



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

LEONARDO CARDIA CASERTA

**INVESTIGATION OF THE MICROBIOME AND OCCURRENCE
OF ZOO NOTIC PATHOGENS IN *DIDELPHIS* OPOSSUMS FROM
FOREST FRAGMENTS IN THE REGION OF CAMPINAS - SP**

**INVESTIGAÇÃO DO MICROBIOMA E OCORRÊNCIA DE
PATÓGENOS ZONÓTICOS EM GAMBÁS *DIDELPHIS* DE
FRAGMENTOS FLORESTAIS DA REGIÃO DE CAMPINAS – SP**

CAMPINAS

2019

LEONARDO CARDIA CASERTA

**INVESTIGATION OF THE MICROBIOME AND OCCURRENCE
OF ZOONOTIC PATHOGENS IN *DIDELPHIS* OPOSSUMS FROM
FOREST FRAGMENTS IN THE REGION OF CAMPINAS - SP**

**INVESTIGAÇÃO DO MICROBIOMA E OCORRÊNCIA DE
PATÓGENOS ZOONÓTICOS EM GAMBÁS *DIDELPHIS* DE
FRAGMENTOS FLORESTAIS DA REGIÃO DE CAMPINAS – SP**

*Thesis presented to the Institute of Biology of the
University of Campinas in partial fulfillment of the
requirements for the degree of Doctor in Genetics
and Molecular Biology, in the area of
Microbiology*

*Tese apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas como parte
dos requisitos exigidos para a obtenção do título de
Doutor em Genética e Biologia Molecular, na área
de Microbiologia*

Este arquivo digital corresponde à versão
final da Tese defendida pelo
aluno Leonardo Cardia Caserta e orientada pela
Profa. Dra. Clarice Weis Arns.

Orientadora: CLARICE WEIS ARNS

CAMPINAS

2019

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

C268i Caserta, Leonardo Cardia, 1988-
Investigação do microbioma e ocorrência de patógenos zoonóticos em gambás *Didelphis* de fragmentos florestais da região de Campinas - SP / Leonardo Cardia Caserta. – Campinas, SP : [s.n.], 2019.

Orientador: Clarice Weis Arns.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Metagenômica. 2. *Didelphis*. 3. Zoonoses. 4. Gambá. I. Arns, Clarice Weis, 1956-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Investigation of the microbiome and occurrence of zoonotic pathogens in *Didelphis* opossums from forest fragments in the region of Campinas - SP

Palavras-chave em inglês:

Metagenomics

Didelphis

Zoonoses

Opossums

Área de concentração: Microbiologia

Titulação: Doutor em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Clarice Weis Arns [Orientador]

José Luiz Proença Modena

Marcelo Lancellotti

Paulo Vitor Marques Simas

Paulo Anselmo Nunes Felipe

Data de defesa: 03-07-2019

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0003-1643-8560>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/5313147235845931>

Campinas, 03/07/2019

Comissão examinadora

Profa. Dra. Clarice Weis Arns

Prof. Dr. José Luiz Proença Modena

Prof. Dr. Marcelo Lancellotti

Prof. Dr. Paulo Anselmo Nunes Felipe

Dr. Paulo Vitor Marques Simas

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno

Dedicatória

Ao meu avô Nelson Caserta

Por sua vida dedicada ao amor pela minha avó, filhos, netos e bisnetos.

Agradecimentos

À minha família: Meus pais Nelson e Norma, minha irmã Giovanna, meu cunhado Henrique, minha sobrinha Nina e minha esposa Karina, por todo amor e apoio

À minha orientadora Clarice Arns, por toda oportunidade que me foi dada nos últimos sete anos

Aos meus colegas Raphael e Gabriela, pela ajuda nas coletas de amostras

À Fundação José Pedro de Oliveira e toda a equipe da Mata Santa genebra, principalmente Thomaz Barrella pelo apoio nos procedimentos de captura. Juntamente, também agradeço ao Dr. Paulo Anselmo por possibilitar o início das atividades do projeto e pelo fornecimento de materiais para capturas

Profa. Dra. Helena Lage Ferreira pelo empréstimo de reagentes e materiais para o preparo das bibliotecas.

Douglas Paixão, Emerson Gomes e CTBE/CNPEM pelo auxílio no preparo das bibliotecas e utilização do Miseq.

Ao CNPq (processo nº 154978/2016-7) pela bolsa de doutorado e reserva técnica, FAPESP (projeto temático nº 2014/50696-4) por financiar a compra de equipamentos e reagentes e CAPES pelo repasse de recursos ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular.

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

Resumo

A composição da diversidade bacteriana e viral de mamíferos é modelada por diversas características intrínsecas e extrínsecas que influenciam a relação patógeno-hospedeiro. Identificar espécies reservatórios naturais e quais características estão associadas à ocorrência de patógenos são essenciais para o controle de doenças infecciosas emergentes. A biodiversidade encontrada no Brasil representa um potencial para a emergência de novas zoonoses. Marsupiais do gênero *Didelphis* estão amplamente distribuídos pelo continente americano e as espécies *Didelphis albiventris* e *Didelphis aurita* ocorrem nas áreas mais populosas do Brasil e são comuns em toda sua área de distribuição. Adaptam-se à uma variedade de habitats, incluindo grandes centros urbanos e florestas secundárias modificadas pela ação humana. No entanto, seus potenciais como hospedeiros de patógenos zoonóticos ainda não foram profundamente estudados. O objetivo deste trabalho foi realizar um estudo metagenômico focando em amostras de duas espécies de gambás capturados em três fragmentos florestais da região de Campinas, através de sequenciamento de nova geração. O microbioma basal de swabs orais e anais obtidos de gambás saudáveis é descrita e a ocorrência de patógenos zoonóticos que podem ser alvos para pesquisas epidemiológicas futuras também é discutida. Foram observadas diferenças entre a composição do microbioma oral e anal, com microbiomas do mesmo tipo de amostras mais similares entre si independentemente da espécie e local de coleta. Swabs orais apresentaram uma maior diversidade bacteriana. Também foram detectadas sequências relacionadas a patógenos zoonóticos, incluindo *Campylobacter*, *Salmonella*, *Burkholderia*, *Chlamydia* e *Hepacivirus*. Alguns patógenos foram detectados somente em uma espécie de gambá ou somente em um local de coleta, sugerindo que fatores extrínsecos podem contribuir para a ocorrência destes patógenos, mas fatores intrínsecos como dieta e filogenia também podem explicar os padrões observados. Hepacivirus C foi detectado em todas as amostras, sugerindo que gambás didelfídeos são possíveis hospedeiros deste vírus zoonótico. A detecção de patógenos zoonóticos em espécies comuns como gambás alerta para a possibilidade de emergência de doenças em outras espécies, incluindo humanos, especialmente quando seus nichos ecológicos se sobrepõem naturalmente ou devido à fragmentação. Investigações futuras podem abordar a relação entre os padrões de ocorrência de patógenos e fatores extrínsecos como as características ambientais.

Abstract

Mammalian wildlife gut bacterial and viral diversity composition are shaped by numerous host traits and environmental factors influencing host–pathogen relationships. Identifying natural reservoir species and characterizing which traits are associated with pathogens occurrence are key to control emerging infectious diseases. The biodiversity found in Brazil is a potential for the emergence of new zoonoses. Marsupials of the *Didelphis* genus are widely distributed in the American Continent and the species *Didelphis albiventris* and *Didelphis aurita* occur in the most populated areas of Brazil and are common in all of their area of distribution. They adapt to a broad variety of habitats, including great urban centers and secondary forests modified by human action. However, their potential as zoonotic pathogens hosts has not been deeply studied yet. Here we describe a metagenomic study that focused on samples from opossums representing two species captured in three forest fragments in the region of Campinas, State of São Paulo, Brazil, using high throughput sequencing. The baseline microbiome of oral and anal swabs of healthy opossums is described in this article. We also discuss the occurrence of zoonotic pathogens that can be targets for future epidemiological surveys. Differences between oral and gut microbiomes composition were observed, with microbiomes from the same body site being more similar across species and sampling sites. Oral swabs presented higher bacterial diversity than anal swabs. At species level, we also detected sequences related to zoonotic pathogens, including *Campylobacter*, *Salmonella*, *Burkholderia*, *Chlamydia* and *Hepacivirus*. Some pathogen species were assigned only to one opossum specie or only one sampling site, suggesting that extrinsic factors may contribute at some level to the occurrence of these pathogens but intrinsic factors such as diet and phylogeny can also explain the patterns observed. Hepacivirus C was detected in all of the samples, suggesting that didelphid opossums are possible hosts for this zoonotic virus and can also be competent hosts for other viruses from the *Flaviviridae* family. The detection of zoonotic pathogens in such abundant species warns for the possibility of emergence in other species including humans, specially when their habitats overlap naturally or due to the fragmentation. Further investigations could address the relation between these patterns and extrinsic factors such as environmental characteristics.

Sumário

1. Introdução	10
2. Objetivos.....	17
3. Artigo científico.....	18
4. Conclusões	38
5. Referências bibliográficas	40
6. Apêndices.....	51
6.1. Tabela de espécies de bactérias representando pelo menos 0,1 % das sequências classificadas	51
6.2. Tabela de espécies de vírus contendo um total de no mínimo 5 <i>reads</i>	55
6.3. Resultados paralelos	58
6.3.1. Sequenciamento completo do genoma de um isolado brasileiro do vírus da laringotraqueíte infecciosa (ILTV)	59
6.3.2. Detecção metagenômica de sequências relacionadas a Herpesvirus humanos em uma amostra de morcego <i>Molossus molossus</i>	60
6.4. Coautoria de artigos científicos publicados durante o doutorado	61
7. Anexos	62
7.1. Autorização SISBIO para atividades envolvendo fauna silvestre	62
7.2. Declaração de direitos autorais.....	67

1. Introdução

Mais de dois terços dos patógenos humanos emergentes são de origem zoonótica, e entre esses, mais de 70% são originários de animais silvestres (One health initiative). Em novos ambientes, os vírus, particularmente os de genoma RNA, podem facilmente cruzar a barreira da espécie através de mutações, recombinações ou ressortimentos de seu material genético, resultando na capacidade de infectar novos hospedeiros. Devido a suas habilidades adaptativas, vírus de genoma RNA representam mais de 70% dos que infectam humanos (Woolhouse, 2012).

Patógenos emergentes possuem tipicamente uma ampla variedade de hospedeiros, geralmente excedendo diversas ordens de mamíferos (Woolhouse, 2005). A transmissão de uma doença a uma população humana ou animal sem um nível pré-existente de imunidade adquirida resulta em casos mais numerosos e potencialmente mais graves. Muitas dessas infecções podem ser os resultados da urbanização e desenvolvimento da agricultura (Howard, 2012). A elevação da temperatura global, por exemplo, expande a ocorrência de doenças causadas por vetores para latitudes e altitudes mais elevadas (Ooi et al, 2009).

O desmatamento tem aumentado exponencialmente desde o começo do século vinte e resulta em um efeito profundo nos ecossistemas locais, reduzindo a capacidade de controle natural de roedores, insetos e outros possíveis carreadores de doenças infecciosas. A redução da biodiversidade pode levar à invasão e propagação de espécies oportunistas facilitando a emergência de doenças através do aumento do contato com populações humanas locais. (Patz et al., 2004). A transmissão entre espécies pode ocorrer em ambas as direções. Pesquisas em florestas da África demonstraram que humanos e chimpanzés compartilharam uma microbiota geneticamente semelhante em áreas onde seus territórios se sobrepõem, indicando uma troca de bactérias entre primatas humanos e não-humanos mesmo quando não houve contato direto envolvido (Nizeyi et al., 2001) A fragmentação de florestas também aumenta a transmissão de bactérias entre primatas e humanos e seus animais domésticos, considerando que o nível de interferência nos fragmentos florestais correlacionou-se positivamente com a similaridade genética bacteriana entre primatas e humanos (Goldberg et al., 2008)

A chance de patógenos se adaptarem a outras espécies de animais aumenta com a expansão e sobreposição de territórios. A mudança para um novo hospedeiro pode ter consequências importantes do ponto de vista evolutivo do vírus, já que sua adaptação pode

estimular o desenvolvimento de novos fenótipos e assim a expansão para novos nichos ecológicos.

A atividade humana tem alterado a distribuição e abundância de muitas espécies. Consequentemente, a distribuição e abundância de patógenos e parasitas que estas espécies hospedam também podem ser alteradas (Voutilainen, 2012). Com a alteração da população de hospedeiros, a taxa de contato intraespecífico pode ser afetada. No caso de pequenos mamíferos, a perturbação do habitat pode alterar a riqueza de espécies, influenciando a taxa de contato intraespecífico e consequentemente a transmissão. O aumento do contato interespecífico também pode ser uma consequência da redução do habitat natural de algumas espécies. (Dearing, 2010).

Locais que possuem um potencial para a emergência de doenças podem ser previstos a partir de padrões na mudança do uso da terra e sua biodiversidade subjacente. Essas áreas devem ser alvos para a vigilância de patógenos endêmicos de animais silvestres que têm o potencial para a mudança de espécie de hospedeiro. Preservar e proteger habitats intactos nesses locais pode ser uma maneira simples e direta de reduzir o contato humano-animal e assim reduzir a probabilidade da emergência de novos patógenos (Wolfe et al., 2005).

Jones et al., (2008), sugerem a hipótese de que fatores socioeconômicos como densidade populacional humana e práticas agrícolas são importantes determinantes da distribuição espacial de doenças infecciosas emergentes, além de condições ecológicas e ambientais que podem afetar de forma geral a distribuição de patógenos mas, em particular, sugerem que a emergência de doenças zoonóticas com origem em animais silvestres está significativamente correlacionada com a biodiversidade. Os mesmos autores defendem a re-alocação de recursos para uma vigilância mais eficiente de doenças emergentes em latitudes mais baixas como a África tropical, América Latina e Ásia e sugerem que esforços para a conservação de áreas ricas em biodiversidade, pela redução da atividade antropogênica, possuem um grande valor na redução da probabilidade da emergência futura de doenças zoonóticas.

Recentemente, tem-se observado uma correlação entre a perda de biodiversidade e um aumento na tendência de transmissão de patógenos e incidência de doenças. Este padrão ocorre através de sistemas ecológicos que variam no tipo de patógeno, hospedeiro, ecossistema e modo de transmissão (Keesing et al., 2010). Como exemplo, foi detectada uma forte correlação entre a baixa diversidade de aves e uma maior incidência de Vírus do oeste do Nilo (WNV) nos Estados Unidos (Swaddle & Calos, 2008). Para a síndrome pulmonar por hantavírus (HPS),

estudos experimentais de correlação têm mostrado que uma baixa diversidade de pequenos mamíferos aumenta a prevalência de hantavírus em seus hospedeiros, aumentando dessa forma o risco para humanos (Suza et al., 2009).

Um mecanismo que claramente pode aumentar a transmissão é a redução da predação e competição sobre o hospedeiro reservatório, consequentemente aumentando sua densidade populacional. No caso de patógenos para os quais a transmissão é uma função da densidade de hospedeiros, a perda de biodiversidade pode mais provavelmente aumentar a transmissão se essa perda causa um aumento na densidade dos hospedeiros competentes (Keesing et al., 2010). Opostamente, em uma análise recente, a probabilidade da emergência de patógenos de animais silvestres para humanos foi positivamente correlacionada com a riqueza de espécies de mamíferos (Jones et al., 2008). A grande biodiversidade encontrada no Brasil é um potencial para a emergência de novas zoonoses assim como a invasão de populações humanas em regiões previamente inabitadas. Áreas florestadas no Brasil estão sendo constantemente desmatadas para a construção civil e uso para agricultura, aumentando assim o contato entre humanos e animais silvestres (Jansen et al., 2012). Mais de 80% da mata atlântica remanescente existe na forma de fragmentos menores que 50 hectares e isolados entre si, compostos por florestas secundárias (Ribeiro et al., 2009)

Wolfe et al. e Karesh et al., (2012) , descreveram os estágios na transição de um agente infeccioso estritamente animal para humanos. Se o patógeno é capaz de se adaptar ao hospedeiro humano e adquirir os meios para alcançar a transmissão inter-humana, a transmissão horizontal de humano para humano ocorre e mantém o ciclo viral. Em alguns casos, um hospedeiro intermediário como um animal doméstico, pode ser a ligação entre a circulação viral silvestre e a circulação viral humana. Como exemplo, algumas infecções humanas originárias de morcegos como Nipah, Hendra, SARS e Ebola podem envolver uma amplificação intermediária em hospedeiros como porcos, cavalos, civetas e primatas, respectivamente (Wong et al., 2007). A adaptação do HIV a partir do SIV (vírus da imunodeficiência símia) é o principal exemplo de transmissão rara da vida silvestre para humanos seguida de adaptação ao hospedeiro humano e manutenção do ciclo viral. Um segundo padrão envolve muitas transmissões de animais para humanos, possivelmente mediada por artrópodes e transmissões horizontais raras entre humanos. Um exemplo desse segundo padrão de transmissão é o WNV, para o qual o ciclo viral envolve aves silvestres, mosquitos e raramente cavalos e humanos, que são os hospedeiros acidentais (Trevejo et al, 2008). Quando patógenos são compartilhados entre espécies de animais cujos territórios se sobrepõem geograficamente, consequentemente a

possibilidade de transmissão aumenta em função da quantidade de hospedeiros que ocupam o mesmo espaço e também em função da diversidade de patógenos encontradas nos hospedeiros. As consequências da transmissão para um novo hospedeiro podem variar. A infecção pode ser transitória (comumente referida pelo termo “spillover”), na qual o patógeno não será mais detectado no hospedeiro na ausência de repetidas reintroduções entre espécies (Daszak et al., 2000). Alternativamente, o patógeno pode se manter independentemente nas duas espécies, resultando no alcance de mais hospedeiros e potencialmente levando à emergência da doença na espécie mais recentemente infectada (Fenton & Pedersen, 2005).

O vírus Nipah, encontrado na Malásia e Bangladesh foi associado com morcegos *Pteropus* spp. Jovens foram expostos a secreções de morcegos frugívoros quando faziam a colheita ou processamento do óleo de palmas em árvores infestadas por morcegos. Morcegos são ainda os principais hospedeiros de lyssavirus. (Howard et al., 2012). Entre os morcegos, os frugívoros apresentam maior risco de contato com humanos: Restos de frutas são descartados da boca dos animais e assim fornece uma grande oportunidade para a dispersão de vírus zoonóticos. Os padrões de transmissão permitem identificar diferentes animais para o monitoramento de agentes infecciosos novos ou re-emergentes antes da sua primeira detecção na população humana (Temman et al., 2014).

Durante muitos anos, a medicina humana e a veterinária evoluíram separadamente. Apenas recentemente, pesquisadores perceberam que a interação com o ecossistema pode afetar a saúde humana. Este conceito transdisciplinar que envolve a saúde humana, veterinária e ambiental, é conhecido como “*one health*” (uma saúde) e tem como objetivo aumentar a comunicação, colaboração e cooperação através de uma variedade de disciplinas. (One health initiative). A vigilância epidemiológica de doenças infecciosas é a base para estratégias de combate doenças emergentes a curto e longo prazo. Ainda que as técnicas sejam muito similares para o diagnóstico e controle de doenças infecciosas, ainda há pouca integração entre saúde animal e saúde humana. (Howard, 2012).

Para prevenir a emergência de doenças infecciosas em humanos, programas de vigilância agora focam na detecção antecipada de agentes infecciosos novos ou re-emergentes em insetos hematófagos e outros animais antes da adaptação viral a hospedeiros humanos. Neste contexto, a metagenômica viral é uma ferramenta útil para os programas de vigilância (Temman et al., 2014). As técnicas de sequenciamento de nova geração (NGS) possibilitam o sequenciamento de todos os genomas virais em uma determinada amostra sem nenhum conhecimento prévio sobre a sua natureza. Entre essas técnicas, a metagenômica viral tem

permitido a descoberta de espécies virais completamente novas. Com o custo sendo reduzido ao longo dos anos, o uso de técnicas de NGS vêm crescendo exponencialmente (Temman et al., 2014). Estas técnicas são capazes de gerar um grande número de sequências, indo de milhares a milhões de leituras em uma única reação.

Análises de viroma têm sido conduzidas para descrever a diversidade viral basal em humanos saudáveis, como um conhecimento prévio antes de se estudar a diversidade viral em condições patológicas (Popgeorgiev, 2013). Da mesma forma, o uso da metagenômica viral como uma ferramenta para a vigilância de doenças zoonóticas requer um conhecimento prévio da diversidade viral associada a animais em contato próximo a humanos. (Temman, 2014). O viroma de animais silvestres e vetores artrópodes potenciais têm sido registrados com o objetivo de expandir a base de dados de sequências genéticas e facilitar a identificação futura de doenças emergentes e a tomada mais rápida de medidas de controle (Howard, 2012)

Humanos entram em contato com fezes ou urina de animais silvestres no ambiente que compartilham, mais frequentemente do que com tecidos ou órgãos, com exceção do consumo de carne de caça. Como consequência, a maioria dos estudos de metagenômica em vida silvestre tem envolvido fezes ou urina de animais (Temman et al., 2014). Muitas espécies de animais não são os alvos usuais para programas de vigilância de zoonoses, mas exemplos recentes ressaltam que também se deve focar em outras espécies que podem transmitir agentes infecciosos, cruzando a barreira da espécie entre humanos e animais. Os estudos recentes focando a procura do reservatório do vírus da síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV) mostraram o potencial de camelos na transmissão desse vírus para humanos e é um exemplo de espécie não usual em estudos de metagenômica (Haagmans et al., 2014). Semelhantemente, marsupiais brasileiros não têm recebido a devida atenção quanto ao potencial zoonótico que hospedam. As figuras 1 e 2 demonstram a carência de publicações envolvendo vírus em marsupiais e a diferença na abundância total de vírus em comparação com morcegos, primatas e roedores, o que pode ser um reflexo da falta de estudos envolvendo a ordem Didelphimorphia.

Os marsupiais do gênero *Didelphis* possuem ampla distribuição no continente americano, abrangendo do sudoeste do Canadá ao sul da Argentina. As espécies *Didelphis albiventris*, *Didelphis marsupialis* e *Didelphis aurita*, que ocorrem no Brasil, são espécies comuns em toda sua área de distribuição. Adaptam-se a uma ampla variedade de habitats, até mesmo a grandes centros urbanos e florestas secundárias alteradas pela ação humana (Rossi et al, 2006). Resistem bem à ação antrópica no meio ambiente e atualmente a tendência é de

considerá-los como sinantrópicos. A divergência entre marsupiais e placentários data de, aproximadamente, 100 milhões de anos e os registros fósseis mais antigos do gênero *Didelphis* datam de 4 milhões de anos (Jansen, 2002). Sequências de genes de filovírus podem estar presentes no genoma de pequenos mamíferos como marsupiais sul-americanos. Isto sugere que filovírus podem ser descobertos no novo mundo ou que espécies sul-americanas eram hospedeiras de filovírus ancestrais que deram origem aos vírus Ebola e Marburg (Taylor et al., 2010).

Jansen et al. (2012), detectaram a presença de hantavírus em marsupiais e morcegos, indicando que a sobreposição de habitat entre roedores e outras espécies se intensificou após a interferência humana, com a redução de espaço e alimento disponível. Casos de infecção por hantavírus em humanos, por exemplo, representam um sério problema especialmente em áreas desmatadas e recém ocupadas.

Os marsupiais brasileiros *Didelphis albiventris* e *Didelphis aurita*, conhecido, popularmente como gambá de orelha branca e gambá de orelha preta, são pouco estudados quanto a seu microbiomas e capacidade de transmitir doenças zoonóticas e assim como os morcegos, também apresentam uma grande capacidade de adaptação a habitats alterados, incluindo zonas urbanas. Consequentemente representam modelos viáveis para estudos que visam relacionar a composição da microbiota às características do hospedeiros e do ambiente em que vivem.

A Secretaria do Verde, Meio Ambiente e Desenvolvimento Sustentável da prefeitura de Campinas (SVDS) possui um software em sua segunda fase de desenvolvimento denominado Arquimedes II. Seu objetivo consiste em ser uma plataforma acessível pela internet (com níveis de restrição), que integre diferentes ferramentas que permitam a sobreposição de camadas contendo dados sobre a provável dispersão de vírus, ocorrência de vetores e espécies hospedeiras, sobre mapas com dados sobre a cobertura e uso do solo e serviços ecossistêmicos prestados por essas áreas, por exemplo. Novos dados poderão ser inseridos e coletados por pesquisadores, possibilitando a utilização de mapas para diferentes finalidades. Este presente projeto também tem como objetivo contribuir para a saúde pública ao descrever a diversidade bacteriana e viral de mamíferos comuns em fragmentos florstais, sendo possível assim prever o mesmo padrão para outras áreas que possuam as mesmas espécies e características ambientais semelhantes, alertando quanto ao risco da emergência de zoonoses.

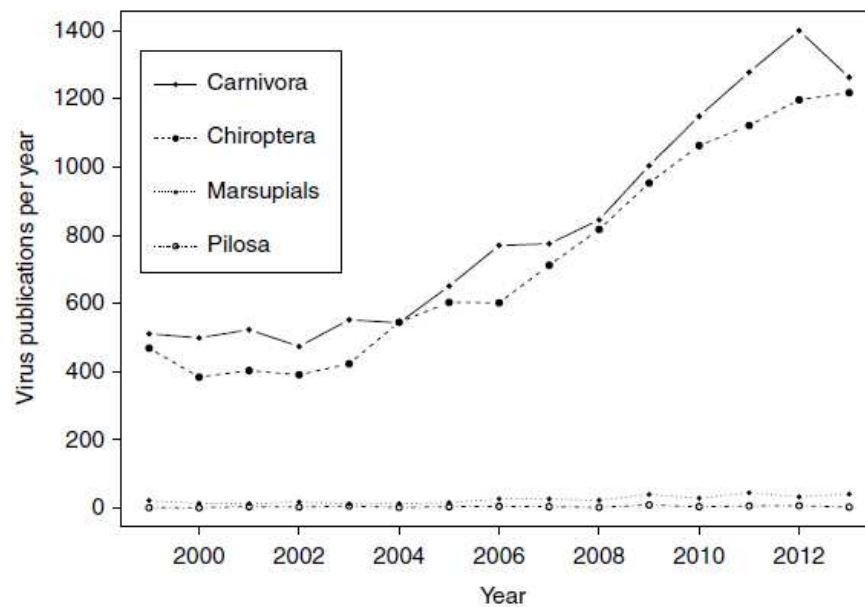


Figura 1: Número de artigos científicos sobre vírus publicados entre 1999–2013 para morcegos, carnívoros, marsupiais e preguiças (Olival et al., 2015)

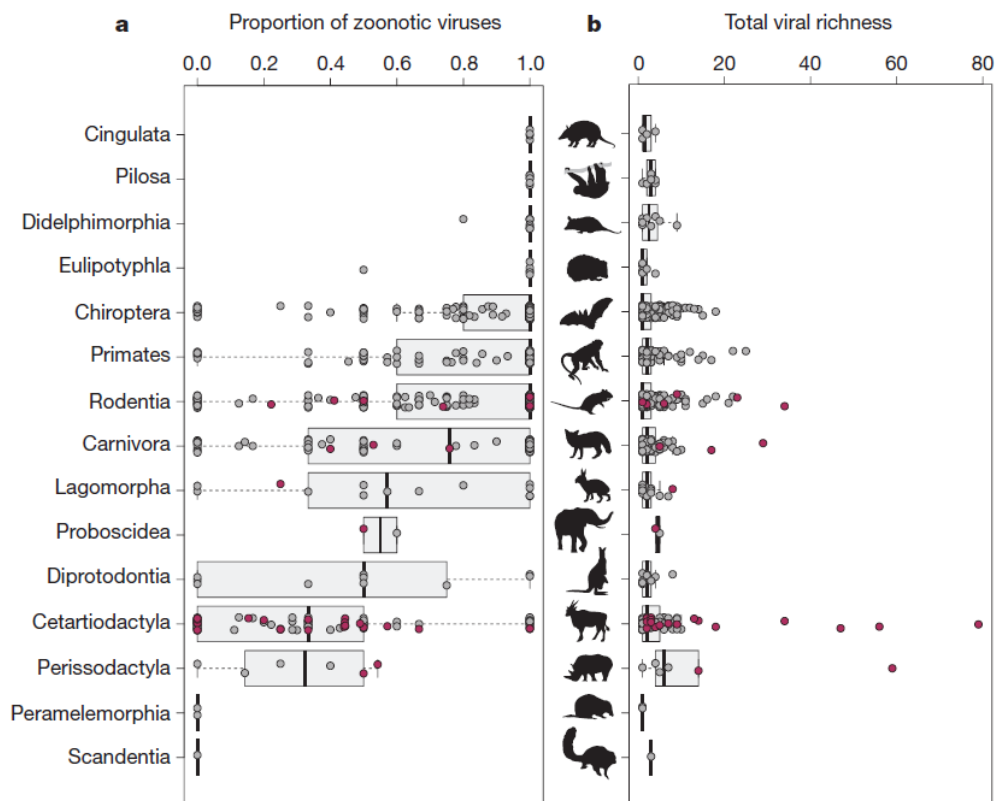


Figura 2: Diversidade viral observada em mamíferos . a, b, Box plots das proporções de vírus zoonóticos (a) e a diversidade viral total por espécie (b), agregada por ordens. Pontos representam espécies de mamíferos selvagens (cinza, $n = 721$) e domésticos (Vermelho escuro, $n=32$) (Olival et al., 2017).

2. Objetivos

- Descrever o microbioma basal de swabs anais e orais de marsupiais didelfídeos de vida livre na região de Campinas, pelas técnicas de sequenciamento de nova geração e análise metagenômica.
- Investigar a presença de bactérias e vírus de importância zoonótica e veterinária

3. Artigo científico

Materiais e métodos, resultados e discussão apresentados em forma de artigo científico, nos moldes da revista “Zoonoses and Public health”

INVESTIGATION OF THE MICROBIOME AND OCCURRENCE OF ZONOTIC PATHOGENS IN DIDELPHID OPOSSUMS FROM BRAZILIAN FOREST FRAGMENTS

Leonardo C. Caserta^{1,2}; Gabriela M. do Nascimento²; Lok R. Joshi²; R; Raphael M. Simão³;
Michael E. Miller¹; Diego G. Diel², Clarice W. Arns¹

1 Laboratório de Virologia Animal, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP- Campinas, 13083970, Brazil

2 Animal Disease Research and Diagnostic Laboratory, Department of Veterinary and Biomedical Sciences, South Dakota State University, Brookings, SD 57007, USA

3 FZEA-USP, Av. Duque de Caxias Norte, 225, Pirassununga – SP, 13635-900, Brazil

Correspondence

Leonardo C. Caserta

Email: leonardo.caserta@gmail.com

Abstract

The mammalian wildlife gut microbiome is shaped by numerous host traits and environmental factors influencing host–pathogen relationships. The identification of reservoir species and characterization of traits that are associated with pathogens are key to control emerging infectious diseases. The significant biodiversity found in Brazil is a potential for the emergence of zoonoses. Marsupials of the *Didelphis* genus are widely distributed in the American Continent. The species *Didelphis albiventris* and *Didelphis aurita* occur in Brazil and are common in all of their area of distribution. They adapt to a broad variety of habitats, including great urban centers and secondary forests. This article describes a metagenomic study that focused on samples from 16 opossums captured in three forest fragments in the State of São Paulo, Brazil, using high throughput sequencing. The baseline oral and gut bacterial and viral diversity of healthy opossums is described and the occurrence of zoonotic pathogens that can be targets for future epidemiological surveys is also discussed. Differences between oral and gut microbiomes composition were observed: Microbiomes from the same body site were more similar across species and sampling sites. Oral swabs presented higher bacterial diversity than anal swabs. We also detected sequences related to zoonotic pathogens, including *Campylobacter*, *Salmonella*, *Burkholderia*, *Chlamydia* and *Hepacivirus*. Some of these genera were assigned only to one specie or only one location of sampling, suggesting that extrinsic factors may contribute at some level to the occurrence of these pathogens in opossums but intrinsic factors such as diet and behavior can also explain the patterns observed. Hepacivirus C was detected in all of the samples, suggesting that opossums are potential hosts for this zoonotic virus. The detection of zoonotic pathogens in such abundant mammal species warns for the possibility of emergence in other species including humans, specially when their territory overlap naturally or due to fragmentation. Further investigations must be carried to address the relation of these patterns with extrinsic factors such as environmental characteristics.

1. Introduction

The mammalian wildlife gut microbiome is shaped by numerous host traits and environmental factors influencing host–pathogen relationships (Anthony et al., 2015; Benson et al., 2010). Recent studies have been using a multidisciplinary approach focusing on pathogen diversity in relation to host and environmental traits to predict risks of zoonotic spillover. Multi-pathogen surveillance approaches are integral to pathogen discovery programs that aim to identify potential public health risks (Temmam, Davoust, Berenger, Raoult, & Desnues, 2014). The identification of reservoir species is key to control emerging infectious diseases and characterizing which traits are associated with pathogens and their reservoir hosts may help to focus future research and disease mitigation efforts (Soc et al., 2012).

The significant biodiversity found in Brazil as well as an unprecedented invasion of human populations in previously uninhabited regions is a potential for the emergence of new zoonoses (De Araujo et al., 2012). The decline of biodiversity leads to the invasion and propagation of opportunistic species, promoting the emergence of diseases due to the increase of contact with local human populations (Patz et al., 2004). Disturbance can alter host population density, which in turn may affect intraspecific and interspecific contact rates (Dearing & Disney, 2010; Suzán et al., 2009; Voutilainen et al., 2012)

Some species are not the usual targets of zoonotic surveillance programs, but examples such as studies searching for the reservoir of Middle-East Respiratory Syndrome-Coronavirus (MERS-CoV) revealed the potential role of camels in the transmission of this virus (Haagmans et al., 2014), highlighting the importance of focusing future viral metagenomic studies on other animal species interacting with humans. Similarly, Brazilian marsupials have not been receiving adequate attention regarding the zoonotic potential they host. Didelphid marsupials are widely distributed in the American Continent. The species *Didelphis albiventris* and *Didelphis aurita* are common in all of their area of distribution and adapt to a broad variety of

habitats, including great urban centers and secondary forests modified by human action (Almeida, Torquetti, & Talamoni, 2008; Nilton C. Cáceres & Monteiro-Filho, 2003; Dos Reis, N. R.; Peracchi, A.I.; Pedro, W. A.; Lima, 2006). The chance of pathogens switching into other related species becomes a greater possibility as host territories expand and overlap (Howard & Fletcher, 2012).

Marsupials virome composition has been poorly studied thus far but data from opossums have been retrieved for hantaviruses, anelloviruses, orthopoxviruses, flaviviruses, picornaviruses and parvoviruses (Bjorklund et al., 2017; Carneiro et al., 2018; De Araujo et al., 2012; de Souza et al., 2018; Gómez et al., 2008; Peres et al., 2018). In relation to bacteria, an association between wildlife and transmission of bacterial pathogens and/or antimicrobial resistance to the food chain was supported by several studies as reviewed previously (Bondo et al., 2019; Greig et al., 2015). Research involving opossum were mainly related to the prevalence of *E. coli*, *Salmonella* and risk factors for transmission of *M. bovis*.

Here we describe a metagenomic study that focused on samples from 16 opossums captured in three forest fragments in the State of São Paulo, Brazil, representing two species: White-eared opossum and black-eared opossum. The baseline oral and rectal bacterial and viral diversity of healthy opossums is described in this article. We expected oral and gut microbiome composition to be different and each species hosting a distinct pattern of bacterial and viral diversity. We also discuss the occurrence of zoonotic pathogens that can be targets for future epidemiological surveys.

2. Materials and methods

2.1. Sample collection :

This research was conducted with the approval of the System of Authorization and Information on Biodiversity (SISBio/ ICMBio) (permit number 45807-2). Oral and anal swab

samples were collected from nine *D. albiventris* and seven *D. aurita* opossums in three different forest fragments in the region of Campinas, São Paulo state, Brazil, over the period of May, 2017 to June, 2018 (fig. 1). Tomahawk traps were baited with banana, peanut cream and guava in the afternoon and controlled for captures during the following morning. Opossums were weighted for proper sedation using a combination of 10 mg/kg of ketamine and 0.2 mg/kg of xylazine and released after recovering from sedation. All swabs were collected in duplicate and immediately put in RNAlater (ThermoFisher Scientific) or in an empty tube. Samples were kept at approximately 4 degrees during transport and stored at -80 degrees until processing.

2.2. Sample preparation and nucleic acid extraction:

Samples stored in RNAlater were homogenized by vortex and cleared by centrifugation for 5 minutes at 10,000x g. Cleared supernatants were pooled according to sampling site, specie and type of sample. 140 µl of each pool was used for RNA and DNA extraction using QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol, with the exception that 25 µg linear polyacrylamide (Sigma) was used as carrier instead of the RNA carrier supplied with the kit and nucleic acids were eluted in 40 µl AVE buffer instead of 60 µl.

2.3. Double stranded cDNA and library preparation for Illumina sequencing:

First-strand cDNA synthesis was performed with the SuperScript IV First-Strand Synthesis System (ThermoFisher) using 11 µl of RNA and 1 µl of random hexamer primers at 50 µM. An initial denaturation was carried out at 72°C for 3 min and placed on ice for at least 1 min. After adding the cDNA synthesis mix, the mixture was incubated at 23°C for 10 min, 50°C for 15 min, 55°C for 15 min and 5 min at 85°C. After 2 min incubation on ice, 1 µl RNaseH was added and reactions were incubated at 37°C for 20 min.

The second strand cDNA was synthesized with DNA polymerase I, Large (Klenow) Fragment (Promega) by adding to the same tube of the retrotranscription reaction 1 µl of 10 mM dNTPs, 2 µl of 10X enzyme buffer, 1.5 µl of RNase/DNase-free H₂O and 0.5 µl of enzyme. The incubation conditions were a denaturation step at 94°C for 2 minutes, followed by incubation on ice for 5 minutes, before the enzyme addition and then 60 min at 37°C followed by 10 min at 75°C. The cDNA was purified with Agencourt AMPure XP beads (Beckman Coulter) using the ratio of 1.8X beads:DNA and eluted in 20 µl buffer EB (Qiagen). The concentration of double stranded-cDNA was measured with QUBIT dsDNA HS Kit (Thermo Fisher Scientific). Since concentrations were lower than 0.2 ng/µl, 5 µl of each ds-cDNA were used for further library preparation.

Libraries were generated with Nextera XT DNA Library Prep Kit (Illumina) according to the manufacturer's instructions. After clean up with AMPure XP beads (Beckman Coulter), the average fragment size was estimated using a High Sensitivity DNA Chip in an Agilent 2100 Bioanalyzer Instrument (Agilent) and libraries were quantified with the KAPA Library Quantification kit (Kapa Biosystems). Libraries were subsequently combined at equimolar concentrations, denatured with 0.1 M NaOH, spiked with 1% PhiX control, and loaded on a MiSeq flow cell with a 600 cycles reagent kit v3 (Illumina) in 300 bp paired-end sequencing run.

2.4.Bioinformatics:

Raw Illumina FastQ reads were processed using scripts in Linux operating system. First, reads were trimmed for size (75 bp minimum), quality (q20 minimum) and adapters using Trim Galore (Babraham Bioinformatics, n.d.). Host sequences were depleted by mapping to an available full genome of the gray short-tailed opossum, a related marsupial, using Bowtie 2 (Langmead & Salzberg, 2012) (*Monodelphis domestica* RefSeq assembly accession no.

GCF_000002295.2). The remaining reads were classified using Kaiju in greedy mode (Menzel, Ng, & Krogh, 2016). The output tables were analyzed in Explicet (Robertson et al., 2013), to generate graphs and diversity analysis.

3. Results:

3.1. Bacterial diversity:

Bacterial populations were clearly different when comparing the two body regions (fig. 2). *Helicobacteraceae* dominated in anal swabs, particularly in *D. albiventris*. In *D. aurita* anal swabs, Flavobacteriaceae and Moraxellaceae were more prevalent, at the expense of *Helicobacteraceae*. Among oral swab pools, there is a high contribution of *Pasteurellaceae* when in comparison with anal swabs. Also, the oral pool of *D. albiventris* (MTO) showed the highest prevalence of *Lachnospiraceae* family among all samples. It is also clear that the *Campylobacteraceae* family is more prevalent in anal swabs, with a very low percentage in oral swabs. *Bacteroidaceae* showed higher abundance in *D. albiventris* oral swab. The most notable difference between oral and anal samples was the high prevalence of *Pasteurellaceae* in oral swabs, besides the dominance of *Helicobacteraceae* in anal swabs. From the comparison between oral swab pools, it can be seen that *Lachnospiraceae* and *Bacteroidaceae* contributed more to the number of sequences in *D. albiventris*, while *Moraxellaceae* and *Pasteurellaceae* contributed more to *D. aurita*.

Beta-diversity was calculated and expressed in terms of a heatmap in figure 4. Samples from the same body region and from the same specie showed a higher similarity, followed by samples from the same sampling site. In other words, the sample MTL for example, which is an anal swab pool of *D. albiventris*, was more similar to SGL, another anal swab pool of *D. albiventris* but from a different sampling site. Anal swabs were more similar to anal swabs from the same species, followed by anal swabs from the other species. The only exception was

the sample from a unique *D. aurita* individual (SG8L), that had an oral swab as the second highest similarity, instead of the same sample type from *D. albiventris*.

3.2. Viral diversity:

Viruses infecting exclusively bacteria have been excluded of further analyses. *Retroviridae* was clearly the most abundant family in all groups, with lower percentage in pools of anal swabs of both species (SG8L was sampled from one single individual). Notably, *Flaviviridae* was less prevalent in oral swabs of both species. It is possible to note the exclusive presence of *Papillomaviridae* in MTL, a *D. albiventris* anal swab. It was not possible to see any pattern of distribution of *Parvoviridae* across the samples, being noticed for *D. albiventris* in only one sampling site (MTL) and for *D. aurita* only in the oral swab pool (RCO). Despite presenting a close abundance level of *Retroviridae* (73,2% for *D. albiventris* and 74.5% for *D. aurita*), it is notable the absence of *Poxviridae* in the *D. albiventris* oral swab when comparing to the *D. aurita* oral swab. Among other less prevalent families, *Alloherpesviridae* and *Smacoviridae* were observed only in one *D. albiventris* anal swab pool (SGL).

Overall, the beta-diversity analysis showed that the virome compositions of oral swabs were more similar. In contrast, anal swabs did not presented clear patterns in similarities. One of the *D. albiventris* pool (MTL) was more similar to a *D. aurita* anal swab pool (RCL), while the *D. aurita* anal swab from a single individual (SG8L) showed higher similarity to the oral swab pool from the same specie (RCO). One of the viromes (SGL) was clearly the most dissimilar among all the samples. Differently, the most dissimilar sample in the bacterial diversity analysis also belonged to a *D. albiventris* anal swab, but from a different sampling site (MTL). The lowest virome similarity value was 0.863, nevertheless, more than 3 times higher than the lowest bacterial similarity value, 0.254.

3.3.Detection of operational taxonomic units (OTUs) related to zoonotic and veterinary pathogens

Sequences related to pathogenic species to humans and domestic animals were detected (table1). Only bacterial species representing at least 0,1% of total number of reads in the sample were considered, with the exception of *Salmonella*. For viral species, a minimum of 5 reads was set as a cutoff.

3.4.Alpha diversity

Oral bacterial microbiomes were more diverse than anal (fig. 3). Anal swab pools belonging to *D. albiventris* were less diverse than *D. aurita*. The same can be observed for oral swab pools. An opposite relation was found for the viral alpha diversity, with anal swabs being more diverse than oral swabs and *D. albiventris* viral composition more diverse than *D. aurita*.

4. Discussion:

This study aimed to investigate the fecal and oral microbiome, as viruses and bacteria excreted in fecal material, replicating in rectal or intestinal tissues and food leftovers containing saliva have greater opportunities of coming into contact with other hosts. The metagenomic approach used here provided an initial assessment of the microbiome composition of gastrointestinal and oral samples from didelphid marsupials, detecting sequences from several viral and bacterial families including species with zoonotic potential.

In a previous study, *Salmonella enterica*, *Campylobacter* spp., *Clostridium difficile*, and anti-microbial resistant *Escherichia coli*, were detected in the faeces of Virginia opossums, a specie that belongs to the genus *Didelphis* (Bondo et al., 2019). In the present study these genera of bacteria were also detected, but *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* remained below the 0,1% of classified reads after the metagenomic analysis. Opossums are omnivorous and also

feed on carcass. Two studies found a high rate of carcass removal by *Didelphis virginiana* in North American fragmented habitats (DeVault, Olson, Beasley, & Rhodes, 2011; Olson, Beasley, & Rhodes Jr., 2016). Thus, food might be a possible source of *Clostridium botulinum* in these animals. However, this bacteria specie was found only in *D. aurita* samples. Indeed, the occurrence of vertebrates in scats of *Didelphis aurita* in a small forest fragment from Brazil was found to be 59% (Nilton C. Cáceres & Monteiro-Filho, 2003).

Among the pathogens detected, *Burkholderia mallei* was present in both pools of oral swabs. This bacteria is the causative agent of glanders, a disease that primarily affects horses, but can also affect mules, donkeys, goats, dogs, and cats. Human glanders is usually a consequence of contact with infected animals (Barrett, Stanberry, Sarkar-Tyson, & Titball, 2009; Ryan, 2016).

Chlamydia psittaci can be carried and transmitted to humans by birds, resulting in respiratory symptoms (Goldstein & Abrahamian, 2017) and is also known to cause ocular infections in koalas and sheeps (Alfano et al., 2015; Underwood et al., 2015). It was detected in all the samples of the present study, with higher prevalence in anal swabs. To the best of our knowledge, this zoonotic bacteria have not been described in opossums yet and despite being transmitted by birds, these marsupials could carry and transmit to humans and other animals when sharing ecological niches.

The *Campylobacter* genus can be found in diverse animal species such as pigs, cervids, rodents and several species of birds (Greig et al., 2015), but also in wild animals like skunk and opossum (Bondo et al., 2019). *Campylobacter jejuni* is the *Campylobacter* species that most commonly causes gastroenteritis in humans (Jaime et al., 2002). The anal swab pool of *D. aurita* (RCL), was the only sample in which *Campylobacter jejuni* was detected. In contrast, this bacterial specie was not detected in *Didelphis virginiana* faecal swabs in studies developed in Canada and California (Bondo et al., 2019). Suggestions can be made that an exchange of

bacteria between domestic animals and opossums may have occurred in this sampling site (RCL), which is surrounded by small ranches where domestic animals are bred. Moreover, feral dogs and cats, that also occur in all of the sites sampled for the present study, may also be intermediate hosts and a link between human-inhabited areas and forest fragments, carrying pathogens between environments.

In extremely fragmented habitats, the presence of domestic animal hosts may allow for persistence of pathogens populations (Loh, Murray, Nava, & Daszak, 2016). In two forest fragments sampled for the present study, Mata Santa Genebra (SGL) and Mata Ribeirão Cachoeira (RCL), feral dogs are commonly seen. Mata Santa Genebra in special, borders an urban area and white-eared opossums frequently circulate between houses and the forest border. This behavior could at least partially explain the microbiome found for the SGL pool. *D. aurita* reveals a great potential to colonize urban environments where there are forest fragments (Nilton Carlos Cáceres, 2000).

Other bacterial species known to cause diseases in domestic animals were detected in the present study, such as *Avibacterium paragallinarum*, *Mannheimia haemolytica*, *Moraxella caprae* and also *Haemophilus haemolyticus*, a human commensal bacterium that colonizes the respiratory tract, but it is highly similar to *H. influenzae* and has been shown to cause invasive disease (Anderson et al., 2012). This specie was detected in both oral swab pools.

Most of the viral hits were from bacteriophages, in agreement with previous studies. Despite a low percentage of viral reads, sequences from virus families capable of infecting vertebrates were detected, including the *Flaviviridae*, *Herpesviridae*, *Poxviridae* and *Retroviridae*. *Retroviridae* family represented 68.19% of viral reads. These retroviruses or at least a portion of retroviruses detected, could be proviruses that have become established in the germ line of the genus *Didelphis* in the past, considering that the emergence of this genus took place more than 4 million years ago (Dias & Perini, 2018). Most of endogenous retroviruses

are defective but some of them, however, can upon activation, give rise to progeny virus that can infect other cells (STRAUSS, STRAUSS, STRAUSS, & STRAUSS, 2008). Retroviral sequences were also detected in other studies involving bats, small carnivores and rodents (Baker et al., 2013; Bodewes et al., 2014; Dacheux et al., 2014; Wu et al., 2018).

A recent study identified hepacivirus in black-footed pygmy rice rats (*Oligoryzomys nigripes*) captured in the northeastern region of São Paulo State, Brazil. (de Souza et al., 2019). This rodent specie is also found in the region of the three forest fragments sampled for the present study and one individual was captured in Matão de Cosmópolis, the fragment sampled for the MTL pool. The habitat overlapping increases the possibility of transmission of pathogens to different species, as shown by the detection of hantavirus in bats, rodents and opossums captured in the same site (De Araujo et al., 2012). The metagenomic detection of hepacivirus C in the present study can be strengthened by the habitat overlapping by *Oligoryzomys nigripes* and *Didelphis* spp. Our results support data that show opossums as carriers of members of *Flaviviridae* family and suggest *D. albiventris* and *D. aurita* as hosts for hepacivirus C. To confirm the presence of hepacivirus sequences as well as other mammalian-infecting viruses, additional opossum sampling is necessary and viral families must be selected for further investigation by specific PCR.

Overall, the microbiome variation seemed to be shaped mainly by host factors. Samples from the same species, followed by the same body region, revealed a closer similarity. However, the predominance of certain bacteria and viruses in only one sampling site may be the result of extrinsic factors such as environmental characteristics, intra or interspecific contact rates. Recent studies have found that host phylogeny and diet explain microbiome diversity among vertebrate clades (Wasimuddin et al., 2017; Youngblut et al., 2018) and microbiomes fluctuate seasonally in response to diet (Hicks et al., 2018). Our work could be extended to more sampling efforts across months and seasons in more geographical locations, thus assessing

the correlation between microbiome diversity and environmental factors.

Bank vole skin and gut microbiomes were shown to have distinct responses to similar environmental cues and thus are structured at different spatial scales (Lavrinenko, Tukalenko, Mappes, & Watts, 2018). Similarly, opossum oral and gut microbiomes presented distinct alpha and beta diversity. Oral samples presented highest bacterial diversity according to alpha diversity measures. This data is in accordance with the human oral cavity which was found to have the highest OTU richness and phylogenetic diversity within the gastrointestinal tract (Stearns et al., 2011). Oral microbiome also contains bacteria from the respiratory tract, thus, possibly explaining here the higher diversity and the presence of bacteria known to cause respiratory disease in domestic animals.

Overall, microbiomes similarity grouped by species, but microbiomes from the same body region were more similar across species and sampling site than microbiomes from different body regions of the same species and sampling site, which is consistent with other microbiome studies (Alfano et al., 2015; Sonnenburg & Fischbach, 2011). This pattern was also true for the viral beta diversity. However, the slight difference of values between viral beta diversity indexes could be the result of not using any viral enrichment procedure, which in turn results in a low number of viral reads and most likely resulting in a closer similarity between samples.

While presenting important results regarding the potential occurrence of pathogens in these hosts, we acknowledge the limitations of the metagenomic approach executed here. Short sequence length and low number of viral reads limits the accurate taxonomic determination of strains, even though Kaiju is a sensitive metagenomic classifier, comparing the six-frame translations of reads against protein databases (Breitwieser, Lu, & Salzberg, 2017). Thus, further confirmation of pathogens by conventional PCR assays must be performed to support the metagenomic data obtained here. Moreover, since the genome of another species was

utilized for host genome removal, we must take into account that part of *D. aurita* and *D. albiventris* genomes may have remained and influenced on the downstream analyses.

All the samples used for this study were stored in RNA later at the moment of collection. RNA Later contains high amounts of salts, thus leading to an enrichment/depletion pattern for some species (Franzosa et al., 2014). However, other data indicates that transcriptomes of samples conserved in RNA Later were unchanged for up to 6 days even at room temperature (Reck et al., 2015). This conservation media is useful specially for studies in tropical environments of difficult access where immediate ultra-low temperature storage is unavailable and the same storage conditions are required for all the samples in order to minimize changes to microbial composition and consequently bias the microbiome composition.

All of the animals captured for this study were apparently healthy, meaning that these *Didelphidae* opossums could be potential non symptomatic hosts for bacteria and viruses belonging to the families that we detected here. Asymptomatic hosts present a challenge since sick animals are easier to be set as targets for epidemiological surveys. Bats were reported as being asymptomatic more often than other host groups (Levinson et al., 2013). As stated previously (Olival, Weekley, & Daszak, 2015), more systematic approaches to assessing health status in wildlife are needed and this also applies to other resilient species such as *Didelphis* opossums.

5. Conclusions:

In conclusion, we have demonstrated the potential of didelphid opossums from Brazilian forest fragments as hosts for zoonotic pathogens. We found a higher bacterial diversity in oral microbiome than gut microbiome and the opposite was found for the viral diversity. Further investigations could address the relation of these patterns with extrinsic factors such as environmental characteristics. The detection of zoonotic pathogens in such an

abundant species warns for the possibility of emergence in other species including humans specially when their habitats overlap naturally or due to the fragmentation. This may increase the potential of opossums to directly contaminate the feed and environment of domestic animals in these regions. Metagenomic high throughput sequencing is still unsuited for routine pathogen surveillance practices in developing countries. However, it is an invaluable tool for pathogen discovery programs in wildlife populations and assessing the risk of emergence of zoonotic pathogens, revealing patterns of occurrence and assembly of viral and bacterial communities. Further molecular characterization of the viral families identified here are required to confirm the presence of strains and assess the risk for public health. Despite still requiring confirmation, we detected OTUs assigned to pathogenic bacteria and virus known to cause diseases in humans and other vertebrate species and provided a baseline microbiome of healthy opossums, enabling an easier identification of candidate pathogens in association with diseases.

Acknowledgements

We would like to thank Brazilian Bioethanol Science and Technology Laboratory CNPEM/MCTIC NGS Sequencing Facility for generating the sequencing data described here. We also thank Thomaz Henrique Barrella (Fundação José Pedro de Oliveira), Márcia Gonçalves Rodrigues (ICMBio) Angela Podolsky and Paulo Anselmo Nunes Felipe for providing access to the forest fragments and help in fieldwork.

Funding

This research was funded by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil (grant number 870370/1997-9 and scholarship number 154978/2016-7). This study was also financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

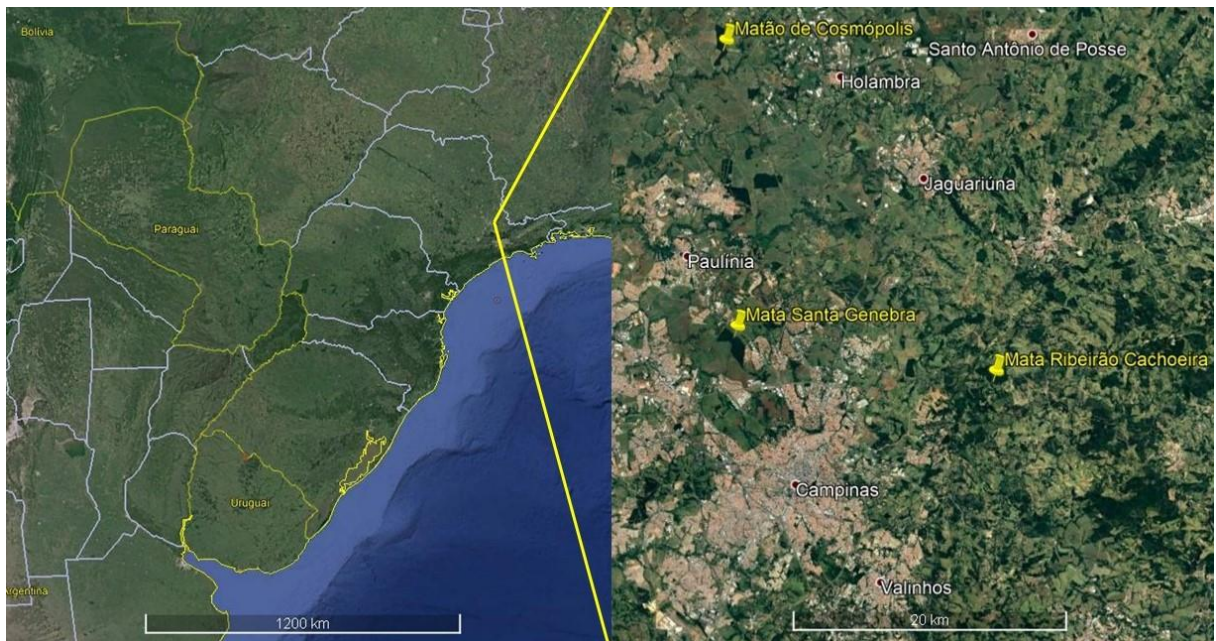


Figure 1. Sampling sites map. Map indicating the forest fragments where opossums were captured for sample collection. Maps were extracted from Google Earth pro (*Google Earth Pro*, 2019)

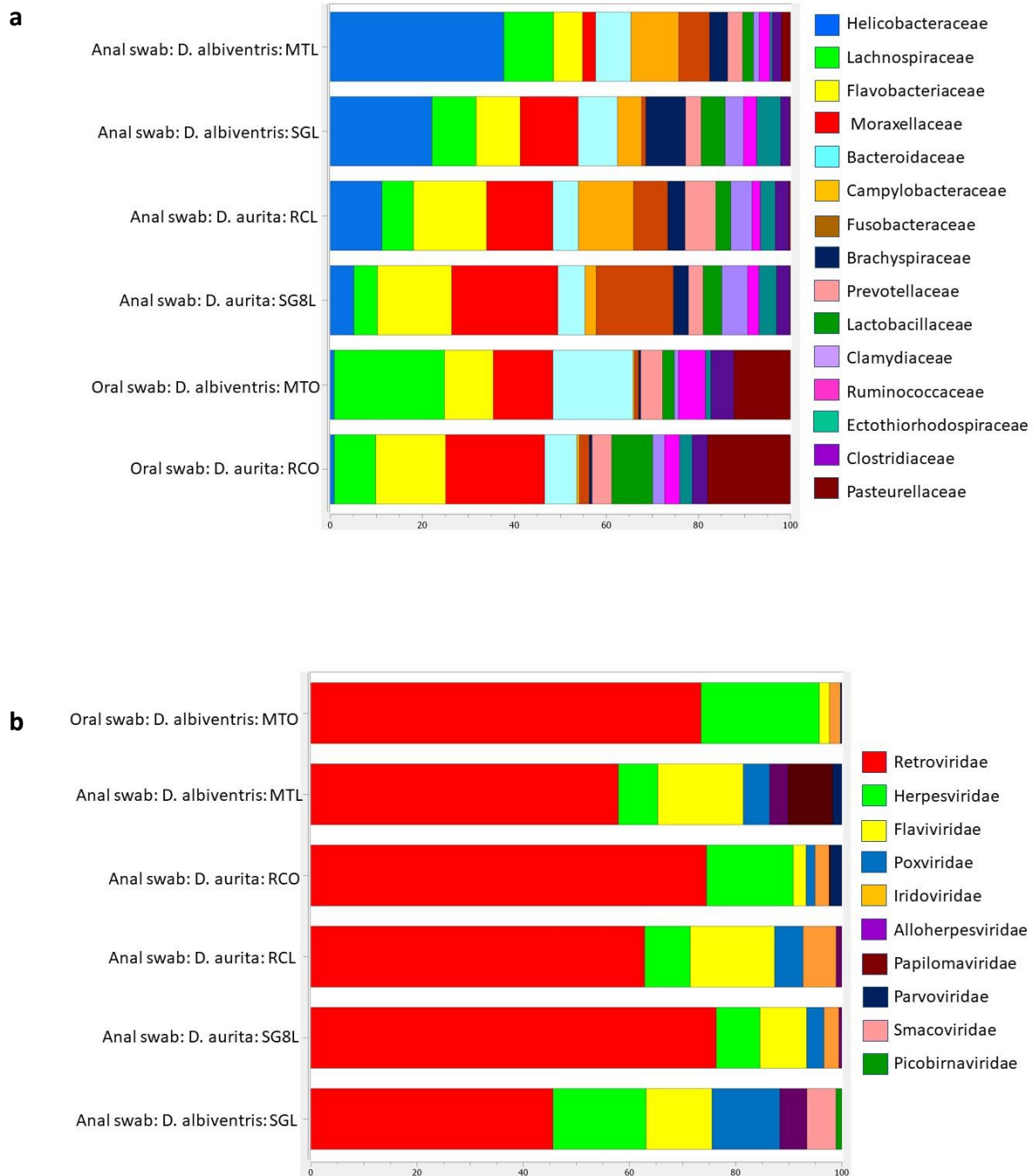
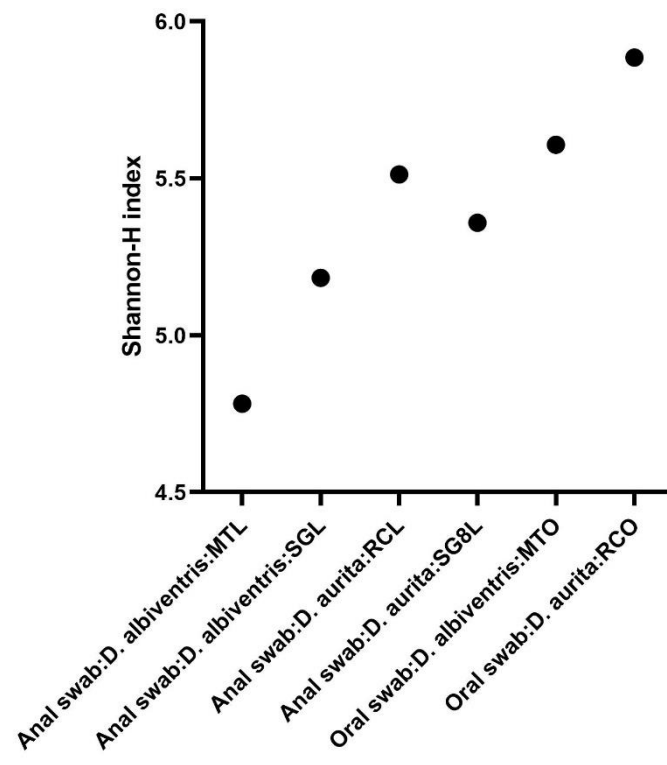


Figure 2. Bacterial and viral families diversity. Stacked bar graphs of the most abundant bacterial (a) and viral (b) families in each sample.

a



b

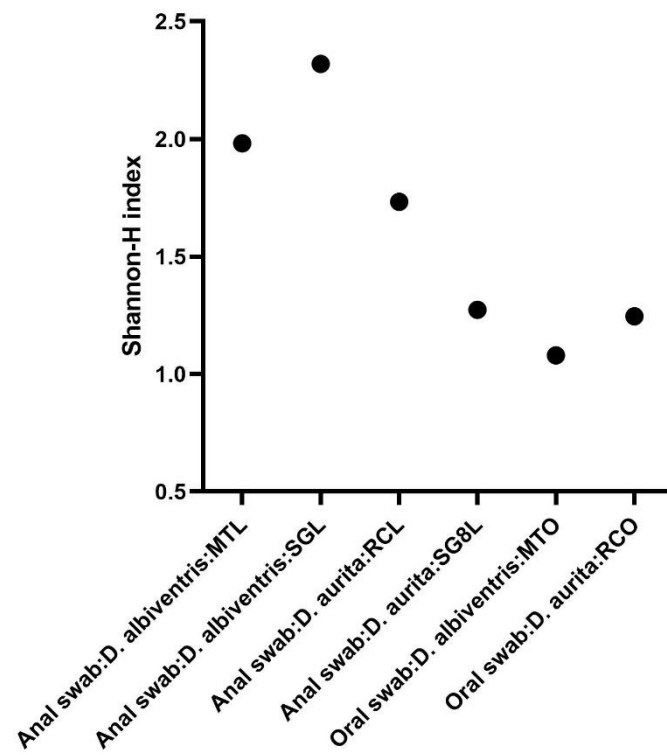


Figure 3. Alpha diversity. Shannon alpha diversity index for bacteria (a) and viruses (b)

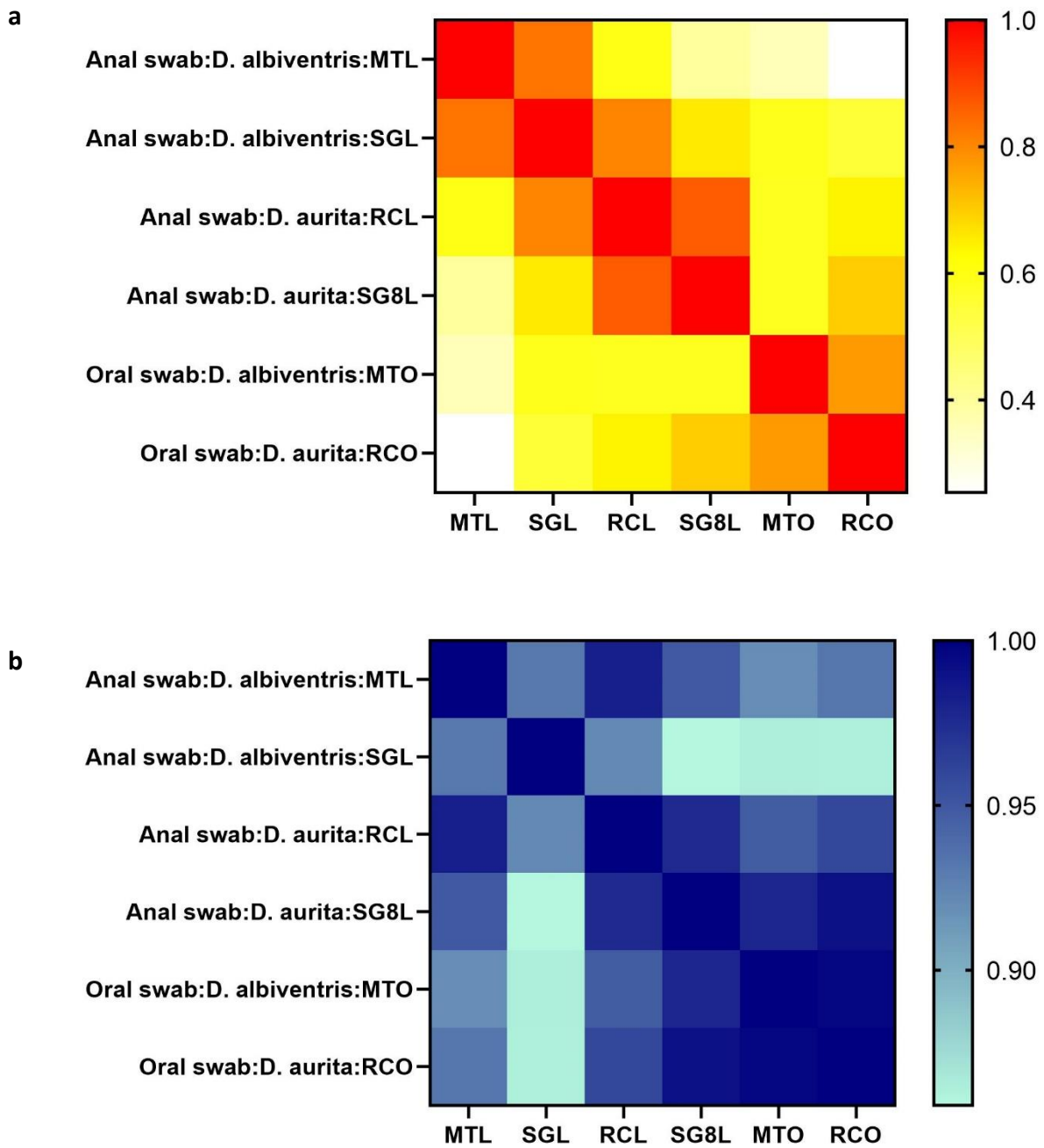


Figure 4. Beta diversity. Heatmap of Morisita-Horn matrix for community similarity indexes of bacteria (a) and viruses (b)

	MTL		MTO		RCL		RCO		SG8L		SGL	
Bacterial species	n of reads	%	n of reads	%	n of reads	%	n of reads	%	n of reads	%	n of reads	%
Salmonella enterica	462	0,04	425	0,20	25	0,01	96	0,15	32	0,01	2248	0,25
Chlamydia psittaci	10801	0,9	2584	1,2	15661	4,6	1502	2,4	14617	5,1	30776	3,4
Avibacterium paragallinarum	9450	0,8	13257	6,3			3108	4,9				
Moraxella caprae			13204	6,3			3467	5,5				
Mannheimia haemolytica			6941	3,3			2874	4,5				
Burkholderia mallei			2309	1,1			952	1,5				
Clostridium botulinum					3959	1,2			2340	0,8		
Campylobacter jejuni					3333	1,0						

	MTL		MTO		RCL		RCO		SG8L		SGL	
Viral species	n of reads	%	n of reads	%	n of reads	%	n of reads	%	n of reads	%	n of reads	%
Hepacivirus C	65	11,9	12	1,4	74	8,7	8	1,7	80	6,7	33	2,4
Reticuloendotheliosis virus	27	4,9	72	8,2	31	3,6	24	5,1	81	6,8	8	0,6
Feline leukemia virus	14	2,6	21	2,4	16	1,9	11	2,4	44	3,7	5	0,4
Saimiriine betaherpesvirus 4	14	2,6			17	2,0			39	3,3	23	1,7
Ovine enzootic nasal tumor virus	3	0,5	10	1,1	3	0,4	1	0,2	9	0,8	7	0,5

Table 1. Detected pathogens. Correspondent number of reads and abundance in each sample

4. Conclusões

Este estudo descreve a composição do microbioma total de duas espécies de mamíferos comuns em zonas urbanas e fragmentos da Região Sudeste do Brasil. A cobertura de sequenciamento para espécies virais raramente é alta, com exceção de casos em que um determinado vírus esteja presente em grandes quantidades devido à doença ou devido à utilização de técnicas de enriquecimento viral. No entanto, levando-se em conta as características de algumas espécies de patógenos zoonóticos, mesmo uma classificação metagenômica a um nível hierárquico anterior à espécie pode ser suficiente para alertar quanto à possibilidade da presença desses patógenos e direcionar o foco para testes moleculares específicos.

Os resultados do estudo apresentado nesta tese ressaltam a importância de uma abordagem transdisciplinar para a decisão de medidas preventivas, pressuposto do conceito de saúde única. Estudos que unam disciplinas como por exemplo ecologia de animais silvestres, microbiologia, biologia molecular, medicina veterinária e ecologia de fragmentos, possibilitam uma base teórica sólida para a prevenção de doenças emergentes. A descrição da fauna de fragmentos florestais pode ter um impacto significativo pois permite a compreensão da densidade populacional de espécies generalistas como os gambás e outras espécies interagindo. É necessário ressaltar também a importância da coleta de mais amostras em fragmentos com características diferentes, possibilitando análises estatísticas confiáveis.

A conservação da biodiversidade desses fragmentos é muito importante para manter o equilíbrio, evitando que espécies mais resilientes dominem nichos ecológicos e aumentem a probabilidade de transmissão de doenças. Para isso, medidas como a manutenção da diversidade vegetal e a restauração florestal através de corredores ecológicos são essenciais para mitigar os efeitos da fragmentação.

O presente estudo utilizou gambás como um modelo para demonstrar o potencial de espécies resilientes como hospedeiros de patógenos zoonóticos, utilizando a detecção simultânea através do sequenciamento de nova geração. O estabelecimento destas técnicas em larga escala para vigilância epidemiológica ainda é limitado no Brasil, principalmente devido ao alto custo de reagentes, acesso à plataformas de sequenciamento e profissionais capacitados para a análise de dados. Além de morcegos, cujo potencial zoonótico já vem sendo descrito em diversos artigos científicos, estudos futuros desse tipo devem ser voltados também à outras

espécies que vivem em fragmentos florestais urbanos e periurbanos do Brasil, como alguns primatas, roedores e carnívoros.

5. Referências bibliográficas

- Alfano, N., Courtiol, A., Vielgrader, H., Timms, P., Roca, A. L., & Greenwood, A. D. (2015). Variation in koala microbiomes within and between individuals: Effect of body region and captivity status. *Scientific Reports*, 5 (December 2014), 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep10189>
- Almeida, A. J. de, Torquetti, C. G., & Talamoni, S. A. (2008). Use of space by neotropical marsupial *Didelphis albiventris* (Didelphimorphia: Didelphidae) in an urban forest fragment. *Revista Brasileira de Zoologia*, 25(2), 214–219. <https://doi.org/10.1590/s0101-81752008000200008>
- Anderson, R., Wang, X., Briere, E. C., Katz, L. S., Cohn, A. C., Clark, T. A., ... Mayer, L. W. (2012). *Haemophilus haemolyticus* isolates causing clinical disease. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(7), 2462–2465. <https://doi.org/10.1128/JCM.06575-11>
- Anthony, S. J., Islam, A., Johnson, C., Navarrete-Macias, I., Liang, E., Jain, K., ... Lipkin, W. I. (2015). Non-random patterns in viral diversity. *Nature Communications*, 6, 1–7. <https://doi.org/10.1038/ncomms9147>
- Araujo, J., Matsumiya, L., Thomazelli, D. A. H., Lautenschlager, D., Ometto, T., Dutra, L.M., Aires, C.C., Favorito, S., Durigon, E. L. Detection of hantavirus in bats from remaining rain forest in São Paulo, Brazil BMC Research Notes (2012), 5:690
- Babraham Bioinformatics. (n.d.). *Trim Galore*. Retrieved from http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/
- Baker, K. S., Leggett, R. M., Bexfield, N. H., Alston, M., Daly, G., Todd, S., ... Murcia, P. R. (2013). Metagenomic study of the viruses of African straw-coloured fruit bats: Detection of a chiropteran poxvirus and isolation of a novel adenovirus. *Virology*, 441(2), 95–106. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.03.014>
- Barrett, A. D. T., Stanberry, L. R., Sarkar-Tyson, M., & Titball, R. W. (2009). *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei*. *Vaccines for Biodefense and Emerging and*

Neglected Diseases, 831–843. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-369408-9.00043-3>

- Benson, A. K., Kelly, S. A., Legge, R., Ma, F., Low, S. J., Kim, J., ... Pomp, D. (2010). Individuality in gut microbiota composition is a complex polygenic trait shaped by multiple environmental and host genetic factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(44), 18933–18938. <https://doi.org/10.1073/pnas.1007028107>
- Bjorklund, B., Haley, B., Bevilacqua, R., Chandler, M., Duffiney, A., von Hone, K., ... Algeo, T. (2017). Progress towards Bait Station Integration into Oral Rabies Vaccination Programs in the United States: Field Trials in Massachusetts and Florida. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 2(4), 40. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed2030040>
- Bodewes, R., Ruiz-Gonzalez, A., Schapendonk, C. M. E., Van Den Brand, J. M. A., Osterhaus, A. D. M. E., & Smits, S. L. (2014). Viral metagenomic analysis of feces of wild small carnivores. *Virology Journal*, 11(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-11-89>
- Bondo, K. J., Pearl, D. L., Janecko, N., Reid-Smith, R. J., Parmley, E. J., Weese, J. S., ... Jardine, C. M. (2019). *Salmonella*, *Campylobacter*, *Clostridium difficile*, and antimicrobial resistant *Escherichia coli* in the faeces of sympatric meso-mammals in southern Ontario, Canada. *Zoonoses and Public Health*, (February), zph.12576. <https://doi.org/10.1111/zph.12576>
- Breitwieser, F. P., Lu, J., & Salzberg, S. L. (2017). A review of methods and databases for metagenomic classification and assembly. *Briefings in Bioinformatics*, (June), 1–15. <https://doi.org/10.1093/bib/bbx120>
- Cáceres, Nilton C., & Monteiro-Filho, E. L. A. (2003). Food Habits, Home Range and Activity of *Didelphis aurita* (Mammalia, Marsupialia) in a Forest Fragment of Southern Brazil. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, 36(2), 85–92. <https://doi.org/10.1076/snfe.36.2.85.2138>
- Cáceres, Nilton Carlos. (2000). Population ecology and reproduction of the white-eared opossum *Didelphis albiventris* (Mammalia, Marsupialia) in an urban environment of

- Brazil. *Ciencia E Cultura*, 52(3), 171–174. Retrieved from http://jararaca.ufsm.br/websites/niltoncaceres/download/Pop_ecol_2000.pdf
- Carneiro, I. D. O., Sander, A., Silva, N., Moreira-soto, A., Normann, A., & Flehmig, B. (2018). *crossm*. 92(13), 1–14.
- Dacheux, L., Cervantes-Gonzalez, M., Guigon, G., Thiberge, J. M., Vandenbogaert, M., Maufrais, C., ... Bourhy, H. (2014). A preliminary study of viral metagenomics of french bat species in contact with humans: Identification of new mammalian viruses. *PLoS ONE*, 9(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087194>
- Daszak, P., Cunningham, A. A. & Hyatt, A. D. 2000 Emerging infectious diseases of wildlife—threats to biodiversity and human health. *Science* 287, 443–449.
- De Araujo, J., Thomazelli, L. M., Henriques, D. A., Lautenschlager, D., Ometto, T., Dutra, L. M., ... Durigon, E. L. (2012). Detection of hantavirus in bats from remaining rain forest in São Paulo, Brazil. *BMC Research Notes*, 5(1), 1. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-690>
- de Souza, W. M., Fumagalli, M. J., de Araujo, J., Sabino-Santos, G., Maia, F. G. M., Romeiro, M. F., ... Figueiredo, L. T. M. (2018). Discovery of novel anelloviruses in small mammals expands the host range and diversity of the Anelloviridae. *Virology*, 514(October 2017), 9–17. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2017.11.001>
- de Souza, W. M., Fumagalli, M. J., Sabino-Santos, G., Maia, F. G. M., Modha, S., Nunes, M. R. T., ... Figueiredo, L. T. M. (2019). A novel hepacivirus in wild rodents from South America. *Viruses*, 11(3), 1–7. <https://doi.org/10.3390/v11030297>
- Dearing, M. D., & Disney, L. (2010). Ecology of hantavirus in a changing world. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1195(1), 99–112. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05452.x>
- DeVault, T. L., Olson, Z. H., Beasley, J. C., & Rhodes, O. E. (2011). Mesopredators dominate competition for carrion in an agricultural landscape. *Basic and Applied Ecology*, 12(3),

268–274. <https://doi.org/10.1016/j.baae.2011.02.008>

Dias, C. A. R., & Perini, F. A. (2018). Biogeography and early emergence of the genus *Didelphis* (Didelphimorphia, Mammalia). *Zoologica Scripta*, 47(6), 645–654. <https://doi.org/10.1111/zsc.12306>

Dos Reis, N. R.; Peracchi, A.I.; Pedro, W. A.; Lima, I. P. (2006). Ordem Didelphimorphia. In *Mamíferos do Brasil*.

Fenton, A. & Pedersen, A. B. 2005 Community epidemiology in theory and practice: a conceptual framework for classifying disease threats in human and wild populations. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 1815–1821

Franzosa, E. A., Morgan, X. C., Segata, N., Waldron, L., Reyes, J., Earl, A. M., ... Huttenhower, C. (2014). Relating the metatranscriptome and metagenome of the human gut. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(22), E2329–E2338. <https://doi.org/10.1073/pnas.1319284111>

Goldberg, T. L., Gillespie, T. R., Rwego, I. B., Estoff, E. L., & Chapman, C. A. (2008). Forest fragmentation as cause of bacterial transmission among nonhuman primates, humans, and livestock, Uganda. *Emerging Infectious Diseases*, 14(9), 1375–1382. <https://doi.org/10.3201/eid1409.071196>

Goldstein, E. J. C., & Abrahamian, F. M. (2017). 73 - *Infections from Pets* (J. Cohen, W. G. Powderly, & S. M. B. T.-I. D. (Fourth E. Opal, Eds.)). <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-6285-8.00073-3>

Gómez, A., Kilpatrick, A. M., Kramer, L. D., Dupuis, A. P., Maffei, J. G., Marra, P. P., ... Aguirre, A. A. (2008). Multiple factors influence West Nile virus seroprevalence in wild mammals. *Emerging Infectious Diseases*, 14(6), 962–965.

Google Earth Pro. (2019). Retrieved from <https://www.google.com/earth/download/ge/>

Greig, J., Rajić, A., Young, I., Mascarenhas, M., Waddell, L., & Lejeune, J. (2015). A

- scoping review of the role of wildlife in the transmission of bacterial pathogens and antimicrobial resistance to the food chain. *Zoonoses and Public Health*, 62(4), 269–284. <https://doi.org/10.1111/zph.12147>
- Haagmans, B. L., Al Dhahiry, S. H. S., Reusken, C. B. E. M., Raj, V. S., Galiano, M., Myers, R., ... Koopmans, M. P. G. (2014). Middle East respiratory syndrome coronavirus in dromedary camels: an outbreak investigation. *The Lancet Infectious Diseases*, 14(2), 140–145. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70690-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70690-X)
- Hahn, B.H.; Shaw, G.M.; de Cock, K.M.; Sharp, P.M. AIDS as a zoonosis: Scientific and public health implications. *Science* (2000), 287, 607–614.
- Hicks, A. L., Lee, K. J., Couto-Rodriguez, M., Patel, J., Sinha, R., Guo, C., ... Williams, B. L. (2018). Gut microbiomes of wild great apes fluctuate seasonally in response to diet. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04204-w>
- Howard, C. R., & Fletcher, N. F. (2012). Emerging virus diseases: Can we ever expect the unexpected? *Emerging Microbes and Infections*, 1(September), 1–11. <https://doi.org/10.1038/emi.2012.47>
- Jaime, A. L., Joan, S., Lee, B., Nancy, S., Sydney, M. H., Eleanor, L., ... Laurene, M. (2002). *Campylobacter upsaliensis*: Another Pathogen for Consideration in the United States. *Clinical Infectious Diseases*, 34(11), e59–e60. <https://doi.org/10.1086/340266>
- Jansen, a. m. marsupiais didelfídeos: gambás e cuícas. in Andrade, A., Pinto, S.C., Oliveira, R.S., animais de laboratório: criação e experimentação [online]. rio de janeiro: editora fiocruz, (2002). 388 p. isbn: 85-7541-015-6.
- Jones, K. et al. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature* (2008) 451, 990–993.
- Karesh, W.B., Dobson, A., Lloyd-Smith, J.O., Lubroth, J., Dixon, M.A., Bennett, M., Aldrich, S., Harrington, T., Formenty, P., Loh, E.H., et al. Ecology of zoonoses: Natural and unnatural histories. *Lancet* (2012), 380, 1936–1945.

- Keesing, F.; Belden, L.K.; Daszak, P.; Dobson, A.; Harvell, C.D.; Holt, R.D.; Hudson, P.; Jolles, A.; Jones, K. E.; Mitchell, C. E.; et al. Impacts of biodiversity on the emergence and transmission of infectious diseases. *Nature* (2010), 468, 647–652.
- Langmead, B., & Salzberg, S. L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods*, 9, 357. Retrieved from <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>
- Lavrinenko, A., Tukalenko, E., Mappes, T., & Watts, P. C. (2018). Skin and gut microbiomes of a wild mammal respond to different environmental cues. *Microbiome*, 6(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0595-0>
- Levinson, J., Bogich, T. L., Olival, K. J., Epstein, J. H., Johnson, C. K., Karesh, W., & Daszak, P. (2013). Targeting surveillance for zoonotic virus discovery. *Emerging Infectious Diseases*, 19(5), 743–747. <https://doi.org/10.3201/eid1905.121042>
- Loh, E. H., Murray, K. A., Nava, A., & Daszak, P. (2016). Evaluating the Links between Biodiversity, Land-Use Change, and Infectious Disease Emergence. *Tropical Conservation*, (January), 79–88. <https://doi.org/10.1016/j.cemconcomp.2012.08.017>
- Menzel, P., Ng, K. L., & Krogh, A. (2016). Fast and sensitive taxonomic classification for metagenomics with Kaiju. *Nature Communications*, 7, 11257. Retrieved from <https://doi.org/10.1038/ncomms11257>
- Nizeyi, J. B., Innocent, R. B., Erume, J., Kalema, G. R. N. N., Cranfield, M. R., & graczyk, t. k. (2001). campylobacteriosis, salmonellosis, and shigellosis in free-ranging human-habituated mountain gorillas of uganda. *Journal of Wildlife Diseases*, 37(2), 239–244.
- Olival, K. J., Weekley, C. C., & Daszak, P. (2015). Are Bats Really “Special” as Viral Reservoirs? What We Know and Need to Know. *Bats and Viruses: A New Frontier of Emerging Infectious Diseases*, 281–294. <https://doi.org/10.1002/9781118818824.ch11>
- Olival, K. J., Hosseini, P. R., Zambrana-Torrel, C., Ross, N., Bogich, T. L., & Daszak, P. (2017). Host and viral traits predict zoonotic spillover from mammals. *Nature*, 546(7660), 646–650.

- Olson, Z. H., Beasley, J. C., & Rhodes Jr., O. E. (2016). Carcass Type Affects Local Scavenger Guilds More than Habitat Connectivity. *PLOS ONE*, 11(2), e0147798. Retrieved from <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147798>
- One Health Initiative. Available online: <http://www.onehealthinitiative.com/> (accessado em 25/04/2016)
- Ooi, E.E.; Gubler, D.J. Dengue in Southeast Asia: epidemiological characteristics and strategic challenges in disease prevention. *Cad Saude Publica* (2009); 25 Suppl 1: S115–S124.
- Patz, J. A., Daszak, P., Tabor, G. M., Aguirre, A. A., Pearl, M., Epstein, J., ... Zakarov, V. (2004). Unhealthy landscapes: Policy recommendations on land use change and infectious disease emergence. *Environmental Health Perspectives*, 112(10), 1092–1098. <https://doi.org/10.1289/ehp.6877>
- Peracchi, A.L.; Lima, I. P.; Dos Reis, N. R.; Nogueira, M. R.; Filho, H. O. Ordem Chiroptera. In Mamíferos do Brasil. Dos Reis, N. R.; Peracchi, A.L.; Pedro, W. A.; Lima, I. P. (2006). Universidade Estadual de Londrina
- Peres, M. G., Bacchiega, T. S., Appolinário, C. M., Vicente, A. F., Mioni, M. de S. R., Ribeiro, B. L. D., ... Megid, J. (2018). Vaccinia virus in blood samples of humans, domestic and wild mammals in Brazil. *Viruses*, 10(1), 1–12. <https://doi.org/10.3390/v10010042>
- Pfaender, S., Brown, R. J. P., Pietschmann, T., & Steinmann, E. (2014). Natural reservoirs for homologs of hepatitis C virus. *Emerging Microbes and Infections*, 3(000), 0. <https://doi.org/10.1038/emi.2014.19>
- Popgeorgiev, N.; Temmam, S.; Raoult, D.; Desnues, C. Describing the silent human virome with an emphasis on giant viruses. *Intervirology* (2013), 56, 395–412.
- Pybus OG, G. R. (2013). Virology: the virus whose family expanded. *Nature*, 498: 310–3.

- Reck, M., Tomasch, J., Deng, Z., Jarek, M., Husemann, P., & Wagner-Döbler, I. (2015). Stool metatranscriptomics: A technical guideline for mRNA stabilisation and isolation. *BMC Genomics*, 16(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1694-y>
- Ribeiro, M. C., Metzger, J. P., Martensen, A. C., Ponzoni, F. J., & Hirota, M. M. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. *Biological Conservation*, (2009). 142(6), 1141–1153. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biocon.2009.02.021>
- Robertson, C. E., Harris, J. K., Wagner, B. D., Granger, D., Browne, K., Tatem, B., ... Frank, D. N. (2013). Explicet: graphical user interface software for metadata-driven management, analysis and visualization of microbiome data. *Bioinformatics*, 29(23), 3100–3101. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt526>
- Rossi, R. V.; Bianconi, G. V.; Pedro, W. A. Ordem Didelphimorphia. In Mamíferos do Brasil. Dos Reis, N. R.; Peracchi, A.I.; Pedro, W. A.; Lima, I. P. (2006). Universidade Estadual de Londrina
- Ryan, J. R. (2016). *Chapter 4 - Category B Diseases and Agents* (J. R. B. T.-B. and B. (Second E. Ryan, Ed.). <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802029-6.00004-9>
- Secretaria Municipal do Verde, Meio Ambiente e Desenvolvimento Sustentável. <http://campinas.sp.gov.br/governo/meio-ambiente/verde-desenvolvimento.php>. (Acessado em 10/06/2016)
- Soc, P. R. B., Fooks, C. E., Rupprecht, J. L. N., Wood, C. T. W., Pulliam, J. N., Mills, M. E., ... Webb, C. T. (2012). viruses: are bats special? A comparison of bats and rodents as reservoirs of zoonotic A comparison of bats and rodents as reservoirs of zoonotic viruses: are bats special? *Proc R Soc B*. Retrieved from <http://rspb.royalsocietypublishing.org/content/suppl/2013/01/31/rspb.2012.2753.DC1.h%5Cnhttp://rspb.royalsocietypublishing.org/content/280/1756/20122753.full.html#ref-list-1%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1098/rspb.2012.2753%5Cnhttp://rspb.royalsocietypublishing>

- Sonnenburg, J. L., & Fischbach, M. A. (2011). Community health care: therapeutic opportunities in the human microbiome. *Science Translational Medicine*, 3(78), 78ps12-78ps12. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3001626>
- Stearns, J. C., Lynch, M. D. J., Senadheera, D. B., Tenenbaum, H. C., Goldberg, M. B., Cvitkovitch, D. G., ... Neufeld, J. D. (2011). Bacterial biogeography of the human digestive tract. *Scientific Reports*, 1, 170. <https://doi.org/10.1038/srep00170>
- STRAUSS, J. H., STRAUSS, E. G., STRAUSS, J. H., & STRAUSS, E. G. (2008). Viruses Whose Life Cycle Uses Reverse Transcriptase. *Viruses and Human Disease*, 211–259. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-373741-0.50009-X>
- Suzán, G., Marcé, E., Giermakowski, J. T., Mills, J. N., Ceballos, G., Ostfeld, R. S., ... Yates, T. L. (2009). Experimental evidence for reduced rodent diversity causing increased hantavirus prevalence. *PLoS ONE*, 4(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005461>
- Swaddle, J. & Calos, P. Increased avian diversity is associated with lower incidence of human West Nile infection: observation of the dilution effect. *PLoS ONE* 3, (2008) e2488.
- Taylor, D.J., Leach, R.W., Bruenn, J. Filoviruses are ancient and integrated into mammalian genomes. *BMC Evol Biol* (2010); 10: 193.
- Temmam, S., Davoust, B., Berenger, J. M., Raoult, D., & Desnues, C. (2014). Viral metagenomics on animals as a tool for the detection of zoonoses prior to human infection? *International Journal of Molecular Sciences*, 15(6), 10377–10397. <https://doi.org/10.3390/ijms150610377>
- Trevejo, R.T.; Eidson, M. Zoonosis update: West Nile virus. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* (2008), 232, 1302–1309.
- Underwood, W. J., Blauwiekel, R., Delano, M. L., Gillesby, R., Mischler, S. A., & Schoell, A. (2015). *Chapter 15 - Biology and Diseases of Ruminants (Sheep, Goats, and Cattle)* (J. G. Fox, L. C. Anderson, G. M. Otto, K. R. Pritchett-Corning, & M. T. B. T.-L. A. M. (Third E. Whary, Eds.). <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409527->

4.00015-8

- Voutilainen, L., Savola, S., Kallio, E. R., Laakkonen, J., Vaheri, A., Vapalahti, O., & Henttonen, H. (2012). Environmental change and disease dynamics: Effects of intensive forest management on Puumala hantavirus infection in boreal bank vole populations. *PLoS ONE*, 7(6), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039452>
- Wasimuddin, Menke, S., Melzheimer, J., Thalwitzer, S., Heinrich, S., Wachter, B., & Sommer, S. (2017). Gut microbiomes of free-ranging and captive Namibian cheetahs: Diversity, putative functions and occurrence of potential pathogens. *Molecular Ecology*, 26(20), 5515–5527. <https://doi.org/10.1111/mec.14278>
- Wolfe, N.D., Daszak, P., Kilpatrick, A.M., Burke, D.S. Bushmeathunting, deforestation, and prediction of zoonoses emergence. *Emerg. Infect. Dis.* (2005); 11, 1822–1827.
- Wolfe, N. D., Panosian Dunavan, C.; Diamond, J. Origins of major human infectious diseases. *Nature* (2007), 447, 279–283.
- Wong, S.; Lau, S.; Woo, P.; Yuen, K.Y. Bats as a continuing source of emerging infections in humans. *Rev. Med. Virol.* (2007), 17, 67–91.
- Woolhouse, M. E; Gowtage-Sequeria, S. Host range and emerging and reemerging pathogens. *Emerg Infect Dis* (2005); 11: 1842–1847.
- Woolhouse, M.; Scott, F.; Hudson, Z.; Howey, R.; Chase-Topping, M. Human viruses: Discovery and emergence. *Phil. Trans. R. Soc. B* (2012), 367, 2864–2871.
- Wu, Z., Lu, L., Du, J., Yang, L., Ren, X., Liu, B., ... Jin, Q. (2018). Comparative analysis of rodent and small mammal viromes to better understand the wildlife origin of emerging infectious diseases. *Microbiome*, 6(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0554-9>
- Youngblut, N. D., Reischer, G. H., Walters, W., Schuster, N., Walzer, C., Stalder, G., ... Farnleitner, A. H. (2018). Host diet and evolutionary history explain different aspects of gut microbiome diversity among vertebrate clades. *BioRxiv*, (2019), 484006.

<https://doi.org/10.1101/484006>

6. Apêndices

6.1. Tabela de espécies de bactérias representando pelo menos 0,1 % das sequências classificadas

	MTL	MTO	RCL	RCO	SG8L	SGL	Total
[Clostridium] bolteae	10825	2507				5626	18958
[Clostridium] hiranonis					2026		2026
[Clostridium] leptum				672			672
[Clostridium] scindens		1846					1846
[Ruminococcus] gnavus	12037	3421				4922	20380
[Ruminococcus] torques	45294	6350	5050	530	4984	27060	89268
Abiotrophia defectiva				642			642
Absiella dolichum				547	2212		2759
Acidihalobacter prosperus	7420	3237	11414	1550	10325	50694	84640
Acinetobacter sp. P8-3-8	40966	16975	51029	6172	62657	121909	299708
Actinobacillus capsulatus				506			506
Adhaeribacter aquaticus	22137					9355	31492
Alcanivorax hongdengensis				745			745
Algicola sagamiensis		2385		844			3229
Alkaliflexus imshenetskii	10047		6355		1790		18192
Alkaliphilus transvaalensis					1784		1784
Anaerococcus tetradius					1643		1643
Anaerophaga thermohalophila			2543				2543
Anaerostipes caccae	8501	2575				5306	16382
Aquimarina agarivorans	18965	8950	28925	3849	33174	44916	138779
Arsenophonus endosymbiont of Nilaparvata lugens		7831		1917			9748
Aurantimonas manganooxydans			5877				5877
Avibacterium paragallinarum	9450	13257		3108			25815
Bacillus bogoriensis	12397				2250		14647
Bacillus simplex				1444			1444
Bacteroides caccae	20226	3564	2522		1725	11483	39520
Bacteroides massiliensis		2153					2153
Bacteroides paurosaccharolyticus					1760		1760
Bacteroides propionificaciens						7688	7688
Bacteroides pyogenes			2525		2296		4821
Bacteroides uniformis	21676	4810			2097	17544	46127
Barnesiella intestinihominis	7484					5433	12917
Bavariicoccus seileri				840			840
Blautia obeum	23237	5095	4419	827	1988	13316	48882
Brachyspira alvinipulli	41045		8602		6171	59678	115496
Brachyspira pilosicoli	8516		2552			13000	24068
Burkholderia mallei		2309		952			3261
Butyrlicimonas synergistica			3645				3645
Caldalkalibacillus thermarum					1686	4732	6418

Campylobacter corcagiensis			9597				9597
Campylobacter cuniculorum	78770		15843		2996	25197	122806
Campylobacter fetus			2369				2369
Campylobacter jejuni			3333				3333
Candidatus Magnetobacterium casensis			2458				2458
Candidatus Paracaedibacter symbiosus	42532	1959		539		19507	64537
Candidatus Schmidhempelia bombi		2500					2500
Capnocytophaga cynodegmi	8233	7811		1066	1912	10473	29495
Carnobacterium maltaromaticum				649			649
Chlamydia muridarum	7565					8104	15669
Chlamydia psittaci	10801	2584	15661	1502	14617	30776	75941
Citrobacter youngae				1037			1037
Clostridiales bacterium VE202-09			2322				2322
Clostridium botulinum			3959		2340		6299
Clostridium sp. 12(A)		1807					1807
Corynebacterium efficiens		2810			5500		8310
Corynebacterium pseudogenitalium		2551		569	3852		6972
Dethiobacter alkaliphilus	7510					9197	16707
Diplorickettsia massiliensis		5623		1277			6900
Dorea longicatena		1999					1999
Dyadobacter tibetensis						4877	4877
Enterococcus mundtii				801			801
Eremococcus coleocola				1449			1449
Eubacterium ventriosum	11788	3340				5635	20763
Eudoraea adriatica			3623				3623
Facklamia sourekii				773			773
Faecalibacterium prausnitzii		5449				4922	10371
Flavobacterium chungangense	33156					16608	49764
Fluoribacter dumoffii		1742					1742
Fusobacterium gonidiaformans	10218				4016		14234
Fusobacterium nucleatum	68588	1737	16386	806	30654	5592	123763
Fusobacterium russii					2817		2817
Gemella cuniculi				796			796
Haemophilus haemolyticus		4359		1223			5582
Helicobacter canadensis	9571						9571
Helicobacter cinaedi	8663						8663
Helicobacter felis	45130		2716			19962	67808
Helicobacter pullorum	215345		14714		5452	77986	313497
Helicobacter pylori	142829		7391		2227	47191	199638
Helicobacter rodentium	8827		4440			9641	22908
Heliobacterium modesticaldum	21732	2690	3091	2587	3687	16824	50611
Hydrogenovibrio kuenenii		4121		1118			5239
Intestinibacter bartlettii					2300		2300
Kineothrix alysoides		1786					1786
Lachnospiraceae bacterium 1_4_56FAA		2254					2254
Lactobacillus crispatus	9672			1230	1918	10542	23362

Lactobacillus rhamnosus				1665			1665
Lactobacillus rossiae			6289		5197	21670	33156
Lactococcus garvieae						21544	21544
Lawsonia intracellularis	7742					8617	16359
Leptotrichia hofstadii	9207				2737		11944
Leptotrichia shahii						6673	6673
Listeria grayi	10800			1446		12906	25152
Mannheimia haemolytica		6941		2874			9815
Marinilabilia salmonicolor			2614				2614
Marinococcus halotolerans				893			893
Moraxella caprae		13204		3467			16671
Neisseria polysaccharea				653			653
Nitrincola lacisaponensis		14928		545	2534		18007
Nocardioideae bacterium Broad-1	7353						7353
Oligella ureolytica		1791					1791
Parabacteroides merdae	17583	2063	10667	679	7039	10275	48306
Pararhodospirillum photometricum		1948	2347	693		7654	12642
Parasutterella excrementihominis		2687					2687
Parvimonas micra			6540		5590		12130
Peptoniphilus sp. ChDC B134	8152		2707		3059		13918
Photobacterium phosphoreum	19468	2118		747		10563	32896
Porphyromonas asaccharolytica			2657				2657
Porphyromonas levii			9839		6380		16219
Porphyromonas somerae			4783		2847		7630
Porphyromonas uenonis			2529				2529
Prevotella pleuritidis			3349				3349
Prevotella sp. 10(H)	7516		5930	660	3021		17127
Prevotella sp. oral taxon 473			5494				5494
Prevotella timonensis	8468					4616	13084
Prochlorococcus sp. scB241_528O2			4424				4424
Proteiniphilum acetatigenes	7580		4263		3069	6629	21541
Providencia stuartii		3854		1068		4428	9350
Pseudeschherichia vulneris		1934					1934
Pseudoflavonifractor capillosus	13153	2352	2416		3839	10361	32121
Psychrilyobacter atlanticus					3157		3157
Ruminiclostridium josui					1804		1804
Salinimicrobium terrae			3326				3326
Schaalia odontolytica					1734		1734
Sediminispirochaeta bajacaliforniensis	7493					12356	19849
Segetibacter koreensis	9597					9453	19050
Selenomonas sp. oral taxon 149					1636		1636
Sphingobacteriaceae bacterium DW12			3557	589			4146
Streptococcus anginosus				1229	2153		3382
Streptomyces lydicus			2625				2625
Streptomyces sp. C		1772					1772
Streptomyces sp. NRRL F-2890		2342					2342

Streptomyces sp. NRRL F-5123				731			731
Streptomyces sp. NRRL F-6677		2070			1703		3773
Streptomyces viridosporus					1789		1789
Streptomyces xylophagus				562			562
Sulfurospirillum arcachonense	13322					4801	18123
Sulfurospirillum multivorans	49591		3975			14773	68339
Thermicanus aegyptius		2786		1248			4034
Treponema primitia			2369				2369
Treponema socranskii			3175			7382	10557
Varibaculum cambriense					1845		1845
Vibrio alginolyticus		3211		930			4141

6.2. Tabela de espécies de vírus contendo um total de no mínimo 5 reads

	MTL	MTO	RCL	RCO	SG8L	SGL	Total
Erwinia virus Asesino;		1				617	618
Ralstonia virus RSA1;	49		231		159	5	444
Baboon endogenous virus;	23	81	30	34	83	45	296
Hepacivirus C;	65	12	74	8	80	33	272
Reticuloendotheliosis virus;	27	72	31	24	81	8	243
Atlantic salmon swim bladder sarcoma virus;	21	62	33	26	59	22	223
Gibbon ape leukemia virus;	28	39	26	26	69	18	206
Murine leukemia virus;	15	32	11	10	40	6	114
Feline leukemia virus;	14	21	16	11	44	5	111
Mouse mammary tumor virus;	14	24	22	8	27	8	103
Choristoneura fumiferana granulovirus;	19	35	14	3	9	16	96
Saimiriine betaherpesvirus 4;	14		17		39	23	93
Haliotid herpesvirus 1;	9	21	15	9	30	8	92
Orpheovirus IHUMI-LCC2;	12	6	25	1	22	11	77
Koala retrovirus;	3	19	10	9	28	7	76
Lymphocystis disease virus - isolate China;	5	8	21	6	18	15	73
Flamingopox virus FGPVKD09;	4	2	7		3	44	60
Glypta fumiferanae ichnovirus;	4	5	13	5	26	5	58
Hyposoter fugitivus ichnovirus;	7	11	6	2	28		54
RD114 retrovirus;	6	13	10	6	17	2	54
Erwinia virus EaH2;						46	46
Bovine retrovirus CH15;	2	5	7	10	15	3	42
Simian retrovirus 8;	2	5	12	6	16	1	42
Chrysochromulina ericina virus;	2	6	4	2	9	16	39
Chipapillomavirus 2;	34	1			1		36
Ovine enzootic nasal tumor virus;	3	10	3	1	9	7	33
Cotesia congregata bracovirus;	2	17	2		7	4	32
Halyomorpha halys virus;						30	30
Paramecium bursaria Chlorella virus 1;	7	4	8	2	7	2	30
Squirrel monkey retrovirus;	11	4		2	10	3	30
Squirrel monkey simian foamy virus;	1	6	4	14	4	1	30
Acanthamoeba polyphaga mimivirus;	6	3	6		6	8	29
Arthrobacter virus Mudcat;	5	4		17	2		28
Pandoravirus inopinatum;	6	3	1	10	5	2	27
Mason-Pfizer monkey virus;	2	5	6	4	7	2	26
Molluscum contagiosum virus;	3	2	7	1	7	5	25
Dishui lake phycodnavirus 1;	6	4			5	9	24

Aureococcus anophagefferens virus;	2	1	3	1	2	14	23
Cyprinid herpesvirus 3;	13		1		2	7	23
Simian retrovirus 4;	1	7	7		6	1	22
Pandoravirus salinus;	5	2	5	1	4	4	21
BeAn 58058 virus;	4	4	3	3	2	3	19
Bathycoccus sp. RCC1105 virus BpV;		1	3		2	11	17
Escherichia virus SUSP2;						17	17
Jaagsiekte sheep retrovirus;	1	1	5	5	5		17
Moku virus;						17	17
Walleye dermal sarcoma virus;	1	5	1	3	5	2	17
Acanthamoeba polyphaga mouloumou virus;	1	1	4	2	3	5	16
Lepidopteran iteradenovirus 4;			8	8			16
Murine osteosarcoma virus;	1	3	4	1	6	1	16
Spider monkey simian foamy virus;				16			16
Cercopithecine betaherpesvirus 5;	3	3	4		3	1	14
Citrobacter virus Moog;				2		12	14
Moloney murine sarcoma virus;	2	2	3		6	1	14
Bat iflavivirus;						12	12
Equid gammaherpesvirus 5;	3	4		1	4		12
Shigella virus Sf6;						12	12
Cafeteria roenbergensis virus;	2	2	4		2	1	11
Megavirus chiliensis;	1	1		1	7	1	11
Y73 sarcoma virus;	3	1			4	3	11
Campylobacter virus CP21;	4		2	1	1	2	10
Cricetid gammaherpesvirus 2;	2		5	1	2		10
Escherichia virus phiX174;	1	8			1		10
Tokyo virus A1;		1	1		6	2	10
Cnaphalocrocis medinalis granulovirus;	1		2	2	4		9
Desmodus rotundus endogenous retrovirus;	1	4			3	1	9
Fujinami sarcoma virus;	3	2	1		3		9
Noumeavirus;	1	1	1		2	4	9
Oryctes rhinoceros nudivirus;	1	2	3	2	1		9
Pandoravirus macleodensis;		2	1	1	4	1	9
Pandoravirus quercus;		2	2	2	1	2	9
Pasteurella virus F108;		8		1			9
Rhodococcus virus Pepy6;	1			8			9
Cedrat virus A11;			7			1	8
Hubei permutotetra-like virus 9;		8					8
Invertebrate iridescent virus 31;	1	2	2	1	2		8
Rhodococcus virus Poco6;				8			8
Abelson murine leukemia virus;			1		2	4	7

Elephantid betaherpesvirus 1;	1	1	1		3	1	7
Hardy-Zuckerman feline sarcoma virus;		1	1		4	1	7
Salmonella virus HK620;						7	7
Salmonella virus SPN3US;		1			2	4	7
Avian sarcoma virus CT10;	1					5	6
Bovine foamy virus;				6			6
Bovine gammaherpesvirus 4;	1				1	4	6
Cyprinid herpesvirus 1;	1				1	4	6
Feline immunodeficiency virus;		1	1		4		6
Harvey murine sarcoma virus;	1	3	1			1	6
Hubei picorna-like virus 42;						6	6
Hymenopteran ambidensovirus 1;	6						6
Micromonas pusilla virus 12T;	1				5		6
Mule deerpox virus;		3		1	1	1	6
Tunisvirus;	1		1	1	3		6
Escherichia virus SUSP1;						5	5
Heliothis zea nudiviruses;	1	2	1		1		5
Human gammaherpesvirus 4;		1	2	1		1	5
Invertebrate iridescent virus 6;	1		1		2	1	5
Pandoravirus dulcis;	1		3		1		5
Ranid herpesvirus 2;			3			2	5
Sea lion mastadenovirus A;	2	1				2	5
Volepox virus;	1				1	3	5

6.3. Resultados paralelos

Juntamente às amostras de gambás, outras duas amostras, descritas a seguir, foram incluídas no sequenciamento e seus resultados serão utilizados em publicações futuras.

6.3.1. Sequenciamento completo do genoma de um isolado brasileiro do vírus da laringotraqueíte infecciosa (ILTV)

A amostra patogênica ILTV/Brazil/2018/Unicamp-02, proveniente de uma granja de galinhas poedeiras do estado do Espírito Santo, foi caracterizada como cepa de campo após PCR convencional e sequenciamento parcial do gene ICP4 (fig.3). Isolada após 5 passagens em ovos embrionados, seguiu-se o pré-tratamento, extração de DNA e preparação da biblioteca com kit Nextera XT (Illumina) e finalmente, foi sequenciada para a obtenção do genoma completo. As sequências de proteínas imunogênicas podem ser utilizadas para a construção de uma vacina recombinante.

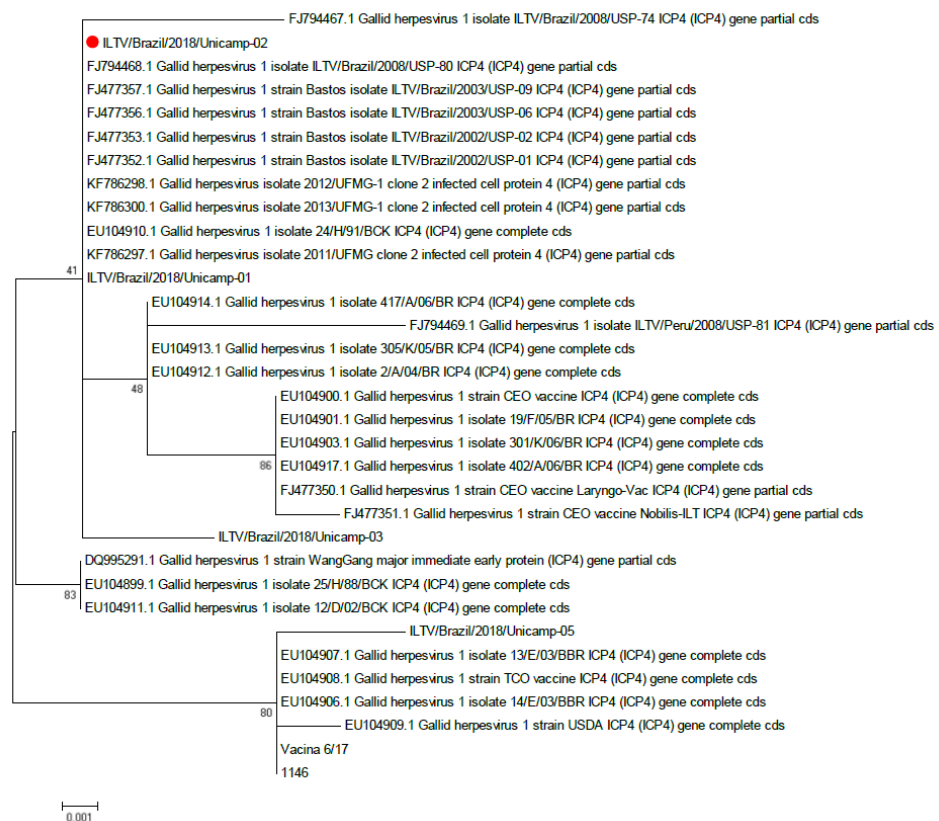


Figura 3: Árvore filogenética exibindo relações entre cepas vacinais e de campo de ILTV, baseada no alinhamento de sequências parciais do gene ICP4.

6.3.2. Detecção metagenômica de sequências relacionadas a Herpesvirus humanos em uma amostra de morcego *Molossus molossus*.

Uma amostra de suabe anal coletada de um morcego da espécie *Molossus molossus* se agrupou junto à uma sequência de herpesvírus humano após a análise filogenética de sequências parciais. Esta amostra foi processada para a realização de sequenciamento NGS de acordo com o protocolo descrito anteriormente nesta tese. A presença de diversos herpesvirus humanos foi confirmada após a análise metagenômica das sequências obtidas (fig. 4)



Figura 4: Gráfico exibindo espécies de herpesvírus pertencentes à família Betaherpesvirinae, detectadas após a análise metagenômica.

6.4. Coautoria de artigos científicos publicados durante o doutorado

Artigos publicados no período de agosto de 2015 a julho de 2019:

1. RIZOTTO, LAÍS S.; SIMÃO, RAPHAEL M.; SCAGION, GUILHERME P.; SIMASAKI, ALESSANDRA A.; **CASERTA, LEONARDO C.**; BENASSI, JULIA C.; ARNS, CLARICE W.; FERREIRA, HELENA L. Detection of avian metapneumovirus subtype A from wild birds in the State of São Paulo, Brazil. PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA (ONLINE). , v.39, p.209 - 213, 2019. *Referências adicionais: Português. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: [doi:10.1590/1678-5150-pvb-6021]*
2. *CAVALHEIRO, MATHEUS MARTINI; ***CASERTA, LEONARDO C.**; DOS SANTOS, MARCIA M. A. B.; BARNABÉ, ANA C. S.; DURÃES-CARVALHO, RICARDO; AIELLO PADILLA, MARINA; SIMÃO, RAPHAEL M.; RIZOTTO, LAÍS S.; SIMAS, PAULO V. M.; BASTOS, JULIANA C. S.; CARDOSO, TEREZA C.; FELIPPE, PAULO A. N.; ARNS, C.W.; FERREIRA, HELENA L. Avian coronavirus isolated from a pigeon sample induced clinical disease, tracheal ciliostasis, and a high humoral response in day-old chicks. AVIAN PATHOLOGY. , v.48, p.1 - 19, 2018. *Referências adicionais: Inglês. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: [doi:10.1080/03079457.2018.1442557]*
***Primeira autoria compartilhada**
3. JUDICE, CARLA CRISTINA; TAN, JESLIN J. L.; PARISE, PIERINA LORENCINI; KAM, YIU-WING; MILANEZ, GUILHERME PAIER; LEITE, JULIANA ALMEIDA; **CASERTA, LEONARDO CARDIA**; ARNS, CLARICE WEIS; RESENDE, MARIANGELA RIBEIRO; ANGERAMI, RODRIGO; AMARAL, ELIANA; JUNIOR, RENATO PASSINI; FREITAS, ANDRÉ RICARDO RIBAS; COSTA, FABIO TRINDADE MARANHÃO; PROENCA-MODENA, JOSE LUIZ; NG, LISA F. P. Efficient detection of Zika virus RNA in patients' blood from the 2016 outbreak in Campinas, Brazil. Scientific Reports. , v.8, p.1 - , 2018. *Referências adicionais: Inglês. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: [doi:10.1038/s41598-018-22159-2]*
4. RIZOTTO, LAÍS S.; SCAGION, GUILHERME P.; CARDOSO, TEREZA C.; SIMÃO, RAPHAEL M.; **CASERTA, LEONARDO C.**; BENASSI, JULIA C.; KEID, LARA B.; OLIVEIRA, TRÍCIA M. F. DE S.; SOARES, RODRIGO M.; ARNS, CLARICE W.; VAN BORM, STEVEN; FERREIRA, HELENA L. Complete Genome Sequence of an Avian Metapneumovirus Subtype A Strain Isolated from Chicken (*Gallus gallus*) in Brazil. GENOME ANNOUNCEMENTS. , v.5, p.e00688-17 - , 2017. *Referências adicionais: Inglês. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: [doi:10.1128/genomea.00688-17]*
5. BASTOS, JULIANA CRISTINA SANTIAGO; PADILLA, MARINA AIELLO; **CASERTA, LEONARDO CARDIA**; MIOTTO, NOELLE; VIGANI, ALINE GONZALEZ; ARNS, CLARICE WEIS
 Hepatitis C virus: Promising discoveries and new treatments. World Journal of Gastroenterology. , v.22, p.6393 - , 2016. *Referências adicionais: Inglês. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: [doi:10.3748/wjg.v22.i28.6393]*
6. DURÃES-CARVALHO, RICARDO; **CASERTA, LEONARDO C.**; BARNABÉ, ANA C. S.; MARTINI, MATHEUS C.; FERREIRA, HELENA L.; FELIPPE, PAULO A. N.; SANTOS, MÁRCIA B.; ARNS, CLARICE W. Coronaviruses Detected in Brazilian Wild Birds Reveal Close Evolutionary Relationships with Beta- and Deltacoronaviruses Isolated From Mammals. Journal of Molecular Evolution. , v.81, p.21 - 23, 2015. *Referências adicionais: Inglês. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: [doi:10.1007/s00239-015-9693-9]*

7. Anexos

7.1. Autorização SISBIO para atividades envolvendo fauna silvestre



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 45807-2	Data da Emissão: 17/01/2018 10:36	Data para Revalidação*: 16/02/2019
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Cláudio Wels Arns	CPF: 271.855.160-72
Título do Projeto: Pesquisa de microrganismos (vírus e bactérias) em aves silvestres, morcegos e outros mamíferos silvestres.	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS	CNPJ: 46.068.425/0001-33

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Padronização do RT-PCR e Teste das amostras por RT-PCR	12/2016	09/2018
2	Isolamento viral, Análise e interpretação dos resultados, Preparação de relatório	02/2017	09/2019
3	Coleta e remessa das amostras	04/2017	09/2020
4	Sequenciamento, análise filogenética, Metagenômica	09/2017	09/2018
5	Sequenciamento Alinhamento/Filogenia Caracterização bioinformática, Metagenômica	09/2017	09/2020
6	Análise e interpretação dos resultados, Preparação dos relatórios, Preparação dos ma	09/2017	09/2020

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exige o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/gen .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

Outras ressalvas

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 66196825



Página 1/5



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 45807-2	Data da Emissão: 17/01/2018 10:36	Data para Revalidação*: 16/02/2019
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Clarice Wels Arns	CPF: 271.855.160-72
Título do Projeto: Pesquisa de microrganismos (virus e bactérias) em aves silvestres, morcegos e outros mamíferos silvestres.	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS	CNPJ: 46.068.425/0001-33

1	1) Para ARIE Matão de Cosmópolis, não está autorizada a metodologia "Fragmento de tecido/órgão" de carnívoros e de tatu. 2) A presente autorização só terá validade após aprovação pela comissão de ética no uso de animais da Universidade Estadual de Campinas. 3) Os trabalhos de campo devem ser agendados com as chefias das UC's com antecedência mínima de 15 dias para que sejam informadas as ressalvas e especificidades de cada uma, sendo acordados os procedimentos e atividades possíveis. 4) O volume de sangue coletado não deve ultrapassar o equivalente a 1% da massa corporal da ave. Em coletas consecutivas, não deve ultrapassar 2% a cada 14 dias. Não deve ser utilizada a metodologia de punção cardíaca. 5) As armadilhas utilizadas para captura de mamíferos deverão ser vistoriadas pelo menos duas vezes ao dia (matutino e vespertino) para minimizar a morte devido a hipotermia ou hipertermia. 6) As armadilhas de queda deverão ser mantidas fechadas entre as campanhas e deverão ser retiradas após a última campanha, caso não haja previsão de reutilização, e os buracos devem ser tampados com terra. 7) As redes de neblinas deverão ser verificadas no mínimo de 20 em 20 minutos. 8) Os animais somente deverão ser soltos no ambiente após recuperação total da anestesia. 9) Para ARIE Matão de Cosmópolis - Gostaríamos de receber, com antecedência, o cronograma de atividades na UC. O trabalho de campo na ARIE Matão de Cosmópolis deve ser agendado com antecedência. O pesquisador deverá informar a Chefe da Unidade os dias do mês em que iniciará o trabalho de campo e o dia em que o finalizará. Para tanto solicitamos que registre a sua agenda de trabalho enviando mensagem para: marciagrodriues@gmail.com ou entre em contato pelo celular (o/ Whatsapp): 19 – 96112-8888. Solicitamos também que envie qualquer informação que considere relevante para subsidiar o Plano de Manejo da UC, que está em fase de elaboração.
---	---

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Paulo Anselmo Nunes Felipe	DETECÇÃO VIRAL E AJUDA NA COLETA DE AMOSTRAS E TRANSPORTE	485.008.606-34	86247104 SSP-GP	Brasileira
2	JÚLIO CÉSAR DA COSTA	Ajuda na coleta de amostras e transporte	225.521.608-67	325737502 SSP/GP-GP	Brasileira
3	Ana Caroline de Souza Barnabé	DETECÇÃO VIRAL E AJUDA NA COLETA DE AMOSTRAS E TRANSPORTE	021.631.911-09	4907852 DGPC-GO	Brasileira
4	Helena Lage Ferreira	Colaborador Científico	034.402.556-03	M8542260 SSP-MG	Brasileira
5	Leonardo Cardia Caserta	DETECÇÃO VIRAL E AJUDA NA COLETA DE AMOSTRAS E TRANSPORTE	335.395.399-06	449561550 SSP-GP	Brasileira
6	Matheus Cavalheiro Martini	DETECÇÃO VIRAL E AJUDA NA COLETA DE AMOSTRAS E TRANSPORTE	001.666.860-00	7078828725 SJO-RS	Brasileira
7	Michael Edward Miller	Ajuda na coleta de amostras, transporte e processamento	052.360.309-60	96520867 ssp-FR	Brasileira
8	Reinaldo Bolognini Orsi	(auxílio na captura de morcegos)	072.207.648-71	12734281 ssp/sp-GP	Brasileira
9	PAULO VITOR MARQUES SIMAS	Pesquisador, que atuará na coordenação de coleta e análise	317.491.388-83	350524439 SSP-GP	Brasileira
10	Felipe Nunes Felipe	Processamento de material	430.455.018-77	363263937 ssp-GP	Brasileira
1	Raissa Marques Beck	Deteção viral e processamento de amostras	373.809.578-05	460275373 ssp-GP	Brasileira
1	THOMAZ HENRIQUE BARRELLA	Coordenar as coletas na Mata Sta Genebra, biólogo	278.587.868-06	26788493X SSP-GP	Brasileira

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 66196825



Página 2/5



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 45807-2	Data da Emissão: 17/01/2018 10:36	Data para Revalidação*: 16/02/2019
* De acordo com o art. 26 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Cláudio Wels Arns	CPF: 271.855.160-72
Título do Projeto: Pesquisa de microrganismos (vírus e bactérias) em aves silvestres, morcegos e outros mamíferos silvestres.	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS	CNPJ: 46.068.425/0001-33

1	Cynira Any Jovilhana da Silva Gabriel	bióloga Mata Sta. Genebra- auxílio taxonomia	120.818.908-52	0252519434 MDEXB-SP	Brasil
1	RODRIGO ANTONIO ARAÚJO PIRES	auxílio na captura de morcegos	248.595.818-14	265597560 asp-SP	Brasil
1	Paulo de Tarso Gerace da Rocha e Silva	Coleta, identificação de amostras	715.438.647-91	085806198 IFF-RJ	Brasil

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	CAMPINAS	SP	Centro de Triagem do Bosque dos Jequitibás	Fora de UC Federal
2	JUNDIAÍ	SP	Centro de Triagem da Associação Mata Ciliar ? Jundiaí	Fora de UC Federal
3		SP	ÁREA DE RELEVANTE INTERESSE ECOLÓGICO MATA DE SANTA GENEBRA	UC Federal
4	CAMPINAS	SP	Parque Santa Genebra	Fora de UC Federal
5	CAMPINAS	SP	Mata Santa Genebra	Fora de UC Federal
6	CAMPINAS	SP	APA de Sousa e Joaquim Egídio - Campinas	Fora de UC Federal
7		SP	ÁREA DE RELEVANTE INTERESSE ECOLÓGICO MATÃO DE COSMÓPOLIS	UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Captura de animais silvestres in situ	Piciformes, Columbiformes, Chiroptera, Carniiformes, Apodiformes, Cingulata, Strigiformes, Felidae, Pelecaniformes, Passeriformes, Galliformes, Psittaciformes, Falconiformes, Canidae, Procyonidae, Rodentia, Mustelidae, Accipitriformes, Anseriformes, Marsupialia, Cathartiformes
2	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Accipitriformes, Apodiformes, Cingulata, Falconiformes, Pelecaniformes, Passeriformes, Psittaciformes, Piciformes, Strigiformes, Galliformes, Anseriformes, Marsupialia, Felidae, Canidae, Rodentia, Mustelidae, Carniiformes, Cathartiformes, Chiroptera, Columbiformes, Procyonidae
3	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Pelecaniformes, Galliformes, Falconiformes, Columbiformes, Psittaciformes, Piciformes, Passeriformes, Carniiformes, Cingulata, Mustelidae, Procyonidae, Strigiformes, Felidae, Accipitriformes, Anseriformes, Apodiformes, Marsupialia, Rodentia, Cathartiformes, Chiroptera, Canidae
4	Marcação de animais silvestres in situ	Canidae, Mustelidae, Rodentia, Marsupialia, Chiroptera, Cingulata, Procyonidae, Felidae

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Aves)	Penas, Fezes, Sangue, Outras amostras biológicas (GUABES TRAQUEAIS e cloacal), Animal encontrado morto ou partes (carcassa)/osso/pele
2	Amostras biológicas (Carnívoros)	Sangue, Outras amostras biológicas (Swab traqueal e anal), Fezes, Animal encontrado morto ou partes (carcassa)/osso/pele, Fragmento de tecido/órgão
3	Amostras biológicas (Outros mamíferos)	Pêlo, Animal encontrado morto ou partes (carcassa)/osso/pele, Sangue, Secreção, Fezes, Outras amostras biológicas (Swab traqueal e anal)
4	Amostras biológicas (Tatus)	Sangue, Animal encontrado morto ou partes (carcassa)/osso/pele, Fezes, Outras amostras biológicas (Swab traqueal e anal), Fragmento de tecido/órgão, Secreção
5	Método de captura/coleta (Aves)	Rede de neblina, Puçá
6	Método de captura/coleta (Carnívoros)	Armadilha tipo gaiola com atração por iscas ("Box Trap/Tomahawk/Sherman")

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 66196825





Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 45807-2	Data da Emissão: 17/01/2018 10:36	Data para Revalidação*: 16/02/2019
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Clarice Wels Arns	CPF: 271.855.160-72
Título do Projeto: Pesquisa de microrganismos (vírus e bactérias) em aves silvestres, morcegos e outros mamíferos silvestres.	
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS	CNPJ: 46.068.425/0001-33

7	Método de captura/coleta (Outros mamíferos)	Armadilha tipo gaiola com atração por iscas ("Box Trap/Tomahawk/Sherman"), Armadilha de queda "pit fall", Outros métodos de captura/coleta (Ceva e brete m.ável)
8	Método de captura/coleta (Tatus)	Captura manual, Armadilha tipo gaiola com atração por iscas ("Box Trap/Tomahawk/Sherman")
9	Método de marcação (Aves)	Microchip
10	Método de marcação (Carnívoros)	Microchip
11	Método de marcação (Outros mamíferos)	Microchip
12	Método de marcação (Tatus)	Microchip

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS	
2	UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS	

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 66196825



Página 4/5



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 45807-2	Data da Emissão: 17/01/2018 10:36	Data para Revalidação*: 16/02/2019
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Clarice Wels Arns	CPF: 271.855.160-72
Título do Projeto: Pesquisa de microrganismos (vírus e bactérias) em aves silvestres, morcegos e outros mamíferos silvestres.	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS	CNPJ: 46.068.425/0001-33

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº 03/2014, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Taxon*	Qtde.	Tipo de amostra	Qtde.	Data

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 66196825

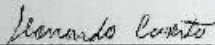


7.2. Declaração de direitos autorais

Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **INVESTIGAÇÃO DO MICROBIOMA E OCORRÊNCIA DE PATÓGENOS ZOONÓTICOS EM GAMBÁS DIDELPHIS DE FRAGMENTOS FLORESTAIS DA REGIÃO DE CAMPINAS – SP**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/96, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 29/07/2019

Assinatura : 
Nome do(a) autor(a): **Leonardo Cardia Caserta**
RG n.º 449561550

Assinatura : 
Nome do(a) orientador(a): **Clarice Weis Arns**
RG n.º 5003366001