presente, uma amiga que quero levar para a vida.

Agradeço a todos os colegas de laboratório, Cristine Cerva, Carolina Tochetto, Diane Lima, Willian Paim, Anne Caroline Santos, Marina Vidaletti, Bruna Lopes, cada um de vocês foi importante em algum momento da caminhada, fizeram a diferença. Ao Dennis Maletich Junqueira, agradeço pela parceria e amizade.

À Empresa de Falcoaria Hayabusa pela ajuda em relação as amostras. Agradeço a Medica Veterinária Ana Paula Morel por fazer parte desse trabalho e por toda ajuda.

Ao PPGCV/UFRGS e à Coordenação de Aperfeiçoamento de pessoal de nível Superior (CAPES) pela oportunidade e pela concessão da bolsa de doutorado.

Finalmente, aos meus “filhos gatos”, Pipo, Capitu, Pipoca e Greice Kelly, estiveram sempre juntos durante a fase de escrita da tese.

Muito obrigada a todos!!!!

RESUMO

Pombos (*Columba livia*) são aves exóticas no Brasil que coabitam de forma crescente com a população urbana e de animais de criação, podendo ser reservatórios, portadoras e/ou transmissoras de agentes patogênicos para outras espécies. Neste trabalho foi realizado sequenciamento de alto desempenho buscando identificar o viroma de pombos de vida livre. No primeiro estudo foram caracterizados sete genomas completos de pigeon circovirus (PiCV), sequenciados a partir de amostras de soro de pombos das diferentes regiões amostradas. Os dados permitiram análises sobre a variabilidade genômica deste vírus, os quais apresentam similaridade genética com PiCV previamente relatados na Europa. Além disso, foram identificados pontos propensos a eventos de recombinação em ambas as ORFs (*Rep* e *Cap*), apesar do elevado grau de conservação. No segundo estudo que compõe essa tese, foram reportados e analisados dois genomas de girovírus - PiGyV_RS/TQ e PiGyV_RS/RG. Por apresentarem baixa identidade com vírus conhecidos, sugere-se tratar de um novo girovírus circulante em pombos de vida livre com nome sugerido de Pigeon Gyrovirus (PiGyV). O terceiro estudo realizado apresenta os resultados dos viromas obtidos dos soros de 137 pombos coletados em sete regiões geograficamente distintas da região sul do Brasil. O total de *reads* sequenciadas por região variou de 325.182 a 1.243.426, e em média, 43% destas apresentaram identidade com sequências virais depositadas no GenBank. Dentre os *contigs* virais, 90,8% apresentaram identidade com sequências de genomas de vírus eucarióticos representativos de seis famílias virais: *Circoviridae* (a mais abundante), *Flaviviridae*, *Anelloviridae*, *Adenoviridae*, *Parvoviridae* e *Coronaviridae*. Alguns dos genomas identificados podem representar agentes de potencial impacto à saúde humana e animal, como os vírus pertencentes aos gêneros *Hepacivirus* e *Pegivirus*. Estes resultados contribuem para um maior entendimento dos vírus que circulam em pombos de vida livre, além de ter contribuído para a descoberta de vírus que, até o presente momento, não tinham sido relatados no Brasil.

Palavras-chave - Pombos, *Columba livia*, viroma, sequenciamento de alto desempenho (HTS), *Hepacivirus*, *Pegivirus* e *Gyrovirus*.

ABSTRACT

Pigeons (*Columba livia*) are exotic birds in Brazil that increasingly cohabit with urban population and rural animals, being potential reservoirs, carriers and/or transmitters of pathogens for other species. In this work, high performance sequencing was carried out to identify the pigeon viroma of free life. In the first study, seven complete genomes of pigeon circovirus (PiCV) were characterized, sequenced from serum samples of pigeons from different sampled regions. The data allowed analyzes on the genomic variability of this virus, which have genetic similarity with PiCV previously reported in Europe. In addition, points prone to recombination events were identified in both ORFs (Rep and Cap), despite the high degree of conservation. In the second study that composes this thesis, two genomes of gyrovirus - PiGyV_RS/TQ and PiGyV_RS/RG were reported and analyzed. Because they have low identity with known viruses, it is suggested to treat a new circulating gyrovirus in free-living pigeons with the suggested name of Pigeon Gyrovirus (PiGyV). The third study presents the viroma results obtained from sera of 137 pigeons, grouped according to seven sampled regions. The total reads sequenced by region ranged from 325,182 to 1.243,426. In average, 43.0% of the reads showed identity to viral sequences deposited in GenBank. Among viral contigs, 90.8% presented identity to sequences of eukaryotic viral genomes, and the viruses of animal interest were classified into six families: *Circoviridae* (the most abundant), *Flaviviridae*, *Anelloviridae*, *Adenoviridae*, *Parvoviridae* and *Coronaviridae*. It was possible to observe the great diversity of viral families circulating in the serum of the pigeons, some of which have a potential impact on human and animal health, such as viruses belonging to the genus *Hepacivirus* and *Pegivirus*. These results contribute to a better understanding of the viruses that circulate in free living pigeons, as well as contributing to the discovery of viruses that, to date, have not been reported in Brazil.

Keywords: Pigeons, *Columba livia*, viroma, high performance sequencing (HTS), *Gyrovirus*, *Hepacivirus*, *Pegivirus*.

LISTA DE FIGURAS

1 REVISÃO DE LITERATURA	12
1.1 Pombo doméstico (<i>Columba livia</i>)	12
Figura 2: Esquema apresentando as aplicações da metagenômica viral.	20
3. ARTIGOS CIENTÍFICOS	22
3.1 Columbidae circovirus detected in free ranging pigeons from Southern Brazil: insights on PiCV evolution	22
Figura S1. Place of origin of the free-living pigeons used in this study.....	39
Figura S2. Likelihood mapping of five datasets comprising 82 PiCV sequences.....	40
Figura S3. Bootscanning plots of six PiCV recombinant sequences.....	41
Figura S4. Box plot of PiCV viral genome loads and the city of origin of sampled pigeons.	41
3.2 Nova espécie de Pigeon gyrovirus (PiGyV) recuperado de soro de pombos de vida livre no Sul do Brasil	43
Figura 1. Representação esquemática da organização genômica dos girovírus descritos.	49
Figura 2. Matriz bidimensional de identidade pareada de nucleotídeos utilizando SDT v1.2.	50
Figura 3. Comparação de sequências nucleotídicas das regiões VP1 e VP2 entre os girovírus identificados neste estudo.	51
3.3 Caracterização do viroma sérico de pombos de vida livre na região Sul do Brasil ..	57
Figura 1. Relação das <i>reads</i> virais representativos de membros de diferentes famílias virais detectadas nos soros de pombos das sete regiões amostradas.	64
Figura 2. Relação dos <i>contigs</i> virais dos <i>pools</i> com identidade (BLASTx) a membros de famílias virais detectadas nos soros de pombos de sete regiões amostradas.	65

LISTA DE TABELAS

1 REVISÃO DE LITERATURA	12
1.1 Pombo doméstico (<i>Columba livia</i>)	12
Tabela 1. Agentes infecciosos já detectados em pombos de vida livre.....	14
3. ARTIGOS CIENTÍFICOS	22
3.1 Columbidae circovirus detected in free ranging pigeons from Southern Brazil: insights on PiCV evolution.....	22
Table S1. PiCV contigs retrieved in the present study.....	31
Table S2. Summary of unique recombination events identified by RDP4 in the PiCV complete genome sequences.	32
Table S3. PiCV non-recombinant complete genomes used as genetic group references for Simplot analysis.....	34
Table S4. GenBank accession numbers, sampling information and phylogenetic genotype information of 110 PiCV full genome sequences.....	35
3.2 Nova espécie de Pigeon gyrovirus (PiGyV) recuperado de soro de pombos de vida livre no Sul do Brasil	43
Tabela 1. <i>Contigs</i> identificados no BLASTx com identidade aos genomas de girovírus em amostras de soro de pombos.....	48
3.3 Caracterização do viroma sérico de pombos de vida livre na região Sul do Brasil ..	57
Tabela 1. Identificação dos pools formados por município amostrado, número de coletas, número total de amostras de soro de pombos coletadas e número de amostras utilizadas para esse estudo.....	59
Tabela 2. Resultados obtidos com o sequenciamento. O número de <i>reads</i> sequenciadas e trimadas por <i>pool</i> é apresentado, bem como o número de <i>contigs</i> montados e com identidade com sequências virais depositadas no GenBank.	63
Tabela 3. <i>Contigs</i> identificados (BLASTx/n) como genomas de vírus em amostras de soro de pombos.....	66
Tabela S1. Relação das sequências representativas de vírus do gênero <i>Pegivirus</i> encontradas nas amostras de soro de pombos coletados na região de São Leopoldo.....	77
Tabela S2. Relação das sequências representativas de vírus do gênero <i>Hepacivirus</i> encontradas nas amostras de soro de pombos coletados na região de São Leopoldo.....	79
Tabela S3. Relação das sequências genômicas representativas de vírus de procariotos encontradas nas amostras de soro de pombos coletados em todas as regiões amostradas.....	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aa: aminoácido

Cap: proteína do capsídeo

APMV-1: Avian paramyxovirus serotype-1

cDNA: DNA complementar

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

DNA: *deoxyribonucleic acid* (Ácido Desoxirribonucleico)

dNTP: *deoxynucleotide triphosphates* (desoxirribonucleotídeos trifosfatados)

EDTA: *ethylenediamine tetraacetic acid* (ácido etilendiamino tetra-acético)

FadV: Adenovirus dos perus

HTS: *high throughput sequencing* (sequenciamento de alto desempenho)

Kb: mil pares de base

MDA: *multiple displacement amplification* (amplificação de deslocamento múltiplo)

mM: milimolar

mRNA: *messenger RNA* (RNA mensageiro)

NaCl: cloreto de sódio

NCBI: *Nacional Center for Biotechnology Information* (Centro Nacional de Informação Biotecnológica)

ng: nanograma

NJ: Neighbor-Joining

nm: nanômetro

nmol: nanomol

nt: nucleotídeo

ORF: *open reading frame* (fase aberta de leitura)

PCA: *principal component analysis* (análise de componentes principais)

PCR: *polymerase chain reaction* (reação em cadeia da polimerase)

PiCV: pigeon circovirus

PiHV: Pigeon Herpesvirus

Rep: proteína da replicase

RNA: *ribonucleic acid* (ácido ribonucleico)

rpm: rotações por minuto

ssDNA: *single strand DNA* (DNA de fita simples)

TE: Tris EDTA

TEN: Tris EDTA Cloreto de sódio

μL : microlitro

VBI: Vírus da bronquite infecciosa das galinhas

IBAMA: Instituto Brasileiro do meio Ambiente e dos recursos naturais renováveis

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	11
1 REVISÃO DE LITERATURA.....	12
1.1 Pombo doméstico (<i>Columba livia</i>).....	12
1.1.1 Papel dos pombos como reservatórios de agentes com potencial patogênico	12
1.2 Saúde única e emergência de doenças	15
1.3 Abordagem metagenômica para caracterização de microbiomas.....	17
2 OBJETIVOS	21
2.1 Objetivo geral	21
2.2 Objetivos específicos	21
3. ARTIGOS CIENTÍFICOS.....	22
3.1 Columbid circovirus detected in free ranging pigeons from Southern Brazil: insights on PiCV evolution	22
3.2 Nova espécie de Pigeon gyrovirus (PiGyV) recuperado de soro de pombos de vida livre no Sul do Brasil	43
3.3 Caracterização do viroma sérico de pombos de vida livre na região Sul do Brasil	57
REFERÊNCIAS	83

INTRODUÇÃO

A interação das espécies exóticas e silvestres com animais de criação e o homem no que diz respeito à emergência e reemergência de patógenos é um assunto de extrema relevância nos dias atuais; além disso, a transmissão de patógenos entre espécies de animais, também chamada de *spillover*, é um desafio global para a saúde pública (PLOWRIGHT et al., 2017). Aves silvestres podem ser infectadas com vários tipos de micro-organismos patogênicos que podem ser transmitidos a humanos e animais (REED, K.D.; MEECE, J.K.; HENKEL, J.S.; SHUKLA, 2002); seu papel na epidemiologia de patógenos relevantes à saúde pública e animal vem sendo investigado nos últimos anos (KRISTENSEN et al., 2010). Pombos (*Columba livia*) são aves silvestres que coabitam com a população urbana e de animais de criação, podendo ser reservatórios, portadoras e/ou transmissoras de agentes patogênicos para outras espécies animais, além de poderem albergar novos vírus ainda não descritos (TIZARD, 2004).

A caracterização do viroma de pombos pode mostrar resultados enriquecedores do conhecimento a respeito de reservatórios virais, contribuindo com dados sobre vírus circulantes nessas aves que coabitam tão intensamente com humanos e animais de produção. Estudos acerca dos vírus circulantes em pombos são de importância tanto para saúde animal quanto pública.

Neste contexto, a aplicação de sequenciamento de alto desempenho como ferramenta de metagenômica, técnica que permite sequenciar todos os genomas de uma amostra sem a necessidade de conhecimento prévio sobre a sua natureza (CAPOBIANCHI; GIOMBINI; ROZERA, 2013; MARDIS, 2017) pode oportunizar o estudo de vírus insuspeitos nas populações de pombos, além de permitir a caracterização de parte da microbiota dessas aves. Esta técnica já revelou uma vasta biodiversidade microbiana em vários ambientes e está sendo cada vez mais aplicada na área humana e animal para casos difíceis de (DELWART, 2007; DUTILH et al., 2017). A aplicação de sequenciamento de alto desempenho em amostras de soro de pombos oportuniza a descoberta de vírus que, até o presente momento, não tenham sido relatados no Brasil.

Portanto, este trabalho tem como objetivo aplicar ferramentas de metagenômica para caracterizar o viroma (conjunto de vírus presentes em determinado hospedeiro) de pombos de vida livre aparentemente saudáveis da região Sul do Brasil. Com isso, será possível dimensionar o potencial impacto desses animais à saúde humana e animal.

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Pombo doméstico (*Columba livia*)

Os pombos são aves silvestres pertencentes à ordem Columbiformes, família Columbidae, gênero *Columba* que compreende uma única espécie, *Columba livia*, conhecida popularmente como pombo doméstico (CATROXO et al., 2011; NUNES, 2003). Esta espécie originou-se por cruzamento seletivo da espécie selvagem, conhecida como “pombo das rochas” (SEABRA & OLIVEIRA, 2016) e a partir da Europa, norte da África, Oriente Médio e Ásia, onde foram domesticados, foram introduzidos pelo homem em praticamente todo o mundo (FONTOURA et al., 2013). Eles têm por característica a proximidade de convívio com o homem, especialmente em ambientes urbanos (NUNES, 2003; SEABRA & OLIVEIRA, 2016).

No Brasil, o pombo doméstico foi introduzido pelos europeus no século XVI, já domesticado (BENCKE, 2007); portanto, é considerada uma espécie exótica (NETO et al., 1997; BENCKE, 2007; FONTOURA et al., 2013) . Em muitos lugares, pombos domésticos que escaparam ou foram intencionalmente soltos reverteram a um estado selvagem ou semisselvagem, dando origem às populações ferais hoje estabelecidas em muitas cidades e zonas rurais (NUNES; MIRANDA, 2010).

A estrutura urbana permite a adaptação e reprodução dessas aves, o ciclo reprodutivo dos pombos é regulado pela disponibilidade de alimento (NUNES et al., 2003; NUNES & MIRANDA, 2010); em ambientes urbanos, sua capacidade reprodutiva é maior, podendo variar entre duas a seis ninhadas por ano, com uma ou duas aves por ninhada. Outros fatores também contribuem para o aumento na população desta espécie, como a grande disponibilidade de abrigos e a ausência de predadores naturais. Tais fatos fazem com que os pombos atualmente detenham o *status* de pragas urbanas (NUNES, 2003), sendo considerado um problema de saúde pública (ROCHA-E-SILVA et al., 2014; VÁZQUEZ et al., 2010).

1.1.1 Papel dos pombos como reservatórios de agentes com potencial patogênico

Aves silvestres podem ser reservatórios de vários tipos de micro-organismos patogênicos que podem potencialmente ser transmitidos a humanos (REED et al., 2003). Em virtude disso, o papel dos pombos urbanos na epidemiologia de patógenos relevantes à saúde pública e animal vem sendo investigado mais profundamente nos últimos anos. Os pombos podem ser infectados por agentes com potencial de causar enfermidades em humanos; dentre eles deve-se mencionar o *Cryptococcus neoformans*,

encontrado nas fezes e importante causa de mortalidade em pessoas imunossuprimidas (REOLON, A., 2004). Ainda, vírus, parasitas e bactérias com potencial zoonótico e/ou de infectar outras espécies de animais também têm sido descritos em pombos (Tabela 1). Dentre os vírus que os pombos podem disseminar estão os paramyxovírus aviários - especialmente o *Avian paramyxovirus serotype-1* (APMV-1) (ESPERÓN et al., 2014), adenovírus, rotavírus, poxvírus e circovírus (FREICK; MÜLLER; RAUE, 2008; MARLIER; VINDEVOGEL, 2006) (Tabela 1). Além de espécies já conhecidas, novos vírus foram identificados em aves silvestres, como aqueles pertencentes às famílias *Parvoviridae*, *Picornaviridae*, *Reoviridae*, *Adenoviridae*, *Astroviridae* e *Caliciviridae*, mas que ainda não têm seu papel estabelecido como causadores de doença (PESTKA; STENZEL; KONCICKI, 2014).

No Brasil, apesar do aumento populacional dos pombos, pouco é conhecido sobre essas aves como potenciais reservatórios de patógenos ou sobre sua microbiota. A caça aos pombos é proibida no país (IBAMA, 2005), fato que dificulta o desenvolvimento de estudos nessas aves, assim como o seu controle populacional. Ainda, a investigação dos vírus patogênicos presentes nestas aves é relevante para o entendimento epidemiológico de algumas doenças e o papel que elas apresentam na manutenção de patógenos já conhecidos (STENZEL et al., 2014; TIZARD, 2004) ou até mesmo desconhecidos (EDWARDS R.A. & ROHWER F., 2005; KRISTENSEN et al., 2010)

Assim, dentro da perspectiva de saúde única, o pombo doméstico deve ser alvo de pesquisas para avaliar a ocorrência de vírus de interesse para a saúde animal e pública. A utilização de metagenômica na descrição da comunidade viral circulante nesses animais é uma ferramenta ideal para este propósito e pode contribuir no entendimento da dinâmica do surgimento de infecções com potencial de transmissão inter-espécies.

Tabela 1. Agentes infecciosos já detectados em pombos de vida livre.

Agente infeccioso	Local	Doença em humanos	Patogenicidade em outras espécies	Referências
Bactérias				
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	Índia	sim	Galinhas, perus	(FAROOQ et al., 2009)
<i>Escherichia. coli</i> diarreio gênicas	Itália, Suíça	sim	Cavalos, suínos, aves	(MORABITO et al., 2001); (HAAG-WACKERNAGEL; MOCH, 2004)
<i>Salmonela</i> Typhimurium	Itália	sim	Aves	(GARGIULO et al., 2014)
<i>Campylobacter</i> spp.	Itália	sim	Aves	(GARGIULO et al., 2014)
<i>Coxiella burnetii</i> (<i>Q fever</i>)	Austrália	sim	Bovinos, ovinos	(REED et al., 2009)
<i>Listeria monocytogenes</i>	Egito	sim	Bovinos, ovinos	(ABD EL-AZIZ; ELMOSSALAMI; EL-NEKLAWY, 2002)
Vírus				
<i>Avian paramyxovirus serotype -1</i> (APMV-1)	Polônia	não	Aves	(PESTKA et al., 2014, ESPERÓN et al., 2014)
Pigeon herpesvirus (PiHV)	Alemanha	não	Aves	(FREICK et al., 2008)
Pigeon circovirus (PiCV)	Alemanha, Bélgica	não	Aves	(FREICK et al., 2008, MARLIER et al., 2006)
Coronavírus (vírus da bronquite infecciosa das galinhas - VBI)	Brasil	não	Aves	(LILLEHAUG et al., 2005; MONTASSIER et al., 2013)
Adenovírus dos perus (FAdV)	Bélgica, Brasil	não	Aves	(MARLIER et al., 2006, CATROXO et al., 2011)
Fungos				
<i>Cryptococcus neoformans</i>	Brasil	sim	Cães, aves	(REOLON et al., 2004)

1.2 Saúde única e emergência de doenças

A interação das espécies exóticas e silvestres com animais de criação e o homem no que diz respeito à emergência e reemergência de patógenos são alvo do campo de estudo denominado Saúde Única (*One Health*) (WASHBURNNE et al., 2018). Embora este tema seja antigo, apenas no ano de 2007, o termo *One Health* foi criado em um seminário global de Salzburg, que tratou e discutiu a saúde humana, animal e ambiental como interdependentes.

Neste contexto, a transmissão de patógenos entre espécies de animais, também chamada de *spillover*, é um desafio global para a saúde pública; esse fenômeno depende da interação entre humanos e/ou diferentes espécies de animais ou vetores infectados no ambiente (PLOWRIGHT et al., 2017). Para que ocorra o *spillover*, um patógeno deve superar uma série de barreiras. No que se refere aos hospedeiros, distribuição e densidade são fatores importantes; no que se refere ao patógeno, há influência da prevalência, intensidade de infecção, sobrevivência e disseminação no ambiente. Ainda, a exposição do novo hospedeiro, sua resposta imunológica e o sucesso de replicação do patógeno no novo organismo são necessários para finalizar o ciclo de transmissão interespecies (Figura 1; PLOWRIGHT et al., 2017).

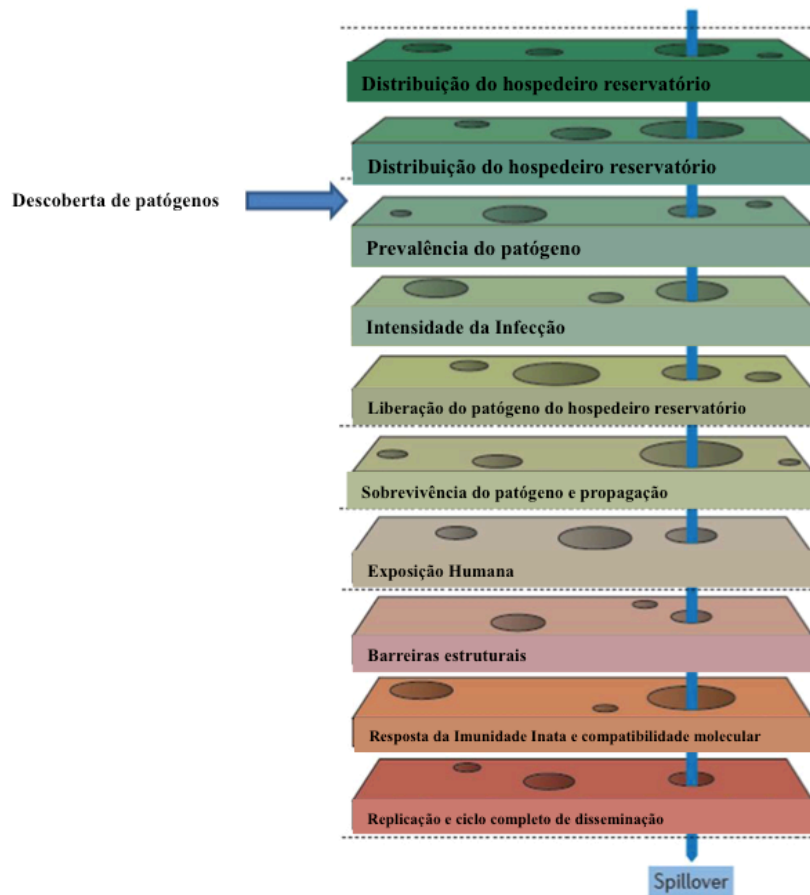


Figura 1. Barreiras para ocorrência de *spillover*. Esquema mostrando os estágios para a emergência de patógenos. A seta horizontal azul mostra a importância de detecção dos patógenos para evitar sua emergência. Fonte: Adaptado de Plowright et al., 2017. Licença para uso da imagem: Springer Nature License 4515410570831.

O conhecimento dos padrões da diversidade de micro-organismos e vírus no ambiente silvestre e os mecanismos da transmissão cruzada entre espécies também são dados importantes para o entendimento de *spillover* (MORSE et al., 2012). Neste sentido, sabe-se que a emergência de patógenos zoonóticos que dominaram as pandemias dos últimos 100 anos foi correlacionada à densidade da população humana e à distribuição global da biodiversidade da vida selvagem (OLIVAL et al., 2017). Com relação aos reservatórios, algumas características compartilhadas entre eles, como maior produção reprodutiva e menor sobrevivência em longo prazo, estão associadas à sua capacidade de servir como hospedeiros e de se envolver na transmissão cruzada (PLOURDE et al., 2017).

Embora a maioria das doenças emergentes resulte de um processo de transmissão de patógenos entre espécies – *spillover*, existem casos de vírus que parecerem co-divergir com seus hospedeiros ao longo de períodos de tempo evolutivo

(GEOGHEGAN; DUCHÊNE; HOLMES, 2017). Este é o caso dos herpesvírus em vertebrados, para os quais foi sugerido que a co-divergência ao longo de 400 milhões de anos tenha exercido um papel fundamental para sua evolução (MCGEOCH & GATHERER, 2005). Desta forma, a identificação das frequências relativas entre o surgimento de vírus patogênicos por co-divergência ou por transmissão entre espécies é importante para entender os mecanismos virais de evolução e surgimento de doenças (GEOGHEGAN; DUCHÊNE; HOLMES, 2017).

Ao longo dos anos, diversos patógenos emergentes impactaram tanto a saúde humana como animal; estima-se que mais de 60% deles tenham se originado da fauna silvestre (MACKENZIE; JEGGO, 2013; PHAN et al., 2013). Fatores como a expansão da população humana, intensificação da agricultura e interferência nos habitats de animais por desmatamento e mudança climática contribuíram para esse cenário (JONES et al., 2008). Patógenos emergentes causaram doenças com altas taxas de mortalidade, tais como Influenza, que ocorre em muitas espécies e teve origem em aves migratórias (BEAN et al., 2013). Outros vírus como Hendra, Nipah e coronavírus, que causa a Síndrome Respiratória Aguda e Severa (SARS), também tiveram origem em animais silvestres – morcegos (BEAN et al., 2013). Ainda, vírus como Ebola, HIV, Influenza H5N1 e Vírus do Nilo Ocidental também têm origens em animais silvestres e ajudaram a sedimentar esse conceito de saúde interespecies (MOKILI; ROHWER; DUTILH, 2012).

Uma das limitações no controle de doenças virais que ocorrem por *spillover* é a necessidade de gerenciar os casos na população alvo, e também as interfaces de transmissão de potenciais reservatórios (OLIVAL et al., 2017; PLOURDE et al., 2017). Para isso, o conhecimento da diversidade de espécies virais na natureza e seus hospedeiros, bem como a compreensão de quais vírus são mais propensos à transmissão cruzada é fundamental para melhorar os esforços de vigilância e projetar intervenções de saúde pública (WASHBURNE et al., 2018).

1.3 Abordagem metagenômica para caracterização de microbiomas

As técnicas clássicas de identificação de micro-organismos são baseadas no isolamento do agente, microscopia eletrônica e métodos imunológicos (DUTILH et al., 2017; TEMMAM et al., 2015). No entanto, embora o isolamento seja considerado padrão-ouro, ele possui uma limitação importante, já que 99,9% dos vírus não são cultiváveis (EDWARDS R.A. & ROHWER F., 2005; TEMMAM et al., 2014)

Em 1953, através da pesquisa de James Watson e Francis Crick, onde descreveram a dupla fita do DNA, foi desencadeada “a era da difusão da biologia molecular” (Watson & Crick, 1953). Saiki et al. (1985) introduziram a reação em cadeia da polimerase (PCR), que rendeu o Prêmio Nobel de Química em 1993 a Kary Mullis, coordenador do grupo. Esta técnica viabilizou a identificação de agentes infecciosos independente de métodos de cultivo e isolamento, através da detecção de segmentos de seus genomas (SAIKI et al., 1988). Embora a PCR e outras técnicas moleculares como sequenciamento de Sanger e micro arranjos tenham permitido a identificação de novos vírus (BEXFIELD; KELLAM, 2011; SANGER et al., 1978); o conhecimento prévio do genoma ou de genes de vírus similares era requerido. Para superar essa questão, técnicas de PCR independentes de sequência, como PCR com oligonucleotídeos degenerados (DOP-PCR) e amplificação por círculo rolante (RCA) com oligonucleotídeos randômicos (BEXFIELD; KELLAM, 2011) foram desenvolvidas; No entanto, o resultado final da maioria desses métodos requer a identificação por sequenciamento de Sanger; este sequenciamento gera pouca quantidade de informação por reação (no máximo 1000 pb sequenciados) e o custo por base sequenciada é relativamente alto, quando comparado ao sequenciamento de alto desempenho (*HTS*), onde gera um número alto de informações em relação ao custo.

Para superar estas limitações, novas técnicas de sequenciamento, denominadas sequenciamento de alto desempenho (*HTS*, do inglês *high throughput sequencing*), foram desenvolvidas (ESCOBAR-ZEPEDA et al., 2010). Essa metodologia, possibilita sequenciar os genomas de vírus presentes em uma amostra sem conhecimento prévio de suas sequências. O termo “metagenômica” foi cunhado com o significado de análise do conjunto dos genomas presentes em uma amostra, tanto do ponto de vista das sequências quanto das funções (RIESENFELD et al., 2004). Assim, a metagenômica tem sido utilizada na investigação de microbiomas, possibilitando a descoberta de novos agentes virais e bacterianos em amostras de seres humanos, animais e do ambiente (MOUSTAFA et al., 2017; WEBER et al., 2018; XIE et al., 2013); dessa forma, essa ferramenta pode contribuir no entendimento da dinâmica do surgimento de infecções interespecies (Figura 1).

1.3.1 Metagenômica viral

O termo “metagenômica viral” é utilizado para estudos que buscam identificar os genomas de vírus existentes em amostras biológicas (LIMA et al., 2017; SMITS et al., 2015) ou ambientais (ROSARIO et al., 2009; ROSARIO et al., 2012). Essa

ferramenta também pode ser utilizada para a identificação de vírus associados a uma doença específica ou, em casos mais particulares, para contribuir na identificação de vírus isolados em laboratório (SMITS et al., 2015).

Os estudos de metagenômica viral mostraram que a maioria dos vírus nas comunidades ambientais não é cultivável (ROSARIO; DUFFY; BREITBART, 2012); além disso, forneceram dados sobre a ecologia viral ao elucidar o potencial genético, estrutura da comunidade e biogeografia de vírus ambientais (SMITS et al., 2015; ROSARIO & BREITBART, 2011). Ainda, a metagenômica viral expandiu o conhecimento das interações vírus-hospedeiro, através da descoberta de genes virais similares a genes metabólicos celulares que desempenham funções relacionadas à motilidade e quimiotaxia, antioxidação, repressão transcricional, tradução e modificações pós-traducionais, sugerindo que os vírus manipulam seus hospedeiros de forma imprevista (DINSDALE et al., 2008; ROSARIO; DUFFY; BREITBART, 2012). Em um primeiro momento, houve a suspeita de que esses genes pudessem ser resultado de contaminação (ROSARIO; DUFFY; BREITBART, 2012); No entanto, na metagenômica viral as partículas virais purificadas para posterior sequenciamento; ainda, esses genes foram posteriormente isolados em vírus cultivados (BREITBART et al., 2002). A metagenômica viral pode ainda ajudar na descoberta de novos vírus; na identificação de genes obtidos por transferência horizontal; pode auxiliar na projeção de estratégias de vigilância de vírus patogênicos emergentes; e na descoberta de enzimas virais com valor comercial e/ou biomédico (Figura 2; DAY et al., 2015; ROSARIO et al., 2011). Desta forma, a metagenômica viral é uma ferramenta interessante para vigilância de vírus em aves silvestres, tais como os pombos.

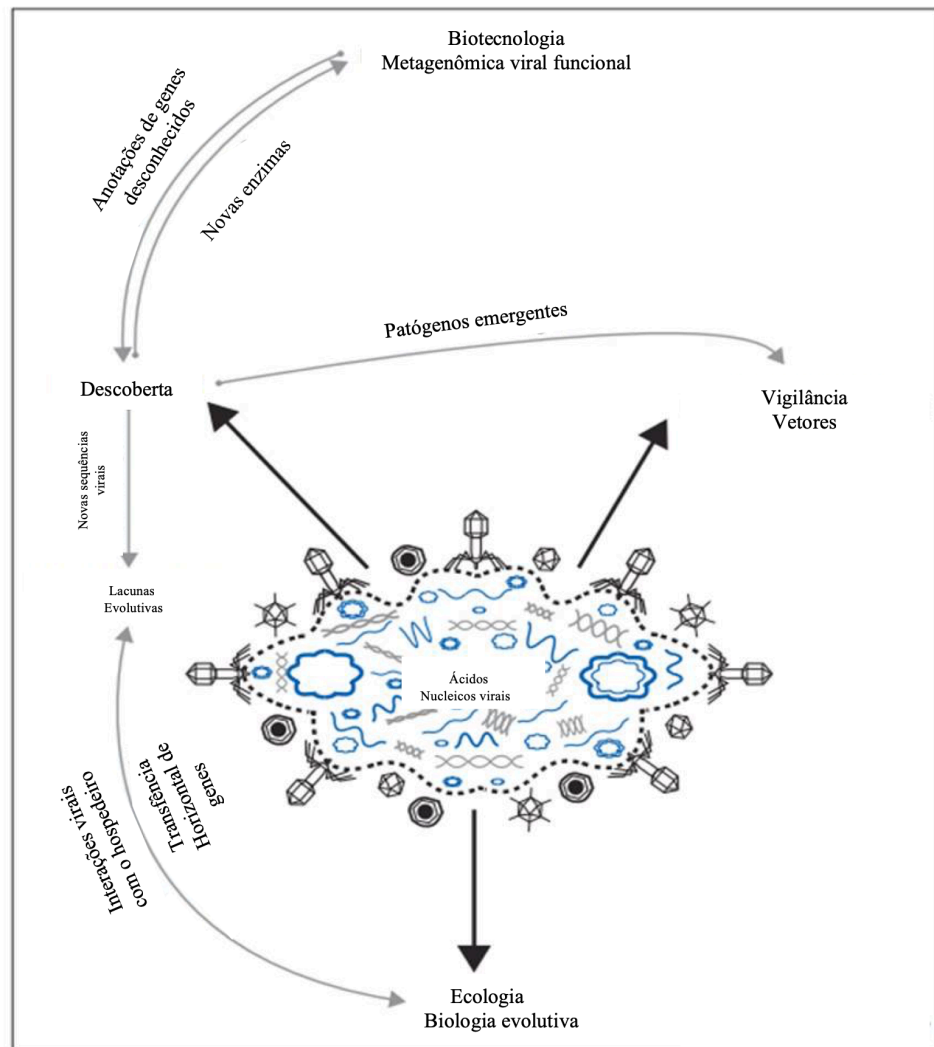


Figura 2: Esquema apresentando as aplicações da metagenômica viral. Fonte: Adaptado de Rosario & Breitbart, 2011. Licença para uso da imagem: 4515410570831.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Contribuir para o entendimento sobre os vírus circulantes em pombos de vida livre (*Columba livia*).

2.2 Objetivos específicos

Caracterizar o viroma sérico de pombos de vida livre na da região Sul do Brasil;

Caracterizar os genomas virais completos obtidos.

3. ARTIGOS CIENTÍFICOS

3.1 Columbidae circovirus detected in free ranging pigeons from Southern Brazil: insights on PiCV evolution

Loiko, M.R.^{1,2}, Junqueira, D.M.³, Varela, A.P.M.^{1,2}, Tochetto, C.^{1,2}, Scheffer, C.M.^{1,2}, Cerva, C.^{1,2}, Morel, A.P.⁴, Paim, W.P.^{1,2}, Lima, D.A.^{1,2}, Trainini, L.G.⁴, Mayer, F.Q.², Roehle, P.M.¹

¹Laboratório de Virologia, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, Av. Sarmiento Leite 500, sala 208, Porto Alegre, CEP 90050-170, Rio Grande do Sul (RS), Brazil.

² Laboratório de Biologia Molecular, Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF), Secretaria Estadual de Agricultura, Pecuária e Irrigação, (RS), Brazil.

³Centro Universitário Ritter dos Reis - UniRitter. Porto Alegre (RS), Brazil.

⁴Falcoaria e Consultoria Ambiental – HAYABUSA. São Francisco de Paula (RS), Brazil.

Address correspondence to Paulo Michel Roehle, proehle@gmail.com.



Columbid circoviruses detected in free ranging pigeons from Southern Brazil: insights on PiCV

M. R. Loiko^{1,2} · D. M. Junqueira³ · A. P. M. Varela^{1,2} · C. Tochetto^{1,2} · C. M. Scheffer¹ · D. A. Lima^{1,2} · A. P. Morel⁴ · C. Cerva^{1,2} · W. P. Paim^{1,2} · Fabiana Quoos Mayer² · P. M. Roehe¹

Received: 23 January 2018 / Accepted: 12 June 2018
© Springer-Verlag GmbH Austria, part of Springer Nature 2018

Abstract

Pigeon circovirus (PiCV) is taxonomically classified as a member of the *Circovirus* genus, family *Circoviridae*. The virus contains a single stranded DNA genome of approximately 2 kb, with minor length variations among different isolates. The occurrence of PiCV infections in pigeons (*Columba livia*) has been documented worldwide over the past 20 years; however, in Brazil there were still no reports on PiCV detection. This study identifies seven PiCV genomes recovered from domestic pigeons of South Brazil through high-throughput sequencing and shows a high frequency of PiCV infection, through quantitative real-time PCR. Phylogenetic classification was performed by maximum likelihood analysis of the full genomes, ORF V1 (*Rep*) and ORF C1 (*Cap*). The results show that either full genome or *Cap* based analysis allowed PiCV classification into five major clades (groups A to E), where Brazilian sequences were classified as A, C or D. Recombination analyses were carried out with Simplot and RDP4 and the results show that both *Rep* and *Cap* ORFs contain several recombination hotspots, pointing to an important role for such events in PiCV evolution.

Introduction

Taxonomically, pigeon circovirus (PiCV) is a member of *Circoviridae* family, genus *Circovirus* [1]. The virus has not been isolated in cell cultures *in vitro*; therefore, all research performed on PiCV to date has focused on genomic analyses. The PiCV virion is a non-enveloped, icosahedral particle with a single-stranded circular DNA (ssDNA) genome of approximately 2 kb [2–4]. The genome is ambisense with two major open reading frames (ORFs): V1, which encodes the replication associated protein (*Rep*), and C1, which encodes the only structural protein of the capsid (*Cap*) [1, 5, 6]. A canonical nonanucleotide motif (NANTATTAC) at the apex of a stem-loop located between the 5'-ends of the two main ORFs is also present and is believed to be required for initiation of the replication of the viral genome [4, 6, 7]. The full PiCV genomes so far reported present minor length variations among different isolates [5].

Although widely distributed in healthy pigeons, PiCV has been associated with immune suppression and to a syndrome known as “young pigeon disease syndrome” (YPDS), a complex and variable condition, mostly affecting young domestic pigeon populations worldwide [4, 6, 8]. This syndrome is characterized by clinical signs such as lethargy, poor race performance, weight loss, respiratory disease and diarrhea

Handling Editor: Sheela Ramamoorthy.

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00705-018-3990-8>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Fabiana Quoos Mayer
bimmayer@gmail.com

¹ Laboratório de Virologia, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, Av. Sarmiento Leite 500, sala 208, Porto Alegre, Rio Grande do Sul CEP 90050-170, Brazil

² Laboratório de Biologia Molecular, Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF), Secretaria Estadual de Agricultura, Pecuária e Irrigação, Estrada Municipal do Conde, 6000, Eldorado do Sul, Rio Grande do Sul CEP 92990-000, Brazil

³ Centro Universitário Ritter dos Reis-UniRitter, Laureate International Universities, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

⁴ Falcoaria e Consultoria Ambiental-HAYABUSA, São Francisco de Paula, RS, Brazil

Published online: 13 August 2018

Springer

[9]. It is believed that intentional or unintentional carryover of pigeons, as well as international trade, may have facilitated worldwide spread of PiCV [10]. In Brazil, to date, there are no reports on PiCV infections or YPDS in pigeons. However, from the data gathered here, it can be assumed that PiCV infections are fairly evenly distributed throughout the country. In this study, seven complete genome sequences of PiCV were recovered from pigeons collected in different cities from Southern Brazil; moreover, a quantitative real-time PCR (qPCR) was developed to evaluate the frequency and viral load of PiCV in pigeons' sera. Phylogenetic and recombination analyses were performed in an attempt to evaluate some aspects of PiCV's evolutionary history.

Materials and methods

Ethics statement

The Brazilian Institute for the Environment and Renewable Natural Resources (IBAMA) granted permission for the capture of pigeons (*Columba livia*) according to Official Letter 02023.000660/2014-61 RS/CETAS/IBAMA. The permission for work with free-living pigeons was granted by the Ethics Committee on the use of animals (CEUA) of the Veterinary Research Institute Desidério Finamor - FEPAGRO /RS, under registry nº 29/2014 and by SISBIO (Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade), under registry number 47313-2.

Sample collection and preparation

Serum samples were collected from apparently healthy pigeons from the states of Paraná (PR; n = 10), Santa Catarina (SC; n = 23) and Rio Grande do Sul (RS; n = 86), between September 2014 and November 2015 (Fig. S1). Serum samples (200 µL each) were collected from pigeons and pooled according to city of origin, thus constituting seven pools (one from PR, one from SC and five from RS). The pools were filtered through 0.22 µm syringe filters. For virus purification and concentration, samples were centrifuged at 160,000 x g for 3 h at 4 °C on 25% sucrose cushions. The pellets obtained were resuspended in 200 µL TE (10 mM Tris pH 7.4; 1 mM EDTA pH 8.0) and stored at -80 °C until further processing.

Viral DNA extraction

Prior to viral nucleic acid extraction, the resuspended pellets were treated with 5 µL of Turbo DNaseI (Life Technologies/Ambion) and 5 µL of RNaseI (Thermo Scientific/Fermentas) for 2 h at 37 °C to remove non-encapsidated nucleic acids [11] and the reactions stopped according to

the manufacturers' protocols. Encapsidated nucleic acids were subsequently extracted with MagMAX Pathogen DNA/RNA purification kit (Life Technologies, Inc.) following the manufacturer's instructions.

Nucleic acid enrichment, purification and quantification

Viral DNA was enriched by multiple displacement amplification (MDA) using φ29 DNA polymerase [12, 13]. The reaction was carried out for 18 h at 30 °C followed by a final step of 10 min at 65 °C. The amplicons were examined by electrophoresis on 1% (w/v) agarose gels stained with ethidium bromide and purified with Agencourt® AMPure® XP (Beckman Coulter/Life Sciences). The purity and yield of DNA was estimated by spectrophotometry (L-Quant; Loccus Biotechnology) and fluorometry (Qubit 2.0; Invitrogen). The DNA concentration was adjusted to 2.5 ng/µL.

Genomic library construction and nucleotide sequencing

The genomic libraries were prepared using the Nextera® DNA Sample Preparation Kit (Illumina®) according to the manufacturer's instructions. Libraries' sequencing was performed with the Miseq v2 Reagent Kit 500 Cycles, which generates paired-end reads of 250 bp, in the MiSeq™ platform (Illumina®).

Sequence analyses

The obtained raw reads were submitted to FastQC analysis and trimmed with Trimmomatic program using as a quality parameter a Phred score of at least 30. Recovered sequences were assembled with aid of the SPAdes Genome Assembler 3.6.0. Viral sequences were searched and compared to sequences available in GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) nucleotide and protein databases using BLASTn/BLASTx with Blast2GO software. Subsequently, the contigs classified as PiCV were again submitted to BLAST individually using the online available tool (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). The Geneious v. 8.1.4 software was used for genome annotations.

PiCV phylogenetic analyses and genome sequence diversity

The seven full sequences recovered in this study were aligned with 103 complete PiCV genome sequences available at GenBank. Two additional datasets were constructed: (a), representative of ORF V1 (corresponding to nucleotides 1-948 on the *Rep* gene, and (b), representing ORF C1, (corresponding to nucleotides 1120-1944 on the *Cap* gene). All

alignments were generated with the program MUSCLE [14]. All datasets had their phylogenetic signal tested in TreePuzzle [15].

Maximum Likelihood (ML) phylogenies were inferred in PhyML [16] incorporating the best-fitted nucleotide substitution model (GTR+4 Γ +I) as determined in SMS [17]. Additionally, amino acid trees were inferred for *Rep* and *Cap* using the JTT model. The approximate likelihood-ratio test (aLRT) based on the Shimodaira-Hasegawa-like procedure was used to assess the degree of confidence in topology of all trees [18]. Phylogenetic reconstructions were assessed using FigTree v1.4.3 [19] and were plotted using ggtree on R package [20]. In addition, similarity analyses were performed with all genomes using the SDT v1.2 software [21].

Recombination breakpoints on PiCV genomes were identified using seven different detection methods available within the program RDP4 (RDP, GENECONV, Bootscan, MaxChi, Chimaera, SiScan, and 3Seq). Such events were only considered when evidence was confirmed by three or more different detection methods. In addition, in order to characterize patterns of recombination between different groups, all of the 110 complete PiCV genome sequences (7 from the present study plus 103 from Genbank) were submitted to bootscan analysis using Simplot 3.5.1 [22]. The Kimura 2-parameter model was used in a distance model with a sliding window of 200 nt increased by increments of 20 nt.

GenBank accession numbers

The seven complete genome sequences generated in this study were deposited in GenBank under accession numbers KX808543, KY114965, MF621931, MF664481, MF664482, MF664483 and MF664484.

Quantitative real-time PCR for PiCV

To evaluate the frequency of PiCV in pigeons' sera, a qPCR specific to the *Rep* region was developed with the primers - forward: PiCV 5' TTTGTGGAGTTCAACGTCTCG 3' and reverse: PiCV 5'GCACTTCTCCTGGCTGTACC 3' targeting an amplicon size of 78 bp. The qPCR analytical sensitivity was evaluated through cloning the amplicon by TOPO TA Cloning (Invitrogen, USA) and transformation in competent *Escherichia coli*. The plasmid DNA was extracted using standard methods [23], quantified using L-quant spectrophotometer (Loccus, Brazil) and used to construct a standard curve with quantities of PiCV DNA molecules ranging from 5×10^8 - 1×10^1 DNA molecules/ μ L. The reactions were performed in a 12.5 μ L volume, with mixtures containing 30 ng DNA, 6.75 μ L of 2X SYBR[®] Select Master mix (Applied Biosystems by Life Technologies) and 0.2 μ M of each forward and reverse primers. The assay was performed using a Rotor-Gene Q (Qiagen) under the following conditions: PCR activation at 95 °C for 2 min followed by 40 cycles of 95 °C for 15 s and 60 °C for 30 s. A melt curve analysis was performed with a raise in temperature from 50 °C to 95 °C with a gradual increase of 0.3 °C/read. A total of 185 samples were tested in duplicate against a standard curve with known PiCV molecule numbers. Positive and negative controls were included in all reactions.

Statistical analysis

To evaluate if the PiCV viral load was the same among the different sampled cities, a Kruskal Wallis was used, since the data had no normal distribution (data not shown). Statistical differences were considered significant if $p < 0.05$; the analysis was performed in SPSS software v.22.0.

Table 1 Characterization of the seven PiCV genomes described in the present study

Accession number	Sampling year	City/State	Genome size (bp)	Group classification	Number of reads	Genome coverage	Cap start codon	Nonnucleotide
MF664481	2016	Porto Alegre/RS	2038	A	414,800	12,640	ATA	TAGTATTAC
MF664484	2016	Rio Grande/RS	2038	A	207,926	6,609	ATA	TAGTATTAC
KX808543	2015	Cambará/PR	2041	C	325,182	4,136	ATG	TAGTATTAC
KY114965	2015	Cachoeirinha/RS	2041	C	141,842	141,842	ATG	TAGTATTAC
MF621931	2016	Gravatá/RS	2038	C	619,980	21,435	ATG	TAGTATTAC
MF664483	2016	Criciúma/SC	2041	C	836,562	32,430	ATG	TAGTATTAC
MF664482	2016	São Leopoldo/RS	2040	D	1,243,426	28,825	ATG	TAGTATTAC

Fig. 1 Two-dimensional genome-wide pairwise identity plot of 110 complete PiCV genomes calculated using SDT v1.2. A) Identity matrix of 110 available complete PiCV genomes. B) Nucleotide identity matrix of the seven complete PiCV genomes identified here

Results

PiCV genome characterization

The genomes obtained in this study are complete circularized contigs that were generated with high coverage by high throughput sequencing. In addition to these, there were other incomplete PiCV contigs in each pool, which were not further analyzed here (Table S1). The reading coverage for each of the seven full genomes is shown in Table 1. The PiCV genomes are 2038 to 2041 nucleotides in length, with two large open reading frames (ORFs) in opposite orientations: ORF V1, encoding the replication-associated protein (*Rep*) with 316 amino acids (nt 1 - 948); and ORF C1, encoding the capsid protein (*Cap*) with 275 amino acids (nt 1119 - 1940). Two of the PiCV sequences (MF664481 and MF664484) presented an ATA as the start codon in ORF C1 while the other five have an ATG as the start codon (Table 1). The canonical nonanucleotide motif at the apex of a stem-loop was identified between the two ORFs in all genomes (Table 1).

Phylogenetic classification

The seven Brazilian PiCV genomes displayed between 89% to 100% identity among themselves, and >84% identity with the 103 full PiCV genomes available in Genbank (Fig. 1A and 1B). For phylogenetic analyses, either the complete genome or *Cap* or *Rep* nucleotide sequences were used, as well as translated datasets of *Cap* and *Rep* (Figs. 2 and 3). All datasets presented consistent phylogenetic signals (Fig. S2) and were submitted for phylogenetic inference. The full genome dataset and *Cap* sequences allowed the subdivision of PiCV genomes into five major clades (groups A to E; Figs. 2A, 3A, and 3C), consistent with previous findings [5, 6, 24]. The seven genomes reported in the present study clustered within three such groups, following both full genome and *Cap* analyses (at nucleotide and amino acid levels): A (MF664481 and MF664484), C (KX808543, KY114965, MF621931, and MF664483), and D (MF664482) (Figs. 2A, 3A, and 3C). Phylogenetic trees reconstructed using the *Rep* sequences displayed a different topology and did not recover the previously described phylogenetic groups (Fig. 3B and 3D).

Recombination analysis

Analyses performed with RDP4 indicated the occurrence of 40 recombination events in the PiCV genome, totaling 80 different breakpoints: 31 in the *Rep* region, 7 in the intergenic region and 42 in the *Cap* region (Table S2). To better understand the extent of recombination in the PiCV genomes, bootscan analyses (Figs. 2B and S3) were conducted with aid of the Simplot software. For this purpose, 24 sequences (9 for A, 2 for group B, 7 for group C, 4 for group D, and 2 for group E) were chosen as references for each genetic group, based on the full genome phylogenetic analysis described above (Table S3). The results reveal that all of the 110 complete genome sequences examined here display multiple putative signs of recombination within the *Rep* region. Twenty-five of these sequences (22.7%) presented additional, clear signs of recombination in the *Cap* region (Table S4). In addition, 47 (42.7%) sequences exhibited low phylogenetic signals in the *Cap* region (Table S4), which do not necessarily confirm the occurrence of recombination events, since these might result from intra-group genetic variability (Table S4). This group included six of the seven genomes described in this study (MF664481, MF664484, KX808543, KY114965, MF621931, and MF664483). Finally, only 38 sequences seemed not to present any evidence of recombination in the *Cap* region (including sample MF664482, recovered in this study).

PiCV infection frequency

The analytical sensitivity of the qPCR developed here was 50 PiCV molecules/reaction, in a linear scale with an efficiency of 1.02. There was ability to detect lower number of molecules, however this was in a non quantifiable manner (data not shown). The frequency of PiCV infections in pigeons' sera from Brazil, as determined by qPCR, was 93.5% (173/185). The viral load was evaluated in 115 of these samples, ranging from 8×10^3 to 1.5×10^{13} DNA molecules/mL serum. There was no significant difference regarding the viral loads and the origin of the samples ($p = 0.068$) (Fig. S4).

Discussion

Pigeons are native to Europe, North Africa, the Middle East, and Asia, where they were domesticated and subsequently spread to different regions of the world. In Brazil, it is believed that Europeans introduced pigeons in the XVI century. In view of the species' remarkable capacity to adapt to sinantropic/urban areas, pigeons became widespread in Brazilian cities, though they are still considered an exotic species [25, 26]. One of the components of the pigeon's

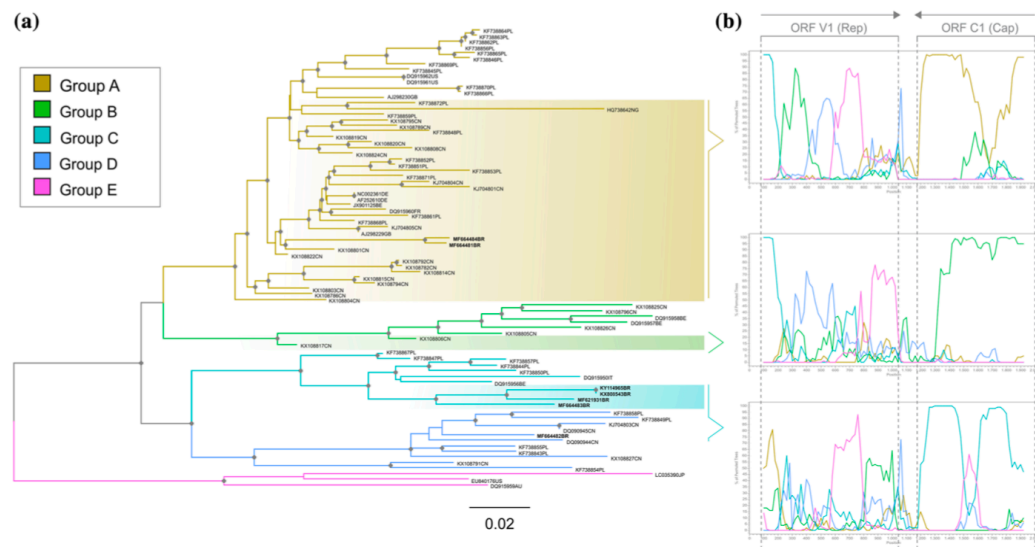


Fig. 2 Phylogenetic analysis of PiCV sequences. A) Maximum likelihood phylogenetic tree of eighty-two complete pigeon circovirus genomes (sequences from this study are in bold). Highlighted branches group sequences presenting a drop in the recombination signal for *Cap*; B) Bootscanning plots of three PiCV sequences showing the complex recombination pattern for *Rep* (all samples presented recombined *Rep* sequences according to Simplot analysis). In addition,

the Simplot results only show a representative pattern of the dropping recombination signal for *Cap* sequences. Samples presenting a clear signal of recombination for *Cap* and *Rep* were excluded from the phylogenetic analysis. Branches are colored according to the group classification of each sequence. Gray circles at the nodes mark aLRT support values >70. The branch lengths are drawn to scale with the bar at the bottom indicating nucleotide substitutions per site

microbiome, PiCV, has been reported in different parts of the world in birds of all ages, over the past 20 years [5, 27, 28]. In Brazil, to date, no studies on PiCV had been reported. In the present study, seven full PiCV genome sequences recovered from apparently healthy pigeons from urban regions of Southern Brazilian cities are reported (Fig.S1). The genomes display between 84% to 100% nucleotide identity with previously reported PiCV sequences [24]; in addition, other contigs which contained incomplete genomes were recovered, indicating the likely occurrence of additional, different PiCV strains in the sampled birds. The frequency of PiCV occurrence in individual samples was also high, with viral loads that varied from thousands to trillions of genome molecules per mL. No association could be drawn between viral loads and the place of origin of the birds, suggesting that the virus is widely distributed in the population of pigeons throughout the country.

Maximum likelihood phylogenies, either with the full genome sequences or with the *Cap* coding region only (nucleotide and amino acid phylogenetic reconstructions) were in accordance with the previously proposed subdivision of PiCV into five genetic groups (A to E) [5, 6]. Interestingly, the two sequences recovered here that classified in group A had an ATA as the start codon for *Cap*, which seems to be an

alternative codon, as previously suggested [29]. Recently, a sixth genetic group (F) comprising three genomic sequences was proposed [29]; however, in the present study, despite the analysis being performed with those same sequences for comparison, phylogenetic reconstructions could not identify a sixth PiCV group. In fact, the Simplot analysis performed here revealed that one of the three sequences putatively classified as group F displayed signs of multiple recombination events in both *Rep* and *Cap* ORFs (Table S4), whereas the other two most likely belong to group D. This finding may introduce potential bias on the construction of phylogenetic trees and highlight the importance of recombination analyses when examining PiCV genome phylogeny.

The Brazilian PiCV genomes grouped together in monophyletic clades within their respective groups (groups A and C), when examining either full genomes or just the *Cap* region, indicating a high degree of phylogenetic relatedness among them. Phylogenetic analyses of the *Rep* region could not recover the same genetic groups generated by comparing full genomes or *Cap* regions, indicating that *Rep* is not as suitable for phylogenetic taxonomy (with at the amino acid or nucleotide levels). Nevertheless, six out of the seven genomes recovered in this study grouped within the same clade in the *Rep*-based tree, providing evidence of the high

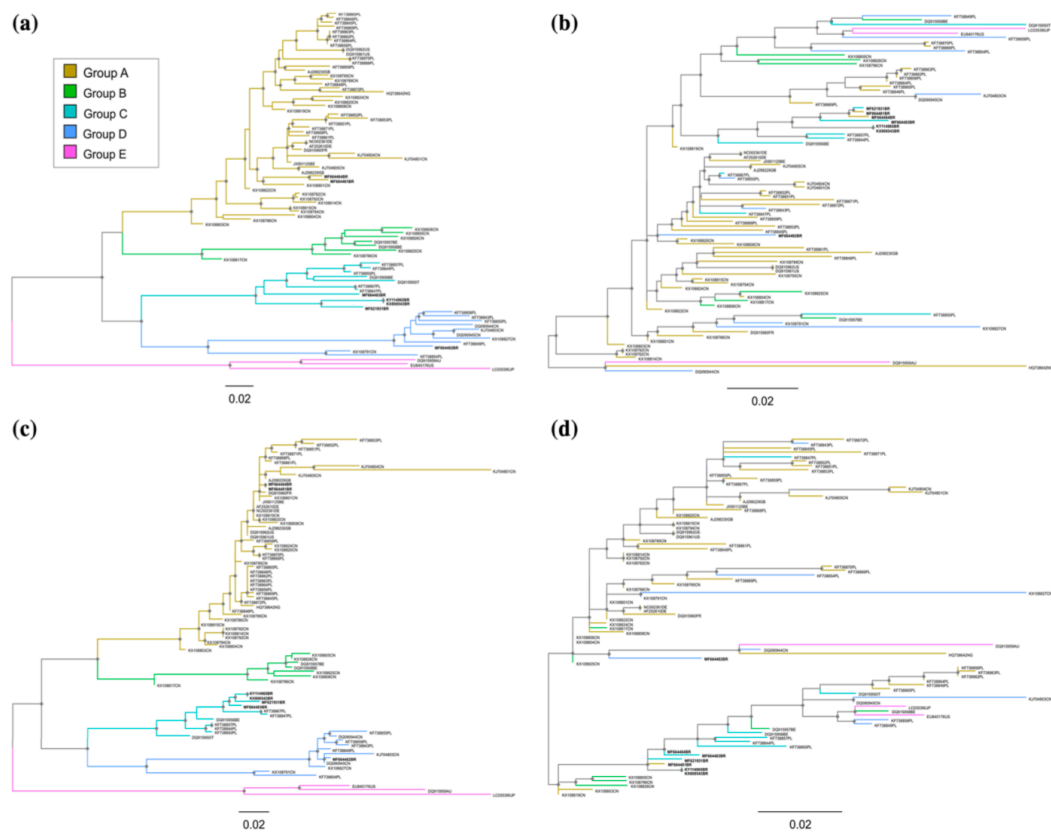


Fig. 3 Maximum likelihood phylogenetic tree of 82 samples (only non-recombinant sequences were used for reconstruction of the phylogenies) from PiCV *Cap* and *Rep* (sequences from this study are bolded). A) Mid-point rooted nucleotide tree of *Cap* sequences (835 bp). B) *Rep* nucleotide sequences phylogenetic tree (959 bp). C) *Cap*

amino acid tree (272 residues), and D) *Rep* amino acid tree (318 residues). Branches are colored according to the group classification of each sequence. Gray circles at the nodes mark aLRT support values >70. Branch lengths are drawn to scale with the bar at the bottom indicating nucleotide/amino acid substitutions per site

degree of phylogenetic relatedness between those isolates (Fig. 3B and 3D).

Regarding recombination analyses, the present study detected several recombination events within PiCV genomes in 110 full genome sequences (Table S4). These findings support the observation that recombination seems to play a significant role in PiCV evolution [3, 10, 24, 30, 31]. The *Rep* gene, despite encoding a protein essential to viral replication, exhibited 31 recombination breakpoints, with all 110 sequences exhibiting signs of recombination events within *Rep*. A possible explanation for this observation is that the mixing of segments of genomes from different, yet stable genotypes, may provide grounds for some degree of genetic variability while preserving the activity of the enzyme. Moreover, a bottleneck effect may also explain such findings, as *Rep* is essential for virus replication. Regarding *Cap*, 40 hotspots were found, highlighting that recombination can

take place to ensure genetic variability in the viral capsid, providing additional opportunities to escape from the host's immune response [32]. As the *Cap* region presented higher genetic variability, it is also plausible to hypothesize that evolutionary events other than recombination could be shaping this region.

In conclusion, the present study described seven new PiCV genomes, recovered from apparently healthy Brazilian pigeons. The viruses' genomic variability was similar to those of previously described PiCV genomes, suggesting no additional selective pressure that could significantly change the overall viral genome profile after the introduction of pigeons to Brazil. Novel recombination events were detected, emphasizing its importance in shaping PiCV evolution. Moreover, we described wide PiCV distribution in evaluated Brazilian pigeons. The role of PiCV in YPDS still needs further investigation, but recombination events may

be relevant for the emergence of pathogenic strains, which could be the object for future studies.

Acknowledgements The authors are grateful to Mr. Luis Gustavo Trainini, who kindly gave access to the samples. This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP, contract 01.10.0783.00). P.M.R. has a CNPq 1A research fellow. This work was carried out as part of the doctoral studies of M.R.L. (Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, UFRGS).

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare no conflict of interest.

References

- Mankertz A, Hattermann K, Ehlers B, Soike D (2000) Cloning and sequencing of columbid circovirus (CoCV), a new circovirus from pigeons. *Arch Virol* 145:2469–2479. <https://doi.org/10.1007/s007050070002>
- Duchatel JP, Todd D, Curry A et al (2005) New data on the transmission of pigeon circovirus. *Vet Rec* 157:413–415. <https://doi.org/10.1136/vr.157.14.413>
- Rosario K, Breitbart M, Harrach B et al (2017) Revisiting the taxonomy of the family Circoviridae: establishment of the genus *Cyclovirus* and removal of the genus *Gyrovirus*. *Arch Virol* 162:1447–1463. <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3247-y>
- Stenzel T, Farkas K, Varsani A (2015) Genome sequence of a diverse goose circovirus recovered from greylag goose. *Genome Announc*. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00767-15>
- Cságola A, Lőrincz M, Tombácz K et al (2012) Genetic diversity of pigeon circovirus in Hungary. *Virus Genes* 44:75–79. <https://doi.org/10.1007/s11262-011-0669-6>
- Yamamoto E, Ito H, Kitamoto E et al (2015) Complete genome sequence of pigeon circovirus detected in racing pigeons in western Japan. *Virus Genes* 51:140–143. <https://doi.org/10.1007/s11262-015-1211-z>
- Delwart E, Li L (2012) Rapidly expanding genetic diversity and host range of the Circoviridae viral family and other Rep encoding small circular ssDNA genomes. *Virus Res* 164:114–121. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.11.021>
- Todd D, Weston JH, Soike D, Smyth JA (2001) Genome sequence determinations and analyses of novel circoviruses from goose and pigeon. *Virology* 286:354–362. <https://doi.org/10.1006/viro.2001.0985>
- Woods LW, Latimer KS, Niagro FD et al (1994) A retrospective study of circovirus infection in pigeons: nine cases (1986–1993). *J Vet Diagn Invest* 6:156–164. <https://doi.org/10.1177/104063879400600205>
- Julian L, Piasecki T, Chrzastek K et al (2013) Extensive recombination detected among beak and feather disease virus isolates from breeding facilities in Poland. *J Gen Virol* 94:1086–1095. <https://doi.org/10.1099/vir.0.050179-0>
- Ng TFF, Willner DL, Lim YW et al (2011) Broad surveys of DNA viral diversity obtained through viral metagenomics of mosquitoes. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020579>
- Dean FB (2001) Rapid amplification of plasmid and phage DNA using Phi29 DNA polymerase and multiply-primed rolling circle amplification. *Genome Res* 11:1095–1099. <https://doi.org/10.1101/gr.180501>
- Lasken RS (2009) Genomic DNA amplification by the multiple displacement amplification (MDA) method: figure 1. *Biochem Soc Trans* 37:450–453. <https://doi.org/10.1042/BST0370450>
- Edgar RC (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* 32:1792–1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>
- Schmidt HA, Petzold E, Vingron M, von Haeseler A (2003) Molecular phylogenetics: parallelized parameter estimation and quartet puzzling. *J Parallel Distrib Comput* 63:719–727. [https://doi.org/10.1016/S0743-7315\(03\)00129-1](https://doi.org/10.1016/S0743-7315(03)00129-1)
- Guindon S, Dufayard J-F, Lefort V et al (2010) New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst Biol* 59:307–321. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syq010>
- Lefort V, Longueville J-E, Gascuel O (2017) SMS: smart model selection in PhyML. *Mol Biol Evol* 34:2422–2424. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx149>
- Anisimova M, Gascuel O (2006) Approximate likelihood-ratio test for branches: a fast, accurate, and powerful alternative. *Syst Biol* 55:539–552. <https://doi.org/10.1080/10635150600755453>
- Rambaut A (2009) FigTree v1.4: tree figure drawing tool [Internet]
- Yu G, Smith DK, Zhu H et al (2017) GGTREE: an R package for visualization and annotation of phylogenetic trees with their covariates and other associated data. *Methods Ecol Evol* 8:28–36. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12628>
- Muhire B, Martin DP, Brown JK et al (2013) A genome-wide pairwise-identity-based proposal for the classification of viruses in the genus *Mastrevirus* (family Geminiviridae). *Arch Virol* 158:1411–1424. <https://doi.org/10.1007/s00705-012-1601-7>
- Lole KS, Bollinger RC, Paranjape RS et al (1999) Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination. *J Virol* 73:152–160
- Sambrook J, Russel DW (2001) *Molecular cloning—a laboratory manual*, 3rd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Stenzel T, Piasecki T, Chrzastek K et al (2014) Pigeon circoviruses display patterns of recombination, genomic secondary structure and selection similar to those of beak and feather disease viruses. *J Gen Virol* 95:1338–1351. <https://doi.org/10.1099/vir.0.063917-0>
- Bencke GA (2007) POMBOS-DOMÉSTICOS Sugestões para o controle em escolas públicas estaduais. http://www.FzbrsGovBr/Upload/20150514114242Pombos_DomesticosPdf.23
- Fontoura PM, Dyer E, Blackburn TM, Orsi ML (2013) Non-native bird species in Brazil Espécies. *Neotrop Biol Conserv* 8:165–175. <https://doi.org/10.4013/nbc.2013.83.07>
- Duchatel JP, Todd D, Smyth JA et al (2006) Observations on detection, excretion and transmission of pigeon circovirus in adult, young and embryonic pigeons. *Avian Pathol* 35:30–34. <https://doi.org/10.1080/03079450500465692>
- Stenzel TA, Pestka D, Tykalowski B et al (2012) Epidemiological investigation of selected pigeon viral infections in Poland. *Vet Rec* 171:562. <https://doi.org/10.1136/vr.100932>
- Wang K-C, Zhuang Q, Qiu Y et al (2017) Genome sequence characterization of pigeon circoviruses in China. *Virus Res* 233:1–7. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.03.007>
- Lefevre P, Lett J-M, Varsani A, Martin DP (2009) Widely conserved recombination patterns among single-stranded DNA viruses. *J Virol* 83:2697–2707. <https://doi.org/10.1128/JVI.02152-08>
- Varsani A, de Villiers GK, Regnard GL et al (2010) A unique isolate of beak and feather disease virus isolated from budgerigars (*Melopsittacus undulatus*) in South Africa. *Arch Virol* 155:435–439. <https://doi.org/10.1007/s00705-010-0589-0>
- Lemey P, Posada D (2009) Introduction to recombination detection. In: Lemey P, Salemi M, Vandamme A-M (eds) *The phylogenetic handbook*, 2nd edn. Cambridge University Press, Cambridge, pp 493–517

Supplementary tables

Table S1. PiCV contigs retrieved in the present study.

Pool	Contig	GenBank accession number	Contig size (bp)	Contig coverage	Blastn		Blastx		
					Maximum Identity (%)	E-value	Gene	Maximum Identity (%)	E-value
Gravataí	1	MF621931	2,038	12,549	97	0.0	Cap	98	3.00E-169
	9	-	1,061	13,441	93	0.0	Rep	99	0.0
	11	-	943	12,974	95	0.0	Cap	95	8.00E-171
	619	-	304	7,503	93	7.00E-122	Cap	99	4.00E-177
	1835	-	238	18,417	96	8.00E-105	Cap	100	4.00E-40
	2356	-	224	8,027	96	2.00E-95	Rep	96	2.00E-51
Porto Alegre	1	MF664481	2,093	24,041	9	0.0	Cap	98	5.00E-35
	2	-	1,743	35,867	96	0.0	Cap	100	2.00E-175
Taquara	3	-	1,344	35,203	88	0.0	Rep	100	0.0
	60	-	408	35,738	95	9.00E-162	Cap	98	2.00E-172
	1	MF664482	2,041	52,605	96	0.0	Rep	99	2.00E-160
São Leopoldo	6	-	1,249	54,108	96	0.0	Cap	92	3.00E-166
	17	-	856	54,121	91	0.0	Rep	100	7.00E-34
	1151	-	276	54,870	97	2.00E-127	Cap	99	2.00E-174
	2	MF664484	2,095	12,532	95	0.0	Rep	99	5.00E-131
Rio Grande	4	MF664483	2,149	39,866	94	0.0	Cap	100	2.00E-176
	21	-	847	39,839	93	0.0	Cap	99	1.00E-165
Criciúma	80	-	494	34,225	95	0.0	Rep	100	3.00E-60
	113	-	440	39,200	95	2.00E-174	Cap	100	2.00E-172
	183	KX808543	2,118	4,660	93	0.0	Rep	100	0.0
Paraná	1	KY114965	2,041	7,197	93	0.0	Cap	100	6.00E-174
	2	-	1,157	7,086	97	0.0	Rep	100	0.0
Cachoeirinha	1	KY114965	2,041	7,197	93	0.0	Cap	100	2.00E-177
	2	-	1,157	7,086	97	0.0	Rep	100	0.0
Cachoeirinha	1	KY114965	2,041	7,197	93	0.0	Cap	100	6.00E-177
	2	-	1,157	7,086	97	0.0	Rep	100	0.0
Cachoeirinha	1	KY114965	2,041	7,197	93	0.0	Cap	100	1.00E-103
	2	-	1,157	7,086	97	0.0	Rep	100	3.00E-86

Table S2. Summary of unique recombination events identified by RDP4 in the PiCV complete genome sequences.

N	Breakpoint Positions		ORF involved in breakpoints			Detection Method (probability)						
	Begin	End	Rep	IR	Cap	RDP	GENECONV	Bootscan	Maxchi	Chimaera	SiSscan	3Seq
1	1166	1907			XX	6.35E+02	1.92E+01	8.33E+06	2.97E+00	3.55E+08	1.12E-13	1.88E-20
2	2000	1130		X	X	3.02E-04	1.92E-03	2.14E-04	3.34E+02	4.45E+01	9.33E-01	8.28E-15
3	1348	1997			XX	2.52E+03	6.86E+01	NS	1.04E+03	NS	1.91E-02	5.65E-14
4	1004	1984		X	X	6.36E+01	2.72E+05	2.61E+07	2.35E+01	NS	4.07E-16	2.52E-10
5	132	1260	X		X	7.54E+03	1.73E+02	7.52E+03	1.67E+04	9.65E+03	1.17E+04	4.74E-09
6	132	1311	X		X	1.19E+08	NS	NS	8.80E+00	2.66E+05	1.61E+11	1.45E-08
7	1114	1981		X	X	3.28E+03	5.02E+04	5.03E+09	8.42E+00	NS	1.65E-15	5.38E-08
8	1136	1982		X	X	2.91E+10	5.26E+11	1.40E+12	7.83E+05	NS	2.67E-07	9.37E-08
9	1256	2000			XX	5.31E+09	8.57E+10	5.80E+10	1.88E+06	NS	1.43E-11	6.47E-04
10	152	830	XX			2.43E+03	1.93E+06	1.24E+07	2.84E+07	5.25E+06	6.87E+05	1.43E-02
11	1256	1874			XX	8.99E+06	4.32E+09	NS	8.11E+04	NS	2.76E+01	8.59E-02
12	627	2000	X		X	7.33E+11	NS	NS	9.55E+05	3.46E+10	6.15E-01	8.82E-02
13	1901	994		X	X	4.95E+00	1.29E+01	3.50E-03	2.24E+04	2.95E+05	1.14E-07	5.49E+06
14	764	1349	X		X	8.02E+02	8.83E+01	1.09E+03	1.56E+05	1.26E+06	3.53E+06	7.45E+03
15	1198	1916			XX	8.57E+10	NS	NS	7.70E+06	NS	5.69E-04	2.07E+02
16	1136	1697		X	X	1.42E+09	2.08E+11	7.82E+10	1.13E+06	3.54E+05	1.26E+05	3.25E+02
17	1716*	1946			XX	2.51E+10	7.94E+10	NS	6.00E+08	2.61E+06	1.65E+06	1.65E+02
18	1306	1403			XX	3.39E+02	1.14E+08	3.14E+07	9.20E+08	6.60E+09	4.91E+10	2.04E+05
19	1456	1770			XX	2.82E+08	2.92E+09	NS	4.30E+06	4.45E+05	1.40E+06	1.74E+03
20	174	1274	X		X	7.09E+08	3.22E+11	1.09E+09	4.20E+07	2.85E+05	4.39E+07	1.27E+02
21	938	1888	X		X	1.28E+12	NS	NS	1.25E+06	NS	3.63E-05	1.57E+04
22	1667	1838			XX	3.49E+04	3.06E+04	NS	9.14E+06	1.81E+09	1.58E+07	2.26E+04

23	968	1836	X	X	NS	NS	NS	2.69E+09	1.99E+12	5.34E+02	6.09E+04
24	520	1970	X	X	NS	NS	NS	1.39E+10	3.96E+11	2.12E-08	7.12E+05
25	74	856	XX		1.67E+09	NS	6.62E+09	2.13E+09	7.34E+06	1.66E+09	8.10E+05
26	156*	2005	X	X	NS	NS	NS	3.12E+08	2.65E+12	3.48E+04	1.96E+06
27	170	1160	X	X	NS	NS	NS	9.52E+06	2.86E-02	4.06E+12	5.78E+11
28	461	937*	XX		2.80E+11	4.59E+11	NS	6.66E+09	5.86E+08	4.08E+07	1.08E+07
29	310	758*	XX		2.85E+11	NS	NS	4.30E+11	1.86E+09	7.13E+08	2.00E+07
30	2002*	184*	X	X	1.12E+11	1.59E+12	NS	3.68E+11	NS	2.33E+03	1.05E+06
31	327	1500	X	X	NS	NS	NS	1.16E+09	4.65E+07	2.43E+04	4.87E+09
32	1932	928	X	X	1.61E+12	NS	6.24E+10	2.02E+08	2.59E+10	1.90E+08	3.66E+10
33	393	950	XX		3.10E+08	1.31E+10	NS	1.64E+11	1.50E+11	1.17E+08	2.05E+10
34	1906	1975*		XX	NS	NS	NS	2.25E+12	3.07E+12	2.02E+04	1.49E-02
35	40*	123	XX		NS	NS	NS	2.18E+09	5.23E+09	8.99E+08	5.48E+06
36	186	954	XX		NS	9.12E+09	9.89E+09	1.80E+12	1.56E+11	3.61E+12	8.17E+10
37	1315	1594		XX	NS	NS	NS	9.32E+10	1.00E+11	3.52E+06	3.98E+09
38	393	763*	XX		8.64E+10	3.05E+12	NS	NS	NS	7.41E+10	3.89E-02
39	198	758*	XX		2.48E+12	NS	NS	1.06E+12	4.50E+11	7.31E-11	3.37E-02
40	1406*	1595		XX	2.39E+11	NS	NS	1.27E+12	6.44E+10	2.63E+12	1.46E+10

IR. intergenic region;

*. The actual breakpoint position is undetermined (it was most likely overprinted by a subsequent recombination event);

NS. no significant P-value was recorded for this recombination event using this method.

Table S3. PiCV non-recombinant complete genomes used as genetic group references for Simplot analysis.

Group	Access Number
A	KF738845
	KF738846
	KF738856
	KF738862
	KF738863
	KF738864
	KF738865
	KF738869
KF738870	
B	DQ915957
	DQ915958
C	DQ915950
	DQ915956
	KF738844
	KF738847
	KF738850
	KF738857
KF738867	
D	DQ090944
	KF738843
	KF738855
	KF738858
E	EU840176
	LC035390

Table S4. GenBank accession numbers, sampling information and phylogenetic genotype information of 110 PiCV full genome sequences.

Access Number	Country	Size (bp)	Sampling Year	Genotype (Genetic Group)		Phylogenetic Group#
				<i>Rep (V1)</i>	<i>Cap (C1)</i>	
AF252610	Germany	2037	2001	Rec	A*	A
AJ298229	United Kingdom	2037	2001	Rec	A*	A
AJ298230	United Kingdom	2036	-	Rec	A	A
DQ915960	France	2037	2007	Rec	A*	A
DQ915961	United States	2037	-	Rec	A	A
DQ915962	United States	2037	-	Rec	A	A
HQ738642	Nigeria	2036	2009	Rec	A*	A
JX901125	Belgium	2037	1998	Rec	A*	A
KF738845	Poland	2037	2011	Rec	A	A
KF738846	Poland	2041	2002	Rec	A	A
KF738848	Poland	2036	2012	Rec	A*	A
KF738851	Poland	2036	2012	Rec	A*	A
KF738852	Poland	2036	2012	Rec	A*	A
KF738853	Poland	2036	2013	Rec	A*	A
KF738856	Poland	2038	2002	Rec	A	A
KF738859	Poland	2037	2011	Rec	A*	A
KF738861	Poland	2037	2011	Rec	A*	A
KF738862	Poland	2038	2002	Rec	A	A
KF738863	Poland	2038	2002	Rec	A	A
KF738864	Poland	2038	2002	Rec	A	A
KF738865	Poland	2041	2002	Rec	A	A
KF738866	Poland	2037	2011	Rec	A	A
KF738868	Poland	2037	2011	Rec	A*	A
KF738869	Poland	2037	2003	Rec	A	A
KF738870	Poland	2037	2011	Rec	A	A
KF738871	Poland	2037	2011	Rec	A*	A

KF738872	Poland	2037	2011	Rec	A*	A
KJ704801	China	2032	2014	Rec	A*	A
KJ704804	China	2035	2014	Rec	A*	A
KJ704805	China	2037	2014	Rec	A*	A
KX108782	China	2037	2014	Rec	A*	A
KX108786	China	2037	2014	Rec	A*	A
KX108789	China	2037	2014	Rec	A*	A
KX108792	China	2037	2014	Rec	A*	A
KX108794	China	2037	2014	Rec	A*	A
KX108795	China	2037	2014	Rec	A*	A
KX108798	China	2031	2014	Rec	A*	A
KX108801	China	2037	2014	Rec	A*	A
KX108803	China	2037	2014	Rec	A*	A
KX108804	China	2037	2014	Rec	A*	A
KX108808	China	2037	2014	Rec	A*	A
KX108814	China	2037	2014	Rec	A*	A
KX108815	China	2037	2014	Rec	A*	A
KX108819	China	2037	2014	Rec	A*	A
KX108820	China	2038	2014	Rec	A*	A
KX108822	China	2037	2014	Rec	A*	A
KX108824	China	2037	2014	Rec	A*	A
MF664481	Brazil	2038	2016	Rec	A*	A
MF664484	Brazil	2038	2016	Rec	A*	A
NC002361	Germany	2037	2016	Rec	A*	A
DQ915957	Belgium	2032	-	Rec	B	B
DQ915958	Belgium	2032	-	Rec	B	B
KJ704802	China	2031	2014	Rec	B*	B
KJ704806	China	2033	2014	Rec	B*	B
KX108796	China	2031	2014	Rec	B	B
KX108805	China	2031	2014	Rec	B	B

KX108806	China	2031	2014	Rec	B*	B
KX108817	China	2031	2014	Rec	B*	B
KX108825	China	2031	2014	Rec	B	B
KX108826	China	2031	2014	Rec	B	B
DQ915950	Italy	2040	-	Rec	C	C
DQ915956	Belgium	2038	-	Rec	C	C
KF738844	Poland	2038	2011	Rec	C	C
KF738847	Poland	2034	2002	Rec	C	C
KF738850	Poland	2037	2012	Rec	C	C
KF738857	Poland	2038	2003	Rec	C	C
KF738867	Poland	2034	2002	Rec	C	C
KX808543	Brazil	2041	2016	Rec	C*	C
KY114965	Brazil	2041	2016	Rec	C*	C
MF621931	Brazil	2038	2016	Rec	C*	C
MF664483	Brazil	2041	2016	Rec	C*	C
DQ090944	China	2039	2005	Rec	D	D
DQ090945	China	2039	2005	Rec	D	D
KF738843	Poland	2042	2011	Rec	D	D
KF738849	Poland	2041	2012	Rec	D	D
KF738854	Poland	2043	2013	Rec	D*	D
KF738855	Poland	2042	2002	Rec	D	D
KF738858	Poland	2043	2002	Rec	D	D
KJ704803	China	2039	2014	Rec	D	D
KX108791	China	2037	2014	Rec	D*	D
KX108827	China	2034	2014	Rec	D	D
MF664482	Brazil	2041	2016	Rec	D	D
DQ915959	Australia	2039	2006	Rec	E	E
EU840176	USA	2041	2003	Rec	E	E
LC035390	Japan	2041	2010	Rec	E	E
JN183455	China	2037	2009	Rec	Rec	Rec

KF738860	Poland	2035	2011	Rec	Rec	Rec
KX108780	China	2032	2014	Rec	Rec	Rec
KX108781	China	2034	2014	Rec	Rec	Rec
KX108783	China	2040	2014	Rec	Rec	Rec
KX108784	China	2037	2014	Rec	Rec	Rec
KX108785	China	2037	2014	Rec	Rec	Rec
KX108787	China	2037	2014	Rec	Rec	Rec
KX108788	China	2037	2014	Rec	Rec	Rec
KX108790	China	2034	2014	Rec	Rec	Rec
KX108793	China	2040	2014	Rec	Rec	Rec
KX108797	China	2040	2014	Rec	Rec	Rec
KX108799	China	2031	2014	Rec	Rec	Rec
KX108800	China	2037	2014	Rec	Rec	Rec
KX108802	China	2037	2014	Rec	Rec	Rec
KX108807	China	2031	2014	Rec	Rec	Rec
KX108809	China	2031	2014	Rec	Rec	Rec
KX108810	China	2037	2014	Rec	Rec	Rec
KX108811	China	2031	2014	Rec	Rec	Rec
KX108812	China	2034	2014	Rec	Rec	Rec
KX108813	China	2034	2014	Rec	Rec	Rec
KX108816	China	2040	2014	Rec	Rec	Rec
KX108818	China	2034	2014	Rec	Rec	Rec
KX108821	China	2034	2014	Rec	Rec	Rec
KX108823	China	2031	2014	Rec	Rec	Rec

*Percentage of permuted trees in the recombination analysis using Simplot v.3.5.1 drops below 70 for more than 100 base pairs.

Bold: genomes recovered in this study. Abbreviations: bp. base pairs; Rec. recombinant.

Phylogenetic grouping based on whole genome phylogenetic analyses.

Supplementary figures

Figure S1. Place of origin of the free-living pigeons used in this study. The points marked on the map are the cities where the pigeons were captured.

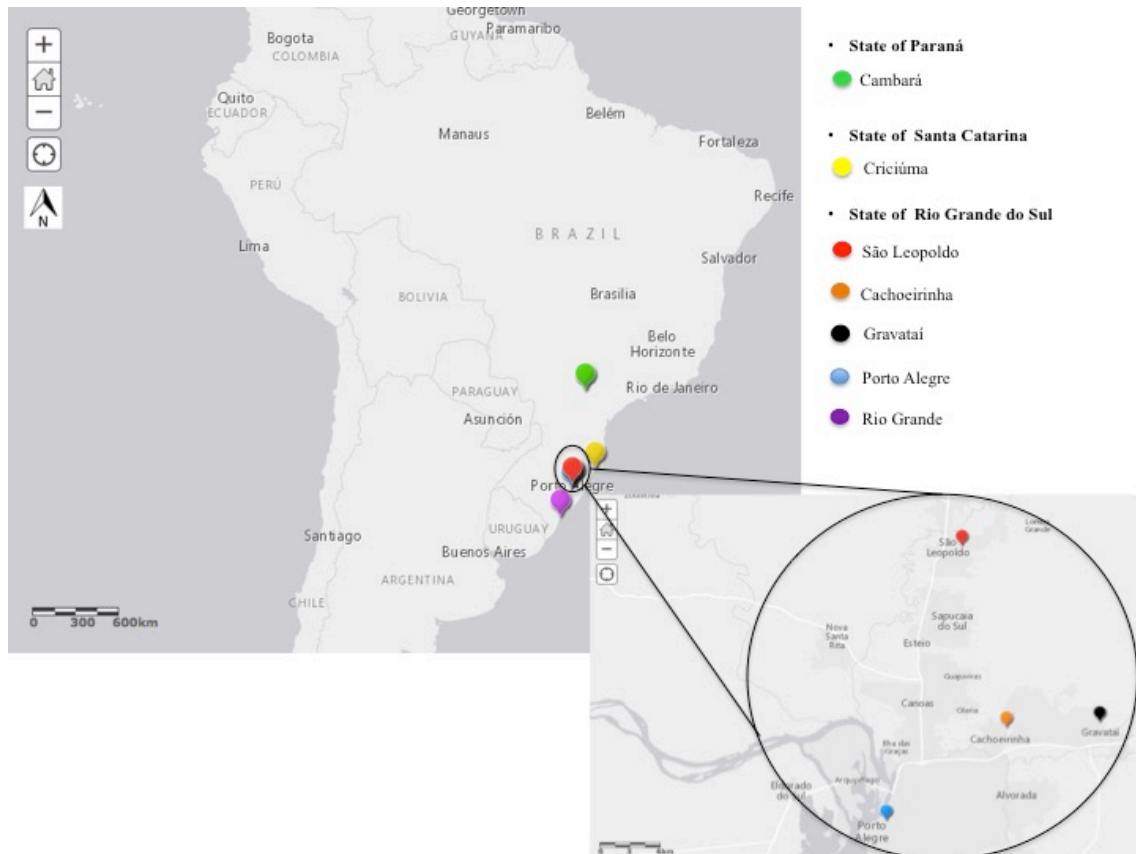


Figure S2. Likelihood mapping of five datasets comprising 82 PiCV sequences. A) Complete genome nucleotide sequences, B) Cap nucleotide sequences, C) Cap amino acid sequences, D) Rep nucleotide sequences, and E) Rep amino acid sequences.

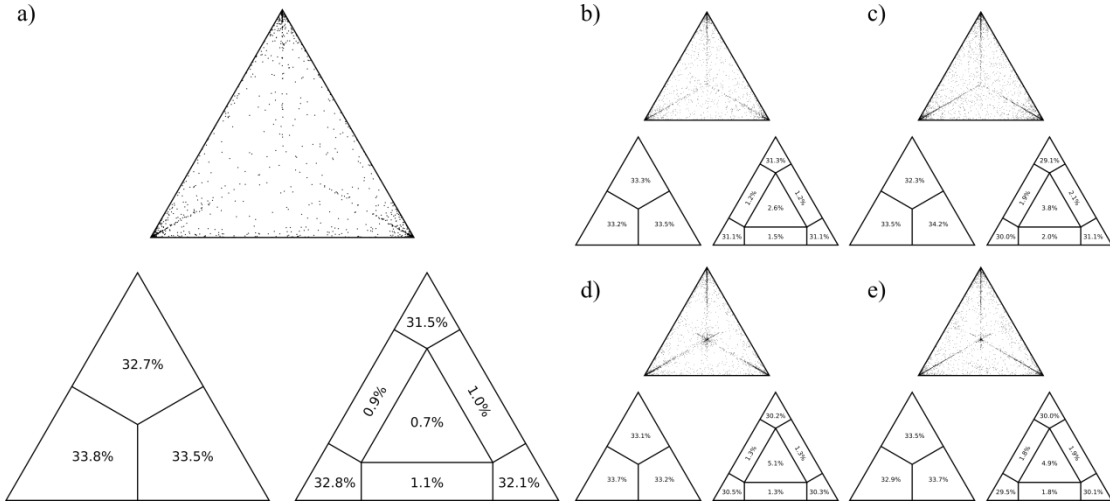


Figure S3. Bootscanning plots of six PiCV recombinant sequences. Bootscan analyses were performed on a sliding window of 200 nt by increments of 20 nt. A) Genotype A sequence showing no recombination profile; B) Genotype A (Table S1) sequence showing a recombination pattern around positions 1619-1826; C) Genotype A, break point positions around 1480-1826; D) Genotype C sequence presenting no recombination profile; E) and F) Recombination profiles of the sequences from Brazil in this study (genotype C*).

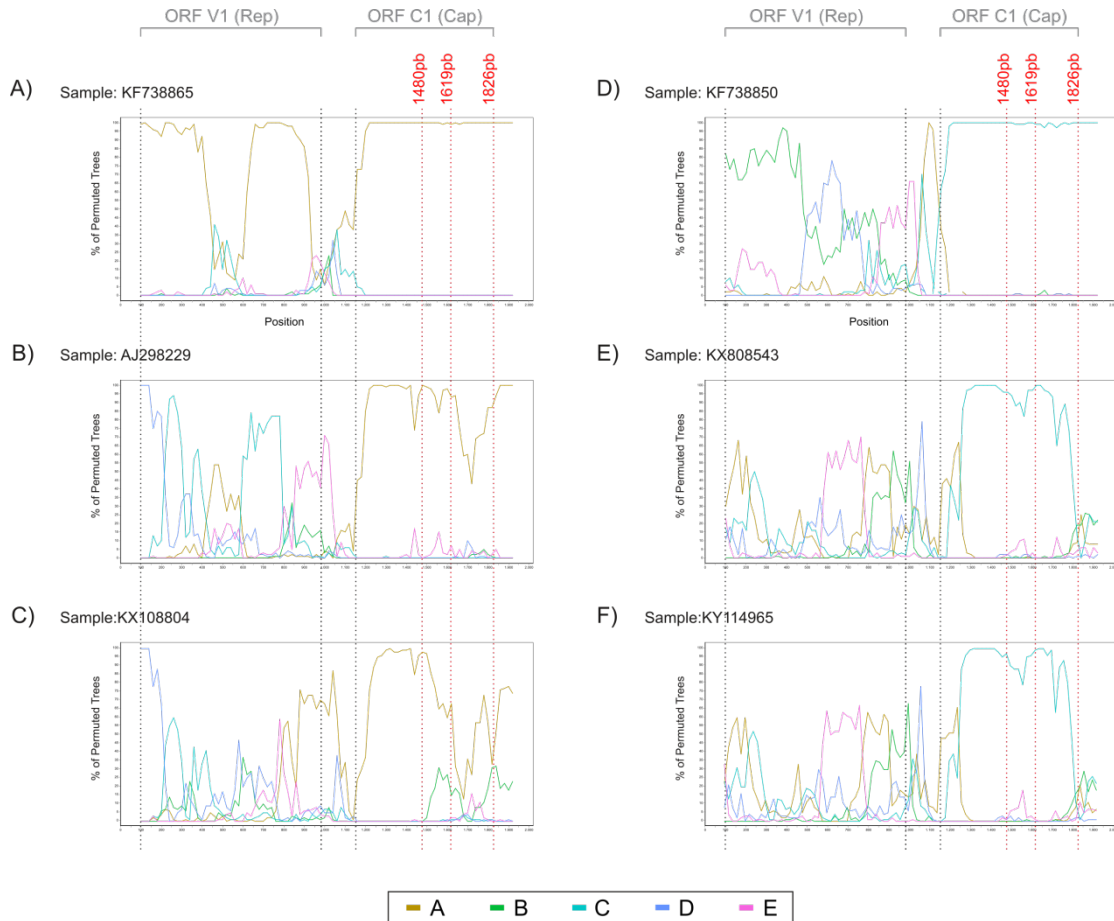
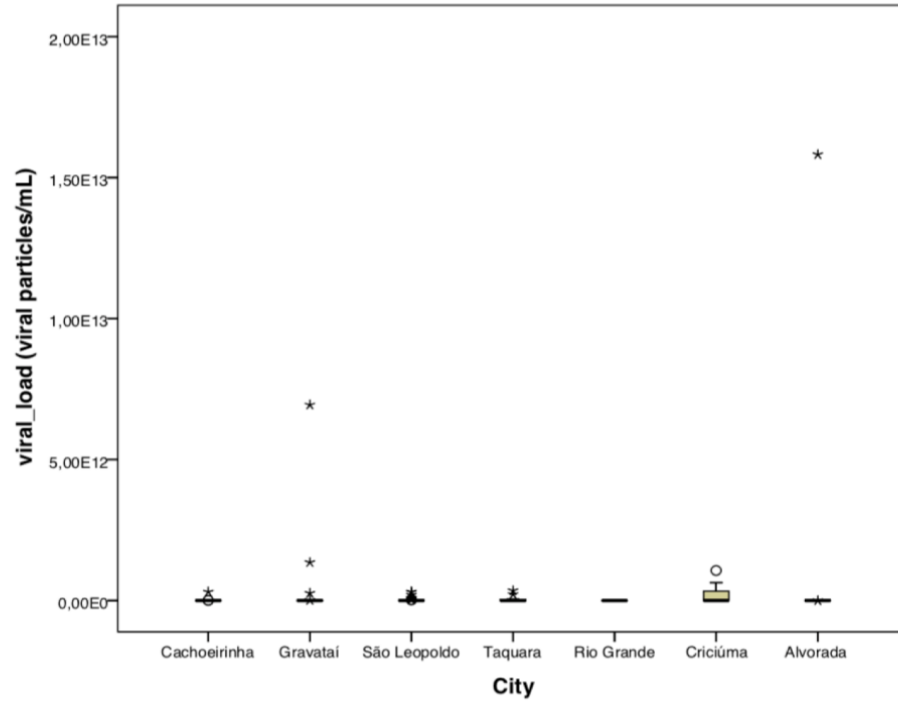


Figure S4. Box plot of PiCV viral genome loads and the city of origin of sampled pigeons



3.2 Nova espécie de Pigeon gyrovirus (PiGyV) recuperado de soro de pombos de vida livre no Sul do Brasil

Loiko, M.R.^{1, 2}, Varela, A.P.M.^{1, 2}, Tochetto, C.^{1, 2}, Lopes, B. C.²; Scheffer, C.M.^{1, 2}, Cerva, C.^{1,2}, Morel, A.P.³, Lima, D.A.^{1,2}, Mayer, F.Q.², Roehe, P.M.¹

¹Laboratório de Virologia, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, Av. Sarmiento Leite 500, sala 208, Porto Alegre, CEP 90050-170, Rio Grande do Sul (RS), Brasil.

² Laboratório de Biologia Molecular, Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF), Secretaria Estadual de Agricultura, Pecuária e Irrigação, (RS), Brasil.

³Falcoaria e Consultoria Ambiental – HAYABUSA. São Francisco de Paula (RS), Brasil.

Address correspondence to Paulo Michel Roehe, proehe@gmail.com.

Artigo científico em preparação para ser submetido à revista *Virus Genes*.

Resumo

Como todas as espécies, as aves silvestres são portadoras de uma série de agentes infecciosos, alguns destes podendo apresentar potencial patogênico, não só para a espécie hospedeira como para outras, incluindo humanos. O pombo doméstico (*Columba livia*), por sua impressionante adaptação a ambientes sinantrópicos, é uma das espécies cujo microbioma merece atenção especial, uma vez que micro-organismos potencialmente capazes de cruzar a barreira interespecies e infectar humanos representam um risco iminente. No entanto, até o momento há pouca informação relacionada à possibilidade do pombo doméstico ser portador ou hospedeiro de vírus com potencial patogênico para humanos. As dificuldades de isolamento e cultivo destes agentes representavam sérias barreiras para o avanço do conhecimento nessa área. Correntemente, o sequenciamento de alto desempenho (HTS) tem permitido a identificação de genomas virais independente de seu cultivo, além de permitir a identificação de genomas de agentes independente de conhecimento ou suspeita prévia. No presente estudo são descritos os dois genomas completos (PiGyV_RS/TQ e PiGyV_RS/RG) de dois representativos de membros da família Anelloviridae, gênero Gyrovirus. Estes foram identificados a partir de amostras de soro coletadas de pombos de vida livre; quando comparados com sequências similares disponíveis, os genomas identificados apresentam identidade inferior a 50%, sugerindo ser um novo girovírus circulante em pombos de vida livre, para o qual é sugerida a denominação “pigeon gyrovirus (PiGyV). Neste estudo é apresentada a caracterização dos genomas desse agente, que é o primeiro girovírus identificado em pombos domésticos. Seu potencial patogênico, bem como sua capacidade de infectar outras espécies, permanecem a ser investigados no futuro.

Palavras-chaves: *Columba livia*, HTS, *Anelloviridae*, *Gyrovirus*, *Pigeon Gyrovirus* (PiGyV).

Introdução

Pombos (*Columba livia*) são aves silvestres, exóticas no Brasil, pertencentes à ordem Columbiformes, família *Columbidae* (CATROXO et al., 2011). Essas aves estão distribuídas no mundo todo e coabitam, de forma crescente, em ambientes sinantrópicos, não raro convivendo inclusive com animais de criação. Todas as espécies, incluindo as aves silvestres, apresentam uma microbiota própria, sendo eventualmente descritas como hospedeiros/reservatórios de vírus potencialmente zoonóticos, tais como o vírus influenza, adenovírus, parvovírus, rotavírus, picornavirus, mesivírus, megrivírus, vírus da febre do Nilo Ocidental (WNV) e o vírus da encefalite de *Saint Louis* (SLE) (BODEWES, 2018; MACKENZIE; JEGGO, 2013; PHAN et al., 2013). No que se refere a pombos, eles podem ser carreadores de agentes com potencial de causar enfermidades, incluindo vírus, fungos, parasitas e bactérias, sendo alguns agentes de caráter zoonótico (HURT et al., 2016; TIZARD, 2004); apesar disso, pouco é conhecido sobre os vírus que circulam nesses animais.

O uso de sequenciamento de alto desempenho (HTS) para análises metagenômicas é um método rápido e preciso para detectar sequências virais em animais com e sem doença (BODEWES, 2018; DELWART; LI, 2012). Essa ferramenta pode contribuir com o conhecimento dos vírus que circulam em aves domésticas e silvestres (BODEWES, 2018), podendo fornecer uma melhor compreensão sobre agentes virais patogênicos ou não aos animais domésticos e humanos (RAMÍREZ-MARTÍNEZ et al., 2018). Dentro desta perspectiva, a abordagem metagenômica têm permitido a identificação de novos vírus pertencentes a uma variedade de famílias, incluindo membros da família *Anelloviridae*. No decorrer de estudos visando determinar o viroma presente em soros de pombos, foi detectada a presença de dois genomas representativos de membros do gênero *Gyrovirus*, família *Anelloviridae* (Loiko et al., preparação). Até o presente não havia relatos sobre a circulação de tais vírus em pombos. No decorrer dessas análises, duas sequências representativas de membros do gênero *Gyrovirus* foram identificadas, as quais apresentavam 98% de identidade entre si. No entanto, devido à baixa identidade com os girovírus previamente descritos, sugere-se que tais genomas sejam representativos de um novo girovírus, para o qual é proposta a denominação “*Pigeon gyrovirus* (PiGyV)”.

Material e Métodos

Coleta das amostras

O Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (Ibama) concedeu permissão para a captura de pombos (*Columba livia*) de acordo com o Ofício 02023.000660/2014-61 RS/CETAS/IBAMA. A permissão para trabalhar com os animais foi concedida pelo Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor - FEPAGRO/RS, sob registro nº 29/2014 e pelo SISBIO (Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade), sob o número de registro 47313-2. O período de coleta foi de setembro de 2014 a novembro de 2016. As capturas foram feitas com armadilhas Tomahawk, com dimensões de 21 x 42 x 21 cm. Os pombos capturados foram mantidos em gaiolas com alimentação e água *ad libitum* até a coleta de amostras, que foi realizada com os pombos vivos, submetidos a contenção manual. Foi coletado sangue por punção em veia ulnar com volume máximo extraído de 1 mL. Os soros de 137 pombos, aparentemente saudáveis, foram coletados e agrupados em *pools* conforme os sete municípios de coleta do sul do Brasil.

Preparo das amostras

Para a concentração e purificação das partículas virais, os *pools* foram filtrados em filtro de 45 µm e centrifugados sobre colchão de sacarose a 25% (25 g de sacarose ultrapura em 100 mL de TEN – Tris 50 mM, EDTA 5 mM, NaCl 140 mM, pH 8,0) a ~150.000 x g por 2 h a 4 °C (ultracentrífuga Sorvall ODT Combi, rotor AH-629). O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* foi eluído em 300 µL de água Milli-Q. As amostras foram mantidas a - 80 °C até a extração de DNA. As amostras foram tratadas com 2,5 µL de DNase (2 U/µL, Turbo DNase, Ambion) e 5 µL de RNase A (20 mg/mL, Invitrogen) para degradação dos ácidos nucleicos exógenos (SHAN et al., 2011), homogeneizadas e incubadas por 2 h a 37 °C. O DNA viral foi extraído pelo método fenol (SAMBROOK, J. AND RUSSEL, 2011), quantificado por espectrofotometria de microvolumes (L-quant, Locus Biotecnologia, Brasil) e fluorimetria (Qubit, Invitrogen, USA). O DNA extraído foi submetido à eletroforese em gel de agarose 0,8% (p/v) corado com brometo de etídio para verificação da qualidade do DNA.

Enriquecimento e sequenciamento das amostras

Para o enriquecimento do DNA foi utilizada a técnica de MDA (*multiple displacement amplification*) com a phi29 DNA Polymerase (DEAN, 2001; LASKEN,

2009). Os amplicons foram avaliados por eletroforese em gel de agarose a 1% (p/v) corado com brometo de etídio e purificados com Agencourt® AMPure® XP (Beckman Coulter/Life Sciences). A pureza e o rendimento do DNA foram avaliados por espectrofotômetro (L-quant, Locus Biotecnologia, Brasil) e fluorimetria (Qubit, Invitrogen, USA), respectivamente. A concentração do DNA amplificado de cada pool foi ajustada para 2,5 ng/μL. O preparo das bibliotecas de DNA foi feito com *Nextera DNA preparation kit* (Illumina, USA) de acordo com instruções do fabricante. O sequenciamento foi realizado com cartucho de sequenciamento de 2 x 150 ciclos *paired-end* (MiSeq v2 Reagent Kit 300 Cycles PE), que gera *reads* com até 300 pb através da plataforma MiSeq (Illumina®, USA).

Análise das sequências

As *reads* obtidas foram filtradas através do programa Trimmomatic (<http://www.usadellab.org/cms/?page=trimmomatic>), utilizando como parâmetro de qualidade um escore (Phred >20) e tamanho (>36 nucleotídeos). Após a trimagem, o metagenoma viral foi montado *de novo* através do software SPAdes 3.10.1 (BANKEVICH et al., 2012), utilizando o parâmetro *metaSPAdes* (NURK S, MELESHKO D, KOROBAYNIKOV A, 2017). A qualidade da montagem foi avaliada com o programa MetaQUAST (MIKHEENKO et al., 2016). As *reads* e *contigs* gerados foram submetidos ao BLASTx/BLASTn para a pesquisa de sequências similares depositadas no GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). O ponto de corte escolhido para o *E-value* foi de 10⁻⁵. Posteriormente, esses *contigs* foram analisados e anotados utilizando o software Geneious v. 8.1.3.

Análises filogenéticas

Os genomas identificados (PiGyV_RS/TQ e PiGyV_RS/RG) foram alinhados com sequências referências de girovírus (n=12) disponíveis no banco de dados (GenBank) usando o software Muscle (Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation). Árvores filogenéticas em nível de nucleotídeo para genoma completo e genes VP1 e VP2 foram geradas no software Mega 6 package (versão 6.06) usando o método *Maximum Likelihood* com *bootstrap* de 1.000 replicatas. A distância evolutiva foi estimada usando o melhor modelo indicado pelo Mega 6 package (versão 6.06) para cada análise filogenética.

Resultados e Discussão

O número de *reads* virais obtidas no sequenciamento dos *pools* de soros variou entre 4.991 a 650.951, as quais geraram 17 a 356 contigs com identidade às sequências virais disponíveis no banco de dados (GenBank). Dentre os contigs virais obtidos, dez apresentaram identidade com membros do gênero *Gyrovirus*, família *Anelloviridae* (Tabela 1). Destes, foi possível identificar dois genomas (>98%) denominados PiGyV_RS/TQ e PiGyV_RS/RG, compostos por 2573 e 2461 nucleotídeos, respectivamente. Os genomas foram identificados nos *pools* de soro coletados em Taquara e Rio Grande e apresentaram cobertura de 4.193 e 25 vezes, respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1. Contigs identificados no BLASTx com identidade aos genomas de girovírus em amostras de soro de pombos. Apenas os melhores hits são mostrados.

Município	Sequência	Tamanho (nt)	BLAST	Vírus	<i>E-Value</i>	ID (%)
Taquara	PiGyV_RS/TQ	2.573	VP1	AGV2	7,81E-68	40
	Contig_4	1.313	VP1	AGV2	7,58E-78	39
São Leopoldo	Contig_5	1.262	VP1	Ashy storm petrel gyrovirus	3,36E-27	38
	Contig_70	567	VP1	Ashy storm petrel gyrovirus	2,13E-29	50
Rio Grande	PiGyV_RS/RG	2.461	VP1	AGV2	1,40E-67	40
	Contig_3	752	VP2	GyV10	2,00E-04	40
	Contig_6	464	VP1	AGV2	8,00E-14	37
Gravataí	Contig_8	396	VP2	AGV2	7,00E-62	98
	Contig_15	321	VP1	AGV2	5,90E-16	64
	Contig_16	307	VP1	AGV2	3,00E-21	47

As sequências PiGyV_RS/TQ e PiGyV_RS/RG apresentaram a mesma organização genômica dos girovírus previamente descritos, contendo uma região não codificante rica em GC, regiões que codificam as proteínas VP1 contendo 477 aminoácidos (posição 1110 a 2543 nt) e VP2 composta por 261 aminoácidos (posição 559 a 1344 nt). A VP1 da sequência PiGyV_RS/RG não está completa, faltando apenas 6

nt (2 aminoácidos). Em relação à VP3, não foi identificada nenhuma região correspondente à codificação dessa proteína em ambas as sequências (Figura 2). A ausência de uma região que codifica a proteína VP3 já foi descrita para girovírus 4 e 5 (GyV4 e GyV5). Os genomas apresentaram um sítio de poliadenilação (AATAAA) e uma região repetitiva direta quase perfeita na região não codificante (em azul – Figura 1: TGTACAGGGGGGTACGTCACCTTGTACAGGGGGGGTCCGCCATCTTGTACAGGGGGGTGTACAGGGGGGTACGTCA), também presentes nos demais girovírus.

Adicionalmente, dois importantes *motifs* foram identificados. Um deles, TX3AQ, está presente na região que codifica a VP1 e tem sido associado com a replicação por círculo rolante (*rolling-circle replication* – RCR). Na região que codifica a proteína VP2, foi possível identificar o *motif* WX7HX3CXCX5H que é conservado entre os girovírus (TAKAHASHI, K. Y. IWASA, M. HIJIKATA, 2000).

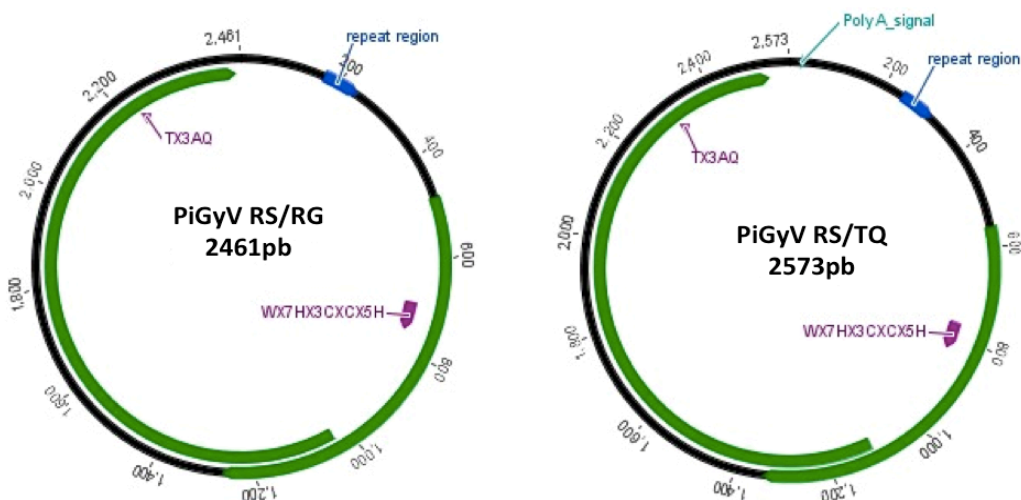


Figura 1. Representação esquemática da organização genômica dos girovírus descritos. Nos genomas estão anotadas as regiões codificantes (VP1 e VP2), a região repetitiva, o sítio de poliadenilação e os motivos (TX3AQ e WX7HX3CXCX5H). As imagens foram geradas através do Software Geneious versão 8.1.

Quando comparados com sequências de outros membros do gênero disponíveis no GenBank, os genomas identificados apresentaram identidade genômica de 29,8% a 41,5%. Em relação às regiões codificantes, a identidade em nível de nucleotídeo foi de 31% a 47,6% para VP1 e de 26,8% a 35% para VP2 (Figura 2). Esse baixo nível de similaridade justifica a proposição de que estes genomas correspondem a um girovírus não previamente reportado, para o qual é proposto o nome *Pigeon Gyrovirus* (PiGyV).

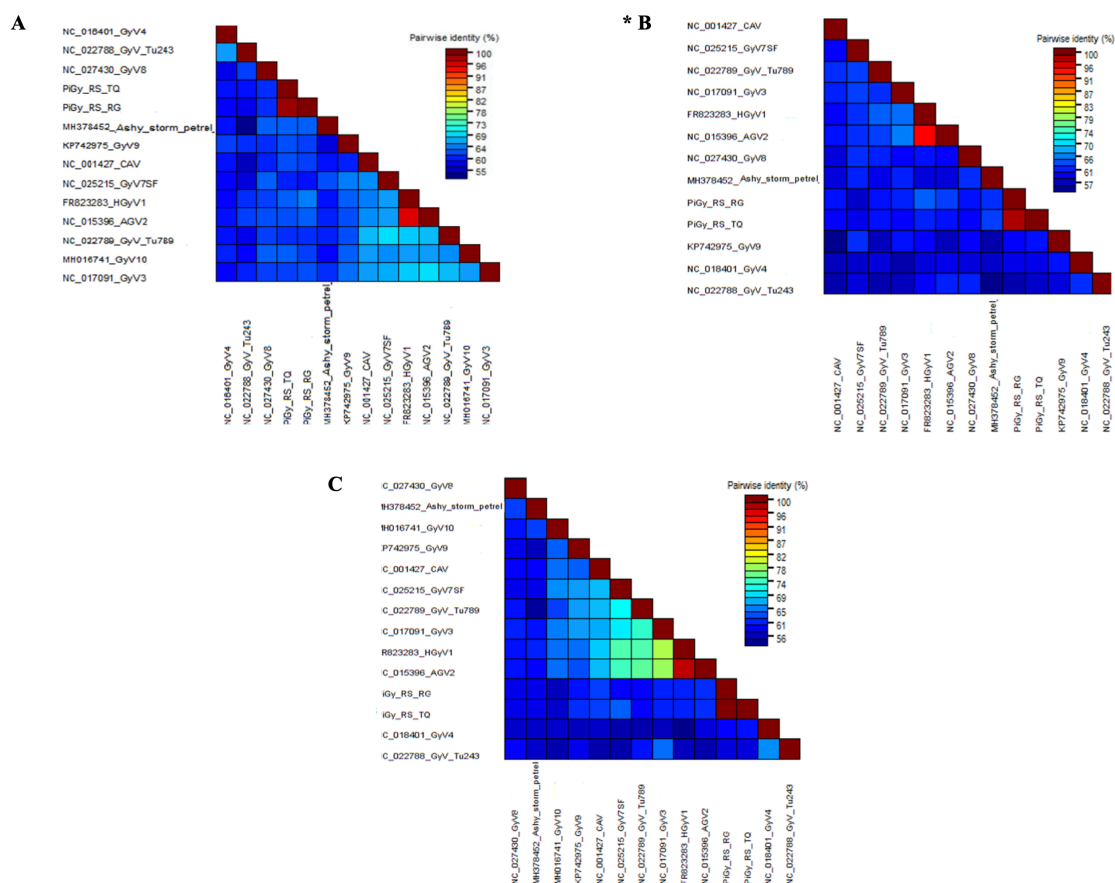


Figure 2. Matriz bidimensional de identidade pareada de nucleotídeos utilizando SDT v1.2 (MUHIRE; VARSANI; MARTIN, 2014). A) Matriz de identidade de nucleotídeos de 14 genomas completos de Gyrovirus disponíveis no GenBank. B) Matriz de identidade de nucleotídeos de 13 sequências de VP1; C) Matriz de identidade de nucleotídeos de 14 sequências de VP2. *A sequência MH016741_GyV10 não foi incluída na matriz devido não ter a região da VP1 completa depositada no GenBank.

Os dois genomas descritos (PiGyV_RS/TQ e PiGyV_RS/RG) apresentaram identidade entre eles superior a 97%. Quando comparados os dois genomas, um total de 24 e 2 substituições nucleotídicas foram identificadas na VP1 e VP2, respectivamente (Figura 3). Para a VP1, a maioria das substituições (21/26) não altera os aminoácidos codificados (aa), caracterizando mutações silenciosas. Esse tipo de mutação pode gerar um códon cujo tRNA seja menos frequente, causando potenciais impactos para os produtos gênicos dependentes de quantidade; esse fenômeno pode, em alguma extensão, influenciar na capacidade infecciosa do vírus; no entanto, futuros estudos devem ser realizados para avaliar esta possibilidade.

Três substituições na região codificante de VP1 levam a trocas importantes no grupo de aminoácidos grados (S/A; I/T; Y/D – Figura 4), possivelmente alterando a

estrutura tridimensional da proteína, porém sem alteração em nível da classificação nutricional do aa (essencial, não essencial ou condicionalmente essencial). Com relação à VP2, duas substituições nucleotídicas com consequentes alterações na sequência de aminoácidos foram identificadas (E/D; E/G – Figura 4); uma das substituições (E/G), por resultar em troca de grupo de aa pode estar relacionada à mudança na estrutura tridimensional da proteína. Alterações em genomas virais podem estar relacionadas com a viabilidade – ou não- de infecção do vírus em diferentes hospedeiros. Recentemente, outros autores (FANG et al., 2017) mostraram uma diferença no número de locais de ligação de fatores de transcrição em regiões não-codificantes do CAV de diferentes hospedeiros. Estudos mais aprofundados sobre as variações no PiGyV devem ser realizados para avaliar o significado dessas modificações na biologia do vírus.

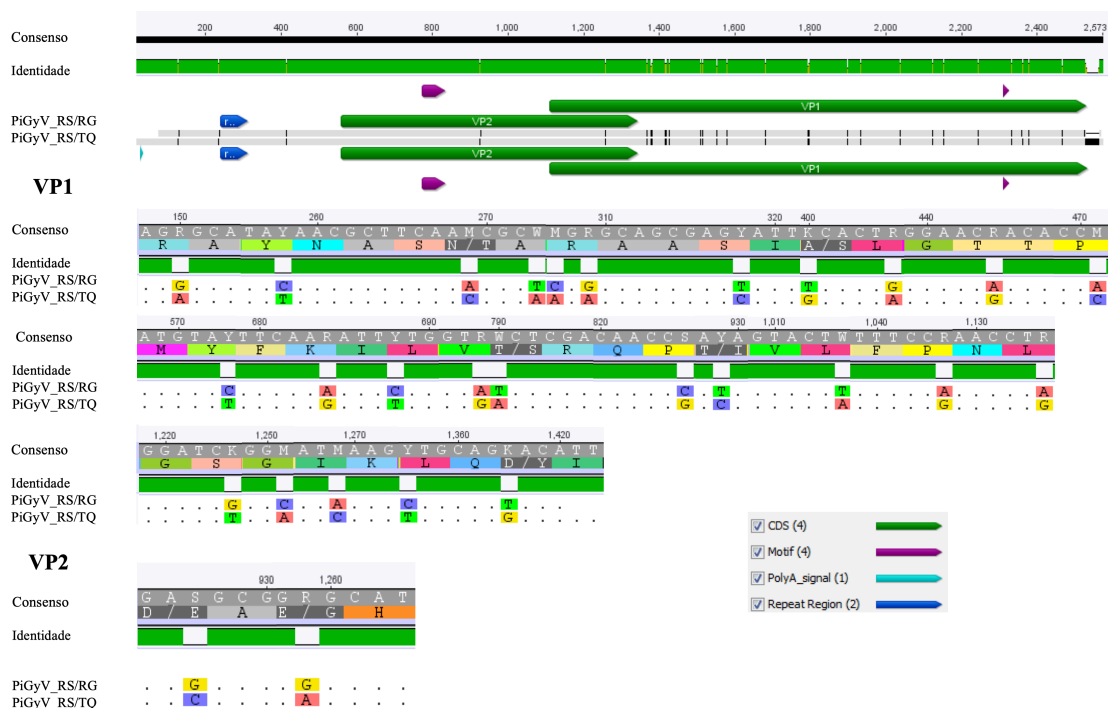


Figura 3. Comparação de sequências nucleotídicas das regiões VP1 e VP2 entre os girovírus identificados neste estudo. As modificações são destacadas pelas letras correspondentes às alterações específicas dos nucleotídeos referentes a cada ponto divergente. Regiões VP1e VP2 com 26 e 2 nucleotídeos divergentes, respectivamente. Alinhamento feito através do Software Geneious versão 8.1.

Adicionalmente, uma análise filogenética foi conduzida com base nas sequências de nucleotídeos do genoma completo e das regiões que codificam as proteínas VP1 e VP2. As árvores filogenéticas construídas com os genomas completos e VP1 mostraram que PiGyV_RS/TQ e PiGyV_RS/RG estão mais próximos ao ash storm-petrel gyrovirus, (*Oceanodroma homochroa*) ou painho-cinzeno, uma ave que

habita ilhas costeiras da Califórnia e México (Figura 4) e que tem sido alvo de estudos de conservação (WAITS et al., 2018). A análise filogenética da região VP2 colocou os genomas descritos no presente estudo mais próximos ao girovírus tipo 8 (GyV8; NC_027430_GyV8), o qual foi identificado em aves com proventriculite transmissível viral (TVP), bem como em crianças com gastroenterite aguda (LI et al., 2018).

Com relação à topologia das árvores, quando avaliado o genoma completo (Figura 5A), as sequências se agruparam em três clados distintos, o mesmo observado quando se analisou a região da proteína VP2 (Figura 5C), mantendo uma similaridade da topologia. A árvore filogenética construída usando o gene de VP1 (Figura 5B) apresentou uma topologia um pouco diferente, onde se observa a formação de quatro clados, mas mantendo os grupos filogenéticos. O genoma completo é o padrão ouro para análises entre sequências genômicas, mas a análise dos genes individuais é importante para os casos nos quais os genomas completos não estão disponíveis; assim, nestes casos, sugere-se que para girovírus, se avalie a região VP2.

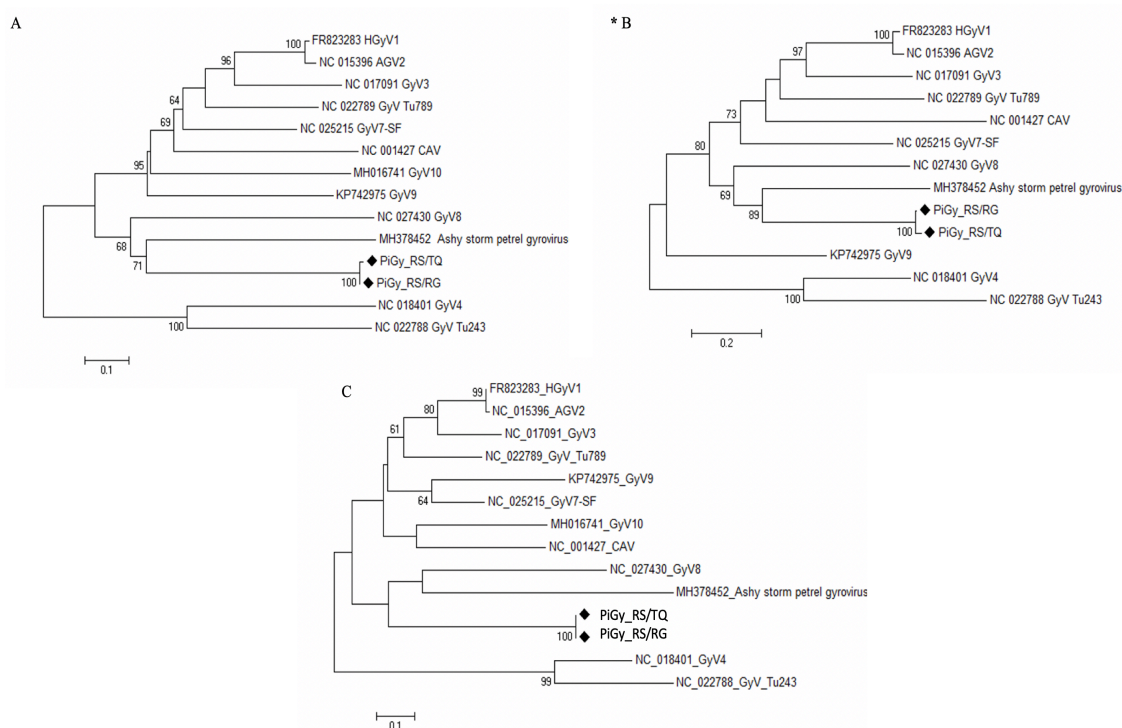


Figura 4. Análise filogenética molecular pelo método da máxima verossimilhança. Árvores filogenéticas geradas com base nas sequências de nucleotídeos do genoma completo (A), VP1 (B) e VP2 (C) dos genomas PiGy_RS/TQ e PiGy_RS/RG juntamente com sequências-referencia de girovírus disponíveis no GenBank. Valores de bootstrap (com base em 1.000 réplicas) superiores a 60% são mostrados. As árvores filogenéticas foram geradas no MEGA6 utilizando Maximum Likelihood (ML) com o modelo de substituição GTR+G+I para genoma e

VP1 e K2+G para VP2 (TAMURA et al., 2013). *A sequência MH016741_GyV10 não foi incluída na filogenia devido não ter a região da VP1 completa depositada no GenBank.

A vigilância molecular de vírus em amostras de animais ou do ambiente é importante para fornecer base para um melhor entendimento de eventuais surtos de doenças virais, bem como para conhecer as possíveis relações evolutivas dos vírus com seus hospedeiros (BODEWES, 2018). O presente estudo mostra a aplicabilidade do sequenciamento de alto desempenho como ferramenta de metagenômica no conhecimento de novos vírus, mostrando dois novos girovírus. Outros girovírus têm sido identificados, através de análises moleculares convencionais ou através de metagenômica, tais como Human gyrovirus type 1 (HGyV1), Avian gyrovirus 2 (AGV2), Gyrovirus 3, 4, 5, 6, 7-SF, 8, 9, 10 (GyV3, GyV4, GyV5, GyV6, GyV7-SF, GyV9, GyV10, respectivamente) (CHU et al., 2012; GOLDBERG et al., 2018a; LI et al., 2015; PHAN et al., 2015; ZHANG et al., 2014) e ashy storm-petrel gyrovirus (WAITS et al., 2018). Tais girovírus foram identificados em diferentes tipos de amostras biológicas e hospedeiros como suabes de pele humanas, fezes humanas e de furões, diarreia em humanos, amostras de carne de frango, soros e tecidos de aves de produção e suabe cloacal e fezes de aves aquáticas.

Embora um número crescente de girovírus venha sendo descrito, as informações sobre o impacto desses vírus nos organismos hospedeiros ainda são escassas (WAITS et al., 2018). O vírus da anemia infecciosa das galinhas (CAV) é o único membro do gênero cuja patogenia é conhecida, sendo responsável por causar imunossupressão, anemia e hemorragia em aves jovens (RIJSEWIJK et al., 2011b); no entanto, esse mesmo vírus foi identificado em amostras de sangue de seres humanos, amostras fecais de gatos de rua, ratos e cães (FANG et al., 2017; ZHANG et al., 2014), não se sabendo o impacto nessas espécies. É importante ressaltar o potencial zoonótico dos girovírus; além de CAV, também AGV2 foi identificado em humanos, tendo alta identidade com o vírus detectado em outros hospedeiros como frango, e furão (YAO et al., 2017). Ainda, o HGyV, descrito em humanos é altamente relacionado ao AGV2, já que ambos possuem alta identidade (PHAN et al., 2012).

Outros girovírus foram descritos em diferentes espécies e quadros clínicos. O GyV8 foi descrito em um caso de ataxia em um fulmar do norte (*Fulmarus glacialis*), ave aquática encontrada na costa da Califórnia; no entanto, a relação de causa de GyV8 com a doença não foi estabelecida. Em relação ao GyV3 já relatado, foi identificado em frangos de corte comerciais com proventriculite transmissível viral (TVP) na China;

esta mesma cepa apresentou alta identidade com o girovírus FecGy em fezes de crianças com gastroenterite aguda e uma investigação epidemiológica sugeriu a ligação entre os girovírus de ambos os casos, sendo uma questão preocupante para a saúde pública (LI et al., 2018). Ainda, três variantes de GyV10 foram identificadas em aves jovens da espécie *Chauna torquata* (conhecida como Tachã) que morreram de doença neurológica com características clínicas e patológicas semelhantes à infecção por CAV (GOLDBERG et al., 2018a).

Apesar de a maioria dos girovírus não serem comprovadamente patogênicos, a identificação de novos vírus dessa família e em novos hospedeiros é importante do ponto de vista virológico. Neste estudo, um novo girovírus foi identificado em pombos de vida livre, aves que têm intensa circulação entre diversos habitats. Até o momento era desconhecida a circulação de girovírus nesses animais; dessa forma, mais investigações são necessárias para revelar a diversidade genética e as propriedades biológicas desse novo vírus.

Referências bibliográficas

BANKEVICH, A. et al. SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. **Journal of Computational Biology**, v. 19, n. 5, p. 455–477, maio 2012.

BODEWES, R. Novel viruses in birds: Flying through the roof or is a cage needed? **The Veterinary Journal**, v. 233, n. 3, p. 55–62, mar. 2018.

CATROXO, M. et al. Research of Viral Agent in Free-living Pigeon Feces (*Columba livia*) in the City of São Paulo, SP, Brazil, for Transmission Electron Microscopy; Investigación de. **Int. J. Morphol.**, v. 29, n. 2, p. 628–635, 2011.

CHU, D. K. W. et al. Characterization of a novel gyrovirus in human stool and chicken meat. **Journal of Clinical Virology**, v. 55, n. 3, p. 209–213, nov. 2012.

DEAN, F. B. Rapid Amplification of Plasmid and Phage DNA Using Phi29 DNA Polymerase and Multiply-Primed Rolling Circle Amplification. **Genome Research**, v. 11, n. 6, p. 1095–1099, 1 jun. 2001.

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. 114–121, 2012.

FANG, L. et al. Genetic Analysis of Two Chicken Infectious Anemia Virus Variants-Related Gyrovirus in Stray Mice and Dogs: The First Report in China, 2015. **BioMed Research International**, v. 2017, p. 1–9, 2017.

GOLDBERG, T. L. et al. Severe neurologic disease and chick mortality in crested screamers (*Chauna torquata*) infected with a novel Gyrovirus. **Virology**, v. 520, n. May, p. 111–115, 2018.

HURT, A. C. et al. Evidence for the Introduction, Reassortment, and Persistence of Diverse Influenza A Viruses in Antarctica. **Journal of Virology**, v. 90, n. 21, p. 9674–9682, 2016.

LASKEN, R. S. Genomic DNA amplification by the multiple displacement amplification (MDA) method: Figure 1. **Biochemical Society Transactions**, v. 37, n. 2, p. 450–453, 2009.

LI, G. et al. Emergence of gyrovirus 3 in commercial broiler chickens with transmissible viral proventriculitis. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 65, n. 5, p. 1170–1174, out. 2018.

LI, L. et al. A gyrovirus infecting a sea bird. **Archives of Virology**, v. 160, n. 8, p. 2105–2109, 4 ago. 2015.

MACKENZIE, J. S.; JEGGO, M. Reservoirs and vectors of emerging viruses. **Current Opinion in Virology**, v. 3, n. 2, p. 170–179, 2013.

MUHIRE, B. M.; VARSANI, A.; MARTIN, D. P. SDT: A Virus Classification Tool Based on Pairwise Sequence Alignment and Identity Calculation. **PLoS ONE**, v. 9, n. 9, p. e108277, 26 set. 2014.

NURK S, MELESHKO D, KOROBAYNIKOV A, P. P. metaSPAdes: a new versatile metagenomics assembler Sergey. **Genome Res.**, v. 1, n. 27, p. 30–47, 2017.

PHAN, T. G. et al. The Viruses of Wild Pigeon Droppings. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, p.

e72787, 4 set. 2013.

PHAN, T. G. et al. A new gyrovirus in human feces. **Virus Genes**, v. 51, n. 1, p. 132–135, 27 ago. 2015.

RAMÍREZ-MARTÍNEZ, L. A. et al. Fecal virome composition of migratory wild duck species. **PLOS ONE**, v. 13, n. 11, p. e0206970, 21 nov. 2018.

RIJSEWIJK, F. A. M. et al. Discovery of a genome of a distant relative of chicken anemia virus reveals a new member of the genus Gyrovirus. **Archives of Virology**, v. 156, n. 6, p. 1097–1100, 26 jun. 2011.

SAMBROOK, J. AND RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning - A laboratory Manual**. Third Edit ed. [s.l: s.n.].

SHAN, T. et al. The Fecal Virome of Pigs on a High-Density Farm. **Journal of Virology**, v. 85, n. 22, p. 11697–11708, 15 nov. 2011.

TAKAHASHI, K. Y. IWASA, M. HIJIKATA, AND S. M. Identification of a new human DNA virus (TTV-like mini virus, TLMV) intermediately related to TT virus and chicken anemia virus. **Archives of Virology**, v. 145, p. 979–993, nov. 2000.

TAMURA, K. et al. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725–2729, 2013.

TIZARD, I. Salmonellosis in wild birds. **Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine**, v. 13, n. 2, p. 50–66, abr. 2004.

WAITS, K. et al. Genome Sequence of a Gyrovirus Associated with Ashy Storm-Petrel. **Microbiology Resource Announcements**, v. 7, n. 11, p. 1–3, 2018.

YAO, S. et al. Novel characteristics of the avian gyrovirus 2 genome. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1–10, 2017.

ZHANG, W. et al. What is for dinner? Viral metagenomics of US store bought beef, pork, and chicken. **Virology**, v. 468–470, p. 303–310, nov. 2014.

3.3 Caracterização do viroma sérico de pombos de vida livre na região Sul do Brasil

Resumo

Pombos (*Columba livia*) são aves exóticas no Brasil, que coabitam com humanos e outras espécies de animais em ambientes urbanos e rurais. Estas aves podem ser reservatórios, portadoras e/ou transmissoras de vírus patogênicos para outras espécies. O sequenciamento de alto desempenho (HTS) tem permitido a exploração de comunidades virais em vários ecossistemas, através da metagenômica. Neste estudo foram avaliados soros de 137 pombos provenientes de sete municípios brasileiros. As amostras foram selecionadas por região de captura para criação de *pools* e extrações de DNA e RNA foram realizadas para sequenciamento na plataforma MiSeq. As *reads* obtidas foram filtradas, montadas *de novo* e identificadas por BLASTx. Os *contigs* foram analisados e mapeados por referencia no software Geneious versão 8.1.3. O número de *reads* sequenciadas por pool de amostra variou de 325.182 a 1.243.436, e em média, 43,0% delas apresentaram identidade com sequências virais depositadas no GenBank. Houve variação de 1.738 a 23.416 *contigs* entre as amostras. Dentre os *contigs* virais, 90,8% apresentaram identidade com sequências de genomas de vírus eucarióticos e 9,2% com vírus procarióticos. Dentre os genomas virais identificados, 41,2% correspondiam a genomas de DNA e 58,5% a genomas de RNA. Tais genomas foram classificados como prováveis membros de seis famílias de vírus taxonomicamente reconhecidas; *Circoviridae* (a mais abundante), *Flaviviridae*, *Anelloviridae*, *Adenoviridae*, *Parvoviridae* e *Coronaviridae*. O vírus com maior número de *reads*, ou seja, que deu origem à maior quantidade de leituras foi o circovírus dos pombos ou *Pigeon circovirus* (PiCV); além disso, foi observada uma grande diversidade de vírus circulantes no soro, como os vírus do gênero *Hepacivirus* e *Pegivirus*. Tal potencial deverá ser investigado com maior profundidade, futuramente.

Palavras-chave - Pombos, *Columba livia*, viroma, sequenciamento de alto desempenho (HTS).

1. Introdução

Pombos (*Columba livia*) são aves silvestres pertencentes à ordem Columbiformes, família Columbidae, espécie *Columba livia* (CATROXO et al., 2011; NUNES, 2003). Essas aves coabitam de forma crescente com a população urbana e com animais de criação, além de estarem distribuídas no mundo todo, podendo ser reservatórios, portadoras e/ou transmissoras de agentes patogênicos para outras espécies, além de albergar vírus ainda não descritos. Desta forma, estudos que avaliam a interação das espécies exóticas e silvestres com animais de criação e o homem no que diz respeito à emergência e reemergência de patógenos são importantes (MOKILI; ROHWER; DUTILH, 2012; WASHBURNE et al., 2018).

O sequenciamento de alto desempenho (HTS) tem permitido a exploração de comunidades virais em vários ecossistemas, através da metagenômica. Exemplos incluem a descoberta de novos vírus de eucariotos pertencentes a uma variedade de famílias, incluindo *Coronaviridae*, *Bunyaviridae*, *Astroviridae*, *Flaviviridae*, *Filoviridae*, *Paramyxoviridae*, *Adenoviridae*, *Reoviridae*, *Bornaviridae*, *Parvoviridae*, *Retroviridae* e de outras famílias virais (BODEWES, 2018; DELWART, 2007; MACKENZIE; JEGGO, 2013; PHILADELPHO et al., 2014). Aves silvestres têm sido descritas como hospedeiros/reservatórios de muitos vírus (BODEWES, 2018; MACKENZIE; JEGGO, 2013; PHAN et al., 2013) como influenza vírus H5N1, adenovírus, parvovírus, girovírus, picornavírus, mesivírus-1, mesivírus-2, *Turkey megrivirus*, *West Nile virus* (WNV), *Saint Louis encephalitis virus* (SLE) (BODEWES, 2018; MURRAY et al., 2011; PHAN et al., 2012; WAITS et al., 2018).

Diversas famílias virais já foram identificadas em amostras de pombos, como *Circoviridae*, *Parvoviridae*, *Picornaviridae*, *Reoviridae*, *Adenovirus*, *Astroviridae* e *Caliciviridae*, bem como vírus de plantas e insetos provavelmente provenientes de alimentos consumidos. Além disso, uma nova espécie de parvovírus chamada *Aviparvovirus* (PHAN et al., 2013) foi proposta, bem como um novo circovírus detectado durante um surto de diarreia entre os pombos de corrida no Japão (YAMAMOTO et al., 2015). Ainda, um novo alphaherpesvírus foi isolado do fígado e baço de pombos (*Columba livia*) durante um surto em um lote usado para a produção de carne na China (ZHANG et al., 2015). Assim, é crescente o número de vírus identificados nestes animais. O crescente contato de pombos com animais de criação e humanos evidencia a importância de uma melhor compreensão do viroma dessas aves, tanto para estimar a transmissão de vírus entre espécies, como para descrever novos

vírus com potencial patogênico (PHAN et al., 2013). Assim, o objetivo deste estudo foi caracterizar o viroma sérico de pombos urbanos na região Sul do Brasil.

2 Material e métodos

2.1 Amostragem - *Captura dos pombos e coleta*

Esse trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (CEUA-IPVDF) – nº 29/2014. As capturas dos pombos (*Columba livia*) foram realizadas para controle ambiental pela Empresa Hayabusa Consultoria Ambiental (registro no IBAMA sob Nº 2486528), com a finalidade de controle populacional. Para esse estudo foram utilizados sangue de 137 pombos vivos e aparentemente saudáveis, agrupados de acordo com os municípios de coleta, todos na região Sul do Brasil. O número de amostras coletadas variou em função da captura e das regiões amostradas (Tabela 1). O período de coleta foi de setembro de 2014 até novembro de 2016.

Tabela 1. Identificação dos pools formados por município amostrado, número de coletas, número total de amostras de soro de pombos coletadas e número de amostras utilizadas para esse estudo.

<i>Pool</i>	<i>Estado</i>	<i>Município</i>	<i>Nº Coletas</i>	<i>N ° total amostras</i>	<i>N ° amostras no pool</i>
1		Gravataí/Cachoeirinha	11	120	42
2		Porto Alegre	2	10	10
3	RS	Rio Grande	1	15	15
4		São Leopoldo	9	100	20
5		Taquara	3	25	18
6	SC	Criciúma	1	23	23
7	PR	Cambará	1	10	10
Total			29	328	137

As capturas foram feitas com armadilhas Tomahawk, com dimensões de 21 x 42 x 21 cm. O local da colocação das armadilhas foi variável, podendo ser instaladas na parte externa ou interna de galpões/armazéns, em pontos planos e no alto desses locais. Os pombos capturados foram mantidos em gaiolas com alimentação e água *ad libitum* até o momento da coleta de amostras, que foi realizada com os pombos vivos através de contenção manual. Foi coletado o sangue por punção em veia ulnar com volume máximo extraído de 1 mL.

2.2 Preparo das amostras

As amostras foram selecionadas por região de captura e quantidade de soro obtido para criação de *pools*. Os soros foram centrifugados a 3.000 rpm, durante 5 minutos a 4 °C. Em um tubo de 15 mL, foram aliqüotados 300 µL de cada soro para formação do *pool*, que foi filtrado em filtro de 0,45 µm para novo tubo de 15 mL. O *pool* foi acondicionado a – 80 °C até a realização da ultracentrifugação.

O processo de ultracentrifugação foi realizado com colchão de sacarose 25%, centrifugado a 27.000 rpm por 2 horas. O sobrenadante foi desprezado e o pellet foi eluído em 400 µL de água Milli-Q. As amostras foram mantidas a - 80 °C até a extração de DNA e RNA.

2.3 Extração de ácidos nucleicos virais para metagenômica

As extrações de DNA e RNA foram realizadas com a transferência de 200 µL para um microtubo de 1,5 mL e adição do mesmo volume de clorofórmio, seguido de homogeneização durante 10 minutos à temperatura ambiente. Após centrifugação a 14.000 rpm por 5 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi transferido para novo microtubo, ao qual foram adicionados 40 µL de tampão de DNase, 5 µL de RNase A (20 mg/mL, Invitrogen) e 2,5 µL de turbo DNase I (Life Technologies/Ambion). A amostra foi incubada por 2 horas a 37 °C. Após as enzimas foram inativadas utilizando 12,6 µL de EDTA (25 mM) e 7,4 µL de água Milli-Q a 75 °C durante 10 minutos. A amostra foi fracionada em dois volumes iguais de 200 uL, para extração de DNA e RNA.

Para extração de DNA, em 200 µL da amostra tratada, foram adicionados 200 µL de tampão TEN 2 X, 40 µL de SDS 10% e 2 µL de Proteinase K (20 mg/mL). A amostra foi incubada por 1 hora a 37 °C sob agitação lenta. Após, foram adicionados 26 µL de NaCl 5 M e 440 µL de fenol, seguido de incubação à temperatura ambiente por 30 minutos. As amostras foram então centrifugadas por 10 minutos a 14.000 rpm a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para novo microtubo e 1 mL de etanol absoluto gelado foi adicionado, sendo homogeneizado por inversão. A amostra ficou armazenada a -20 °C *overnight*. Após, foi centrifugada a 14.000 rpm durante 30 minutos a 4 °C; o sobrenadante foi descartado e foi adicionado 1 mL de etanol 70% à temperatura ambiente. A amostra foi novamente centrifugada por 5 minutos a 4 °C a 14.000 rpm. O excesso de etanol foi removido e o pellet foi ressuspendido em 30 µL de água Milli-Q.

Para extração de RNA, em 200 µL da amostra tratada com nucleases, foram adicionados 50 uL de TEN 2x para completar o volume de 250 uL da amostra para extração, foram adicionados 750 µL de Trizol (Invitrogen, USA). A amostra foi

incubada por 5 minutos à temperatura ambiente, sendo então adicionados 200 µL de clorofórmio. A suspensão foi então homogeneizada e incubada por 2 minutos à temperatura ambiente. As amostras foram então centrifugadas a 14.000 rpm por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo ao qual foram adicionados 500 µL de isopropanol absoluto, seguido de incubação durante 10 minutos à temperatura ambiente. A seguir, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado; o pellet foi incubado a 40 °C por 5 a 10 minutos e eluído em 30 µL de água Milli-Q.

2.4 Preparo das bibliotecas genômicas e sequenciamento

O enriquecimento do RNA foi realizado de forma randômica por transcrição reversa com os kits TransPlex® *Whole Transcriptome Amplification* (Sigma-Aldrich), conforme instruções do fabricante. Para o enriquecimento do DNA foi utilizada a técnica de MDA (*multiple displacement amplification*) com a DNA polimerase phi29 (DEAN et al., 2001, LASKEN et al., 2009). Os amplicons foram avaliados por eletroforese em gel de agarose a 1% (p/v) corado com brometo de etídio e purificados com Agencourt® AMPure® XP (Beckman Coulter / Life Sciences). A pureza e o rendimento do DNA foram avaliados por espectrofotômetro L-Quant (Loccus Biotechnology) e Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen), respectivamente. A concentração do DNA amplificado de cada *pool* foi ajustada para 2,5 ng/µL. O preparo das bibliotecas de DNA foi feito com *Nextera DNA preparation kit* (Illumina, USA) de acordo com instruções do fabricante. O sequenciamento foi realizado com cartucho de sequenciamento de 2 x 150 ciclos *paired-end* (MiSeq v2 Reagent Kit 300 Cycles PE), que gera *reads* com até 300 pb através da plataforma MiSeq (Illumina®, USA).

2.5 Análise das sequências

As *reads* obtidas foram filtradas através do programa Trimmomatic (<http://www.usadellab.org/cms/?page=trimmomatic>), utilizando como parâmetro de qualidade um escore (Phred > 20) e tamanho (> 36 nucleotídeos). O metagenoma viral foi montado *de novo* através do software Spades 3.10.1 (BANKEVICH et al., 2012). A qualidade da montagem foi avaliada com o programa MetaQUAST (MIKHEENKO; SAVELIEV; GUREVICH, 2016). Os *contigs* gerados foram analisados com auxílio da ferramenta de bioinformática Blast2GO. Os contigs foram analisados e mapeados por referência no software Geneious *version* 8.1.3.

3. Resultados

3.1 Caracterização dos viromas

O número de *reads* sequenciadas por *pool* variou de 325.182 a 1.243.426 (Tabela 2), com tamanho variando de 121 a 146 nucleotídeos após a trimagem. As *reads* de cada *pool* foram comparadas ao banco de dados de sequências virais em nível de proteína, usando o BLASTx. Em média, 43% das *reads* apresentaram identidade com sequências virais depositadas no GenBank.

No que se refere ao número de *contigs*, houve variação de 1.738 a 23.416 entre as amostras (Tabela 2). Os *contigs* resultantes das montagens foram comparados ao banco de dados de sequências virais em nível de nucleotídeos (BLASTn) e de proteína (BLASTx).

Tabela 2. Resultados obtidos com o sequenciamento. O número de *reads* sequenciadas e trimadas por *pool* é apresentado, bem como o número de *contigs* montados e com identidade com sequências virais depositadas no GenBank.

Amostra	Nº de reads	Nº de reads após trimagem (%)	Nº de reads virais (%)	Nº de contigs	Nº de contigs (> 1000 bp)	Nº de contigs virais (%)
RS_Gravataí	619.930	595.439 (96,0)	335.324 (54,09)	7.875	9	57 (0,72)
RS_Porto Alegre	414.800	397.836 (95,9)	178.586 (43,05)	1.738	15	31 (1,78)
RS-Taquara	720.118	691.535 (96,03)	341.787 (47,46)	23.416	6	26 (0,11)
RS_São Leopoldo	1.243.426	1.187.861 (95,5)	650.951 (52,35)	22.971	9	166 (0,72)
RS_Rio Grande	406.045	401.571 (98,9)	103.357 (49,71)	6.247	2	17 (0,27)
SC_Criciúma	836.562	790.567 (94,5)	392.228 (46,89)	3.543	15	55 (1,55)
PR_Cambará	325.182	311.328 (95,7)	4.991 (1,53)	4.745	399	356 (7,50)

As *reads* virais apresentaram identidade com sequências de genomas de vírus eucarióticos já reconhecidos; a maioria das leituras correspondeu a genomas de representativos de membros da família *Circoviridae* (Figura 1). Dentre estas, foi identificado com maior frequência o vírus *Columbid circovirus*. As *reads* que puderam ser relacionadas a outras famílias virais estão representadas quantitativamente na Figura 1. Genomas completos foram obtidos nas famílias *Circoviridae*, cujos resultados foram previamente publicados (Loiko et al., 2018), e *Anelloviridae*, de membros do gênero *Gyrovirus*, dados esses que estão em fase de análise para publicação.

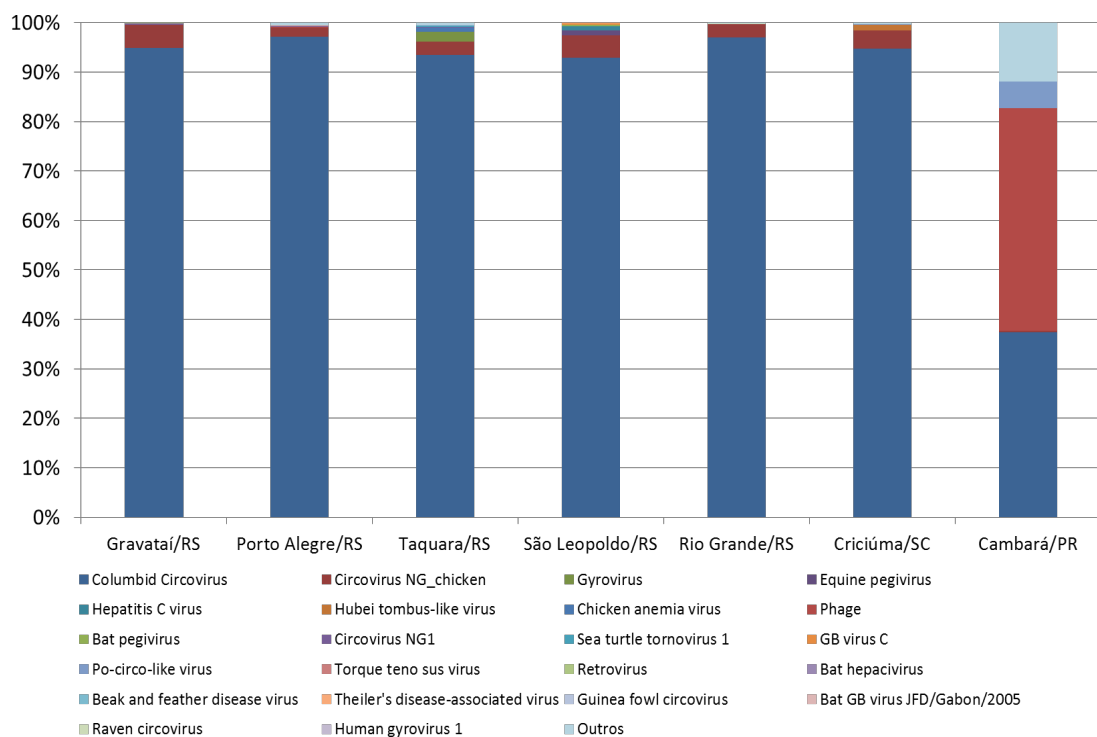


Figura 1. Relação das *reads* virais representativas de membros de diferentes famílias virais detectadas nos soros de pombos das sete regiões amostradas. *Outros = vírus de insetos, plantas, algas e protozoários.

Vírus com genoma de DNA foram identificados em 41,2% dos *contigs* virais analisados nos soros, enquanto que vírus com genoma RNA foram identificados em 58,8% (Tabela 3). Os *contigs* representativos de vírus identificados em animais e humanos foram classificados dentro de seis famílias virais (Tabela 3; Figura 2). Dentre os membros dessas famílias, alguns membros notoriamente infectam aves (*Circoviridae*, *Adenoviridae*, *Anelloviridae*, *Parvoviridae*, *Coronaviridae*) e mamíferos (*Flaviviridae*). Dentro da família *Flaviviridae*, foram identificados 76 sequências virais pertencentes a dois gêneros: *Hepaciviridae* e *Pegiviridae* (Tabela S1 e S2 – Material

Suplementar). Além disso, *contigs* com segmentos de genomas de bacteriófagos e vírus de plantas e algas também foram identificados (Figura 2). Genomas de bacteriófagos foram identificados em todas as amostras analisadas (Tabela S1 – Material Suplementar).

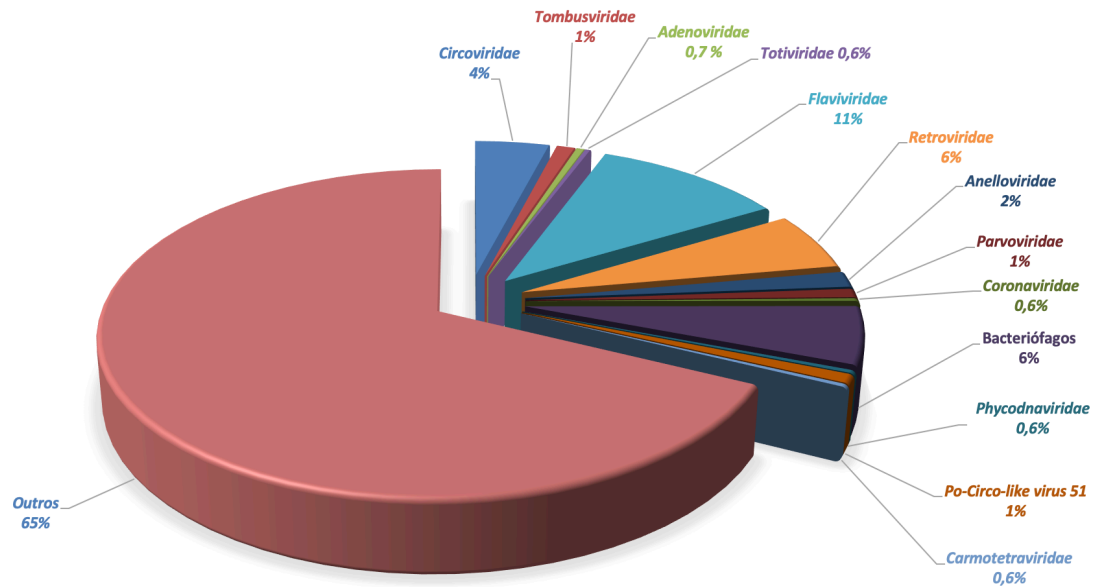


Figura 2. Relação dos *contigs* virais dos *pools* com identidade (BLASTx) a membros de famílias virais detectadas nos soros de pombos de sete regiões amostradas.

Tabela 3. *Contigs* identificados (BLASTx/n) como genomas de vírus em amostras de soro de pombos. A quantidade e tamanho dos *contigs* são apresentados, assim como o número de *reads* e a cobertura.

Família	Tipo de genoma	Gênero / Vírus	Quantidade (Contigs/reads)	Tamanho (pb)	Cobertura	ID (%)	E-Value	Município de origem
<i>Circoviridae</i>	ssDNA	<i>Pigeon circovirus*</i>	22 / 1.867 – 607.637	1743 – 2.062	101,4 – 27.907,0	92 - 97	0.0 - 0.0	Todos os municípios
		<i>Po-Circo-like virus</i>	6 / 268 - 400	404 – 1.064	581,0 - 716,8	42 - 70	1e-10 - 2e-19	Cambará/PR
<i>Flaviviridae</i>	(+) ssRNA	<i>Hepacivirus</i>	31 / 140 – 4.651	161 - 950	4,4 – 2.794,7	44 - 75	0,001 - 4e-24	São Leopoldo/RS
		<i>Pegivirus</i>	45 / 1.403 – 5.525	193 – 1.093	40,7 – 2456,9	41 - 65	2e-11 - 1e-16	
<i>Anelloviridae</i>	ssDNA	<i>Gyrovirus*</i>	10 / 30 – 6.723	244 – 2.573	11,4 – 2.469,1	81 - 89	2e-12 - 1e-04	Rio Grande/RS Taquara/RS São Leopoldo/RS
<i>Adenoviridae</i>	ssDNA	<i>Aviadenovirus</i>	3 / 15 – 20	320 - 785	2,9 - 10,2	76 - 79	3e-38 - 1e-96	São Leopoldo/RS Rio grande/RS
<i>Parvoviridae</i>	ssDNA	<i>Dependoparvovirus</i>	4 / 10 - 30	200 - 340	4,1 - 12,2	72 - 78	1e-08 - 7e-07	Criciúma/SC Rio Grande/RS
<i>Coronaviridae</i>	(+) ssRNA	<i>Gammacoronavirus</i>	2 / 22 – 30	336 - 482	2,8 – 11,1	95 - 98	1e-78 - 2e-10	Criciúma/SC

* *contigs* que formaram genomas completos.

4. Discussão

Os animais silvestres, especialmente aves de várias espécies, incluindo os pombos, são hospedeiros de vírus, a maioria dos quais não são conhecidos. Em alguns casos, esses vírus podem infectar outras espécies, incluindo seres humanos (MACKENZIE; JEGGO, 2013; PHAN et al., 2013). No Brasil, apesar do aumento populacional dos pombos, pouco é conhecido sobre seu potencial como reservatórios de patógenos ou sobre seu microbioma. A investigação dos vírus presentes nestas aves é relevante para o entendimento epidemiológico de agentes infecciosos.

Dentre os genomas de vírus detectados no presente trabalho, o circovírus de pombos (PiCV) foi o mais frequente (LOIKO et al., 2018). Este vírus, também conhecido como Columbid circovírus (CoCV), é membro do gênero *Circovirus* pertencente à família *Circoviridae*, é um agente imunossupressor que causa doença dos pombos jovens (*young pigeon disease syndrome* - YPDS) e tem sido relatado em populações de pombos domésticos e urbanos em todo o mundo (TODD et al., 2001; YAMAMOTO et al., 2015); Entretanto, no Brasil infecções com esse agente não haviam sido documentadas até o presente estudo.

Contigs apresentando identidade com vírus de DNA circular de fita simples codificador de proteína associada à replicação (CRESS), também chamados “*Po-circo-like viruses*” foram detectados nesse estudo. Os vírus CRESS foram classificados em seis famílias pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV), nomeadamente *Geminiviridae*, *Nanoviridae*, *Circoviridae*, *Genomoviridae*, *Bacilladnaviridae* e *Smacoviridae* (GUO et al., 2018). Além dessas famílias virais já reconhecidas, um grande número de novos CRESS, ainda não foram classificados pelo ICTV. Um grande número de genomas de CRESS, descobertos em vários hospedeiros, já foram relatados, incluindo em chimpanzés, suínos, roedores, humanos, patos e galinhas (BLINKOVA et al., 2010; CASTRIGNANO et al., 2013; DE SALES LIMA et al., 2015; LIMA et al., 2019; STEEL et al., 2016; ZHANG et al., 2014), entre outras espécies. Em pombos, até o presente não havia relatos da ocorrência de CRESS nessa espécie.

Com relação à família *Flaviviridae*, foram encontradas sequências com similaridade a membros dos gêneros *Hepacivirus* e *Pegivirus* nas amostras obtidas de um dos municípios amostrados. Ambos os gêneros contêm espécies que infectam seres humanos e outros mamíferos (THÉZÉ et al., 2015), como é o caso do vírus da hepatite C (VHC), que é uma das causas mais importantes de doença hepática crônica (PFAENDER et al., 2014) e frequentemente está associado ao pegivírus humano (HPgV) (STAPLETON, 2005). Os hepacivírus infectam aproximadamente 5% da

população mundial e causam hepatite e carcinoma hepatocelular (KAPOOR et al., 2011). Nos últimos anos houve uma expansão em relação a diversidade genética e variedade de hospedeiros das espécies de hepacivírus e pegivírus. Em torno de 250 novas sequências de vírus dos gêneros *Hepacivirus* e *Pegivirus* foram identificadas em mamíferos não humanos após 2010 (THÉZÉ et al., 2015), incluindo morcegos (QUAN et al., 2013), primatas (PFAENDER et al., 2014), vacas (CORMAN et al., 2015) e equinos (SCHEEL et al., 2015). Animais silvestres como morcegos, que formam grandes e densos grupos sociais, favorecem a manutenção de hepacivírus (DREXLER et al., 2013). Várias espécies de roedores também estão em foco como potenciais reservatórios de hepacivírus de roedores (RPdV); a descoberta de hepacivírus e pegivírus em espécies de ratos comensais é particularmente intrigante, pois estes representam uma população com consideráveis interações diretas e indiretas com humanos (FIRTH et al., 2014).

Entretanto, a possibilidade dos hepacivírus infectarem hospedeiros não mamíferos era totalmente desconhecida (HARTLAGE; CULLEN; KAPOOR, 2016); no ano de 2016 foi identificado um hepacivírus, denominado “Wenling shark vírus” (WLSV) em vísceras de um tubarão. Em nível molecular, a organização genômica do WLSV seja semelhante de outros vírus dentro do gênero *Hepacivirus*, embora diferenças substanciais tenham sido detectadas na proteína NS4 e NS5A (SHI et al., 2016; SMITH et al., 2016). A descoberta deste vírus em um peixe cartilaginoso expande a gama de hospedeiros potenciais de hepacivírus e pode levar à descoberta de novos hepacivírus em outros animais como peixes, anfíbios e répteis (SHI et al., 2016). A provável circulação desses vírus em outros hospedeiros não mamíferos como os pombos indica que outras espécies ou gêneros ainda precisam ser definidos (SHI et al., 2016; SMITH et al., 2016).

Nos últimos anos, vários homólogos com variados graus de relação genética com o vírus da hepatite C (HCV), novos hepacivírus (vírus semelhantes ao HCV) e pegivírus (vírus semelhantes a vírus GB), foram identificados em uma ampla gama de espécies de mamíferos (KAPOOR et al., 2013; BOUKADIDA et al., 2018). A diversidade genética dos hepacivírus encontrados excedeu a observada para hepacivírus infectando seres humanos ou não-primatas, levando ao questionamento sobre a origem, evolução dos hepacivírus (BOUKADIDA et al., 2018). O ciclo de vida infeccioso do HCV depende de um primeiro evento proteolítico crítico da sua poliproteína única, que é realizada pela proteína não estrutural 2 (NS2) e permite a montagem da replicase e a replicação do genoma. Em estudo realizado por Boukadida e colaboradores (2018), foi

caracterizada e avaliada a conservação do mecanismo de ação proteolítico e dos mecanismos regulatórios do NS2 entre HCV e de hepacivírus identificados em outras espécies de animais. Em geral, observaram que essas características únicas da região de NS2, são conservadas através de hepacivírus, independentemente de suas distâncias genéticas, destacando seu significado funcional no ciclo de vida do hepacivírus.

Até o presente, não havia relatos de infecção com hepacivírus em pombos de vida livre. Como essas aves também têm contato com populações humanas, é possível que elas exerçam algum papel na disseminação destes vírus; no entanto, estudos mais detalhados sobre a evolução e distribuição destes vírus, assim como sobre a epidemiologia molecular dos vírus em ambas as espécies, são necessários para elucidar esta questão. Ainda, no presente estudo, baixa identidade foi observada entre os *contigs* correspondentes a esses gêneros e as sequências de referência; assim, é provável que os genomas aqui reportados sejam representativos de novas espécies dentro dos gêneros. Estudos moleculares para completar o genoma devem ser feitos para permitir análises filogenéticas mais aprofundadas, bem como a posterior análise nas amostras individuais para avaliar a frequência de circulação desses vírus. Outro fato que chama a atenção, é que esses genomas virais foram identificados em animais de apenas um município, indicando uma possível influência ambiental, como o contato com resíduos de origem humana ou de outros mamíferos, ou ainda com água contaminada; no entanto, deve-se ressaltar que as sequências virais foram obtidas de soro, indicando uma possível viremia e, conseqüentemente, uma adaptação do vírus a este hospedeiro.

Em relação à família *Anelloviridae*, pelo menos 12 girovírus já foram reportados, sendo eles *human gyrovirus type 1* (HGyV1), *avian gyrovirus 2* (AGV2), GyV3, GyV4, GyV5, GyV6, GyV7-SF, GyV8, GyV9, GyV10, *ashy storm-petrel gyrovirus* e vírus da anemia infecciosa das galinhas (CAV) (CHU et al., 2012; GOLDBERG et al., 2018b; LI et al., 2015; PHAN et al., 2015; RIJSEWIJK et al., 2011a; WAITS et al., 2018; ZHANG et al., 2014). Genomas desses vírus já foram identificados em amostras oriundas de diferentes hospedeiros, incluindo humanos, aves domésticas e aquáticas, furão, gato, rato e cães. No entanto, até o momento, não existia relato sobre a circulação de girovírus em pombos.

Genomas representativos de membros da família *Adenoviridae* foram identificados em 2 *pools* de soro coletados nas cidades de Rio Grande e São Leopoldo (RS). Até o momento, vírus dessa família haviam sido descritos no viroma intestinal de patos aquáticos (ZHAO et al., 2018), frangos de corte (LIMA et al., 2017, 2019) e morcegos (HU et al., 2017), sendo o presente estudo o primeiro a reportar genomas

desses agentes em pombos. Infecções por adenovírus são onipresentes em aves de criação comercial e, provavelmente, em muitas espécies de aves. Embora muitas infecções sejam subclínicas, eventualmente podem ocorrer surtos significativos de doenças associadas a adenovírus (MCFERRAN, J.B. & SMYTH, 2000).

Genomas representativos de membros do gênero *Aviparvovirus* (família *Parvoviridae*) também foram identificadas neste estudo. Os parvovírus são patógenos disseminados em aves de produção e perus, e podem causar doenças em uma variedade de mamíferos, bem como em aves e répteis (PHAN et al., 2013). Em um estudo de metagenômica realizado por Phan et al. (2013) em fezes de pombos, encontraram sequências de parvovírus nas amostras; com base na análise filogenética e cálculos de distância genética com parvovírus de galinhas e perus, se sugeriu incluir esses vírus como membros de um novo gênero com o nome proposto de *Aviparvovirus* (para parvovírus aviário) na subfamília *Parvovirinae* (KAPGATE et al., 2018; PHAN et al., 2013). Os parvovírus foram identificados durante o início dos anos 1980 e são encontrados em todo o mundo em aves jovens com síndromes de doenças entéricas (HARLIN; WADE, 2009; LIMA et al., 2019), bem como em aves saudáveis. Existem relatos de parvovírus circulante em pombos causando quadros de doença (HARLIN & WADE, 2009); no entanto, neste estudo, os animais amostrados estavam aparentemente saudáveis. Assim, há necessidade de estudos para avaliar a patogenicidade do vírus. A análise individual do soro dos pombos também poderá ajudar a dimensionar a abrangência de circulação desse vírus.

Com relação às sequências virais do gênero *Gammacoronavirus*, neste estudo foram encontrados apenas 2 *contigs*. Análises filogenéticas indicam que os membros do gênero *Gammacoronavirus* provavelmente se originaram de aves e podem posteriormente cruzar barreiras de espécies para infectar outros animais, como exemplificado pelo possível surgimento do coronavírus suíno HKU15 em suínos oriundos de pardais (CHAN et al., 2015; WOO et al., 2012). Assim, vírus deste gênero devem ser alvo de estudos para melhorar a compreensão da dinâmica evolutiva viral das aves (CHAN et al., 2015).

Ainda, neste estudo um dado interessante observado foi a presença de vírus que infectam bactérias – bacteriófagos circulantes no soro dos pombos. Os fagos são as partículas biológicas mais abundantes na biosfera com aproximadamente 10^{31} partículas existentes, e aproximadamente 10^{15} partículas de fago que povoam o trato intestinal dos animais (JAMAL et al., 2019; MOYE et al., 2018). Esses vírus desempenham um papel importante na formação de populações microbianas, uma vez que podem ser

patogênicos a bactérias, e também podem ter um papel na transferência horizontal de genes. A importância em relação à diversidade genômica dos bacteriófagos e os recentes avanços das tecnologias de sequenciamento e métodos de preparação de amostras estão gerando dados para entender como esses organismos modulam comunidades microbianas e, por extensão, impactam a função do ecossistema e a saúde humana (HENN et al., 2010; REYES et al., 2012).

Investigações de sequências virais e estruturas do capsídeo de bacteriófagos sugerem que a população viral é vasta, dinâmica e antiga, contendo informação genética em reservatórios ainda inexplorados (POPE et al., 2017). A genética da população de fagos é mal definida, mas a diversidade é enorme, e os genomas são caracteristicamente mosaicos, com a transferência genética horizontal, mediada pela recombinação, desempenhando um papel importante em sua evolução (POPE et al., 2017; JAMAL et al., 2019). Os fagos com genomas de DNA de cadeia dupla (dsDNA) predominam no ambiente e existem atualmente cerca de 2.700 genomas sequenciados no banco de dados do GenBank (nr). Padrões de diversidade e mecanismos evolutivos podem ser explorados através da comparação de genomas de fagos de bactérias intimamente relacionadas, e coletas de sequências de genoma de fagos (POPE et al., 2017). Maiores estudos com as sequências dos fagos obtidas são importantes para estabelecer sua relação com o ambiente e os pombos.

É importante salientar que os programas para análise e processamento de dados de metagenômica possuem limitações em função da complexidade das amostras. Uma vez que os dados dizem respeito a uma determinada população heterogênea, a montagem dos *reads* torna-se um desafio, pois facilmente pode gerar sequências que não tem valor biológico, chamadas de “quimeras”. Além disso, a falta de bancos de dados mais completos resulta em um grande número de buscas improdutivas (*no hits*), fazendo com que a maioria das sequências permaneça desconhecida (SCHOLZ; LO; CHAIN, 2012). Neste trabalho, apenas genomas representativos de vírus como alguma similaridade com vírus previamente conhecidos foram avaliados, pois a análise foi baseada em estudos comparativos frente a bancos de genomas virais já estabelecidos. As sequências desconhecidas merecem destaque, pois podem representar vírus novos e deverão ser alvo de estudos futuros.

As aves fornecem o reservatório natural para numerosas espécies virais; como tal, podem apresentar um potencial importante na evolução, emergência e disseminação de agentes infecciosos entre diferentes espécies. Os genomas virais detectados nesse estudo estavam circulantes no sangue dos pombos, mostrando uma provável viremia

nessas aves. A entrada de seres humanos em habitats naturais de aves selvagens, a domesticação de aves selvagens e o crescente consumo de aves por humanos têm facilitado os vírus aviários a atravessar barreiras de espécies, eventualmente causando zoonoses (CHAN et al., 2015). Para avaliar a real transmissão de vírus presentes em pombos para outras espécies animais são necessários maiores estudos. O presente estudo mostra uma grande diversidade de vírus circulantes em pombos no sul do Brasil, sendo que alguns destes podem causar impacto à saúde humana. Evidentemente, estudos filogenéticos e epidemiológicos são necessários para avaliar a profundidade desse potencial.

5. Conclusões

Esse é o primeiro estudo que investiga o viroma nos soros de pombos de vida livre. Os resultados obtidos enriquecem o conhecimento a respeito de reservatórios virais, contribuindo com dados sobre vírus circulantes nessas aves. Uma grande diversidade de genomas virais de distintas famílias foi detectada neste estudo. O genoma viral mais frequente e abundantemente identificado nestas amostras foi o PiCV.

Foi encontrado também sequências virais representativas de genomas de vírus dos gêneros *Hepacivirus* e *Pegivirus* nos soros. A presença destes genomas virais não havia sido previamente descrita em aves; levando em conta a baixa identidade com genomas de referência, é possível que esses genomas possam representar novas espécies virais. Outros dois genomas de membros do gênero *Gyrovirus* foram identificados nas amostras. Até o momento, não existia relato sobre a circulação de girovírus em pombos. O impacto de tais descobertas na saúde humana e animal precisa de estudos complementares.

Referências Bibliográficas

- BANKEVICH, A. et al. SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. **Journal of Computational Biology**, v. 19, n. 5, p. 455–477, maio 2012.
- BLINKOVA, O. et al. Novel circular DNA viruses in stool samples of wild-living chimpanzees. **Journal of General Virology**, v. 91, n. 1, p. 74–86, 1 jan. 2010.
- BODEWES, R. Novel viruses in birds: Flying through the roof or is a cage needed? **The Veterinary Journal**, v. 233, n. 3, p. 55–62, mar. 2018.
- CASTRIGNANO, S. B. et al. Two novel circo-like viruses detected in human feces: complete genome sequencing and electron microscopy analysis. **Virus Research**, v. 178, n. 2, p. 364–373, dez. 2013.
- CATROXO, M. et al. Research of Viral Agent in Free-living Pigeon Feces (*Columba livia*) in the City of São Paulo, SP, Brazil, for Transmission Electron Microscopy; Investigación de. **International Journal Morphol.**, v. 29, n. 2, p. 628–635, 2011.
- CHAN, J. F. W. et al. Cross-species transmission and emergence of novel viruses from birds. **Current Opinion in Virology**, v. 10, p. 63–69, 2015.
- CHU, D. K. W. et al. Characterization of a novel gyrovirus in human stool and chicken meat. **Journal of Clinical Virology**, v. 55, n. 3, p. 209–213, nov. 2012.
- CORMAN, V. M. et al. Highly Divergent Hepaciviruses from African Cattle. **Journal of Virology**, v. 89, n. 11, p. 5876–5882, 1 jun. 2015.
- DE SALES LIMA, F. E. et al. Genomic characterization of novel circular ssDNA viruses from insectivorous bats in Southern Brazil. **PLoS ONE**, v. 10, n. 2, p. 1–11, 2015.
- DELWART, E. L. Viral metagenomics. **Reviews in Medical Virology**, v. 17, n. 2, p. 115–131, mar. 2007.
- DREXLER, J. F. et al. Evidence for Novel Hepaciviruses in Rodents. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 6, p. e1003438, 20 jun. 2013.
- FIRTH, C. et al. Detection of Zoonotic Pathogens and Characterization of Novel Viruses Carried by Commensal *Rattus norvegicus* in New York City. **mBio**, v. 5, n. 5, 2014.
- GOLDBERG, T. L. et al. Severe neurologic disease and chick mortality in crested screamers (*Chauna torquata*) infected with a novel Gyrovirus. **Virology**, v. 520, n. May, p. 111–115, 2018.
- GUO, Z. et al. Identification and genomic characterization of a novel CRESS DNA virus from a calf with severe hemorrhagic enteritis in China. **Virus Research**, v. 255, n. 16, p. 141–146, ago. 2018.
- HARLIN, R.; WADE, L. Bacterial and Parasitic Diseases of Columbiformes. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, v. 12, n. 3, p. 453–473, set. 2009.
- HARTLAGE, A. S.; CULLEN, J. M.; KAPOOR, A. The Strange, Expanding World of Animal Hepaciviruses. **Annual Review of Virology**, v. 3, n. 1, p. 53–75, 29 set. 2016.

- HENN, M. R. et al. Analysis of High-Throughput Sequencing and Annotation Strategies for Phage Genomes. **PLoS ONE**, v. 5, n. 2, p. e9083, 5 fev. 2010.
- HU, D. et al. Virome analysis for identification of novel mammalian viruses in bats from Southeast China. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 10917, 7 dez. 2017.
- JAMAL, M., SMAUS, B, ANDLEEB, S., et al. Bacteriophages: An overview of the control strategies against multiple bacterial infections in different fields. **Journal Basic Microbiol**, v. 59, p. 123–133, 2019.
- KAPGATE, S. S. et al. Avian parvovirus: classification, phylogeny, pathogenesis and diagnosis. **Avian Pathology**, v. 47, n. 6, p. 536–545, 2018.
- KAPOOR, A. et al. Characterization of a canine homolog of hepatitis C virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 28, p. 11608–11613, 12 jul. 2011.
- LI, L. et al. A gyrovirus infecting a sea bird. **Archives of Virology**, v. 160, n. 8, p. 2105–2109, 4 ago. 2015.
- LIMA, D. A. et al. Faecal virome of healthy chickens reveals a large diversity of the eukaryote viral community, including novel circular ssDNA viruses. **Journal of General Virology**, v. 98, n. 4, p. 690–703, 1 abr. 2017.
- LIMA, D. A. et al. The intestinal virome of malabsorption syndrome-affected and unaffected broilers through shotgun metagenomics. **Virus Research**, v. 261, n. August 2018, p. 9–20, fev. 2019.
- LOIKO, M. R. et al. Columbidae circoviruses detected in free ranging pigeons from Southern Brazil: insights on PiCV evolution. **Archives of virology**, v. 163, n. 11, p. 3083–3090, 13 nov. 2018.
- MACKENZIE, J. S.; JEGGO, M. Reservoirs and vectors of emerging viruses. **Current Opinion in Virology**, v. 3, n. 2, p. 170–179, 2013.
- MCFERRAN, J.B. & SMYTH, J. A. Avian Adenoviruses. In: **Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.** Ames, Iowa, USA: Blackwell Publishing Professional, 2000. v. 19p. 589–601.
- MIKHEENKO, A.; SAVELIEV, V.; GUREVICH, A. MetaQUAST: evaluation of metagenome assemblies. **Bioinformatics**, v. 32, n. 7, p. 1088–1090, 1 abr. 2016.
- MOKILI, J. L.; ROHWER, F.; DUTILH, B. E. Metagenomics and future perspectives in virus discovery. **Current Opinion in Virology**, v. 2, n. 1, p. 63–77, 2012.
- MOYE, Z. D., WOOLSTON, J. and SULAKVELIDZE, A. Review Bacteriophage Applications for Food Production and Processing. **Viruses**, v. 10, n. 205, p. 1-22, 2017.
- MURRAY, K. O.; WALKER, C.; GOULD, E. The virology, epidemiology, and clinical impact of West Nile virus: a decade of advancements in research since its introduction into the Western Hemisphere. **Epidemiology and Infection**, v. 139, n. 06, p. 807–817, 23 jun. 2011.
- NUNES, V. F. P. Pombos Urbanos : O Desafio De Controle. **Instituto biológico de São Paulo**, v. 65, p. 89–92, 2003.
- POPE, W. H. et al. Science Education Alliance-Phage Hunters Advancing Genomics and Evolutionary Science (SEA-PHAGES), Hatfull GF. Bacteriophages of *Gordonia* spp. display a spectrum of diversity and genetic relationships. **mBio**, v. 8, n. 4, July/August

2017 .

PFAENDER, S. et al. Natural reservoirs for homologs of hepatitis C virus. **Emerging Microbes & Infections**, v. 3, n. 1, p. 1–9, 25 jan. 2014.

PHAN, T. G. et al. A third gyrovirus species in human faeces. **Journal of General Virology**, v. 93, n. Pt_6, p. 1356–1361, 1 jun. 2012.

PHAN, T. G. et al. The Viruses of Wild Pigeon Droppings. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, p. e72787, 4 set. 2013.

PHAN, T. G. et al. A new gyrovirus in human feces. **Virus Genes**, v. 51, n. 1, p. 132–135, 27 ago. 2015.

PHILADELPHO, N. A. et al. Survey of bornaviruses in pet psittacines in Brazil reveals a novel parrot bornavirus. **Veterinary Microbiology**, v. 174, n. 3–4, p. 584–590, dez. 2014.

QUAN, P.-L. et al. Bats are a major natural reservoir for hepaciviruses and pegiviruses. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 20, p. 8194–8199, 2013.

REYES, A. et al. Going viral: next-generation sequencing applied to phage populations in the human gut. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 9, p. 607–617, 6 set. 2012.

RIJSEWIJK, F. A. M. et al. Discovery of a genome of a distant relative of chicken anemia virus reveals a new member of the genus Gyrovirus. **Archives of Virology**, v. 156, n. 6, p. 1097–1100, 26 jun. 2011.

SCHEEL, T. K. H. et al. Characterization of nonprimate hepacivirus and construction of a functional molecular clone. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 7, p. 2192–2197, 17 fev. 2015.

SCHOLZ, M. B.; LO, C.-C.; CHAIN, P. S. Next generation sequencing and bioinformatic bottlenecks: the current state of metagenomic data analysis. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, n. 1, p. 9–15, fev. 2012.

SHI, M. et al. Divergent Viruses Discovered in Arthropods and Vertebrates Revise the Evolutionary History of the Flaviviridae and Related Viruses. **Journal of Virology**, v. 90, n. 2, p. 659–669, 15 jan. 2016.

SMITH, D. B. et al. Proposed update to the taxonomy of the genera Hepacivirus and Pegivirus within the Flaviviridae family. **Journal of General Virology**, v. 97, n. 11, p. 2894–2907, 10 nov. 2016.

SMITS, S. L. et al. Recovering full-length viral genomes from metagenomes. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. OCT, p. 1–8, 1 out. 2015.

STAPLETON, J. T. GB Virus Type C (GBV-C), Alternative Denomination Hepatitis G Virus (HGV). **Transfusion Medicine and Hemotherapy**, v. 32, n. 3–4, p. 128–131, 2005.

STEEL, O. et al. Circular replication-associated protein encoding DNA viruses identified in the faecal matter of various animals in New Zealand. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 43, p. 151–164, set. 2016.

THÉZÉ, J. et al. Evolutionary and phylogenetic analysis of the hepaciviruses and pegiviruses. **Genome Biology and Evolution**, v. 7, n. 11, p. 2996–3008, 2015.

TODD, D. et al. Genome sequence determinations and analyses of novel circoviruses

from goose and pigeon. **Virology**, v. 286, n. 2, p. 354–362, 2001.

TODD, D. et al. Sequence comparison of pigeon circoviruses. **Research in Veterinary Science**, v. 84, n. 2, p. 311–319, 2008.

WAITTS, K. et al. Genome Sequence of a Gyrovirus Associated with Ashy Storm-Petrel. **Microbiology Resource Announcements**, v. 7, n. 11, p. 1–3, 2018.

WASHBURNE, A. D. et al. Taxonomic patterns in the zoonotic potential of mammalian viruses. **PeerJ**, v. 6, p. e5979, 28 nov. 2018.

WOO, P. C. Y. et al. Discovery of Seven Novel Mammalian and Avian Coronaviruses in the Genus Deltacoronavirus Supports Bat Coronaviruses as the Gene Source of Alphacoronavirus and Betacoronavirus and Avian Coronaviruses as the Gene Source of Gammacoronavirus and Deltacoronavi. **Journal of Virology**, v. 86, n. 7, p. 3995–4008, 1 abr. 2012.

WOODS, L. W. et al. A retrospective study of circovirus infection in pigeons: nine cases (1986-1993). **J Vet Diagn Invest**, v. 6, n. 2, p. 156–164, 1994.

YAMAMOTO, E. et al. Complete genome sequence of pigeon circovirus detected in racing pigeons in western Japan. **Virus Genes**, v. 51, n. 1, p. 140–143, 2015.

ZHANG, L. et al. Characterization of the first columbid herpesvirus 1 isolate from a hybrid meat-type pigeon flock in China. **Archives of Virology**, v. 160, n. 2, p. 459–464, 9 fev. 2015.

ZHANG, W. et al. What is for dinner? Viral metagenomics of US store bought beef, pork, and chicken. **Virology**, v. 468–470, p. 303–310, nov. 2014.

ZHAO, L. et al. Metagenomic Analysis of the Jinding Duck Fecal Virome. **Current Microbiology**, v. 75, n. 6, p. 658–665, 24 jun. 2018.

Material Suplementar

Tabela S1. Relação das sequências representativas de vírus do gênero *Pegivirus* encontradas nas amostras de soro de pombos coletados na região de São Leopoldo.

Best hit (Blastx)	Contig	Tamanho (pb)	ID (%)	Cobertura	E-value
Bat Pegivirus	NODE_19	400	29	29.5	1,00E-05
	NODE_51	633	35	37.5	1,00E-14
	NODE_165	462	56	117.5	7,00E-12
	NODE_184	429	43	6.0	6,00E-04
	NODE_337	364	49	6.5	9,00E-22
	NODE_388	359	41	205.3	2,00E-11
	NODE_887	293	54	2700.4	8,00E-16
	NODE_1178	275	54	2777.5	1,00E-15
	NODE_3212	227	51	241.0	5,00E-04
	NODE_4012	218	59	14.7	8,00E-10
	NODE_4748	211	52	40.7	3,00E-05
Equine Pegivirus	NODE_90	539	58	2336.6	1,00E-17
	NODE_149	475	58	2775.6	1,00E-17
	NODE_63	592	58	4180.7	4,00E-17
	NODE_87	540	58	4048.1	4,00E-23
	NODE_89	539	62	3635.9	1,00E-25
	NODE_133	489	61	2161.3	4,00E-23
	NODE_191	445	58	1484.6	3,00E-22
	NODE_206	427	57	2525.9	9,00E-20
	NODE_268	393	59	1990.2	8,00E-19
	NODE_316	377	60	2153.9	8,00E-25
	NODE_345	370	61	2748.0	2,00E-23
	NODE_352	369	61	4456.9	5,00E-25
	NODE_551	328	60	1205.0	2,00E-26
	NODE_633	317	58	2120.1	5,00E-19
	NODE_659	315	57	2230.4	3,00E-24
	NODE_802	300	65	1801.1	1,00E-16
NODE_6033	199	49	2107.2	5,00E-06	

	NODE_6245	197	62	1809.0	1,00E-06
	NODE_6377	196	56	1123.8	1,00E-05
	NODE_6897	192	56	1934.1	4,00E-07
	NODE_8571	181	52	2009.1	4,00E-04
	NODE_8735	180	57	1980.1	0.002
	NODE_11885	165	45	2220.0	4,00E-04
	NODE_11912	164	62	1940.0	4,00E-04
	NODE_12466	163	62	2690.1	2,00E-04
	<hr/>				
	NODE_31	718	38	416.7	1,00E-09
	NODE_147	477	45	83.8	9,00E-07
	NODE_239	407	53	88.1	7,00E-29
Pegivirus	NODE_367	276	56	40.2	4,00E-12
	NODE_1866	141	63	37.5	4,00E-11
	NODE_2422	239	62	132.9	0.001
	<hr/>				
Rodent pegivirus	NODE_1404	265	34	38.4	5,00E-04
	<hr/>				
Porcine pegivirus	NODE_1101	278	34	7.5	0.11
	<hr/>				

Tabela S2. Relação das sequências representativas de vírus do gênero *Hepacivirus* encontradas nas amostras de soro de pombos coletados na região de São Leopoldo.

Blastx (contig)	Contig	Tamanho (pb)	ID (%)	Cobertura	E-value
GB vírus C	NODE_9	1.093	31	75.7	4,00E-09
	NODE_15	864	47	49.0	1,00E-50
	NODE_84	545	50	204.9	9,00E-11
	NODE_899	292	55	85.6	2,00E-07
Hepacivirus	NODE_205	428	35	7.8	3,00E-14
	NODE_430	430	44	9.8	0,001
	NODE_492	336	34	7.9	6,00E-12
	NODE_695	311	60	2180.1	4,00E-19
	NODE_1127	277	62	7.4	4,00E-09
	NODE_1276	270	40	4.3	8,00E-08
	NODE_1562	260	54	2811.0	2,00E-12
	NODE_572	324	58	2269.0	2,00E-19
	NODE_4858	210	58	3025.1	1,00E-16
	NODE_5409	205	56	3120.2	8,00E-07
	NODE_5921	200	75	386.9	4,00E-24
Hepatitis C virus	NODE_258	395	49	2396.5	8,00E-16
	NODE_1255	270	36	10.1	7,00E-07
	NODE_1634	258	49	2794.7	6,00E-13
	NODE_2224	243	34	72.8	0.009
	NODE_2725	234	56	2012.8	3,00E-06
	NODE_4426	214	62	2983.1	3,00E-12
	NODE_4541	213	56	3232.1	1,00E-06
	NODE_5508	204	56	3321.5	2,00E-06
	NODE_5514	204	62	3406.5	2,00E-12
	NODE_5603	203	62	3127.2	1,00E-12
	NODE_10974	169	62	3337.8	1,00E-12
	NODE_14383	155	62	2522.6	8,00E-13
	NODE_15440	151	59	3278.7	9,00E-11

Tabela S3. Relação das sequências genômicas representativas de vírus de procariotos encontradas nas amostras de soro de pombos coletados em todas as regiões amostradas.

Bacteriófagos	Nº de reads	Nº de contigs	Tamanho (pb)	E-value
RS_Gravataí	71	2	210 - 536	2,59E-08 - 1,50E-27
RS_Porto Alegre	301	12	165 - 550	3,12E-03 - 8,20E-01
RS_Taquara	48	5	145 - 350	2,24E-01 - 0,0001
RS_São Leopoldo	60	4	289 - 480	4,61E-02 - 1,57E-08
RS_Rio Grande	50	4	255 - 750	3,73E-02 - 3,47E-02
SC_Criciúma	120	7	245 - 800	5,67E-29 - 4,21E-29
PR_Cambará	2.249	15	271 - 2688	4,59E-02 - 4,02E-11

4. CONCLUSÕES

Uma diversidade de genomas virais representando distintas famílias virais foi detectada neste estudo. Nas amostras de soro analisadas, as *reads* virais predominantes foram de circovírus. Em relação aos *contigs*, foram observadas sequências virais de diversas famílias, entre elas, as que abrigam espécies com potencial patogênico para animais e humanos.

Entre as famílias virais identificadas nos soros, 7 genomas completos de PiCV, pertencente a família *Circoviridae*, foram sequenciados. Ainda não havia no Brasil dados sobre a circulação desse vírus em pombos de vida livre. Análises filogenéticas e de recombinação foram realizadas na tentativa de ter uma visão da história evolutiva do PiCV que está circulando na região sul do Brasil, já que dois dos genomas identificados são idênticos e foram obtidos de animais de diferentes regiões. Os dados mostraram que tanto a *Rep* quanto a *Cap* possuem pontos propensos à recombinação, mas que mais genomas completos são necessários para entender a variabilidade do vírus.

Ainda, foram descritos dois genomas completos de girovírus, identificados pela primeira vez em soro de pombos. Esses genomas apresentam identidade de 97% entre si, mas alta variabilidade com relação aos demais girovírus conhecidos; assim sugere-se que seja uma nova espécie: *Pigeon girovírus* (PiGy). Uma análise comparativa dos dois genomas foi feita e mutações foram descritas nas sequências de VP1 e VP2. Na filogenia os genomas agruparam com um girovírus identificado em aves aquáticas marinhas, Ashy storm-petrel gyrovirus, e com GyV8, previamente descrito em gastroenterite em humanos e em um fulmar do norte com ataxia.

Dentre as diferentes famílias virais identificadas no soro dos pombos, vírus com identidade aos gêneros *Hepacivirus* e *Pegivirus* estavam presentes em grande número de sequências em animais capturados no município de São Leopoldo. Essas sequências apresentaram baixa identidade com as referências, podendo se tratar de novas espécies virais. Até o momento não havia relato desse gênero viral circulando em amostras de aves, o que demonstra a importância de estudos desse tipo para oportunizar o conhecimento da diversidade viral que pode existir em nichos até então pouco explorados. Esses dados prévios indicam que os pombos podem atuar como reservatórios de alguns desses vírus, podendo integrar a cadeia epidemiológica de infecções em animais e/ou humanos.

Outros genomas parciais foram identificados nas amostras com relação a famílias virais já descritas. Sequências de bacteriófagos foram identificadas em todas as

amostras. Ainda, muitas sequências não foram identificadas com vírus nos bancos de dados virais, mostrando que podem ser vírus ainda desconhecidos. Esses dados demonstram a importância da caracterização da diversidade viral de pombos, pois permitem conhecer os agentes potencialmente infecciosos e que podem impactar na saúde humana e animal em geral. Maiores estudos precisam ser realizados para avaliar o real impacto que esses vírus identificados no soro dos pombos podem ter em outras espécies animais.

REFERÊNCIAS

- ABD EL-AZIZ, A. S.; ELMOSSALAMI, M. K.; EL-NEKLAWY, E. Bacteriological characteristics of dressed young pigeon (squabs) *Columba livia domesticus*. **Nahrung - Food**, v. 46, n. 1, p. 51–53, 2002.
- BANKEVICH, A. et al. SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. **Journal of Computational Biology**, v. 19, n. 5, p. 455–477, maio 2012.
- BEAN, A. G. D. et al. Studying immunity to zoonotic diseases in the natural host — keeping it real. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 12, p. 851–861, 25 dez. 2013.
- BENCKE, G. A. POMBOS-DOMÉSTICOS Sugestões para o controle em escolas públicas estaduais. http://www.Fzb.Rs.Gov.Br/Upload/20150514114242Pombos_Domesticos.Pdf, p. 23, 2007.
- BEXFIELD, N.; KELLAM, P. Metagenomics and the molecular identification of novel viruses. **The Veterinary Journal**, v. 190, n. 2, p. 191–198, nov. 2011.
- BLINKOVA, O. et al. Novel circular DNA viruses in stool samples of wild-living chimpanzees. **Journal of General Virology**, v. 91, n. 1, p. 74–86, 1 jan. 2010.
- BODEWES, R. Novel viruses in birds: Flying through the roof or is a cage needed? **The Veterinary Journal**, v. 233, n. 3, p. 55–62, mar. 2018.
- BREITBART, M. et al. Genomic analysis of uncultured marine viral communities. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 22, p. 14250–14255, 29 out. 2002.
- CAPOBIANCHI, M. R.; GIOMBINI, E.; ROZERA, G. Next-generation sequencing technology in clinical virology. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 19, n. 1, p. 15–22, jan. 2013.
- CASTRIGNANO, S. B. et al. Two novel circo-like viruses detected in human feces: complete genome sequencing and electron microscopy analysis. **Virus Research**, v. 178, n. 2, p. 364–373, dez. 2013.
- CATROXO, M. et al. Research of Viral Agent in Free-living Pigeon Feces (*Columba livia*) in the City of São Paulo, SP, Brazil, for Transmission Electron Microscopy; Investigación de. **Int. J. Morphol.**, v. 29, n. 2, p. 628–635, 2011.
- CHAN, J. F.-W. et al. Cross-species transmission and emergence of novel viruses from birds. **Current Opinion in Virology**, v. 10, p. 63–69, fev. 2015.
- CHU, D. K. W. et al. Characterization of a novel gyrovirus in human stool and chicken meat. **Journal of Clinical Virology**, v. 55, n. 3, p. 209–213, nov. 2012.
- CORMAN, V. M. et al. Highly Divergent Hepaciviruses from African Cattle. **Journal of Virology**, v. 89, n. 11, p. 5876–5882, 1 jun. 2015.
- DAY, J. M. et al. Comparative Analysis of the Intestinal Bacterial and RNA Viral Communities from Sentinel Birds Placed on Selected Broiler Chicken Farms. **PLOS ONE**, v. 10, n. 1, p. e0117210, 30 jan. 2015.
- DE SALES LIMA, F. E. et al. Genomic characterization of novel circular ssDNA

- viruses from insectivorous bats in Southern Brazil. **PLoS ONE**, v. 10, n. 2, p. 1–11, 2015.
- DEAN, F. B. Rapid Amplification of Plasmid and Phage DNA Using Phi29 DNA Polymerase and Multiply-Primed Rolling Circle Amplification. **Genome Research**, v. 11, n. 6, p. 1095–1099, 1 jun. 2001.
- DELWART, E. L. Viral metagenomics. **Reviews in Medical Virology**, v. 17, n. 2, p. 115–131, mar. 2007.
- 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. 114–121, 2012.
- DINSDALE, E. A. et al. Functional metagenomic profiling of nine biomes. **Nature**, v. 452, n. 7187, p. 629–632, 2008.
- DUTILH, B. E. et al. Editorial: Virus Discovery by Metagenomics: The (Im)possibilities. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. September, p. 1–3, 8 set. 2017.
- EDWARDS R.A. AND ROHWER F. Viral metagenomics. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 6, p. 504–510, 2005.
- 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, n. 11–12, p. 509–512, 17 dez. 2015.
- ESPERÓN, F. et al. Seroprevalence of paramyxoviruses in synanthropic and semi-free-range birds. **Avian diseases**, v. 58, n. 2, p. 306–8, jun. 2014.
- FANG, L. et al. Genetic Analysis of Two Chicken Infectious Anemia Virus Variants-Related Gyrovirus in Stray Mice and Dogs: The First Report in China, 2015. **BioMed Research International**, v. 2017, p. 1–9, 2017.
- FAROOQ, S. et al. Isolation of atypical enteropathogenic Escherichia coli and Shiga toxin 1 and 2f-producing Escherichia coli from avian species in India. **Letters in Applied Microbiology**, v. 48, n. 6, p. 692–697, 2009.
- FIRTH, C. et al. Detection of Zoonotic Pathogens and Characterization of Novel Viruses Carried by Commensal Rattus norvegicus in New York City. **mBio**, v. 5, n. 5, 2014.
- FONTOURA, P. M. et al. Espécies de aves não nativas no Brasil. **Neotropical Biology and Conservation**, v. 8, n. 3, p. 165–175, 14 ago. 2013.
- FREICK, M.; MÜLLER, H.; RAUE, R. Rapid detection of pigeon herpesvirus, fowl adenovirus and pigeon circovirus in young racing pigeons by multiplex PCR. **Journal of virological methods**, v. 148, n. 1–2, p. 226–31, mar. 2008.
- GARGIULO, A. et al. Occurrence of Enteropathogenic Bacteria in Urban Pigeons (*Columba livia*) in Italy. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 14, n. 4, p. 251–255, 2014.
- GEOGHEGAN, J. L.; DUCHÊNE, S.; HOLMES, E. C. Comparative analysis estimates the relative frequencies of co-divergence and cross-species transmission within viral families. **PLOS Pathogens**, v. 13, n. 2, p. e1006215, 8 fev. 2017.
- GOLDBERG, T. L. et al. Severe neurologic disease and chick mortality in crested

- screamers (*Chauna torquata*) infected with a novel Gyrovirus. **Virology**, v. 520, n. May, p. 111–115, 2018a.
- GOLDBERG, T. L. et al. Severe neurologic disease and chick mortality in crested screamers (*Chauna torquata*) infected with a novel Gyrovirus. **Virology**, v. 520, n. May, p. 111–115, jul. 2018b.
- GUO, Z. et al. Identification and genomic characterization of a novel CRESS DNA virus from a calf with severe hemorrhagic enteritis in China. **Virus Research**, v. 255, n. 16, p. 141–146, ago. 2018.
- HAAG-WACKERNAGEL, D.; MOCH, H. Health hazards posed by feral pigeons. **Journal of Infection**, v. 48, n. 4, p. 307–313, 2004.
- HARLIN, R.; WADE, L. Bacterial and Parasitic Diseases of Columbiformes. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, v. 12, n. 3, p. 453–473, set. 2009.
- HARTLAGE, A. S.; CULLEN, J. M.; KAPOOR, A. The Strange, Expanding World of Animal Hepaciviruses. **Annual Review of Virology**, v. 3, n. 1, p. 53–75, 29 set. 2016.
- HENN, M. R. et al. Analysis of High-Throughput Sequencing and Annotation Strategies for Phage Genomes. **PLoS ONE**, v. 5, n. 2, p. e9083, 5 fev. 2010.
- HU, D. et al. Virome analysis for identification of novel mammalian viruses in bats from Southeast China. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 10917, 7 dez. 2017.
- HURT, A. C. et al. Evidence for the Introduction, Reassortment, and Persistence of Diverse Influenza A Viruses in Antarctica. **Journal of Virology**, v. 90, n. 21, p. 9674–9682, 2016.
- JONES, K.E.; PATEL, N.G.; LEVY, M.A.; STOREYGARD, A.; BALK, D.; GITTLEMAN, J.L.; DASZAK, P. Global trends in emerging infectious diseases. **Nature**, v. 451, n. 7181, p. 990–993, 21 fev. 2008.
- KAPGATE, S. S. et al. Avian parvovirus: classification, phylogeny, pathogenesis and diagnosis. **Avian Pathology**, v. 47, n. 6, p. 536–545, 2018.
- KAPOOR, A. et al. Characterization of a canine homolog of hepatitis C virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 28, p. 11608–11613, 12 jul. 2011.
- KRISTENSEN, D. M. et al. New dimensions of the virus world discovered through metagenomics. **Trends in Microbiology**, v. 18, n. 1, p. 11–19, 2010.
- LASKEN, R. S. Genomic DNA amplification by the multiple displacement amplification (MDA) method: Figure 1. **Biochemical Society Transactions**, v. 37, n. 2, p. 450–453, 2009.
- LI, G. et al. Emergence of gyrovirus 3 in commercial broiler chickens with transmissible viral proventriculitis. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 65, n. 5, p. 1170–1174, out. 2018.
- LI, L. et al. A gyrovirus infecting a sea bird. **Archives of Virology**, v. 160, n. 8, p. 2105–2109, 4 ago. 2015.
- LILLEHAUG, A. et al. Screening of Feral Pigeon (*Colomba livia*), Mallard (*Anas platyrhynchos*) and Graylag Goose (*Anser anser*) Populations for *Campylobacter* spp

- ., *Salmonella* spp ., *Avian Influenza Virus and Avian*. v. 46, n. 4, p. 193–202, 2005.
- LIMA, D. A. et al. Faecal virome of healthy chickens reveals a large diversity of the eukaryote viral community, including novel circular ssDNA viruses. **Journal of General Virology**, v. 98, n. 4, p. 690–703, 1 abr. 2017.
- LIMA, D. A. et al. The intestinal virome of malabsorption syndrome-affected and unaffected broilers through shotgun metagenomics. **Virus Research**, v. 261, n. August 2018, p. 9–20, fev. 2019.
- LOIKO, M. R. et al. Columbidae circoviruses detected in free ranging pigeons from Southern Brazil: insights on PiCV evolution. **Archives of virology**, v. 163, n. 11, p. 3083–3090, 13 nov. 2018.
- MACKENZIE, J. S.; JEGGO, M. Reservoirs and vectors of emerging viruses. **Current Opinion in Virology**, v. 3, n. 2, p. 170–179, 2013.
- MARDIS, E. R. DNA sequencing technologies: 2006–2016. **Nature Protocols**, v. 12, n. 2, p. 213–218, 5 jan. 2017.
- MARLIER, D.; VINDEVOGEL, H. Viral infections in pigeons. **Veterinary Journal**, v. 172, n. 1, p. 40–51, 2006.
- MCFERRAN, J.B. & SMYTH, J. A. Avian Adenoviruses. In: **Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.** Ames, Iowa, USA: Blackwell Publishing Professional, 2000. v. 19p. 589–601.
- MCGEOCH, D.J.; GATHERER, D. Integrating Reptilian Herpesviruses into the Family Herpesviridae. **Journal of Virology**, v. 79, n. 2, p. 425–731, 2005.
- METZKER, M. L. Sequencing technologies — the next generation. **Nature Reviews Genetics**, v. 11, n. 1, p. 31–46, 8 jan. 2010.
- MIKHEENKO, A.; SAVELIEV, V.; GUREVICH, A. MetaQUAST: evaluation of metagenome assemblies. **Bioinformatics**, v. 32, n. 7, p. 1088–1090, 1 abr. 2016.
- MOKILI, J. L.; ROHWER, F.; DUTILH, B. E. Metagenomics and future perspectives in virus discovery. **Current Opinion in Virology**, v. 2, n. 1, p. 63–77, 2012.
- MONTASSIER, M. F. S. et al. Detecção De Coronavírus Em Aves Silvestres Da Região Nordeste Do Estado De São Paulo, Brasil, Por Técnicas Moleculares De Rt-Pcr E Nested-Pcr / Detection of Coronavirus By Rt-Pcr and Nested-Pcr in Wild Birds From Northeastern São Paulo State, Brazil. **Ars Veterinaria**, v. 29, n. 4, p. 13, 2013.
- MORABITO, S. et al. Detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in feral pigeons. **Veterinary Microbiology**, v. 82, n. 3, p. 275–283, 2001.
- MORSE, S. S. et al. Prediction and prevention of the next pandemic zoonosis. **The Lancet**, v. 380, n. 9857, p. 1956–1965, dez. 2012.
- MOUSTAFA, A. et al. The blood DNA virome in 8,000 humans. **PLOS Pathogens**, v. 13, n. 3, p. e1006292, 22 mar. 2017.
- MUHIRE, B. M.; VARSANI, A.; MARTIN, D. P. SDT: A Virus Classification Tool Based on Pairwise Sequence Alignment and Identity Calculation. **PLoS ONE**, v. 9, n. 9, p. e108277, 26 set. 2014.
- MURRAY, K. O.; WALKER, C.; GOULD, E. The virology, epidemiology, and clinical impact of West Nile virus: a decade of advancements in research since its introduction

- into the Western Hemisphere. **Epidemiology and Infection**, v. 139, n. 06, p. 807–817, 23 jun. 2011.
- NUNES, J. R. DA S.; MIRANDA, D. B. Aspectos biológicos de *Columba livia domestica* (Columbiformes, Columbidae) no Campus da Universidade de Cuiabá-UNIC, Cuiabá-MT. **UniCiências**, v. 14, n. 1, p. 113–133, 2010.
- NUNES, V. F. P. Pombos Urbanos : O Desafio De Controle. **Instituto biológico de São Paulo**, v. 65, p. 89–92, 2003.
- NURK S, MELESHKO D, KOROBAYNIKOV A, P. P. metaSPAdes: a new versatile metagenomics assembler Sergey. **Genome Res.**, v. 1, n. 27, p. 30–47, 2017.
- OLIVAL, K. J. et al. Host and viral traits predict zoonotic spillover from mammals. **Nature**, v. 546, n. 7660, p. 646–650, 21 jun. 2017.
- PESTKA, D.; STENZEL, T.; KONCICKI, A. Occurrence, characteristics and control of pigeon paramyxovirus type 1 in pigeons. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 17, n. 2, p. 379–384, 2014.
- PFAENDER, S. et al. Natural reservoirs for homologs of hepatitis C virus. **Emerging Microbes & Infections**, v. 3, n. 1, p. 1–9, 25 jan. 2014.
- PHAN, T. G. et al. A third gyrovirus species in human faeces. **Journal of General Virology**, v. 93, n. Pt_6, p. 1356–1361, 1 jun. 2012.
- PHAN, T. G. et al. The Viruses of Wild Pigeon Droppings. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, p. e72787, 4 set. 2013.
- PHAN, T. G. et al. A new gyrovirus in human feces. **Virus Genes**, v. 51, n. 1, p. 132–135, 27 ago. 2015.
- PHILADELPHO, N. A. et al. Survey of bornaviruses in pet psittacines in Brazil reveals a novel parrot bornavirus. **Veterinary Microbiology**, v. 174, n. 3–4, p. 584–590, dez. 2014.
- PLOURDE, B. T. et al. Are disease reservoirs special? Taxonomic and life history characteristics. **PloS one**, v. 12, n. 7, p. e0180716, 13 jul. 2017.
- PLOWRIGHT, R. K. et al. Pathways to zoonotic spillover. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 8, p. 502–510, 30 maio 2017.
- RAMÍREZ-MARTÍNEZ, L. A. et al. Fecal virome composition of migratory wild duck species. **PLOS ONE**, v. 13, n. 11, p. e0206970, 21 nov. 2018.
- REED, K.D.; MEECE, J.K.; HENKEL, J.S.; SHUKLA, S. K. Birds, Migration and Emerging Zoonoses: West Nile Virus, Lyme Disease, Influenza A and Enteropathogens. **Journal of Chemical Ecology**, v. 1, n. 1, p. 5–12, 17 set. 2002.
- REOLON, A., L. Prevalência de *Cryptococcus neoformans* nos *Cryptococcus uniguttulatus* and *Debaryomyces pombos urbanos* nas cidades do Rio Grande do hansenii. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 40, p. 293–298, 2004.
- REYES, A. et al. Going viral: next-generation sequencing applied to phage populations in the human gut. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 9, p. 607–617, 6 set. 2012.
- RIESENFELD, C. S.; SCHLOSS, P. D.; HANDELSMAN, J. Metagenomics: Genomic Analysis of Microbial Communities. **Annual Review of Genetics**, v. 38, n. 1, p. 525–

552, 2004.

RIJSEWIJK, F. A. M. et al. Discovery of a genome of a distant relative of chicken anemia virus reveals a new member of the genus Gyrovirus. **Archives of Virology**, v. 156, n. 6, p. 1097–1100, 2011a.

RIJSEWIJK, F. A. M. et al. Discovery of a genome of a distant relative of chicken anemia virus reveals a new member of the genus Gyrovirus. **Archives of Virology**, v. 156, n. 6, p. 1097–1100, 26 jun. 2011b.

ROCHA-E-SILVA, R. C. DA et al. O pombo (*Columba livia*) como agente carreador de *Salmonella* spp. e as implicações em saúde pública. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 81, n. 2, p. 189–194, 2014.

ROSARIO, K. et al. Metagenomic analysis of viruses in reclaimed water. **Environmental Microbiology**, v. 11, n. 11, p. 2806–2820, 2009.

ROSARIO, K.; DUFFY, S.; BREITBART, M. A field guide to eukaryotic circular single-stranded DNA viruses: Insights gained from metagenomics. **Archives of Virology**, v. 157, n. 10, p. 1851–1871, 2012.

SAIKI, R. K. et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science (New York, N.Y.)**, v. 239, n. 4839, p. 487–91, 29 jan. 1988.

SAMBROOK, J. AND RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning - A laboratory Manual**. Third Edit ed. [s.l: s.n.].

SANGER, F. et al. The nucleotide sequence of bacteriophage ϕ X174. **Journal of Molecular Biology**, v. 125, n. 2, p. 225–246, out. 1978.

SCHEEL, T. K. H. et al. Characterization of nonprimate hepacivirus and construction of a functional molecular clone. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 7, p. 2192–2197, 17 fev. 2015.

SCHOLZ, M. B.; LO, C.-C.; CHAIN, P. S. Next generation sequencing and bioinformatic bottlenecks: the current state of metagenomic data analysis. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, n. 1, p. 9–15, fev. 2012.

SEABRA, E. C. M. & OLIVEIRA, E. Implicações da Saúde Humana e Ambiental decorrentes da presença de Pombos no ambiente Urbano. **Revista Científica Multidisciplinar Núcleo do conhecimento**, v. 2, n. 1, p. 106–128, 2016.

SHAN, T. et al. The Fecal Virome of Pigs on a High-Density Farm. **Journal of Virology**, v. 85, n. 22, p. 11697–11708, 15 nov. 2011.

SHI, M. et al. Divergent Viruses Discovered in Arthropods and Vertebrates Revise the Evolutionary History of the Flaviviridae and Related Viruses. **Journal of Virology**, v. 90, n. 2, p. 659–669, 15 jan. 2016.

SMITH, D. B. et al. Proposed update to the taxonomy of the genera Hepacivirus and Pegivirus within the Flaviviridae family. **Journal of General Virology**, v. 97, n. 11, p. 2894–2907, 10 nov. 2016.

SMITS, S. L. et al. Recovering full-length viral genomes from metagenomes. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. OCT, p. 1–8, 1 out. 2015.

STAPLETON, J. T. GB Virus Type C (GBV-C), Alternative Denomination Hepatitis G

- Virus (HGV). **Transfusion Medicine and Hemotherapy**, v. 32, n. 3–4, p. 128–131, 2005.
- STEEL, O. et al. Circular replication-associated protein encoding DNA viruses identified in the faecal matter of various animals in New Zealand. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 43, p. 151–164, set. 2016.
- STENZEL, T. et al. Antimicrobial resistance in bacteria isolated from pigeons in Poland. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 17, n. 1, p. 169–171, 2014.
- TAKAHASHI, K. Y. IWASA, M. HIJIKATA, AND S. M. Identification of a new human DNA virus (TTV-like mini virus, TLMV) intermediately related to TT virus and chicken anemia virus. **Archives of Virology**, v. 145, p. 979–993, nov. 2000.
- TAMURA, K. et al. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725–2729, 2013.
- TEMMAM, S. et al. Viral Metagenomics on Animals as a Tool for the Detection of Zoonoses Prior to Human Infection? **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 6, p. 10377–10397, 10 jun. 2014.
- TEMMAM, S. et al. Host-Associated Metagenomics: A Guide to Generating Infectious RNA Viromes. **PLOS ONE**, v. 10, n. 10, p. e0139810, 2 out. 2015.
- THÉZÉ, J. et al. Evolutionary and phylogenetic analysis of the hepaciviruses and pegiviruses. **Genome Biology and Evolution**, v. 7, n. 11, p. 2996–3008, 2015.
- TIZARD, I. Salmonellosis in wild birds. **Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine**, v. 13, n. 2, p. 50–66, abr. 2004.
- TODD, D. et al. Genome sequence determinations and analyses of novel circoviruses from goose and pigeon. **Virology**, v. 286, n. 2, p. 354–362, 2001.
- TODD, D. et al. Sequence comparison of pigeon circoviruses. **Research in Veterinary Science**, v. 84, n. 2, p. 311–319, 2008.
- VÁZQUEZ, B. et al. Screening for several potential pathogens in feral pigeons (*Columba livia*) in Madrid. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 52, n. 1, p. 1–6, 2010.
- WAITS, K. et al. Genome Sequence of a Gyrovirus Associated with Ashy Storm-Petrel. **Microbiology Resource Announcements**, v. 7, n. 11, p. 1–3, 2018.
- WASHBURNE, A. D. et al. Taxonomic patterns in the zoonotic potential of mammalian viruses. **PeerJ**, v. 6, p. e5979, 28 nov. 2018.
- WEBER, M. N. et al. Characterization of dog serum virome from Northeastern Brazil. **Virology**, v. 525, n. August, p. 192–199, dez. 2018.
- WOO, P. C. Y. et al. Discovery of Seven Novel Mammalian and Avian Coronaviruses in the Genus Deltacoronavirus Supports Bat Coronaviruses as the Gene Source of Alphacoronavirus and Betacoronavirus and Avian Coronaviruses as the Gene Source of Gammacoronavirus and Deltacoronavi. **Journal of Virology**, v. 86, n. 7, p. 3995–4008, 1 abr. 2012.
- WOODS, L. W. et al. A retrospective study of circovirus infection in pigeons: nine cases (1986-1993). **J Vet Diagn Invest**, v. 6, n. 2, p. 156–164, 1994.
- XIE, G. C.; YU, J. M.; DUAN, Z. J. New strategy for virus discovery: Viruses identified in human feces in the last decade. **Science China Life Sciences**, v. 56, n. 8, p.

688–696, 2013.

YAMAMOTO, E. et al. Complete genome sequence of pigeon circovirus detected in racing pigeons in western Japan. **Virus Genes**, v. 51, n. 1, p. 140–143, 2015.

YAO, S. et al. Novel characteristics of the avian gyrovirus 2 genome. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1–10, 2017.

ZHANG, L. et al. Characterization of the first columbid herpesvirus 1 isolate from a hybrid meat-type pigeon flock in China. **Archives of Virology**, v. 160, n. 2, p. 459–464, 9 fev. 2015.

ZHANG, W. et al. What is for dinner? Viral metagenomics of US store bought beef, pork, and chicken. **Virology**, v. 468–470, p. 303–310, nov. 2014.

ZHAO, L. et al. Metagenomic Analysis of the Jinding Duck Fecal Virome. **Current Microbiology**, v. 75, n. 6, p. 658–665, 24 jun. 2018.