



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE BIOLOGIA

PAULO VITOR MARQUES SIMAS

METAVIROMA DE MORCEGOS *Tadarida brasiliensis*  
VIRAL METAGENOMICS OF *Tadarida brasiliensis* BATS

CAMPINAS

2015

**PAULO VITOR MARQUES SIMAS**

**METAVIROMA DE MORCEGOS *Tadarida brasiliensis*  
VIRAL METAGENOMIC OF *Tadarida brasiliensis* BATS**

*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*

*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*

Orientadora/Supervisor: CLARICE WEIS ARNS

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELO ALUNO PAULO VITOR MARQUES SIMAS E ORIENTADA PELA PROFESSORA DOUTORA CLARICE WEIS ARNS.

**CAMPINAS  
2015**

**Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s):** Não se aplica.

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

Si42m Simas, Paulo Vitor Marques, 1984-  
Metaviroma de Morcegos *Tadarida brasiliensis* / Paulo Vitor Marques  
Simas. – Campinas, SP : [s.n.], 2015.

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

1. Epidemiologia molecular. 2. Metagenômica. 3. Coronavírus. 4. Filogenia.  
5. Morcego. I. Ams, Clarice Weis, 1956-. II. Universidade Estadual de  
Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

**Informações para Biblioteca Digital**

**Título em outro idioma:** Viral metagenomic of *Tadarida brasiliensis* bats

**Palavras-chave em inglês:**

Molecular epidemiology

Metagenomics

Coronaviruses

Phylogeny

Bats

**Área de concentração:** Microbiologia

**Titulação:** Doutor em Genética e Biologia Molecular

**Banca examinadora:**

Clarice Weis Ams [Orientador]

Ana Carolina Correa Porto

Renata de Lima

Cristina Elisa Alvarez Martinez

José Luiz Proença Módena

**Data de defesa:** 23-10-2015

**Programa de Pós-Graduação:** Genética e Biologia Molecular

Campinas, 23 de outubro de 2015.

## **COMISSÃO EXAMINADORA**

Profa. Dra. Clarice Weis Arns

Profa. Dra. Ana Carolina Correa Porto

Profa. Dra. Renata de Lima

Profa. Dra. Cristina Elisa Alvarez Martinez

Prof. Dr. José Luiz Proença Módena

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

## Epígrafe

***Veni, vidi, vici***  
*Júlio César, 47 a.C.*

## Dedicatória

Dedico esta tese a Ana Caroline de Souza Barnabé, Clarice Weis Arns e Daniel Ferreira de Lima Neto, por incessante colaboração, apoio e incentivo.

## **Agradecimentos**

Aos meus pais Paulo e Matilde, meu irmão Zeca e minha cunhada Ana, pela incansável assistência e pelo amor incondicional

Ao Flávio Alberto Fidencio, pelo companheirismo e dedicação

À Janaína Rosa Fidencio, pela colaboração

À Fátima Pereira de Souza, pelos bons conselhos

Aos meus familiares e amigos, por todos os bons momentos vividos

A minha companheira de viagens Cláudia Zabotto, pelo constante incentivo

Aos colegas do Departamento de Segurança Alimentar – CEASA/Campinas – “Vão sentir falta de mim”

A Universidade de Sorocaba – UNISO, pelo apoio

A todos os integrantes do LVA – Laboratório de Virologia Animal – Ana Caroline, Ana Paula, Daniel, Geneci, Juliana, Leonardo, Luiza, Ricardo, Marina, Matheus, Paula, Raissa, pela ajuda incondicional e pelos bons momentos de descontração

Ao Instituto de Biologia – IB/UNICAMP, pelo suporte técnico

Ao LaCTAD – Laboratório Central de Tecnologia de Alto Desempenho – UNICAMP, em especial aos funcionários Leandro, Sandra e Susely, pelas orientações técnicas e pelo pronto atendimento

A Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular – Instituto de Biologia – UNICAMP, em especial a secretária Lourdes, pela prontidão e solicitude

Ao CTBE – Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Etanol / CNPEM – Centro Nacional de Pesquisas em Energia e Materiais, aos Dr. Gustavo Goldman e Dra. Juliana Velaski, por possibilitar meu ingresso no curso de Doutorado

Aos Dr. Paulo Anselmo Nunes Felipe e Fábio André Facco Jacomassa, pela coleta e identificação das amostras

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, pela excelente formação fornecida

A Dra. Clarice Weis Arns, pela orientação e carinho

A FAPESP, pelo suporte financeiro

A todos os colaboradores deste trabalho

MUITO OBRIGADO

## Resumo

*Tadarida brasiliensis* é uma espécie de morcego típica das Américas adaptada a áreas urbanas, envolvida na disseminação de diversos agentes virais. Dentre estes, os Coronavírus (CoV) se destacam para vigilância sanitária e epidemiológica, pois nas últimas décadas surgiram estirpes altamente patogênicas que evoluíram a partir dos morcegos. Os objetivos deste trabalho foram caracterizar as espécies de Coronavírus e as suas relações filogenéticas a partir de uma metagenômica viral em morcegos. Para tanto, foram utilizados 10 swabs anais e 10 swabs traqueais de 10 morcegos da espécie *T. brasiliensis* coletados em 2011 no Bosque dos Jequitibás, Campinas, Estado de São Paulo, Brasil. As amostras foram submetidas à *Next-Gen Sequencing* (NGS) usando a plataforma *Illumina HiSeq 2500*, obtendo-se 345.409.110 *reads paired-ends* das quais 76,47% apresentaram  $Q \geq 30$ . Foram utilizadas duas plataformas distintas para montagem dos *contigs* e *scaffolds*, MetaVelvet e Metavir 2, cujos resultados foram semelhantes. A busca por similaridade BLAST foi conduzida a partir de diferentes bancos de dados. Quando submetidas ao UniRef90, obteve-se 97 matches com sequências de origem viral de grande interesse para vigilância epidemiológica. Utilizando apenas bancos de dados específicos para sequências de origem viral, observou-se 827 *matches*, dos quais 6 com Alphacoronavirus não classificados. Aproximadamente 85% das sequências apresentaram similaridade com vírus de DNA fita dupla enquanto que os 15% foram divididos entre vírus de RNA fita simples (5%), Orthoretrovirinae (4%), vírus de RNA fita dupla (2%), fagos não classificados (2%), vírus de DNA fita simples (0.8%) e 0.2% das sequências apresentaram similaridade com *Muska hytrovirus*. As análises filogenéticas realizadas apenas para os *matches* de Coronavírus incluíram sequências representativas de todos os gêneros— alfa, beta, gama e DeltaCoV e foram realizadas utilizando métodos de máxima verossimilhança (ML) e *neighbor-joining*. Foram também identificadas sequências de estreita relação filogenéticas com AlphaCoV-like, Appalachian Ridge CoV.2, Porcine Epidemic Diarrhea Virus (PEDV), HCoV-NL63, Bat Coronavírus 1B, agentes de importância na clínica médica humana e veterinária. Deste modo, pode-se concluir que a abordagem metagenômica realizada com NGS representa uma metodologia com grande potencial discriminatório ou de identificação em estudos epidemiológicos. Considerando-se o impacto zoonótico de muitos CoV, os resultados deste trabalho

contribuem fortemente para uma melhor compreensão da eco-epidemiologia molecular na evolução desses agentes virais.

## Abstract

*Tadarida brasiliensis* is a bats' typical species of the Americas adapted to urban areas, enabling contact and spread of several viral agents. Among them, coronavirus (CoV) stands out for sanitary and epidemiological surveillance, since highly pathogenic virus strains have evolved from bats in recent decades. The goals of this study were to characterize the coronavirus species and its phylogenetic relationships from a viral metagenomics in bats. We used 10 anal and 10 tracheal swabs of *T. brasiliensis* bats' specimens collected in Jequitibás Wood, Campinas, São Paulo, Brazil in 2011. Samples were subjected to Next Gen-Sequencing (NGS) using the Illumina platform HiSeq 2500, yielding 345 409 110 reads paired ends of which 76.47% had  $Q \geq 30$ . We used two separate platforms for assembly of contigs and scaffolds, MetaVelvet and Metavir 2, which showed similar results. The BLAST similarity search was conducted from different databases. When subjected to UniRef90, 97 matches were obtained with sequences of viral origin of great interest for health surveillance. Using only specific databases for viral sequences, 827 matches were identified, of which 6 with unclassified Alphacoronavirus. About 85% of sequences showed similarity to dsDNA virus no RNA stage while 15% were divided in ssRNA virus (5%), Orthoretrovirinae (4%), dsRNA viruses (2%), Unclassified phage (2%), ssDNA virus (0.8%) and 0.2% of the sequences showed similarity to *Muska hytrovirus*. Phylogenetic analyzes only for coronavirus matches included representative sequences of all genus – alpha, beta, gamma and deltaCoV and were performed using maximum likelihood methods (ML) and neighbor-joining (NJ). We identify sequences phylogenetically related AlphaCoV-like, Appalachian Ridge Cov.2, Porcine Epidemic Diarrhea Virus (PEDV), HCoV-NL63, Bat Coronavirus 1B, the viruses of importance in human and veterinary medicine. Thus, we conclude that metagenomic approach performed with NGS represents a powerful methodology for epidemiological studies. Considering the zoonotic impact of many CoV, our results contribute greatly to a better understanding of the molecular eco-epidemiology in the evolution of these viral agents.

## Sumário

|  |    |
|--|----|
| 1. Introdução .....  | 13 |
| 2.1. Morcegos: Biogeografia .....  | 15 |
| 2.2. Morcegos como reservatórios para doenças emergentes .....   | 17 |
| 2.3. Coronavírus: estrutura, classificação e patogênese .....  | 20 |
| 2.4. Emergência de Coronavírus de Alta Patogenicidade – morcego como animal-chave <sup>24</sup> .....  |    |
| 2.5. Metagenômica viral (metaviroma) e <i>nextgen sequencing</i> : potente ferramenta para a realização de estudos epidemiológicos em larga escala ..... | 28 |
| 3. Objetivos.....  | 32 |
| 3.1. Objetivo Geral .....  | 32 |
| 3.2. Objetivos específicos.....  | 32 |
| 4. Material e métodos.....   | 33 |
| 4.1. Amostras .....  | 33 |
| 4.2. Pré-Tratamento .....  | 33 |
| 4.2.1. Filtração .....   | 33 |
| 4.2.2. Pré-tratamento com DNase I.....   | 33 |
| 4.2.3. Pré-tratamento com Proteinase K.....  | 34 |
| 4.3. Extração de RNA Viral.....  | 34 |
| 4.4. Preparação da Biblioteca, Sequenciamento, Montagem e Anotação dos Genomas Virais.....   | 34 |
| 4.5. Análises Filogenéticas.....   | 35 |
| 4.6. Validação por RT-PCR e sequenciamento segundo metodologia de Sanger de sequência identificada como Alphacoronavirus .....                           | 35 |
| 5. Resultados .....  | 37 |
| 5.1. Diversidade de vírus detectados em <i>Tadarida brasiliensis</i> .....   | 37 |
| 5.1.1. Diversidade viral identificada pelo MetaVelvet utilizando o banco de dados UniRef90.....  | 37 |
| 5.1.2. Diversidade viral identificada pelo Metavir utilizando banco de dados de genomas virais.....  | 39 |
| 5.1.3. Busca por similaridade em bancos de dados específicos.....  | 45 |
| 5.2. Análises Filogenéticas dos Coronavírus identificados em <i>Tadarida brasiliensis</i> .....  | 47 |
| 6. Discussão .....   | 51 |
| 7. Conclusões .....  | 56 |
| 8. Referências Bibliográficas.....   | 57 |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>9. Apêndices.....</b>  | <b>69</b> |
| <b>9.1. Apêndice 1: Diversity of viruses in bats from the urban area of Campinas-SP Brazil using metagenomic analyses .....</b>   | <b>69</b> |
| <b>10.2 Apêndice 2: Análise de similaridade do <i>4936_scaffold_0</i> utilizando ViPR (Virus Pathogen Resource).....</b>  | <b>83</b> |
| <b>10.3 Apêndice 3: Bat coronavirus in Brazil related to appalachian ridge and porcine epidemic diarrhea viruses.....</b>   | <b>86</b> |
| <b>10.4 Apêndice 4: Análise Filogenética utilizando um fragmento de RdRp dos quatro gêneros de Coronavírus – Alpha, Beta, Gamma e Delta – com o <i>4936_scaffold_0</i>.....</b> | <b>87</b> |
| <b>10. Anexos:.....</b>   | <b>88</b> |
| <b>10.1. Anexo 1: Declaração referente a Bioética e Biossegurança .....</b>   | <b>88</b> |
| <b>10.2. Anexo 2: Declaração de Autoria.....</b>  | <b>89</b> |

## 1. Introdução

Patógenos emergentes (aqueles que foram recentemente introduzidos, descobertos ou reconhecidos; que evoluíram recentemente; ou ainda que aumentaram em incidência por expansão geográfica ou por adaptação a uma maior diversidade de hospedeiros; ou que apresentaram mudanças em suas propriedades patogênicas), em especial agentes virais, apresentam um desafio único para a ciência e a medicina porque geralmente pouco se sabe sobre eles antes de causarem epidemias a partir de fontes zoonóticas. A transmissão zoonótica pode ocorrer por um evento de transbordamento de uma espécie animal para outra, eventualmente causando infecções também em humanos. Para a maioria desses vírus, terapias e / ou estratégias de vacinação não foram desenvolvidos, e, portanto, as opções de tratamento clínico para pacientes infectados estão limitados a terapia de suporte inespecífico (adaptado a partir de COLEMAN e FRIEMAN, 2014).

Muitas espécies animais têm sido relatadas como reservatório para uma grande diversidade de vírus. Dentre estas, os morcegos possuem algumas características que os tornam mais propensos a hospedar vírus zoonóticos e transmiti-los aos seres humanos. Muitas espécies de morcegos têm hábitos peridomiciliares, em especial devido a destruição de habitats naturais, de modo que é comum viverem empoleirados em casas e edifícios, bem como nas copas das árvores de áreas urbanas. Isso faz com que o homem tenha contato frequente com seus fômites, excretas e excrementos (LUIS et al., 2013).

Outro fator de destaque é a coabitação dos morcegos com animais comerciais. Por questões de viabilidade econômica do escoamento de produção, a maioria das criações comerciais está localizada em áreas próximas ou mesmo naquelas de expansão de centros urbanos, facilitando o acesso dos morcegos. Esta sobreposição periurbana de nichos ecológicos dá a estes animais importância sanitária e epidemiológica (FELIPPE et al., 2010).

Os morcegos ocupam uma ampla distribuição geográfica e apresentam grande diversidade de espécies. Isso permite que abriguem vírus de alta variabilidade genética, tornando-os fontes potenciais para o surgimento de estirpes que sejam capazes de infectar outros animais, incluindo seres humanos. Assim sendo, estes animais podem atuar como sentinelas, uma vez que podem introduzir patógenos em criações comerciais e até mesmo na população humana (FELIPPE et al., 2010).

Muitos estudos têm indicado que os coronavírus, agentes capazes de causar doenças em aves, mamíferos e seres humanos, tenham surgido pela primeira vez em morcegos. Em humanos, geralmente estão associados a episódios de resfriado comum. No entanto, o surgimento de Coronavírus altamente patogênicos em humanos como a SARS-CoV (Coronavírus causador da Síndrome Respiratória Aguda Grave) em 2003, tem aumentado o interesse científico na evolução molecular desses agentes virais em morcegos. Já foram relatados que morcegos insetívoros podem ser portadores originais do vírus da SARS (LELLI et al., 2013).

Aproximadamente 10 anos após o surgimento de SARS, outro coronavírus de alta patogenicidade foi identificado no Oriente Médio – MERS-CoV (Síndrome Respiratória do Oriente Médio). Dessa forma, é necessária a compreensão da evolução molecular desses agentes como estratégia de controle e prevenção às epidemias causadas por agentes de alta patogenicidade, como SARS e MERS-CoV.

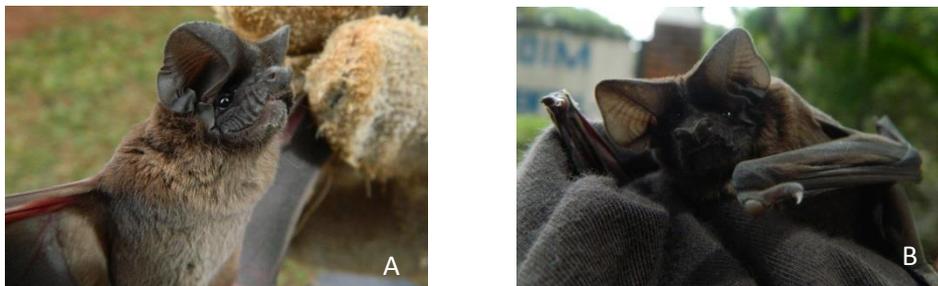
Estudos epidemiológicos tendem a se preocupar com a doença somente a partir do momento em que ela emerge. Essa conduta certamente não será suficiente para atender às novas demandas de enfermidades infecciosas. Assim sendo, a medicina da conservação, ciência que busca a promoção da saúde ecológica por meio da interação entre as saúdes humana, animal e ambiental, surge com a proposta de que toda saúde seja pensada em conjunto, de forma que se tenha uma condição sustentável de existência.

Nessa perspectiva, torna-se imprescindível a realização de estudos epidemiológicos em larga escala em animais chave como os morcegos. Para isso, a utilização de *NextGen Sequencing* pela abordagem de metagenomas – material genético recuperado diretamente a partir de amostras ambientais – é capaz de revelar a diversidade microbiana anteriormente oculta. Dessa forma, este trabalho visa contribuir na facilitação de estudos epidemiológicos por meio da adoção de estratégias simples, porém eficazes, para identificação de patógenos virais de interesse em saúde pública e animal. Uma vez que pouco se conhece sobre a presença de Coronavírus em morcegos do Brasil, esse estudo fornece dados importantes referentes a eco-epidemiologia molecular desses agentes virais.

## 2.1. Morcegos: Biogeografia

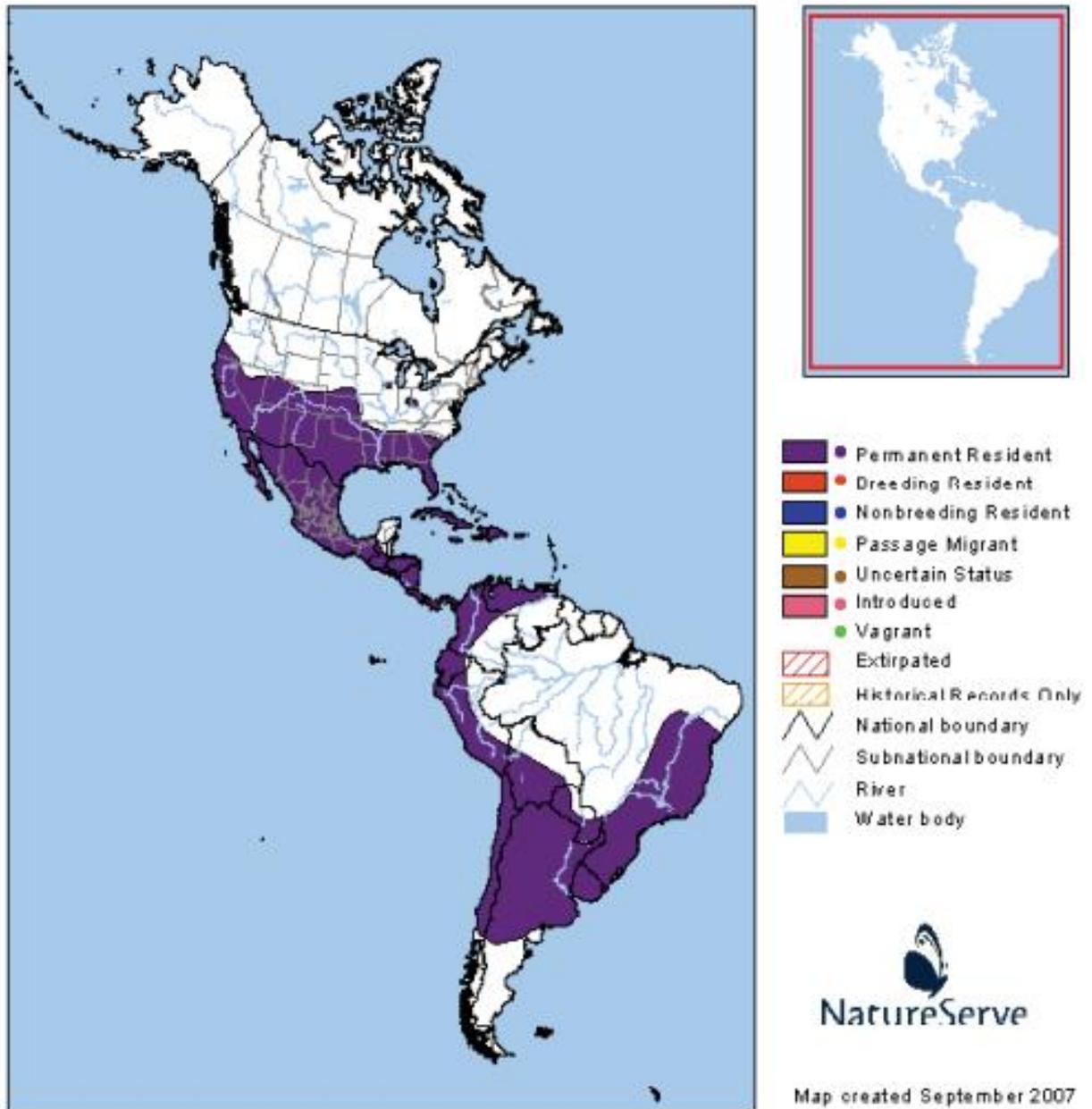
Os morcegos são animais pertencentes à Classe Mammalia, Ordem Chiroptera (*cheir*: mão; *pteron*: asa), Subordens Microchiroptera e Megachiroptera. Trata-se de animais voadores, de hábito crepuscular e noturno. Em relação à alimentação, ao comportamento, a morfologia e a reprodução, apresentam o maior grau de especialização dentre todas as ordens de mamíferos. Tem hábito gregário ou vivem solitários. Exploram áreas abertas (caminhos, pastagens, clareiras, bordas) e também coabitam com humanos, vivendo em forro das casas, dentro de churrasqueiras, nos vãos de dilatação de prédios – neste caso, devido à escassez de ambientes naturais. São animais cosmopolitas, não sendo encontrados apenas nos continentes gelados. Representam 20% de todas as espécies de mamíferos com 1300 espécies distribuídas em 20 famílias, 175 gêneros. No Brasil, já foram descritos a ocorrência de 178 espécies da ordem Microchiroptera, distribuídos em 9 famílias (MORATELLI e CALISHER, 2015).

O gênero *Tadarida* (Rafinesque, 1814) (Molossidae: Chiroptera: Mammalia) é cosmopolita e contém sete espécies (KOOPMAN 1993, ZORTÉA e TADDEY 1995, BARQUEZ et al. 1999). Dentre esses, o morcego de cauda livre *Tadarida brasiliensis* (L. GEOFFROY, 1824) (figura 1) é uma das espécies mais distribuídas na América. Pode ser encontrada desde a metade sul da América do Norte, a maioria da América Central e na América do Sul, desde o noroeste da Venezuela e se estende para o sul ao longo das encostas do Andes e costa do Pacífico na Colômbia, Equador e Peru, ao Chile e Bolívia, sul do Paraguai, sul, sudeste e Estado de Roraima, no Brasil, Uruguai e Argentina para cerca de 45 ° S (KOOPMAN 1982, WILKINS 1989, ARMSTRONG 2008, BERNARD et al. 2011, NABTE et al. 2011) (figura 2).



**Figura 1:** Imagens de 2 espécimes de *Tadarida brasiliensis*, espécie modelo utilizada neste estudo. A. Vista lateral com as asas abertas de um representante da espécie *Tadarida brasiliensis*; nota-se no canto superior esquerdo da imagem que a asa esquerda do animal se encontra pinçada pelos dedos indicador e médio do

pesquisador responsável pela captura, sugerindo o pequeno tamanho do animal. B. Vista frontal. Imagem do acervo pessoal de Fábio André Facco Jacomassa.



**Figura 2:** Distribuição geográfica do *Tadarida brasiliensis*. (modificado de InfoNatura: Animais e Ecossistemas da América Latina) (Armstrong, 2008).

A espécie é caracterizada por animais relativamente pequenos, com populações residentes e migratórias, que usam uma variedade de diferentes abrigos, incluindo cavernas e estruturas feitas pelo homem, tais como pontes, túneis e sótãos, formando grandes colônias nesses locais (WILKINS 1989, ESBERARD et al 1999., ARMSTRONG 2008). *T. brasiliensis* é um insetívoro oportunista e generalista e sua dieta consiste em insetos como lepidópteros, himenópteros,

coleópteros homópteros, dípteros, odonatas, hemípteras, neurópteras (KUNZ et al., 1995, WHITAKER e RODRIGUEZ-DURAN, 1999).

## **2.2. Morcegos como reservatórios para doenças emergentes**

Quase 75% de todas as doenças infecciosas emergentes que ameaçam a saúde pública são zoonóticas, a maioria das quais se dissemina a partir de reservatórios silvestres diretamente para os seres humanos ou através de animais domésticos (JONES et al., 2008). A epidemia de SARS de 2003, a disseminação global de influenza H1N1 de origem suína em 2009, o recente aparecimento de novas febres hemorrágicas e pneumonias e a ameaça contínua representada pela gripe aviária H5N1 e H7N9 destacam a urgente necessidade de compreender os mecanismos que sustentam a emergência viral.

Animais silvestres, especialmente mamíferos e aves, têm sido identificados como reservatórios para uma grande diversidade de vírus, a maioria dos quais não se tem absolutamente nenhum conhecimento, apesar de ser conhecido que estes vírus circulam facilmente em seus nichos específicos. Na maioria das vezes, estes vírus são silenciosos ou assintomáticos em seus hospedeiros naturais. Em alguns casos, podem infectar outras espécies, e em casos raros, esta transmissão interespecífica pode causar infecções em humanos (MACKENZIE e JEGGO, 2013).

Muitos estudos realizados a partir de amostras obtidas de diferentes espécies de animais silvestres tem identificado uma grande diversidade de vírus pertencentes às famílias Coronaviridae, Bunyaviridae, Astroviridae, Rhabdoviridae, Flaviviridae, Filoviridae, Paramyxoviridae, Adenoviridae e Reoviridae. A maioria destes vírus é encontrada em mamíferos das ordens Rodentia, Chiroptera, Primata, Carnívora, bem como nas aves (MACKENZIE e JEGGO, 2013).

Além das características biológicas, outros fatores potenciais contribuem para a emergência de doenças zoonóticas a partir dos morcegos. A destruição de habitats e de recursos alimentares tem causado a seleção de espécies sintrópicas de morcegos e contribuído para o aumento artificial da densidade destes animais. Isso altera o equilíbrio do ecossistema e facilita a disseminação de vírus (SMITH e WANG, 2013).

Uma grande quantidade de pesquisas tem documentado os papéis de morcegos de diferentes espécies na história natural dos muitos vírus para o qual

estes animais extraordinários podem servir como hospedeiros (CALISHER et al., 2006). Desde a identificação de morcegos frugívoros do gênero *Pteropus* como o reservatório natural do Hendra vírus, um membro da família Paramyxoviridae, na Austrália em meados da década de 1990 (HALPIN et al., 2000; YOUNG et al, 1996), os morcegos têm sido repetidamente identificados como a origem de uma sucessão de zoonoses emergentes altamente patogênicas, incluindo o Nipah vírus, o vírus Ebola e o SARS-Coronavírus (revisado por WIBBELT et al., 2010). Drexler e colaboradores (2012) identificaram 66 novas espécies de Paramyxovirus em morcegos e roedores, e chamou atenção para o fato de que Hendra- e Nipah vírus ascenderam provavelmente na África, onde vírus similares estão circulando em morcegos.

Na tentativa de identificar vírus potencialmente zoonóticos em morcegos, Conrady e colaboradores (2014), por meio de RT-PCR em amostras obtidas de 217 morcegos (20 espécies) de 17 localidades diferentes do Kenya, identificaram 4 infecções por Adenovírus, 11 por Paramyxovirus, 2 por Rhabdovirus e 3 coinfeções. Ainda, as análises filogenéticas mostraram que os agentes virais detectados representavam novas linhagens virais em suas respectivas famílias, com exceção dos Adenovírus.

Outros estudos utilizando diversas espécies de morcegos como animais reservatórios de doenças potencialmente zoonóticas têm isolado diferentes agentes virais. Dois novos paramyxovírus que impactam a saúde humana e de animais domésticos foram isolados de morcegos frugívoros de Ghana, vírus Achimota 1 (AchPV1) e Achimota 2 (AchPV2). A partir de análises filogenéticas destes isolados, evidenciou-se que formam um agrupamento filogenético com outros rubalovírus típicos de morcegos, os vírus Tuhoko, Menangle e Tioman. Testes sorológicos específicos para AchPV2 e AchPV1 indicaram evidência de infecção de ambos os vírus em morcegos *Eidolon helvum* de toda a África Sub-Saariana e nas ilhas do Golfo da Guiné. Ainda, detectaram possível evidência sorológica de infecção humana com AchPV2 em Ghana e na Tanzânia. Estes resultados indicam que esta espécie de morcegos frugívoro pode ser reservatória e ainda ser a responsável pela disseminação de doenças zoonóticas (BAKER et a., 2013). Três novos orthoreovirus de mamíferos (MRV) foram isolados de morcegos da Europa. Embora estejam geralmente associados a infecções suaves e clinicamente inaparentes na maioria de seus hospedeiros, há cada vez mais provas da sua capacidade de induzir doença

mais grave em cães e no homem (KOHL et al., 2012). Um novo adenovírus foi isolado de amostras de tecido de 2 morcegos-anão *Pipistrellus pipistrellus* e as análises realizadas mostraram evidências de transmissão de adenovírus entre morcegos (SONTAG et al., 2009).

Diversos outros agentes virais, incluindo Ebolavirus e Marburgvirus (Filovirus), representam ameaças significativas para saúde pública e conservação de espécies, causando surtos de febre hemorrágica com altas taxas de mortalidade. Desde o primeiro surto, em 1967, suas origens, história natural e ecologia permaneceram obscuras até que estudos moleculares e sorológicos recentes apontaram os morcegos como animais importantes na dinâmica de transmissão dos filovirus (OLIVAL e HAYMAN, 2014). Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2015), morcegos frugívoros da família Pteropodidae podem ser os hospedeiros naturais do vírus Ebola. Este patógeno pode ser introduzido na população humana através do contato próximo com sangue, secreções, órgãos ou outros fluidos corporais de animais infectados, como os chimpanzés, gorilas, morcegos, macacos, antílopes florestais e porcos-espinhos encontrados doentes ou mortos em florestas tropicais.

Estudo realizado com 140 morcegos de sete espécies em Merida, Cidade na Península de Yucatán, no México, identificou anticorpos específicos de Flavivirus em 26 espécimes de *Glossophaga soricina*, *Artibeus jamaicensis* e *Artibeus lituratus*. Os títulos foram geralmente mais elevados para o vírus da dengue 2 ou 4. Estes dados podem indicar que a maior parte dos morcegos tinham sido infectados com o vírus do dengue (MACHAIN-WILLIAMS et al., 2013). Outro estudo realizado no México identificou, por RT-PCR, DENV-2 em 4,1% (quatro morcegos em Calakmul – dois *G. soricina*, um *A. jamaicensis* e um *A. lituratus*; e dois morcegos em Montes Azules, ambos *A. lituratus*) das 146 amostras de baço testadas. Trata-se de espécies abundantes e bem adaptadas a ambientes alterados na região Neotropical (SOTOMAYOR-BONILLA et al., 2014).

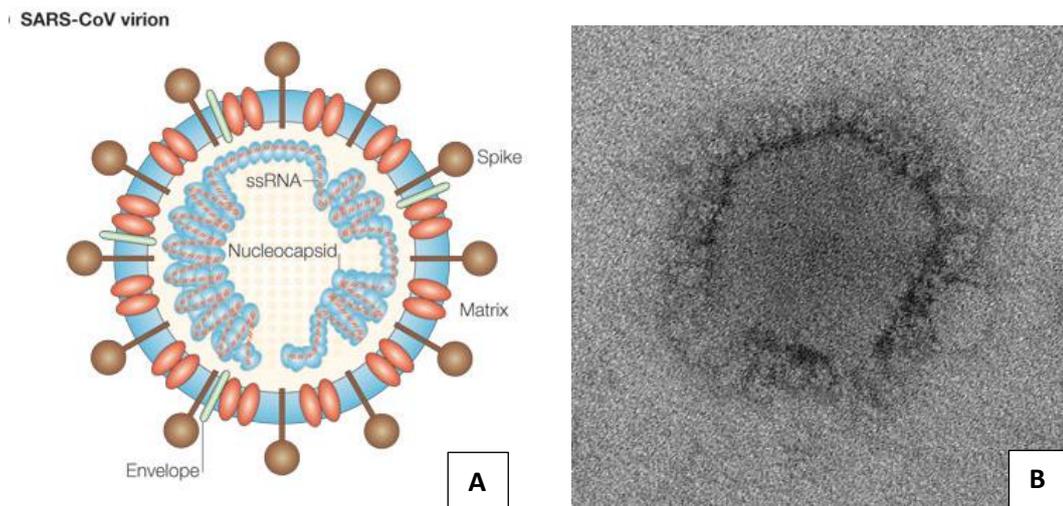
Em relação ao vírus Influenza, sabe-se que as aves aquáticas são importantes animais reservatórios na natureza. No entanto, Tong e colaboradores (2012) relataram uma nova linhagem capaz de infectar previamente morcegos e sua importância para a saúde pública deste novo vírus ainda é desconhecida. Trata-se do subtipo H17N10 do vírus da gripe A. A sequência e análises estruturais revelaram que as proteínas HA17 e NA10 desta estirpe são diferentes das correspondentes em

influenza já conhecidos. Ambas as proteínas HA17 e NA10 não podem se ligar ao ácido siálico, o que indica que elas podem ter novas funções (Tan e Xie, 2015) ou mesmo que o vírus utilize um outro receptor. Outro subtipo, H18N11, foi identificado em morcegos frugívoros (*Artibeus planirostris*) do Peru. Estudos sorológicos com a proteína recombinante H18 indicaram que várias espécies de morcegos peruanos foram infectadas por este vírus. As análises filogenéticas demonstraram que, em alguns segmentos de genes, morcegos do Novo Mundo abrigam uma maior diversidade genética do vírus da gripe do que todas as outras espécies de mamíferos e aves combinados, indicativos da existência de uma associação vírus-hospedeiro de longa data. Estes resultados indicam que os morcegos constituem um reservatório antigo de um conjunto diversificado de vírus da gripe (TONG et al., 2013).

Há ainda a hipótese de que os morcegos são os principais reservatórios de várias famílias de vírus de RNA a partir dos quais foram derivados outros vírus de mamíferos, inclusive de seres humanos. Embora esta hipótese necessite de maiores investigações, a premissa de que os morcegos carregam um grande número de vírus é comumente aceita (SMITH e WANG, 2013).

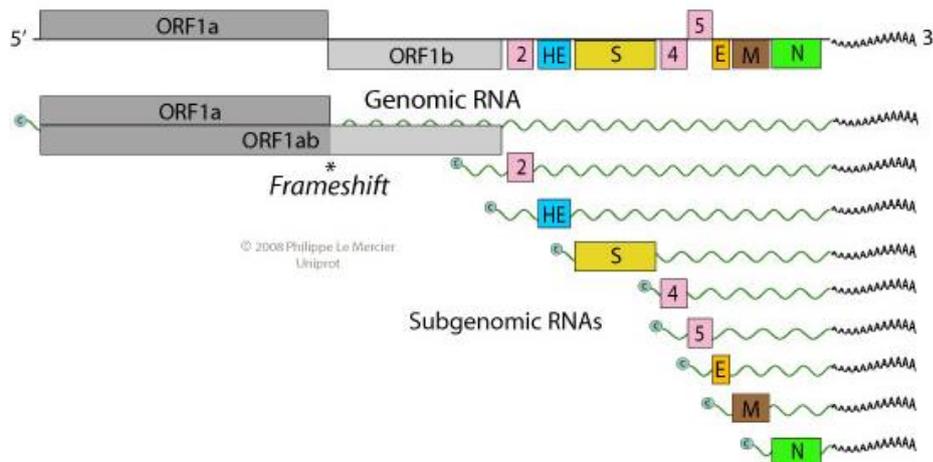
### **2.3. Coronavírus: estrutura, classificação e patogênese**

Os coronavírus (Ordem *Nidovirales*, Família *Coronaviridae*, Subfamílias *Coronavirinae* e *Toronavirinae*) são vírus envelopados (120nm de diâmetro) e simetria helicoidal constituído por um genoma de RNA fita simples polaridade positiva. O envelope apresenta morfologia variável de esférica a pleomórfica e é rico em projeções glicoproteicas, que lhe confere as propriedades características do nome – coroa (figura 3) (espículas de 20 nm) (FAUQUET et al., 2005). A recente descoberta do MERS-CoV incentivou a reclassificação da subfamília *Coronavirinae* em quatro gêneros: *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* e *Deltacoronavirus* (de GROOT et al., 2013).



**Figura 3:** **A.** Representação esquemática de uma partícula de SARS-Coronavírus; nota-se a fita de RNA fita simples envolvida pelas proteínas do nucleocapsídeo, o envelope, as proteínas S (“spike”) e de matriz. Disponível em: <http://www.nature.com/nri/journal/v5/n12/images/nri1732-f1.jpg>. Acesso em 07 de julho de 2015, às 18h01. **B.** Microscopia eletrônica de coloração negativa mostrando uma partícula MERS-CoV com projeções de superfície que rodeiam a periferia da partícula em forma de coroa, um traço característico de coronavírus. Imagem de Cynthia Goldsmith/Maureen Metcalfe/Azaibi Tamin. Disponível em <http://www.cdc.gov/coronavirus/mers/photos.html>. Acesso em 07 de julho de 2015, às 17h55.

O genoma dos coronavírus (figura 4) está subdividido em um número variável de ORFs que codificam um conjunto de proteínas não-estruturais com função de RNA-polimerase (Pol -1a, b), e proteínas estruturais: Hemaglutinina-Esterase (HE), Glicoproteína de superfície (S), Membrana (M), Envelope (E) e Nucleocapsídeo (N).



**Figura 4:** Representação esquemática do genoma do coronavírus MHV (Murine Hepatitis Virus). Genoma linear ssRNA (+) de tamanho variando entre 27 e 32kb (o maior de todos os genomas de vírus RNA). O RNA apresenta CAP (extremidade 5')

e poliadenilação (extremidade 3'). Uma sequência líder de RNA contendo de 65 a 89 nucleotídeos é identificada na extremidade 5' do genoma bem como no final de cada um dos RNAs subgenômicos. Disponível em: [http://viralzone.expasy.org/all\\_by\\_species/30.html](http://viralzone.expasy.org/all_by_species/30.html). Acesso em 16 de março de 2015, às 12h47.

A proteína de membrana (M) é responsável por dar forma ao vírion, enquanto que as proteínas de envelope (E) desempenham um papel essencial durante a montagem (STURMAN et al, 1980; LIU e INGLIS, 1991). Dentro do envelope, um nucleocapsídeo helicoidal é formado pela ligação das proteínas N com o RNA genômico de uma forma de “grânulos sobre a corda” (beads-on-a-string). O genoma, variando de 27.000 a 32.000 nucleotídeos em tamanho, é o maior genoma de RNA conhecido (FUNG e LIU, 2014).

O mecanismo de infecção se dá por meio da interação da proteína S do vírion com receptores do hospedeiro. A proteína S é clivada por uma protease em duas subunidades funcionais: um domínio N-terminal de ligação do receptor (S1) e um domínio C-terminal (S2) responsável pela fusão de membrana (HUANG et al, 2006; QIU et al, 2006; YAMADA et al, 2009). A interação do domínio S1 com o receptor de membrana do hospedeiro é responsável por determinar o tropismo do vírion. Essa interação leva a uma mudança conformacional do domínio S2 que culmina na fusão do envelope viral na membrana celular hospedeira (MASTERS, 2006).

Após a entrada na célula, o RNA genômico atua como mRNA para a tradução da poliproteína replicase. O gene da replicase consiste de duas ORFs (ORF1a e ORF1b). A tradução da ORF1a produz a poliproteína 1a (pp1a). Enquanto isso, um *frameshifting* ribossomal ocorre na junção de ORF1a e ORF1b, permitindo a tradução da ORF1b, produzindo a 1 poliproteína ab (pp1ab) (BRIERLEY et al., 1987). A clivagem autoproteolítica de pp1a produz 11 proteínas não-estruturais (nsp1-nsp11), enquanto que a clivagem de pp1ab produz 15 proteínas não-estruturais (nsp1-nsp10 e nsp12-nsp16). RNA-polimerase dependente de RNA (RdRp) está contida em nsp12 (BAKER et al, 1993; LU et al., 1995).

Usando o RNA genômico como molde, a replicase sintetiza os RNAs genômicos sentido negativo, que são utilizados como moldes para a síntese da progênie de genomas de RNA de sentido positivo. Por meio da transcrição do genoma de forma descontínua, a replicase sintetiza um conjunto de RNAs subgenômicos (sgRNAs) (SAWICKI et al., 2007). Os sgRNAs são traduzidos em

proteínas estruturais e proteínas acessórias. As proteínas estruturais transmembrânicas (S, M, e E) são sintetizadas, inseridas e dobradas no retículo endoplasmático (ER) e transportadas para o compartimento intermédio do Complexo Golgiense. As proteínas N são traduzidas no citoplasma e encapsidam o RNA genômico para formar o nucleocapsídeo.

Os vírions são montados no complexo golgiense (MASTER, 2006), de onde são exportados através de vesículas secretórias que se fundem a membrana celular, formando partículas virais maduras (KRIJNSE-LOCKER et al., 1994). As proteínas S também são responsáveis por causar a fusão da célula infectada com células vizinhas não infectadas, resultando na formação de sincício, permitindo que os vírus se disseminem sem ser liberados para o espaço extracelular (MASTER, 2006).

HCoV-OC43 (OC43) e HCoV-229E (229E) foram os primeiros CoVs humanos documentados, porém, mais recentemente, HCoV-NL63 (NL63) e HCoV-HKU1 (HKU1) foram identificados como consequência do aumento dos esforços de vigilância viral no início do século XXI. Estes quatro vírus geralmente causam infecção aguda do trato respiratório superior e menos frequentemente estão associados a infecções do trato respiratório inferior. Por outro lado, nas últimas duas décadas foram isolados dois novos coronavírus humanos de origem zoonótica que causam doenças e mortalidade significativas, SARS e MERS-CoV (GRALINSKI e BARIC, 2014).

No caso das epidemias, um fator relevante dos Coronavírus é o fato de seu controle ser, em geral, extremamente difícil devido à constante emergência de novas variantes. Sua variabilidade deriva do tamanho de seu genoma, o maior conhecido dentre os vírus RNA, e de seu processo de replicação, que envolve a produção de RNAs mensageiros subgenômicos, que permite um controle temporal da expressão das diferentes proteínas virais. Tais características associadas aos “erros” cometidos pela RNA-polimerase contribuem para uma alta frequência de recombinações e mutações (BOCHKOV et al., 2007; CAVANAGH, 2007; IGNJATOVIC et al., 2006). Estes fatores proporcionam o surgimento de novas variantes na espécie hospedeira bem como outras capazes de se adaptar a novos hospedeiros.

Muitos coronavírus são importantes patógenos veterinários. O vírus da bronquite infecciosa das galinhas é responsável por causar grandes perdas na

indústria avícola (DI FABIO, 2004). Infecções por PEDV (vírus da diarreia epidêmica de suínos) causam diarreia intensa em suínos, levando-os a desidratação e morte, levando a grandes perdas econômicas para a indústria suína mundial (STEVEYSON et al., 2013). Embora o PEDV tenha sido identificado primeiramente na Europa, os surtos têm ocorrido com mais frequência em países asiáticos, como Coréia, China, Japão, Filipinas e Tailândia. Recentemente foi introduzido na América do Norte, Estados Unidos (2013) e Canadá (2014) (WANG et al., 2014). Trata-se de um agente viral altamente infeccioso que resulta em significativa morbidade e mortalidade em leitões.

O surgimento repentino e a rápida disseminação do PEDV nos Estados Unidos causaram preocupações significativas relacionadas a saúde pública. Os surtos em curso de MERS no Oriente Médio e países da Península Arábica e a natureza mortal histórica da Síndrome Respiratória Aguda Grave criaram ainda mais ansiedade devido à falta de informações científicas sobre a origem e a evolução destes coronavírus emergentes (HUANG et al., 2013).

#### **2.4. Emergência de Coronavírus de Alta Patogenicidade – morcego como animal-chave**

Antes da epidemia da Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS), aproximadamente 60 espécies de vírus de morcegos já haviam sido relatadas. A partir daí, vem-se aumentando rapidamente o número de agentes virais identificados e a maioria são novas estirpes virais. Diversas doenças infecciosas graves causadas por vírus identificados previamente em morcegos têm surgido e se disseminado pela Ásia, Austrália, África e América. De modo intrigante, os agentes virais raramente causam sintomas clínicos de doenças em morcegos. A ameaça para a saúde pública de vírus transmitidos por morcegos permanece em grande parte desconhecida. Dessa forma, torna-se importante o aprofundamento de estudos referentes à relação existente entre os vírus de morcego associados com doenças infecciosas humanas emergentes.

Diante desse cenário, dentre os 40 genomas completos de Coronavírus disponíveis no GenBank, 13 (32,5%) são provenientes de morcegos. Além disso, os morcegos são também hospedeiros de outros coronavírus identificados pelo mundo (DONALDSON et al., 2010; QUAN et al., 2010; REUSKEN et al., 2010; BALBONI et al., 2011; WOO et al., 2006), inclusive na América do Sul (BRANDÃO et al., 2008;

GOES et al., 2013; SIMAS et. al, 2015). Tem-se demonstrado que os morcegos são provavelmente o reservatório natural de vírus relacionados geneticamente com o SARS-Coronavírus, conhecidos como SARS-like coronavírus, e que todos os coronavírus de mamíferos foram derivados de vírus de ancestrais que residem em morcegos (SHI et al, 2008; WOO et al, 2009).

A diversidade de Coronavírus em morcegos pode estar relacionada a quatro principais fatores. Primeiro, a grande diversidade de morcegos, que pode proporcionar um grande número de diferentes tipos celulares para diferentes Coronavírus. Em segundo lugar, a capacidade de voo desses animais, que facilita o deslocamento e os deixa livres de obstáculos enfrentados por mamíferos terrestres. Os morcegos já foram encontrados em altitudes de até 5000 m, o que facilita o intercâmbio de partículas virais e/ou seus materiais genéticos entre diferentes espécies hospedeiras. Terceiro, os diferentes nichos ecológicos explorados pelas diferentes espécies de morcegos os submetem a diferentes pressões ambientais e seletivas para o parasitismo de diferentes espécies de Coronavírus. E por último, o hábito gregário da maioria das espécies, resultando em um grande número de animais reunidos, o que facilita a disseminação e intercâmbio de partículas virais (FIELD, 2009; HAYDON et al., 2002; JACKWOOD, 2006; KEESING et al., 2010; WONG et al., 2007; WOO et al., 2009). Por essas razões, o monitoramento de patógenos como os coronavírus em morcegos pode auxiliar na manutenção da saúde pública e na prevenção de zoonoses em animais comerciais.

SARS-CoV foi identificado pela primeira vez em Guangdong, China, em 2002 (TU et al., 2004). O vírus provocou 8273 casos de infecção, dos quais 775 (9%) foram fatais (CHINESE SARS MOLECULAR EPIDEMIOLOGY CONSORTIUM, 2004). A epidemia espalhou-se rapidamente para muitos países do sudeste da Ásia, causando surtos significativos em Hong Kong, Taiwan, Singapura, e no Vietnã. Além desta região, muitos outros países relataram um pequeno número de casos (por exemplo, os Estados Unidos da América teve 27 casos confirmados importados e nenhuma morte). O Canadá foi o país nas Américas com um grande número de ocorrências, sendo confirmados 251 casos e 44 mortes. Devido à implementação de medidas de controle de infecção (quarentena e bloqueios alfandegários), SARS-CoV desapareceu em 2003, e não houve registros de novas infecções humanas desde então (COLEMAN e FRIEMAN, 2014).

As evidências apontam que SARS-CoV foi transmitido aos seres humanos a partir de morcegos-ferradura de forma direta ou através de civetas mascaradas ou por cães-guaxinim nos mercados de animais vivos da China. MERS-CoV pode também ter surgido a partir de morcegos ou outros pequenos animais e os humanos são infectados a partir de contato com dromedários (COLEMAN e FRIEMAN, 2014).

Uma década depois do risco da pandemia por SARS-CoV, surgiu no Reino da Arábia Saudita (KSA), em 2012, o MERS-CoV (ZAKI et al., 2012) com 182 casos confirmados até fevereiro de 2014, dos quais 79 (43%) foram fatais. Recentemente, foi relatado um surto na República da Coreia cuja vigilância clínica e epidemiológica está em andamento (THE KOREAN SOCIETY OF INFECTIOUS DISEASES, 2015). Infecções por MERS-CoV se concentram na Península Arábica, com a maioria dos casos ocorrendo em KSA, Catar, Jordânia, Omã, Emirados Árabes Unidos e Egito. Fora desta região, houve registros de um pequeno número de casos de infecção em países europeus (França, Itália e Reino Unido), em pessoas que haviam viajado para a Península Arábica ou tiveram contato com estas pessoas. Há evidência de transmissão pessoa-a-pessoa de MERS-CoV, que tende a ocorrer apenas em situações em que há contato próximo e prolongado com uma pessoa infectada – no contexto dos cuidados de saúde – ou em pessoas imunodeficientes (COLEMAN e FRIEMAN, 2014).

Com a incidência de dois coronavírus de alta patogenicidade em aproximadamente 10 anos, SARS-CoV e MERS-CoV, um dos legados dos surtos tem sido uma maior consciência de que é necessário compreender como e onde emergem novas zoonoses bem como os fatores relacionados a transmissão interespecífica. Este conhecimento é crucial para a detecção precoce de possíveis ameaças futuras (figura 5) (HEYMANN et al., 2013).



**Figura 5:** Possível rota de transmissão de SARS e MERS-CoV. Nota-se, nas duas rotas de transmissão, a presença dos morcegos como animais reservatórios para

evolução de coronavírus de alta patogenicidade aos humanos. COLEMAN e FRIEMAN, 2014.

Em 2013 foram relatados dois novos SARS-CoVs-like (SL-CoVs), RsSHC014 e Rs3367, identificados em morcegos-ferradura (*Rhinolophus sinicus*). Devido a capacidade de entrar nas células utilizando receptores ACE2 (Receptores de Enzimas Conversoras de Angiotensina 2), estes novos coronavírus foram identificados como ancestrais direto de SARS-CoV em morcegos-ferradura (COLEMAN e FRIEMAN, 2014).

Análises filogenéticas de isolados de MERS-CoV mostraram que esse coronavírus está relacionado a dois coronavírus de morcegos, HKU4 – de morcegos *Tylonycteris* – e HKU5 – de morcegos *Pipistrellus* – e é o sexto coronavírus conhecido capaz de infectar seres humanos (MACKENZIE e JEGGO, 2013).

Wacharapluesadee e colaboradores (2015), realizando a triagem por RT-PCR de 626 amostras obtidas de morcegos de 19 espécies de cinco províncias no leste da Tailândia entre 2008 e 2013, detectaram 47 amostras positivas para CoV. Destes, foram identificados 37 Alphacoronavirus, 9 Betacoronavirus linhagem D e um Betacoronavirus linhagem B (relacionado ao SARS-CoV). Seis novos morcegos *Cynopterus esfinge*, *Taphozous melanopogon*, *Hipposideros lekaguli*, *Rhinolophus shameli*, *Scotophilus heathii* e *Megaderma lyra* foram identificados como reservatórios para CoV. As análises filogenéticas indicaram ainda a existência de uma alta diversidade e uma ecologia complexa de CoV.

Para analisar a diversidade coronavírus na Costa Rica, Moreira-Soto e colaboradores (2015) detectaram coronavírus em swabs anais provenientes de quatro morcegos frugívoros de espécies diferentes (*Artibeus jamaicensis*, *Carollia perspicillata* e *C. castanea* e *Glossophaga soricina*). Na Indonésia, Anindita e colaboradores (2015) relataram a descoberta de Betacoronavírus em morcegos frugívoros da espécie *Dobsonia moluccensis*.

Góes e colaboradores (2013) analisaram fezes coletadas entre 2007 e 2010 de 97 morcegos do Brasil (estado de São Paulo, sul e sudeste) e 75 morcegos do México. Morcegos de uma variedade de espécies, incluindo insetívoros, nectarívoros, frugívoros e hematófagos foram incluídos no estudo. Detectaram, por RT-PCR, RNA de AlphaCoV em *Molossus rufus* e *M. molossus* (BatCoV-M.rufus28/Brasil/2010, KC886321). A sequência de 412 nucleotídeos da RNA

polimerase deste vírus foi estreitamente relacionada com Alphacoronavirus detectados em morcegos *Eptesicus fuscus*, da América do Norte (82% de identidade), morcegos *Myotis australis* da Austrália (77% de identidade), morcegos *Miniopterus*, do Quênia (77% de identidade) e morcegos *Rhinolophus*, de Hong Kong (77% de identidade).

Outros estudos realizados em diversos países também têm identificado material genético de coronavírus em diversas espécies de morcegos. No Japão, Suzuki e colaboradores (2014) relataram Betacoronavirus do grupo B em pequenos morcegos-ferradura de Iwate. Na Nova Zelândia, foi detectada a presença uma sequência de um novo Alphacoronavirus em morcegos *Mystacina tuberculata* de uma floresta nativa intocada de uma ilha remota (HALL et al., 2014). Na Itália, foram detectados, em *Myotis blithii* e *Eptesicus serotinus*, AlphaCoV e BetaCoV (linhagem C) geneticamente relacionados aos identificados em espécies de morcegos espanhóis (DE BENEDICTIS et al., 2014). Outro estudo italiano ainda identificou fragmentos da sequência de RdRp de dois Alphacoronavirus em *Pipistrellus kuhlii*, três Betacoronavirus 2B em *Rhinolophus hipposideros* e 10 Betacoronavirus 2C em *Nyctalus noctula* e *Hypsugo savii* (LELLI et al., 2013).

Por meio de uma análise metagenômica com *nextgen sequencing* de 268 swabs retais de 68 morcegos de quatro condados na província de Yunnan, He e colaboradores (2014) identificaram centenas de sequências relacionadas com a alfa e Betacoronavirus. Relataram ainda o genoma completo de um novo SARS-CoV (LYRa11) contendo 29.805 nucleotídeos de comprimento, 13 ORFs, 91% de identidade de nucleotídeos com SARS CoVs de humanos e civetas, 89% de similaridade com outro SARS-CoV-like de morcego. Um dos relatos mais interessantes foi obtido por meio de análises de recombinação. Tais análises indicaram que LYRa11 é um provável recombinante descendente de linhagens parentais evoluídas a partir SARS-CoVs-like de morcegos.

## **2.5. Metagenômica viral (metaviroma) e *nextgen sequencing*: potente ferramenta para a realização de estudos epidemiológicos em larga escala**

Muitos são os objetivos que podem ser atingidos por meio do uso da metagenômica utilizando *nextgen sequencing*. Thomas e colaboradores (2012) citam tal metodologia como fonte de informação genética sobre possíveis novos biocatalisadores ou enzimas, em casos de bioprospecção; realização de conexões

genômicas entre função e filogenia de organismos “não cultiváveis”; identificação de perfis evolutivos de função e estrutura de comunidades microbianas; e ainda inferências sobre novas hipóteses de funções microbiais.

Estas abordagens são cada vez mais utilizadas para a detecção de novos agentes patogênicos virais bem como para gerar genomas completos de vírus não cultiváveis. A identificação *in silico* de genomas virais completos a partir de dados de sequência permitiria uma rápida caracterização filogenética desses novos vírus (WOOD-CHARLSON et al., 2015).

Dessa forma, a metodologia surge como alternativa para a descoberta de novos agentes virais em animais, permitindo a expansão do conhecimento da diversidade viral bem como de zoonoses potencialmente emergentes. O material identificado pode fornecer *insights* sobre a evolução e filogenia dos vírus. Esses dados, associados a estudos sobre a biologia dos hospedeiros, podem contribuir para o entendimento sobre a eco-epidemiologia de diversos vírus que, por análises complementares, auxiliam na identificação de agentes potencialmente patogênicos.

Viromas de diversas espécies animais bem como de diversos órgãos humanos têm sido obtidos por meio desta abordagem metodológica. O trabalho de Brotman e colaboradores (2014) descreveu a relação temporal entre microbiota vaginal e detecção do papiloma vírus humano (HPV). Um pequeno vírus de DNA, o Torque Teno Virus (TTV), foi encontrado inesperadamente em amostras provenientes de pacientes portadores de oftalmite (culturas bacterianas e fúngicas negativas) (LEE et al., 2015). O metaviroma entérico de musaranhos (gênero *Crocidura*), pequenos mamíferos insetívoros similares aos roedores, foi determinado e identificou vírus de insetos e vírus novos, incluindo cyclovirus, picornavírus e vírus Picorna-like. Ainda, vários cyclovirus, incluindo variantes humanas, foram detectados em musaranhos selvagens em elevada taxa de prevalência. Sequências genômicas completas ou quase completas destes novos vírus foram determinadas e foram submetidas a caracterização genética (SASAKI et al., 2015).

Pelas análises metagenômicas que utilizam *nextgen sequencing* tem-se apontado que morcegos abrigam uma gama de vírus de RNA. Muitos desses vírus são altamente patogênicos e exibem um amplo tropismo celular, sendo capazes de infectar uma grande variedade de células e hospedeiros (VHE, NVI, EBOV, SARS-CoV). Vírus como o HEV, lissavírus e NIV mostram alta conservação genômica

dentro de seus hospedeiros de morcegos, o que sugere que eles estão sob fortes restrições seletivas (SMITH e WANG, 2013).

Considerando que os morcegos abrigam uma grande diversidade de vírus e que pouco se sabe sobre seu viroma, Dacheux e colaboradores (2014) determinaram a diversidade viral de cinco espécies diferentes de morcegos insetívoros franceses (9 espécimes). Detectaram vírus de muitas famílias virais que infectam bactérias, plantas, fungos, insetos, animais vertebrados e mamíferos (Retroviridae, Herpesviridae, Bunyaviridae, Poxviridae, Flaviviridae, Reoviridae, Bornaviridae, Picobirnaviridae). Descreveram novos vírus de mamíferos, incluindo rotavírus, gammaretrovirus, bornavirus e bunyavirus, bem como a primeira identificação de nairovirus em morcegos.

O metaviroma de morcegos de Myanmar (China) revelou a presença de novos vírus de mamíferos. As análises foram conduzidas por meio de órgãos completos do tórax e abdome de 853 morcegos de seis espécies identificando sequências conhecidas pertencentes a 24 famílias virais. Dos *contigs* virais (2% do total de sequências), 45% foram relacionados a vírus de vertebrados, 28% a vírus de insetos, 27% para fagos e 95 *contigs* para vírus de plantas. A validação realizada por PCR seguida por análises filogenéticas levou à descoberta de alguns novos vírus de morcego dos gêneros Mamastrovirus, Bocavírus, Circovirus, Iflavirus e Orthohepadnavirus (HE et al., 2013).

Em populações de morcegos frugívoros africanos (*Eidolon helvum*) foram identificados por metagenômica grande abundância e diversidade de novos herpes e papilomavirus. Os autores também descreveram o isolamento de um novo adenovírus e detectaram, pela primeira vez em Chiroptera, sequências de um poxvírus intimamente relacionado com molusco contagioso (BAKER et al., 2013).

Herman Tse e colaboradores (2012), realizando estudos de 156 amostras de swab retal de morcegos aparentemente saudáveis também por abordagem metagenômica, descobriram uma nova linhagem de Papilomavirus, *Miniopterus schreibersii* Papilomavírus tipo 1 (MscPV1), com genoma de 7.5kb de comprimento. Além da caracterização do novo agente, os pesquisadores realizaram também diversos estudos filogenéticos que permitiram inferir que MscPV1 e *Erethizon dorsatum* papilomavírus (EdPV1) são mais estreitamente relacionados, com divergência aproximada de 60,2-91,9 milhões de anos.

Diante desse cenário e na busca de uma alternativa rápida e eficaz para vigilância epidemiológica em morcegos saudáveis da espécie *Tadarida brasiliensis*, uma espécie típica do Brasil e das Américas, propôs-se a identificação de agentes virais por meio de metagenômica viral (ou metaviroma).

### **3. Objetivos**

#### **3.1. Objetivo Geral**

Este trabalho teve como objetivo geral identificar agentes virais, utilizando metagenômica (metaviroma) de swabs orais e retais colhidos de morcegos *Tadarida brasiliensis* assintomáticos de uma colônia da cidade de Campinas.

#### **3.2. Objetivos específicos**

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- Estimar a diversidade e a abundância dos agentes virais identificados;
- Relacionar filogeneticamente os Coronavírus identificados entre si bem como com genomas obtidos dos bancos de dados;
- Compreender a eco-epidemiologia molecular da evolução de Coronavírus.

## **4. Material e métodos**

### **4.1. Amostras**

A captura e coleta dos morcegos foram realizadas em 2011 numa colônia residente do Bosque dos Jequitibás, Campinas-SP - 22° 54' 31" S, 47° 2' 58" W. Todo o procedimento de coleta foi realizado com autorização prévia dos órgãos ambientais e executada pelo Médico Veterinário Paulo Anselmo Nunes Felipe, profissional cadastrado no Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade. Foram utilizadas redes de neblina 9x3 m em média a 0,5 m do chão para captura de morcegos dispostas próximas ao abrigo da colônia. As redes foram fixadas ao entardecer com o auxílio de hastes de metal e barbantes, de modo que apresentassem “bolsas” ao ficarem armadas. Foram revisadas a cada 20 minutos para evitar que o animal fosse ferido ou morto.

Coletou-se 20 swabs (10 swabs orais e 10 swabs retais) provenientes de 10 espécimes de morcegos da espécie *Tadarida brasiliensis*. Os swabs foram transportados em gelo até o Laboratório de Virologia Animal, Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes, Instituto de Biologia, Unicamp e armazenados em meio MEM a -80°C.

### **4.2. Pré-Tratamento**

Para a realização do procedimento experimental de sequenciamento em larga escala por meio de metagenômica, foi realizado um pré-tratamento das amostras – filtração, DNase I e proteinase K.

#### **4.2.1. Filtração**

As amostras congeladas a -80 °C em RNA later foram ressuspendidas e homogenizadas em 500µL de meio MEM (Invitrogen, USA). Todas as etapas foram conduzidas à 4°C. Os sobrenadantes resultantes foram filtrados através de uma membrana de 0,22µm. A solução filtrada foi centrifugada a 1500g por 20 minutos à 4 °C para concentração de partículas virais e foi submetida ao tratamento com DNase I (Invitrogen) e RNase (Invitrogen) para eliminação de contaminantes não encapsulados.

#### **4.2.2. Pré-tratamento com DNase I**

A reação de pré-tratamento com DNase I (Invitrogen, USA) foi realizada, num volume final de 200µL, utilizando-se, na ordem descrita, 98µL de amostra, solução tampão A (100µL)(2x concentrada e contendo 50% do volume de Glicerol, 200 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM CaCl<sub>2</sub>, e 10 mM MgCl<sub>2</sub>) e 520 U de DNase I

(Invitrogen, USA). Após a homogeneização, a reação foi incubada a 37 °C por uma hora.

#### **4.2.3. Pré-tratamento com Proteinase K**

A reação de pré-tratamento com Proteinase K (Invitrogen, USA) foi realizada, num volume final de 400µL, utilizando-se, na ordem descrita, 196µL de amostra, solução tampão A (200µL), 0,08mg/µL de Proteinase K (solution) RNA Grade (Invitrogen, USA). A reação foi homogeneizada e incubada a 55 °C por uma hora. Após a incubação, a inativação da atividade proteica foi realizada com um choque térmico a 70°C por 1 minuto.

#### **4.3. Extração de RNA Viral**

Após a realização do pré-tratamento, foi realizada a extração de RNA viral utilizando QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, USA), conforme instruções do fabricante. A concentração individual das amostras foi medida com Qubit® Fluorometric Quantitation (Life Technologies).

Após a extração, mediu-se a concentração individual de ácidos nucleicos nas amostras. Foi realizado um *pool* equimolar contendo as 20 amostras (50µL de cada amostra) a partir dos RNAs já eluídos. Este *pool* foi submetido ao mesmo procedimento de extração de RNA com QIAamp Viral RNA Mini Kit, conforme instruções do fabricante. Esta estratégia foi adotada para concentrar o RNA eluído e assim deixá-lo na concentração adequada aos limites de detecção do RNA-Seq em *HiSeq 2500 Sequencing System – Illumina* (400ng a 4µg/µL).

#### **4.4. Preparação da Biblioteca, Sequenciamento, Montagem e Anotação dos Genomas Virais**

As amostras foram encaminhadas ao Laboratório Central de Tecnologia de Alto Desempenho - LaCTAD (UNICAMP) para procedimento de sequenciamento RNA-Seq em *HiSeq 2500 Sequencing System – Illumina*. Foi preparada uma biblioteca de RNA, conforme instruções do fabricante (Illumina) e posteriormente realizada a corrida *paired-end 2x100pb* em 1 lane.

As sequências geradas foram analisadas em três plataformas diferentes. As *reads* foram filtradas de acordo com a qualidade do sequenciamento usando os parâmetros descritos por *Bokulich et al.* – foram submetidas a um pré-processamento de normalização no software CASAVA ([http://support.illumina.com/sequencing/sequencing\\_software/casava.html](http://support.illumina.com/sequencing/sequencing_software/casava.html)), trimadas no software Cutadapt (<http://hpc.ilri.cgiar.org/cutadapt-software>) utilizando

adaptadores correspondentes à tecnologia de amplificação (index) utilizada e filtradas de acordo com os índices de qualidade no programa *FastQ Quality Trimmer* ([http://hannonlab.cshl.edu/fastx\\_toolkit/download.html](http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/download.html)). Todas as etapas foram monitoradas por meio do software *FastQC* (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>).

Foi realizado o procedimento de *montagem denovo* da biblioteca de RNA usando o programa *MetaVelvet* (Namiki et al., 2012) (<http://metavelvet.dna.bio.keio.ac.jp/>). Os contigs resultantes de cada montagem foram anotados automaticamente usando *blastx* (e-value 1e-5) e *tblastx* contra os bancos de dados *Uniref90* e *Uniprot*.

#### 4.5. Análises Filogenéticas

As análises filogenéticas foram geradas pelo software *MEGA* versão 6.0 (TAMURA et al., 2013) a partir de uma matriz de distâncias utilizando as sequências de Coronavírus obtidas no presente trabalho e outras depositadas em bancos de dados de genomas virais – *Coronavirus Database* (<http://covdb.microbiology.hku.hk:8080/COV-newpages/>); *Virus Pathogen Resource/ViPR* (<http://www.viprbrc.org/brc/home.spg?decorator=corona>). Foi construída uma árvore filogenética com os quatro gêneros do CoV (Alfa-, Beta-, Gama- e Delta-) para análises de agrupamento das amostras deste trabalho e consequentemente construir uma análise filogenética mais fidedigna.

Os dados foram comparados àqueles gerados no servidor *Metavir* (<http://metavir-meb.univ-bpclermont.fr/>), um servidor projetado para anotar sequências metagenômicas virais (a partir das *reads* ou de *contigs* montados). Além da anotação automática, o servidor ainda fornece informações sobre cobertura de leitura, taxonomia viral, filogenia para as amostras detectadas, curvas de rarefação e também comparação com os viromas depositados na base de dados. O servidor permite a determinação da composição taxonômica por meio da ferramenta *GAAS* com proteínas completas de genomas virais depositados no *NCBI RefSeq* usando *BLASTx* e quatro limiares diferentes (“e-values” <10-3, 10-5, 10-7).

#### 4.6. Validação por RT-PCR e sequenciamento segundo metodologia de Sanger de sequência identificada como Alphacoronavirus

As amostras foram analisadas por RT-PCR utilizando *primers* convencionais panCoV para um fragmento da replicase (215-pb) conforme adaptação a partir de protocolo descrito por Vijgen e colaboradores (2008) –

inclusão de mais ciclos e menor tempo de extensão a fim de obter mais produtos de PCR. A reação de sequenciamento pela metodologia de Sanger foi realizado em uma amostra de swab anal Pancoronavirus-positivo foi realizada pelo Laboratório Central de Tecnologia de Alto Desempenho em Ciências da Vida (LaCTAD) da Unicamp (<http://www.lactad.unicamp.br>) usando um sequenciador automático (DNA 3730xl Analyzer; Applied Biosystems).

Os cromatogramas foram editados usando UGENE version 1.14 (UGENE, <http://ugene.unipro.ru/forum/YaBB.pl?num=1407749393>) e avaliados por *Phred scores for base calling*. O alinhamento foi feito com software v.2.1 ClustalW (<http://www.clustal.org>) implementado em interface de linha de comando do Linux, e uma matriz de similaridade foi gerada com sequências recuperadas do GenBank. Um fragmento de 144 nucleotídeos do gene da replicase foi obtido após a edição, e as análises filogenéticas foram realizadas após a determinação do melhor modelo de evolução usando o software jModelTest2 (<https://code.google.com/p/jmodeltest2/>). Diferentes sequências de Coronavírus foram incluídas para representar os gêneros alpha, beta, gamma, e deltacoronavirus. Utilizou-se os métodos de máxima verossimilhança (ML, Maximum likelihood – valores de suporte de 1000 Shimodaira-Hasegawa–like com general time-reversible model e aproximação da categoria em 20 rates category em uma distribuição gamma) e Neighbor Joining (NJ) sob Kimura-2 parâmetros e 1000 repetições.

## 5. Resultados

### 5.1. Diversidade de vírus detectados em *Tadarida brasiliensis*

Para a realização deste estudo foram utilizadas 20 amostras (10 swabs de origem traqueal e 10 de origem anal) provenientes de 10 espécimes de morcegos da espécie *Tadarida brasiliensis*. Por meio de *nextgen sequencing* em HiSeq 2500 System (Illumina) realizado a partir de um *pool* de todas as amostras, obteve-se 345.409.110 *reads paired-ends* sendo 76,47% com índice de qualidade Q superior a 30 (99,9% de confiabilidade).

O procedimento de montagem das *reads* para obtenção de *contigs* e *scaffolds* foi realizado por duas plataformas distintas, MetaVelvet (Namiki et al., 2012) e Metavir (Roux et al., 2014), obtendo-se 10.742 e 9.179 *scaffolds*, respectivamente.

#### 5.1.1. Diversidade viral identificada pelo MetaVelvet utilizando o banco de dados UniRef90

A busca por similaridade (BLAST) foi realizada em diferentes bancos de dados. Submetendo-se os *scaffolds* obtidos por MetaVelvet ao banco de dados UniRef90, obteve-se 97 *matches* com sequências de origem viral (tabela 1).

Em relação diversidade viral identificada, evidenciou-se que houve uma baixa prevalência de *scaffolds* similares a genomas de Coronavírus. No entanto, os agentes virais identificados são de grande interesse para vigilância sanitária e epidemiológica. Destaca-se a identificação de agentes virais que infectam aves (Spleen necrosis vírus, Avian reticuloendotheliosis vírus), primatas não humanos (Mason-Pfizer monkey vírus, Simian retrovírus), vertebrados em geral (Dependovirus e Gammaretrovirus não classificados, Adenovirus minor, Betaretrovirus, Bovine endogenous retrovírus), morcegos (Miniopterus bat coronavirus/Kenya/KY33/2006, Bat gammaretrovirus, Bat adenovirus 2, Bat coronavirus Shandong/977/2006, Bat picornavirus 3, Chaerephon bat coronavirus/Kenya/KY22/2006) e humanos (Alphacoronavirus não classificados, Human betaretrovirus, Human T-cell leukemia vírus type I).

Os resultados de BLAST também se assemelha a Provirus ancestral (referências P63135 e Q9N2K0), dados importantes para a compreensão da evolução de agentes virais em morcegos. Grande parte dos *scaffolds* apresentou similaridade com retrovírus e vírus encontrados em insetos e plantas.

**Tabela 1:** Distribuição das similaridades obtidas por BLAST em UniRef90. Os números indicados entre parênteses representam o número de *scaffolds* que apresentaram similaridade com dada sequência referência

| Referência                              | Classificação  | Hospedeiro típico                       |
|---|--|---|
| P63135, Q9N2K0                          | Provirus ancestral                                     | -                                       |
| U3PWQ5                                  | Uncultured virus                                       | -                                       |
| A7LM73 (4)                              | Slow bee paralysis virus                               | Abelhas                                 |
| UPI0001750242                           | Chronic bee paralysis virus                            |   |
| Q88269                                  | Spleen necrosis virus                                  | Aves                                    |
| P87553                                  | Canine adenovirus                                      | Cães                                    |
| P31795                                  | Radiation murine leukemia virus (strain Kaplan)        | Camundongo                              |
| Q85647 (2), P03343 (strain GR)          | Mouse mammary tumor virus                              |   |
| P01102 (2)                              | Murine osteosarcoma virus                              |   |
| UPI0000237CA9                           | Moloney murine leukemia virus                          | Camundongos e outros vertebrados        |
| O36966                                  | Drosophila C virus                                     | Diversas espécies de <i>Drosophila</i>  |
| D0U493                                  | Drosophila melanogaster totivirus SW-2009 <sup>a</sup> | <i>Drosophila melanogaster</i>          |
| A5HB89, A5HB90 (2), A5HB91, A5HB92 (14) | Solenopsis invicta virus 2                             | Formigas                                |
| M4MKZ4                                  | Scheffersomyces segobiensis vírus                      | Fungos                                  |
| G3CCB3                                  | unclassified Mitovirus                                 |   |
| Q05953                                  | Avian reticuloendotheliosis vírus                      | Galinhas                                |
| O36449                                  | Fowlpox virus  |   |
| S5YAF0                                  | Unclassified Alphacoronavirus                          | Humanos, porcos, gatos, cães e morcegos |
| Q7SPV7                                  | Human betaretrovirus                                   | Humanos                                 |
| Q7SPW3                                  |  |   |
| Q4R711                                  | Human T-cell leukemia virus type I                     |   |
| D9D9M0                                  | Circulifer tenellus virus 1                            | Insetos                                 |
| Q85444 (2), Q86285, Q86286 (4)          | Diadromus pulchellus idnoreovirus 1                    |   |
| M1PFP1                                  | Aphid lethal paralysis virus                           |   |
| Q6A562                                  | Thosea asigna virus                                    |   |

|                                      |   |             |
|--------------------------------------|---|-------------|
| M1F264                               | Dezidougou virus                            |             |
| R4ZGL6                               | Mythimna separata entomopoxvirus            |             |
| O89278                               | Himetobi P virus                            |             |
| U3PUQ1                               | Chironomid mitovirus                        |             |
| A9QXE1                               | Rhopalosiphum padi virus                    |             |
| P07570, P07572 (2),<br>UPI00027B2BFB | Mason-Pfizer monkey virus                   | Macacos     |
| L0MXX7                               | Simian Retrovirus Y                         |             |
| E0WCK8                               | Simian Retrovirus 4                         |             |
| Q5IY56                               | Simian Retrovirus 7                         |             |
| F1DB14                               | Miniopterus bat coronavirus/Kenya/KY33/2006 | Morcegos    |
| H9NEA6                               | Bat gammaretrovirus                         |             |
| G1FQN1                               | Bat adenovirus 2                            |             |
| A4ULL1                               | Bat coronavirus Shandong/977/2006           |             |
| G0Y2E4                               | Bat Picornavirus 3                          |             |
| F1DB20                               | Chaerephon bat coronavirus/Kenya/KY22/2006  |             |
| Q8BE69, Q1H5H2                       | Mal de Rio Cuarto vírus                     | Plantas     |
| P17459                               | Cymbidium ringspot virus                    |             |
| F8SRK5 (4)                           | Rice black streaked dwarf virus             |             |
| Q8JYK1 (5)                           | Fiji disease virus (isolate Sugarcane)      |             |
| B6UQC5                               | Carrot mottle virus                         |             |
| Q83858                               | Nilaparvata lugens reovirus                 |             |
| Q2V8M4 (3)                           | Rosy apple aphid virus                      | Pulgões     |
| E0XJJ5 (2)                           | unclassified Dependovirus                   | Vertebrados |
| D5S0D4                               | Adenovirus minor                            |             |
| P11283                               | Betaretrovirus                              |             |
| E7FL24                               | Bovine endogenous retrovirus                |             |
| P10272                               | Unclassified gammaretrovirus                |             |

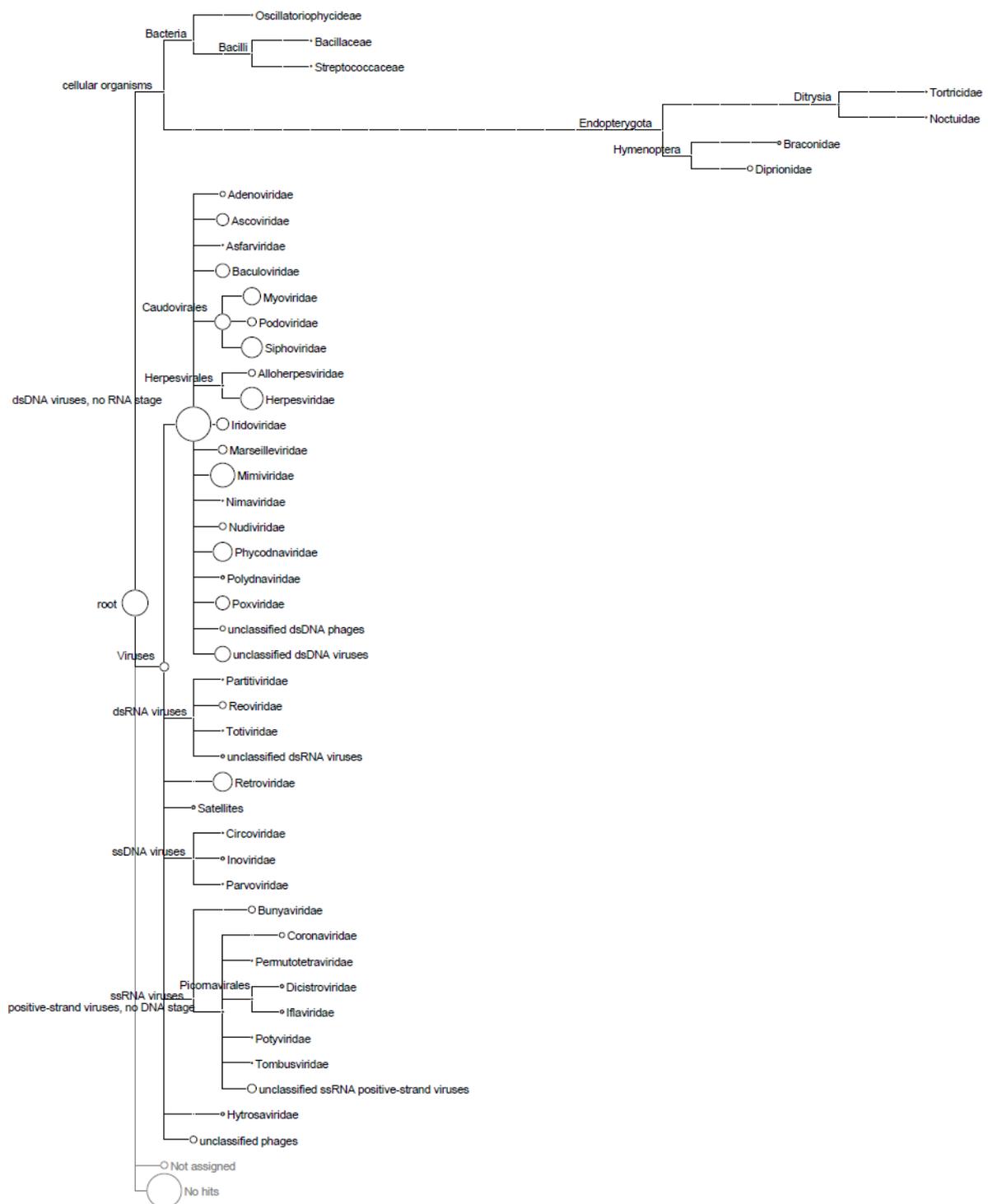
### 5.1.2. Diversidade viral identificada pelo Metavir utilizando banco de dados de genomas virais

Nas análises de similaridade realizadas pelo Metavir (Apêndice 1 – Diversity of viruses in bats from the urban area of Campinas-SP Brazil using metagenomic analyses), encontrou-se 827 *matches* com genomas virais, dos quais 6 Alphacoronavirus não classificados (figura 6). Aproximadamente 85% dos

*scaffolds* apresentaram similaridade com vírus de DNA fita dupla enquanto que os 15% foram divididos entre vírus de RNA fita simples (5%), Orthoretrovirinae (4%), vírus de RNA fita dupla (2%), fagos não classificados (2%), vírus de DNA fita simples (0.8%) e 0.2% das sequências apresentaram similaridade com *Muska hytrovirus*, vírus relacionado a hipertrofia da glândula salivar de *Musca domestica* (painel A, quadro 1).

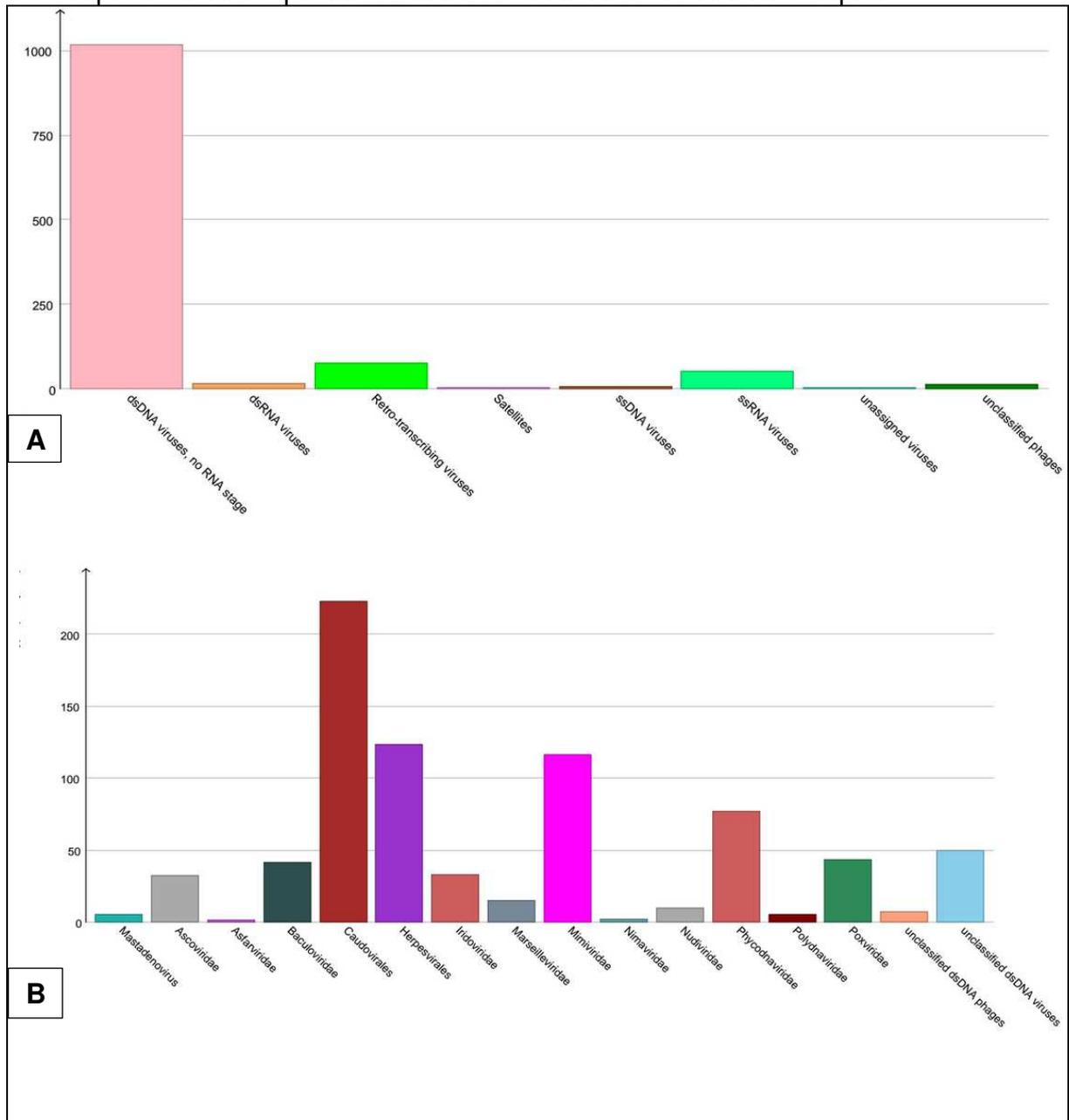
Dentre os vírus de DNA fita dupla (painel B, quadro 1), houve prevalência de similaridade com vírus pertencentes às ordens Caudovirales, Herpesvirales, Mimivirus, Phycodnavirus e Poxvirus. Dentro da ordem Caudovirales (painel C, quadro 1), identificou-se similaridade com membros da família Siphoviridae – fagos com genoma de aproximadamente 50 kb e 70 genes que infectam diversas espécies de bactérias patogênicas humanas (*Enterobacteria*, *Shigella*, *Mycobacterium*, *Bacillus*, dentre outras). Também foram encontradas similaridades com todos os gêneros da família Phycodnaviridae (grandes vírus – 100-560kb – que infectam algas eucarióticas marinhas ou de água doce – painel D, quadro 1) e vírus gigantes que infectam amebas (*Pandoravirus dulcis*, *Pandoravirus inopinatum*, *Pandoravirus salinum*, *Pithovirus sibericum*); ainda, um pequeno número de sequências foi similar àquelas obtidas de vírus dsDNA não classificados que infectam arqueias (painel E, quadro 1).

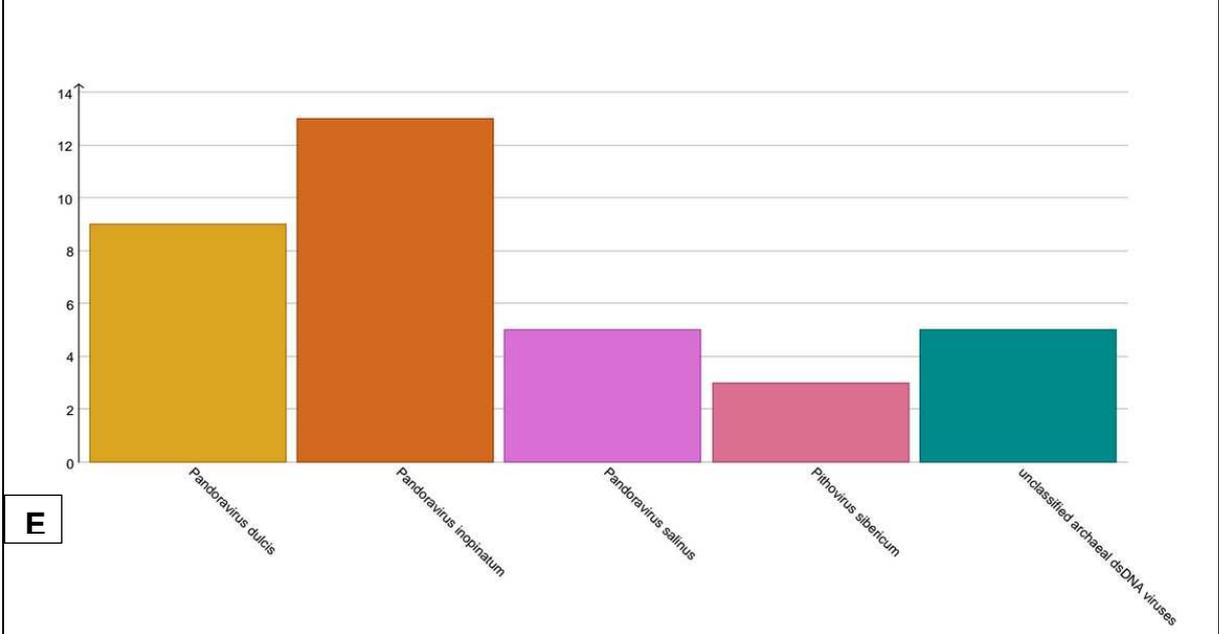
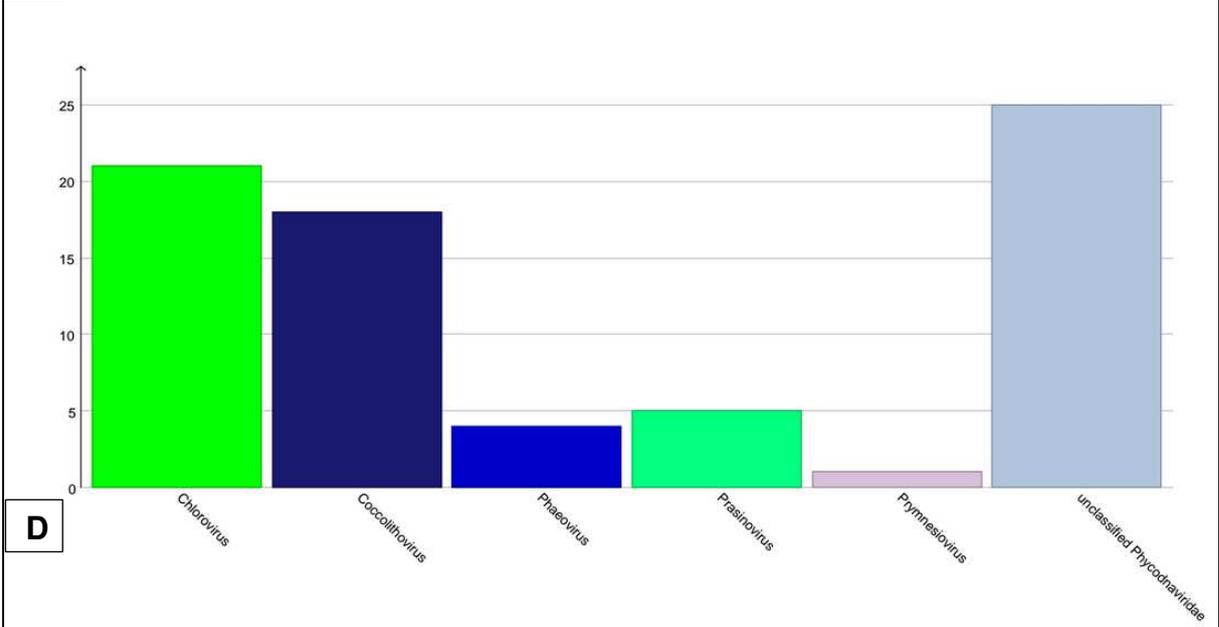
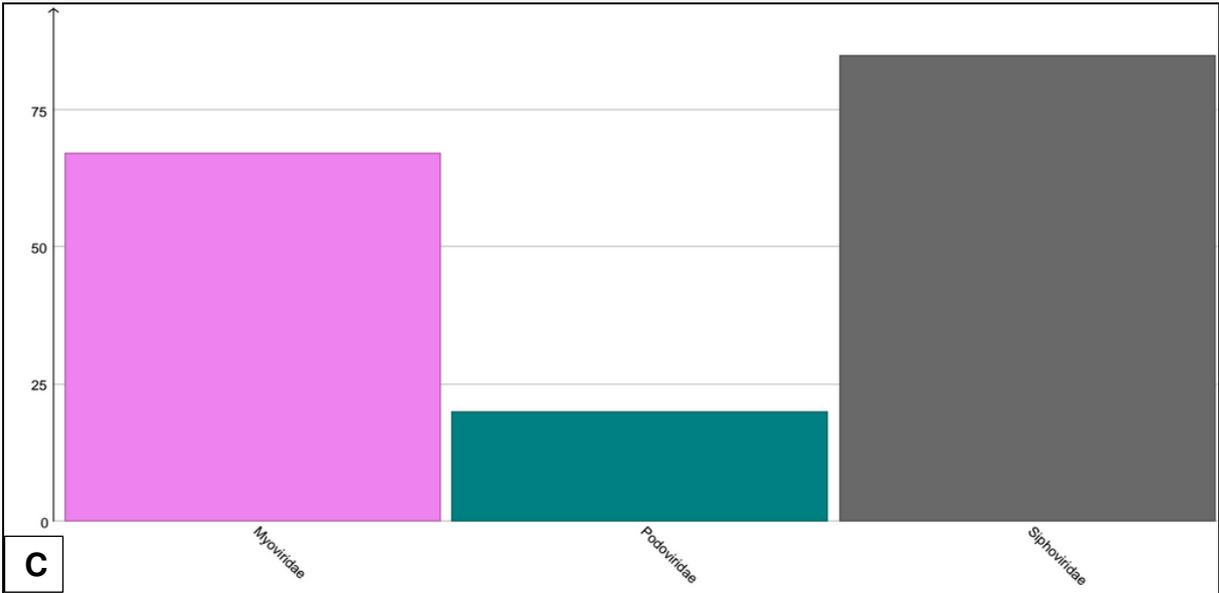
De todos os vírus de RNA identificados, obteve-se similaridade com Picornavirus, Alphacoronavirus, Tombusvirus e Mitovirus não classificados (painéis F e G, quadro 1). A subfamília Orthoretrovirinae foi representada pelos Betaretrovirus Mason-Pfizer Monkey virus, Mouse Mammary Tumor virus, Squirrel Monkey retrovírus, não classificados: Simian retrovirus e Enzootic nasal tumor vírus. Um pequeno número de sequências foi similar a vírus conhecidos de RNA fita dupla pertencentes às famílias Partitiviridae, Reoviridae, Totiviridae bem como com vírus não classificados (painel H, quadro 1).

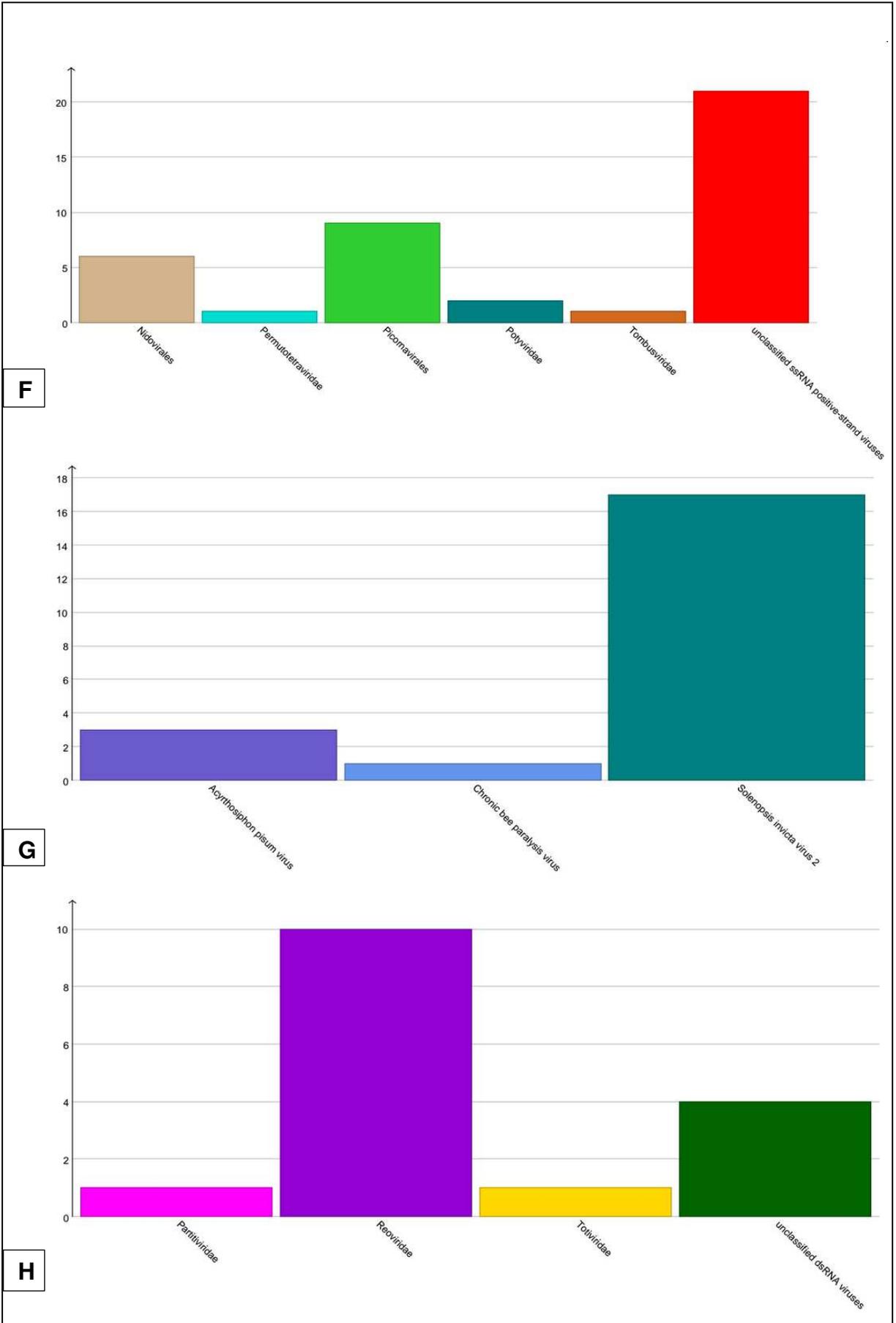


**Figura 6:** Distribuição por famílias da diversidade viral identificada por meio de metagenômica obtida por *nextgen sequencing* em *Tadarida brasiliensis*. Os círculos apresentados no final de cada ramo indicam a proporção do número de seqüências que foram identificadas como similares àquelas das referidas famílias.

**Quadro 1:** Diversidade viral identificada em swabs orotraqueais e anais de *Tadarida brasiliensis* baseada na análise de similaridade realizada pelo Metavir. O número de sequências está associado à ordenada e os táxons (representados por barras coloridas), à abscissa. A. Distribuição da diversidade viral identificada segundo Classificação de Baltimore. B. Vírus de DNA fita dupla (dsDNA vírus). C. Ordem Caudovirales D. Família Phycodnaviridae. E. Vírus gigantes que infectam amebas (Pandoravirus dulcis, Pandoravirus inopinatum, Pandoravirus salinum, Pithovirus sibericum) e dsDNA vírus não classificados que infectam arqueias. F. Vírus de RNA fita simples. G. Vírus que infectam insetos. H. Vírus de RNA fita dupla.







### 5.1.3. Busca por similaridade em bancos de dados específicos

A partir da identificação de Alphacoronavirus não classificados pelas diferentes metodologias utilizadas, novas análises de similaridade foram realizadas banco de dados específico para Coronavírus, CoVDB, encontrando-se 3 *matches* para PEDV, e 2 para HCoV-NL63 (ambos utilizando UniProt database, <http://www.uniprot.org>). Um dos *scaffolds* montados (*4936\_scaffold\_0*) formou um genoma quase completo (24668 nucleotídeos) de um coronavírus hipotético. Um novo teste de similaridade utilizando ViPR (Virus Pathogen Resource, <http://www.viprbrc.org/brc/home.spg?decorator=corona>) mostrou que tal *scaffold* apresenta similaridade com diversos coronavírus de importância em vigilância sanitária e epidemiológica (Apêndice 2).

Ressalta-se a similaridade de diversas sequências com vários coronavírus humanos, incluído àqueles de alta patogenicidade (Human coronavirus NL63 – NC\_005831.2, Human coronavirus 229E – NC\_002645.1, Middle East respiratory syndrome – NC\_019843.3, SARS coronavirus – NC\_004718.3, Human enteric coronavirus – NC\_012950.1, Human coronavirus OC43 – NC\_005147.1, Human coronavirus HKU1 – NC\_006577.2), com outros de interesse em saúde de animais domésticos e comerciais (Porcine epidemic diarrhea vírus – NC\_003436.1, Feline infectious peritonitis – NC\_002306.3, Avian infectious bronchitis vírus – NC\_001451.1) (tabela 2) e ainda com algumas estirpes relacionadas a origem de diversos outros coronavírus (Betacoronavirus HKU24 – NC\_026011.1, Beluga Whale coronavirus SW1 – NC\_010646.1).

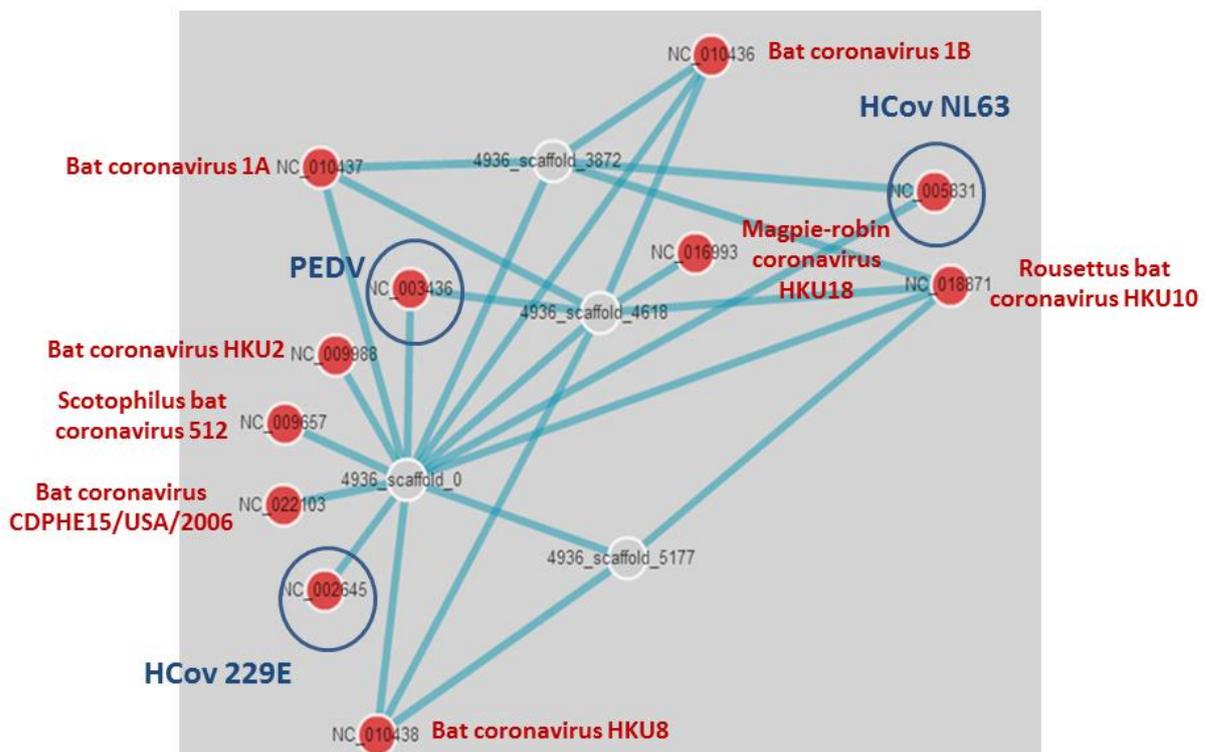
**Tabela 2:** Similaridade de diversas sequências que formaram o 4936\_Scaffold\_0 com vários coronavírus humanos, incluído àqueles de alta patogenicidade.

| Similaridade entre 4936_Scaffold_0 e Coronavirus | Infecções típicas                        | Referência                                     |             |
|--|--|--|-------------|
| <b>Estirpes de importância humana</b>            | Hcov-NL63                                | NC_005831.2                                    |             |
|  | Hcov-229E                                | NC_002645.1                                    |             |
|  | Hcov-OC43                                | NC_005147.1                                    |             |
|  | Hcov-HKU1                                | NC_006577.2                                    |             |
|  | SARS – Severe Acute Respiratory Syndrome | Trato respiratório                             | NC_019843.3 |
|  | MERS – Middle East Respiratory Syndrome  |  | NC_004718.3 |
|  | Human enteric                            | Trato gastrointestinal                         | NC_012950.1 |
| <b>Estirpes de importância veterinária</b>       | PEDV – Porcine Epidemic Diarrhea Virus   | Diarreia epidêmica em porcos                   | NC_003436.1 |
|  | FIV – Feline Immunodeficiency Virus      | AIDS em felinos (gatos)                        | NC_002306.3 |
|  | IBV – Infectious Bronchitis Virus        | Tratos respiratório, geniturinário, intestinal | NC_001451.1 |
| <b>Estirpes de importância evolutiva</b>         | Betacoronavirus HKU24                    |  | NC_026011.1 |
|  | Beluga Whale coronavirus SW1             |  | NC_010646.1 |

Uma reação de RT-PCR convencional com *primers* degenerados para um fragmento do gene da RdRp de PanCoronavírus identificou uma amostra positiva (UNICAMP\_bat\_BR\_14; swab anal do espécime 4). O produto de PCR foi purificado e sequenciado. Análises de similaridade utilizando BLAST identificou uma alta similaridade com o vírus causador da diarreia epidêmica de suínos, o PEDV (Apêndice 3 - Bat coronavirus in Brazil related to appalachian ridge and porcine epidemic diarrhea viruses. *Emerg Infect Dis.* 2015 Apr;21(4):729-31. doi: 10.3201/eid2104.141783.).

## 5.2. Análises Filogenéticas dos Coronavírus identificados em *Tadarida brasiliensis*

As análises filogenéticas e evolutivas dos coronavírus identificados foram realizadas utilizando-se sequências pertencentes a diversos fragmentos do genoma de coronavírus. Por meio de uma rede filogenética gerada pelo Metavir (figura 7), observou-se que a sequência identificada como *4936\_scaffold\_0* apresenta fragmentos diretamente relacionados com coronavírus humanos (HCoV-NL63 e HCoV-229E) bem como com o vírus da diarreia epidêmica de suínos (PEDV).

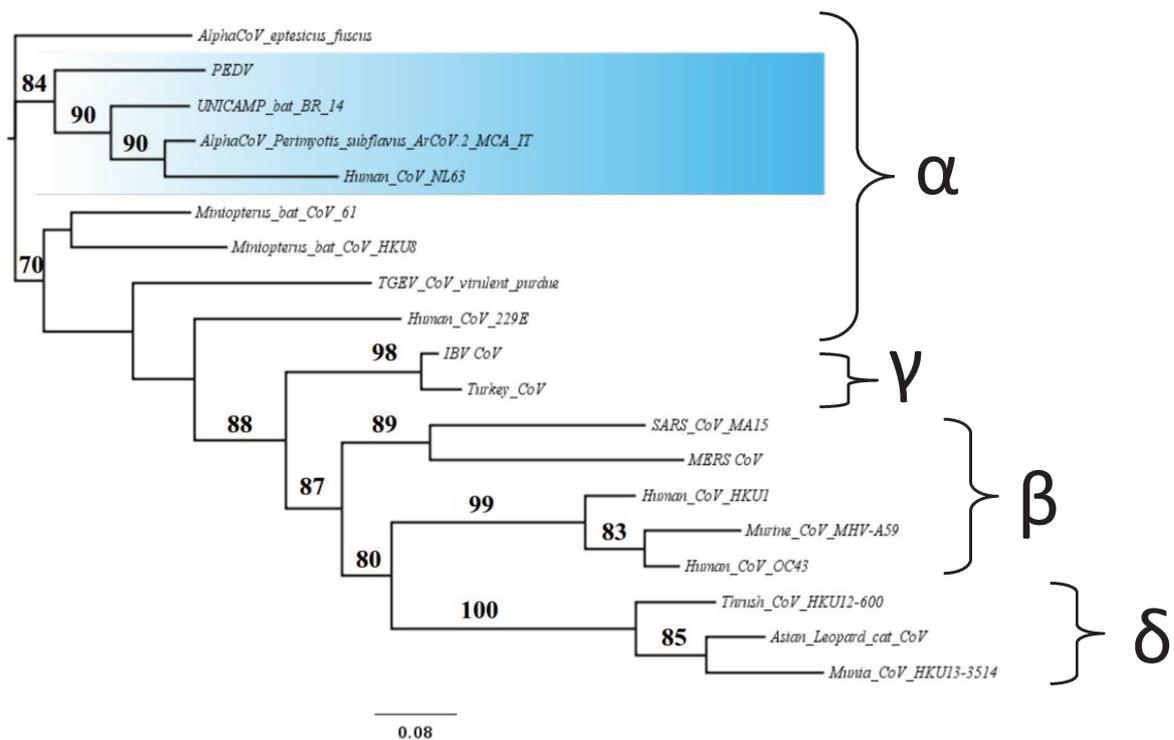


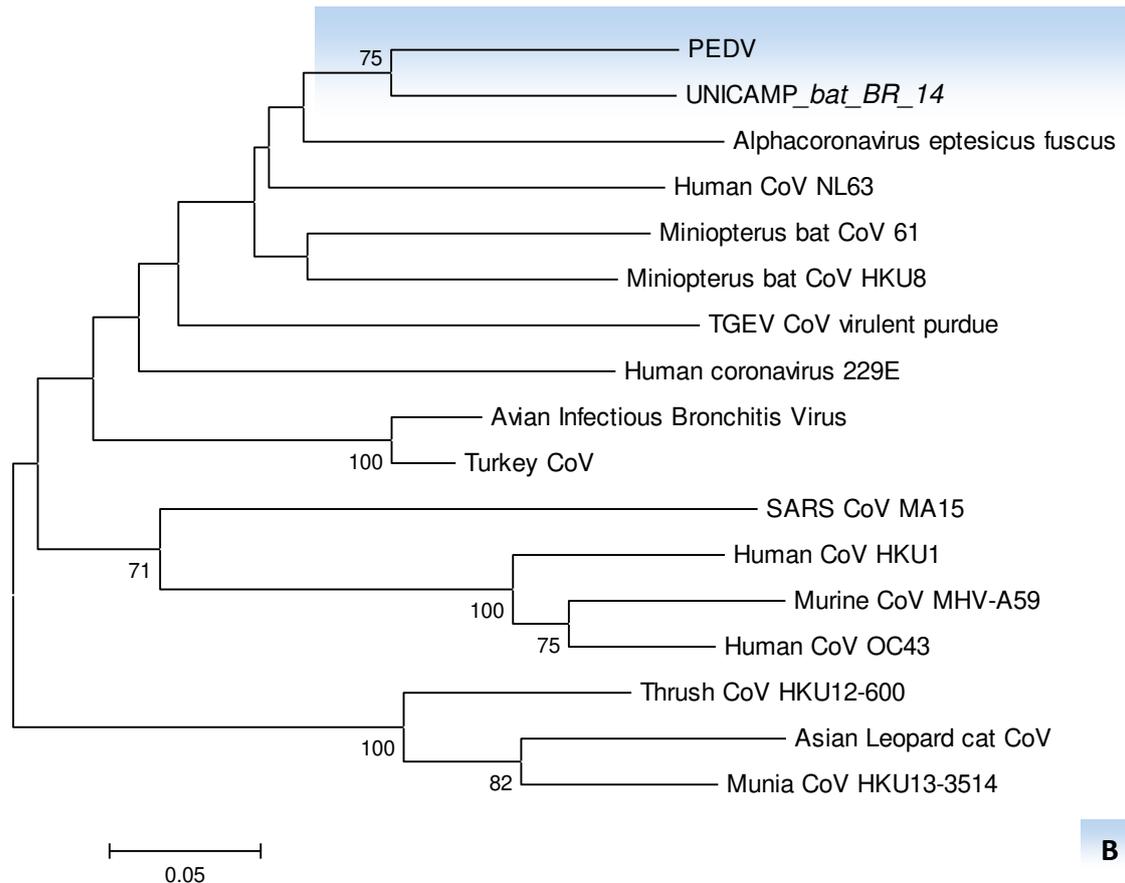
**Figura 7:** Rede filogenética obtida por meio de análises realizadas pelo Metavir. Evidencia-se a relação do scaffold\_0 com diversos coronavírus de interesse em vigilância sanitária e epidemiológica, em especial com coronavírus humanos (HCoV

229E e NL63) e de suínos (PEDV). Scaffold\_0: Alphacoronavirus; scaffold\_5177: *Miniopterus bat coronavirus HKU8*; scaffold\_4618 e scaffold\_3872: Bat coronavirus 1B.

Análises filogenéticas realizadas com um fragmento do gene para RdRP (Apêndice 4) indicou uma forte relação do *4936\_scaffold\_0* com Bat coronavirus 1B – um Alphacoronavírus não classificado isolado primeiramente em morcegos *Miniopterus pusillus* em Hong Kong. Trata-se do primeiro relato deste agente viral no Brasil e em morcegos da espécie *Tadarida brasiliensis*, uma vez que haviam sido relatados apenas em populações de morcegos da Europa, Ásia, África e Austrália.

A partir da sequência obtida por meio da validação com RT-PCR e sequenciamento (metodologia de Sanger), foi gerada uma árvore filogenética por dois métodos distintos, Neighbour Joining (NJ) e Maximum Likelihood (ML). Observou-se uma elevada similaridade com PEDV e forte relação filogenética com ARCoV-2 e com o coronavírus humano HCoV-NL63 (figura 8, realce azul).





**Figura 8:** Árvores filogenéticas obtidas a partir de um fragmento parcial (144 nucleotídeos) do gene de RdRp com Maximum Likelihood (usando software FastTree 2.1.7) A) e Neighbor-Joining (usando MEGA v6.0) B). As sequências deste estudo são destacadas em azul com o nome UNICAMP\_bat\_BR\_14 (disponível no GenBank sob o código KM514667). As sequências referências utilizadas estão descritas na ordem mostrada nas árvores: AlphaCoV Eptesicus fuscus (JX537914.1), PEDV (Porcine Epidemic Diarrhea Coronavirus, AF353511); UNICAMP\_bat\_BR\_14; AlphaCoV Perimyotis subflavus ARCoV.2 MCA IT (JX537913.1); Human CoV NL63 (AY567487); Miniopterus bat CoV 61 (AY864196); Miniopterus bat CoV HKU8 (DQ249228); TGEV CoV virulent purdue (Transmissible Gastroenteritis Coronavirus, DQ811789); Human CoV 229E (AF304460); IBV (Avian Infectious Bronchitis Virus, FJ904722); Turkey CoV (EU095850); SARS CoV (Human Severe Acute Respiratory Syndrome CoV, JF292915); MERS CoV (Middle East Respiratory Syndrome, KJ741000.1); Human CoV HKU1 (AY597011); Murine CoV MHV-A59 (FJ647225); Human CoV OC43 (AY903460); Thrush CoV HKU12-600 (FJ376621); Asian Leopard cat CoV (EF584908); Munia CoV HKU13-3514 (FJ376622). Os números nos ramos representam os valores de suporte. As escalas indicam o número de substituições por sítio.

Em todas as análises filogenéticas realizadas, pode-se notar que as sequências obtidas neste estudo formaram agrupamentos consistentes com Alphacoronavírus de importância em saúde humana e animal. Ainda, a identificação

de Alphacoronavírus não classificado contribui para o entendimento da dinâmica evolutiva dos coronavírus em animais reservatórios como os morcegos.

## 6. Discussão

Nos últimos anos, doenças infecciosas emergentes e graves têm causado temor mundial. Sabe-se ainda que muitas destas doenças são causadas por vírus provenientes de morcegos, como Ebola, Marburg, SARS coronavírus (SARS-CoV), MERS coronavírus (MERS-CoV), Nipah (NIV) e Hendra (VHE) (Han et al., 2015). O crescente reconhecimento da importância dos morcegos como reservatórios de novas doenças deve-se ao fato de constituírem 20% das espécies de mamíferos conhecidas, possuírem estilos de vida únicos e diversificados, incluindo a habilidade de voar, muitas vezes apresentarem estruturas sociais gregárias alcançando incrível abundância e densidades (alguns morcegos cavernícolas atingindo até 500 indivíduos por metro quadrado) e vida longa (WOOD et al., 2012).

À medida que mais informações vêm sendo obtidas quanto aos fatores ou causas de surgimento, tem havido uma expectativa de que se pode, eventualmente, prever o surgimento de novos agentes patogênicos. Estes e outros fatores têm aumentado significativamente a procura por novos patógenos virais, especialmente na interface humano-animal em espécies de animais silvestres e domésticos (MACKENZIE e JEGGO, 2013).

Compreender a ecologia de patógenos virais transmitidos por morcegos e identificar os gatilhos de um surto podem contribuir para o controle ou a redução de surtos de doenças zoonóticas emergentes. Ao compreender os mecanismos de emergência, políticas públicas de gestão de surtos podem ser desenvolvidas e processos de mitigação de risco podem ser implementados (SMITH e WANG, 2013).

Apesar de muitos vírus identificados em morcegos estarem associados a doenças humanas, de animais comerciais e silvestres, a comunidade médica e científica tem se mostrado em descompasso para o combate de eventuais epidemias. Isso se deve, em partes, pelo fato de não haver congruência entre os estudos da biologia dos morcegos e os epidemiológicos. Muitos epidemiologistas pouco sabem sobre biologia, ecologia e evolução dos morcegos. Situação semelhante se observa nos quiroperologistas, que pouco sabem sobre as doenças que podem ser transmitidas pelos morcegos. Assim, torna-se necessário a associação desses conhecimentos para que medidas de prevenção e manejo efetivas possam ser adotadas.

A intensificação da invasão humana em áreas naturais, em particular naqueles locais com elevada riqueza biológica tem causado a redução da

biodiversidade, contribuindo para transmissão de patógenos e incidência de doenças (KEESING et al., 2010). O fato dos morcegos se adaptarem bem em ambientes alterados os torna animais chave de interesse epidemiológico (MORATELLI e CALISHER, 2015).

Com a exceção dos estudos focados em lyssavírus, a maioria das investigações virológicas em morcegos têm sido limitados a um agente zoonótico em particular implicado em um surto de doença geograficamente localizada (SONTAG et al., 2009). Assim, torna-se necessário a formação de uma frente internacional para vigilância ativa de diferentes populações de morcegos para detectar potenciais agentes zoonóticos, bem como vírus desconhecidos de baixa patogenicidade que podem se combinar com outros e se tornarem patogênicos.

Diante da necessidade da identificação de novos agentes patogênicos em morcegos antes mesmo de causarem epidemias, tem-se utilizado de novas tecnologias de sequenciamento alto desempenho. Trata-se de tecnologias que tem revolucionado a capacidade de detecção de fragmentos genômicos tanto em termos da sua sensibilidade quanto de velocidade, e também a um custo muito reduzido (MACKENZIE e JEGGO, 2013). O uso dessas tecnologias associadas a testes sorológicos multiplex aumentaria a capacidade de monitoramento pré-emergência de potenciais agentes zoonóticos (SMITH e WANG, 2013).

A emergência de vírus de alta patogenicidade como SARS e MERS-CoV tem apontado os coronavírus como agentes de interesse em vigilância epidemiológica. Além de se chegar à conclusão de que o SARS-CoV pode ter se originado de morcegos, sugere-se que vários outros novos vírus existam em animais e alguns deles representam risco à saúde pública (FOUCHIER et al., 2004; VAN DER HOEK et al., 2004; WOO et al., 2005; ANDERSON e TONG, 2010).

Embora se tenha obtido grandes avanços no conhecimento desses vírus, há muito que se aprender sobre a evolução de agentes altamente patogênicos em animais reservatórios como os morcegos (COLEMAN e FRIEMAN, 2014). Diversos estudos têm apontado uma grande diversidade de coronavírus pertencentes aos gêneros  $\alpha$  e  $\beta$ -coronavírus da subfamília Coronavirinae que ocorrem amplamente em espécies de morcegos em muitas partes do mundo, incluindo África, a Europa, as Américas e Ásia. Curiosamente, uma análise de vírus isolados de morcegos no México mostrou que as espécies hospedeiras eram forças motrizes na evolução dos coronavírus, e que uma única espécie de morcego pode conter vários coronavírus.

Além disso, a associação filogenética de CoVs com a espécie / gênero foi particularmente evidente em populações alopátricas separadas por distâncias geográficas significativas (MACKENZIE e JEGGO, 2013).

Na tentativa de realizar um estudo epidemiológico de maneira rápida, eficiente e de baixo custo, este trabalho visou identificar, por meio de metagenômica (metaviroma) e sequenciamento de alto desempenho, material genômico viral presente em swabs orais e retais colhidos de 10 espécimes de morcegos *Tadarida brasiliensis* aparentemente saudáveis de uma colônia da cidade de Campinas. Assim, pode-se estimar a diversidade e a abundância dos vírus. Ainda, relacionou-se filogeneticamente os Coronavírus, contribuindo para a compreensão de sua eco-epidemiologia molecular evolutiva.

Com a realização de metagenômica e NGS, obteve-se um grande número de sequências de ótima qualidade (345.409.110 *reads paired-ends* - 76,47%  $Q \geq 30$ ). Nos procedimentos de montagem das *reads* com as plataformas MetaVelvet e Metavir 2, muitos agentes virais de interesse em vigilância epidemiológica e sanitária foram identificados. Pode-se notar que as diferentes plataformas utilizadas forneceram dados complementares, indicando a necessidade da realização de procedimentos similares em estudos que utilizem a mesma metodologia metagenômica.

Embora a busca por similaridade realizada pelo MetaVelvet em diferentes bancos de dados tenha fornecido um pequeno número de *matches* virais (97; 2 para Coronavírus), tais resultados foram validados e permitiram a identificação de um coronavírus com forte relacionamento filogenético com PEDV – vírus de alta patogenicidade em suínos – e coronavírus humano HCoV-NL63 (artigo publicado – Apêndice 2). PEDV tem sido relatado em muitos outros países, incluindo a Alemanha, França, Suíça, Hungria, Itália, China, Coreia do Sul, Tailândia e Vietnã e foi identificado pela primeira vez nos Estados Unidos em maio de 2013. Até o final de janeiro de 2014, o surto havia ocorrido em 23 estados norte-americanos, com 2.692 casos confirmados levando a grandes perdas econômicas. Estudos têm mostrado que todas as estirpes de PEDV americanas estão estreitamente relacionadas a uma estirpe da China, AH2012 (WANG et al, 2014). No entanto, a identificação PEDV em animais selvagens típicos das Américas, como morcegos *Tadarida brasiliensis*, pode ajudar a compreender a evolução destes agentes em reservatórios animais.

Foram também identificados vários agentes virais que infectam insetos, plantas e fungos, bem como àqueles causadores de diversas patogenias em aves, primatas não humanos, vertebrados em geral. Como muitos desses organismos apresentam sobreposição de nichos ecológicos com os morcegos, estes vírus podem estar evoluindo de uma maneira desconhecida pela ciência.

Na busca por similaridade realizada pelo Metavir 2, destacou-se a identificação de vírus associados a diversas patogenias em humanos. Muitas sequências foram classificadas como pertencentes à família Herpesviridae. Sabe-se que diversos agentes virais desta família causam uma grande variedade de doenças humanas, incluindo vários tipos de câncer. Além disso, uma vez que possuem uma grande capacidade de infectar muitos tipos de células ou tecidos (CHAYAVICHITSILP et al., 2009), os morcegos podem estar servindo como um reservatório para a recombinação e surgimento de novas estirpes capazes de infectar outros animais até mesmo causar infecções humanas.

Também houve a identificação de diversos vírus da Ordem Caudovirales, com maior número de agentes pertencentes à família Siphoviridae. Estes fagos são capazes de infectar diversas espécies de bactérias patogênicas humanas (*Enterobacteria*, *Shigella*, *Mycobacterium*, *Bacillus*), de modo que se trata de uma evidência indireta da presença destas bactérias também nos morcegos. A detecção concomitante de herpes e fagos indica que os morcegos podem servir como agentes importantes na evolução desses agentes virais, uma vez que já foi descrita a existência de recombinação entre eles (WELLER e SAWITZKE, 2014).

Muitos Betaretrovirus, vírus que causam vários tipos de tumores em primatas, ovelhas e ratos, foram detectados. Sano et al. (2015) também identificaram diversos agentes virais das famílias Retroviridae e Herpesviridae em morcegos nas Filipinas. Dacheux e colaboradores (2014) determinaram a diversidade viral de cinco espécies diferentes de morcegos insetívoros franceses (9 espécimes). Todos estes resultados sugerem que os retrovírus e herpesvírus estão amplamente distribuídos em populações de morcegos.

De todos os vírus de RNA identificados, houve prevalência de Picornavírus. Uma vez que muitos membros da família Picornaviridae estão envolvidos em muitas doenças humanas e animais (poliomielite, hepatite A e febre aftosa, por exemplo), a identificação destes agentes virais exerce grande importância econômica e médica. Sasaki et al. (2015), estudando o metaviroma

entérico de musaranhos (*Crocidura* gênero), pequenos mamíferos insetívoros como roedores, também identificaram picornavírus e vários vírus Picorna-like. Em se tratando de enterovírus de potencial citolítico, apresentam grande capacidade de se espalhar, de modo que muito deve ser aprendido sobre seus potenciais reservatórios silvestres.

Cabe ressaltar ainda a detecção de diversas sequências correspondentes a dsRNA vírus. Sabendo-se que muitos membros deste grupo causam gastroenterites em crianças (rotavírus) e que outros são patógenos de importância econômica em bovinos e ovinos, sua identificação em morcegos contribui para o entendimento de sua circulação nos ecossistemas. Outro estudo brasileiro também relatou a presença de rotavírus em fezes de morcegos. As análises filogenéticas indicaram a formação de um clado com sequências de origens bovina e humana, sugerindo a existência de recombinação entre as estirpes em hospedeiros animais, eventos estes que precedem a transmissão para os seres humanos (LUCHS e TIMENETSKY, 2014).

Pelo fato dos estudos epidemiológicos ainda serem conduzidos a partir do surgimento das doenças, ainda se trabalha com surtos e não com prevenção. Assim, torna-se necessário a implementação da medicina da conservação, para que se promova a interação entre as saúdes humana, animal e ambiental e se tenha uma condição sustentável de existência. A partir desta perspectiva, a realização deste estudo contribui para levantamentos epidemiológicos com a adoção de estratégias simples, porém eficazes, para identificar patógenos virais de interesse em saúde pública e animal. Desde que pouco se sabe sobre a presença de coronavírus em morcegos no Brasil, este estudo fornece dados importantes sobre a molecular eco-epidemiologia desses agentes virais.

## 7. Conclusões

A partir dos resultados deste trabalho pode-se concluir que:

- a abordagem metagenômica utilizando tecnologia de sequenciamento de alto desempenho foi sensível, rápida e eficaz para a detecção de agentes virais;
- ambas as plataformas de montagem dos genomas virais, MetaVelvet e Metavir 2, foram sensíveis e complementares;
- diversos agentes virais de importância em saúde animal e humana foram identificados em morcegos da espécie *Tadarida brasiliensis*;
- foram identificados coronavírus de interesse em vigilância sanitária e epidemiológica;
- os Alphacoronavírus não classificados identificados apresentaram forte relacionamento filogenético com PEDV, ARCoV, HCoV-NL63 e BtCov-1B;
- a identificação de coronavírus em morcegos da espécie *Tadarida brasiliensis* contribui para o entendimento de eco-epidemiologia molecular evolutiva.

## 8. Referências Bibliográficas

Anderson, LJ, Tong S. Update on SARS research and other possibly zoonotic coronaviruses. *Int J Antimicrob Agents*. Nov;36 Suppl 1:S21-5, 2010.

Anindita, PD, Sasak,i M, Setiyono, A, Handharyani, E, Orba, Y, Kobayashi, S, Rahmadani, I, Taha, S, Adiani, S, Subangkit, M, Nakamura, I, Sawa, H, Kimura, T. Detection of coronavirus genomes in Moluccan naked-backed fruit bats in Indonesia. *Arch Virol*. Apr; 160 (4): 1113-8. 2015.

Armstrong, K. Brazilian free-tailed bat (*Tadarida brasiliensis*). *Mammalian Species*, 4:1-6, 2008.

Baker, KS, Todd, S, Marsh, GA, Cramer, G, Barr, J, Kamins, AO, Peel, AJ, Yu, M, Hayman, DTS, Nadjm, B, Mtove, G, Amos, B, Reyburn, H, Nyarko, E, Suu-Ire, R, Murcia, PR, Cunningham, AA, Wood, JLN, Wang, L. Novel, Potentially Zoonotic Paramyxoviruses from the African Straw-Colored Fruit Bat *Eidolon helvum*. *J Virol*. Feb; 87 (3): 1348-58. 2013.

Baker, S, Yokomori, K, Dong, S, Carlisle, R, Gorbalenya, A, Koonin, EV. Identification of the catalytic sites of a papain-like cysteine proteinase of murine coronavirus. *J. Virol*. 67 6056-63. 1993.

Balboni, A., Palladini, A., Bogliani, G., Battilani, M. Detection of a virus related to betacoronaviruses in Italian greater horseshoe bats. *Epidemiol. Infect.* 139 (2), 216-219, 2011.

Barquez, R.M, Mares, M.A., Braun, J.K. The bats of Argentina. *Special publications, Museum of Texas Tech University*, 42: 1-275, 1999.

Bernard, E., Tavares, VC, Sampaio, E. Compilação atualizada das espécies de morcegos (Chiroptera) para a Amazônia Brasileira. *Biota Neotropica*, 11(1): 35-46, 2011.

Bochkov, YA, Tosi, G, Massi, P, Drygin, VV. Phylogenetic analysis of partial S1 and N gene sequences of infectious bronchitis virus isolates from Italy revealed genetic diversity and recombination. *Virus Genes* 35(1), 65-71, 2011.

Brandão, PE, Scheffer, K, Villarreal, LY, Achkar, S, Oliveira, RN, FahlW, O, Castilho, JG, Kotait, I, Richtzenhain, LJ. A coronavirus detected in the vampire bat *Desmodus rotundus*. *Braz. J. Infect. Dis.* 12 (6), 466-458, 2008.

Brierley, I, Bournsnel, ME, Binns, MM, Bilimoria, B, Blok, VC, Brown, TD. An efficient ribosomal frame-shifting signal in the polymerase-encoding region of the coronavirus IBV. *EMBO J.* 6 3779–3785. 1987.

Brotman, RM, Shardell, MD, Gajer, P, Tracy, JK, Zenilman, JM, Ravel, J, Gravitt, PE. Interplay between the temporal dynamics of the vaginal microbiota and human papillomavirus detection. *J Infect Dis.* 210 (11): 1723-33. 2014.

Calisher, CH, Childs, JE, Field, HE, Holmes, KV, Schountz, T. Bats: Important Reservoir Hosts of Emerging Viruses. *Clin Microbiol Rev.* Jul; 19 (3): 531-45. 2006.

Cavanagh, D. Coronavirus avian infectious bronchitis virus. *Vet Res* 38(2), 281-97, 2007.

Chayavichitsilp P, Buckwalter JV, Krakowski AC, Friedlander SF. Herpes simplex. *Pediatr Rev* 30 (4): 119–29; 2009.

Chinese SARS Molecular Epidemiology Consortium Molecular evolution of the SARS coronavirus during the course of the SARS epidemic in China. *Science.* 303: 1666–9 10. 2004.

Coleman, CM, Frieman, MB. Coronaviruses: Important Emerging Human Pathogens. *Journal of Virology.* May 88 (10): 5209-12, 2014.

Conrardy, C, Tao, Y, Kuzmin, IV, Niezgodna, M, Agwanda, B, Breiman, RF, Anderson, LJ, Rupprecht, CE, Tong, S. Molecular Detection of Adenoviruses, Rhabdoviruses, and Paramyxoviruses in Bats from Kenya. *Am J Trop Med Hyg.* Aug 6; 91 (2): 258–66. 2014.

Dacheux, L, Cervantes-Gonzalez, M, Guigon, G, Thiberge, JM, Vandenbergert, M, Maufrais, C, Caro, V, Bourhy, H. A preliminary study of viral metagenomics of French bat species in contact with humans: identification of new mammalian viruses. *PLoS One.* Jan;9 (1): e87194. 2014.

De Benedictis, P, Marciano, S, Scaravelli, D, Priori, P, Zecchin, B, Capua, I, Monne, I, Cattoli, G. Alpha and lineage C betaCoV infections in Italian bats. *Virus Genes*. Apr; 48 (2):366-71. 2014.

de Groot, RJ, Baker, SC, Baric, RS, Brown, CS, Drosten, C, Enjuanes, L, Fouchier, RAM, Galiano, M, Gorbalenya, AE, Memish, ZA, Perlman, S, Poon, LLM, Snijder, EJ, Stephens, GM, Woo, PCY, Zaki, AM, Zambon, M, Ziebuhr, J. Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV): Announcement of the Coronavirus Study Group. *Journal of Virology*. Jul 87(14): 7790-2, 2013

Di Fabio, J. Classificação viral x variantes brasileiras. *AveWorld*, 2 (12), 20-5, 2004.

Donaldson, EF, Haskew, AN, Gates, JE, Huynh J, Moore, CJ, Frieman, MB. Metagenomic analysis of the viromes of three North American bat species: viral diversity among different bat species that share a common habitat. *Journal of Virology*. 84 (24), 13004-13018, 2013.

Drexler, JF, Corman, VM, Müller, MA, Maganga, GD, Vallo P, Binger, T, Gloza-Rausch, F, Rasche, A, Yordanov, S, Seebens, A, Oppong, S, Sarkodie, YA, Pongombo, C, Lukashev, AN, Schmidt-Chanasit, J, Stöcker, A, Carneiro, AJ, Erbar, S, Maisner, A, Fronhoffs, F, Buettner, R, Kalko, EK, Kruppa, T, Franke, CR, Kallies, R, Yandoko, ER, Herrler, G, Reusken, C, Hassanin, A, Krüger, DH, Matthee, S, Ulrich, RG, Leroy, EM, Drosten, C. Bats host major mammalian paramyxoviruses. *Nat Commun*. Apr 24;3:796, 2012.

Esbérard, CEL, Luz EM, Chagas, AS. Uso de residências para refúgios por morcegos no Estado do Rio de Janeiro (Mammalia: Chiroptera). *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 21: 17-20, 1999.

Fauquet, CM, Mayo, MA, Maniloff, J, Desselberger, U, Ball, LA. *Virus Taxonomy* ed.VIII. Amsterdam: *Elsevier academic press.*, 937-955, 2005.

Felippe, PA, da Silva, LH, Santos, MM, Spilki, FR, Arns, CW. Genetic diversity of avian infectious bronchitis virus isolated from domestic chicken flocks and coronaviruses from feral pigeons in Brazil between 2003 and 2009. *Avian Dis*. Dec;54(4):1191-6, 2010.

Field, HE. Bats and emerging zoonoses: henipaviruses and SARS. *Zoonoses Public Health*. Aug;56 (6-7): 278-84, 2009.

Fouchier, RA, Hartwig, NG, Bestebroer, TM, Niemeyer, B, de Jong, JC, Simon, JH. A previously undescribed coronavirus associated with respiratory disease in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*;101:6212–6, 2004.

Fung, TS, Liu, DX. Coronavirus infection, ER stress, apoptosis and innate immunity. *Frontiers in Microbiology*, 5, 296. 2014.

Góes, LGB, Ruvalcaba, SG, Campos, AA, Queiroz, LH, Carvalho, C, Jerez, JÁ, Durigon, EL, Dávalos, LII, Dominguez, SR. Novel bats Coronaviruses, Brazil and Mexico. *Emerging Infectious Diseases*. Oct 19 (10): 1711-3, 2013.

Gralinski, LE, Baric, RS. Molecular pathology of emerging coronavirus infections. *J Pathol*, 235: 185-95. 2015.

Hall, RJ, Wang, J, Peacey, M, Moore, NE, McInnes, K, Tompkins, DM. New Alphacoronavirus in *Mystacina tuberculata* Bats, New Zealand. *Emerging Infectious Diseases*, 20 (4), 697–700. 2014.

Halpin, K, Young, P, Field, H, Mackenzie, J. Isolation of Hendra virus from pteropid bats: a natural reservoir of Hendra virus. *J. Gen. Virol.* 81, 1927–1932, 2000.

Han, HJ, Wen, HL, Zhou, CM, Chen, FF, Luo, LM, Liu, JW, Yu, XJ. Bats as reservoirs of severe emerging infectious diseases. *Virus Research*: 205 (2): 1-6. 2015.

Haydon, DT, Cleaveland, S, Taylor, LH, Laurenson, MK. Identifying reservoirs of infection: a conceptual and practical challenge. *Emerging Infectious Diseases*. 8, 1468–1473, 2002.

He, B, Li, Z, Yang, F, Zheng, J, Feng, Y, Guo, H, Li, Y, Wang, Y, Su, N, Zhang, F, Fan, Q, Tu, C. Virome Profiling of Bats from Myanmar by Metagenomic Analysis of Tissue Samples Reveals More Novel Mammalian Viruses. *PLoS ONE*, 8 (4), e61950. 2013.

He, B, Zhang, Y, Xu, L, Yang, W, Yang, F, Feng, Y, Xia, L, Zhou, J, Zhen, W, Feng, Y, Guo, H, Zhang, H, Tu, C. Identification of Diverse Alphacoronaviruses and Genomic Characterization of a Novel Severe Acute Respiratory Syndrome-Like Coronavirus from Bats in China. *Journal of Virology*, 88 (12), 7070-82. 2014.

Herman Tse, Tsang, AKL, Tsoi, WH, Leung, ASP, Ho, CC, Lau, SKP, Woo, PCY, Yuen, KY. Identification of a Novel Bat Papillomavirus by Metagenomics. *Plos One*. Aug 7 (8): 1-9, 2012.

Heymann, DL, Mackenzie, JS, Peiris, M. SARS legacy: outbreak reporting is expected and respected. *Lancet*. Mar 9;381(9869): 779-81. 2013.

Huang YW, Dickerman AW, Piñeyro P, Li L, Fang L, Kiehne R, Opriessnig T, Meng XJ. Origin, evolution, and genotyping of emergent porcine epidemic diarrhea virus strains in the United States. *mBio* 4 (5): 00737-13. 2013.

Huang, IC, Bosch, BJ. Li, F, Li, W, Lee, KH, Ghiran, S. SARS coronavirus, but not human coronavirus NL63, utilizes cathepsin L to infect ACE2-expressing cells. *J. Biol. Chem.* 281 3198-203. 2006.

Ignjatovic, J, Gould, G, Sapats, S. Isolation of a variant infectious bronchitis virus in Australia that further illustrates diversity among emerging strains. *Arch Virol* 151(8), 1567-85, 2006.

Jackwood, MW. The relationship of severe acute respiratory syndrome coronavirus with avian and other coronaviruses. *Avian Dis.* Sep; 50 (3): 315-20, 2006.

Jones, KE, Patel, NG, Levy, MA, Storeygard, A, Balk, D, Gittleman, JL, Daszak, P. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature* 451, 990-993. 2008.

Keesing, F, Belden, LK, Daszak, P, Dobson, A, Harvell, CD, Holt, RD, Hudson, P, Jolles, A, Jones, KE, Mitchell, CE, Myers, SS, Bogich, T, Ostfeld, RS. Impacts of biodiversity on the emergence and transmission of infectious diseases. *Nature* 468, 647–52, 2010.

Kohl, C, Lesnik, R, Brinkmann, A, Ebinger, A, Radonić, A, Nitsche, A, Mühldorfer, K, Wibbelt, G, Kurth, A. Isolation and Characterization of Three Mammalian Orthoreoviruses from European Bats. *PLoS ONE* 7(8): e43106. doi: 10.1371/journal.pone.0043106. 2012.

Koopman, KF. Biogeography of bats of South America. Pp. 273-302. In: Mares M.A. and Genoways H.H. (eds.). *Mammalian biology in South America. Special Publication Series, Pymatuning Laboratory of Ecology, University of Pittsburg*, 6:1-539, 1982.

Koopman, KF. Order Chiroptera. Pp. 137-241. In: *Wilson D.E. and Reeder D.M. (Eds.) Mammal species of the World: a taxonomic and geographic reference. Second Edition. Smithsonian Institution. Washigton, D.C., 1.206 pp, 1993.*

Krijnse-Locker, J, Ericsson, M, Rottier, P, Griffiths, G. Characterization of the budding compartment of mouse hepatitis virus: evidence that transport from the RER to the Golgi complex requires only one vesicular transport step. *J. Cell Biol.* 124 55–70. 1994.

Kunz, T H, Whitaker Jr, JO, Wadanoli, MD. Dietary energetics of the insectivorous Mexican free-tailed bat (*Tadarida brasiliensis*) during pregnancy and lactation. *Oecologia*, 101: 407-415, 1995.

Lee, AY, Akileswaran, L, Tibbetts, MD, Garg, SJ, Van Gelder, RN. Identification of torque teno virus in culture-negative endophthalmitis by representational deep DNA sequencing. *Ophthalmology*. Mar; 122 (3):524-30. 2015.

Lelli, D, Papetti, A, Sabelli, C, Rosti, E, Moreno, A, Boniotti, MB. Detection of Coronaviruses in Bats of Various Species in Italy. *Viruses*, 5 (11), 2679-89. 2013.

Liu D., Inglis S. Association of the infectious bronchitis virus 3c protein with the virion envelope. *Virology* 185 911-7. 1991.

Lu, Y, Lu, X, Denison, MR. Identification and characterization of a serine-like proteinase of the murine coronavirus MHV-A59. *J. Virol.* 69 3554-9. 1995.

Luchs, A, Timenetsky, Mdo C. G8P[6] rotaviruses isolated from Amerindian children in Mato Grosso do Sul, Brazil, during 2009: close relationship of

the G and P genes with those of bovine and bat strains. *J Gen Virol.* Mar; 95(Pt 3):627-41. 2014.

Luis, AD, Hayman, DT, O'Shea, TJ, Cryan, PM, Gilbert, AT, Pulliam, JR, Mills, JN, Timonin, ME, Willis, CK, Cunningham, AA, Fooks, AR, Rupprecht CE, Wood, JL, Webb, CT. A comparison of bats and rodents as reservoirs of zoonotic viruses: are bats special? *Proc Biol Sci.* Feb 1; 280 (1756): 201227-53, 2013.

Machain-Williams, C., López-Urbe, M., Talavera-Aguilar, L., Carrillo-Navarrete, J., Vera-Escalante, L., Puerto-Manzano, F., ... Loroño-Pino, M. A. (2013). Serologic Evidence of Flavivirus Infection in Bats in the Yucatan Peninsula of Mexico. *Journal of Wildlife Diseases*, 49 (3), 1-8. 2013.

Mackenzie, JS, Jeggo, M. Reservoirs and vectors of emerging viruses. *Curr Opin Virol.*, Apr; 3 (2): 170-9. 2013.

Masters, PS. The molecular biology of coronaviruses. *Adv. Virus Res.* 66 193-292. 2006.

Moratelli, R, Calisher, CH. Bats and zoonotic viruses: can we confidently link bats with emerging deadly viruses? *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, Vol. 110 (1): 1-22, February, 2015.

Moreira-Soto, A, Taylor-Castillo, L, Vargas-Vargas, N, Rodríguez-Herrera, B, Jiménez, C, Corrales-Aguilar, E. Neotropical Bats from Costa Rica harbour Diverse Coronaviruses. *Zoonoses Public Health.* Feb 4. 2015.

Nabte, MJ, Andrade, A, Monjeu, A, Hernandez, JL, Vaquero, D, Saba SL. *Mammalia, Chiroptera, Molossidae, Tadarida brasiliensis* I. Geoffroy, 1824: Distribution extension. *Check List* 7:142-143, 2011.

Namiki, T, Hachiya, T, Tanaka, H, Sakakibara, Y. MetaVelvet: an extension of Velvet assembler to de novo metagenome assembly from short sequence reads. *Nucleic Acids Research*, 40(20), e155. 2012.

Olival, KJ and Hayman, DTS. Filoviruses in Bats: Current Knowledge and Future Directions. *Viruses.* Apr; 6 (4): 1759-88. 2014.

Qiu, Z, Hingley, ST, Simmons, G, Yu, C, Sarma, JD, Bates, P. Endosomal proteolysis by cathepsins is necessary for murine coronavirus mouse hepatitis virus type 2 spike-mediated entry. *J. Virol.* 80 5768-76. 2006.

Quan, PL, Firth, C, Street, C, Henriquez, JA, Petrosov, A, Tashmukhamedova, A, Hutchison, SK, Egholm, M, Osinubi, MO, Niezgodna, M, Ogunkoya, AB, Briese, T, Rupprecht, CE, Lipkin, WI. Identification of a severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in a leaf-nosed bat in Nigeria. *MBio.* 1 (4), 208-210, 2010.

Reusken, CB, Lina, PH, Pielaat, A, De Vries, A, Damdeisz, C, Adema, J, Drexler, JF, Drosten, C, Kooi, EA. Circulation of group 2 coronaviruses in a bat species common to urban areas in Western Europe. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 10 (8), 785-791, 2010.

Sano, K, Okazaki, S, Taniguchi, S, Masangkay, JS, Puentespina, RJr, Eres, E, Cosico, E, Quibod, N, Kondo, T, Shimoda, H, Hatta, Y, Mitomo, S, Oba, M, Katayama, Y, Sassa Y, Furuya, T, Nagai M, Une, Y, Maeda, K, Kyuwa, S, Yoshikawa, Y, Akashi, H, Omatsu, T, Mizutani, T. Detection of a novel herpesvirus from bats in the Philippines. *Virus Genes.* Aug; 51(1):136-9. 2015.

Sasaki, M, Orba, Y, Ueno, K, Ishii, A, Moonga, L, Hang'ombe, BM, Mweene, AS, Ito, K, Sawa, H. Metagenomic analysis of the shrew enteric virome reveals novel viruses related to human stool-associated viruses. *J Gen Virol.* Feb; 96 (Pt 2):440-52. 2015.

Sawicki, SG, Sawicki, DL, Siddell, SG. A contemporary view of coronavirus transcription. *J. Virol.* 81 20-9. 2007.

Schäfer, A, Baric, RS, Ferris, MT. Systems approaches to coronavirus pathogenesis. Schäfer, A., Baric, R. S., & Ferris, M. T. (2014). Systems approaches to coronavirus pathogenesis. *Current Opinion in Virology*, 0, 61–69. 2014.

Simas, PVM, Barnabé, ACS, Durães-Carvalho, R, Lima-Neto, DF, Caserta, LC, Artacho, L, Jacomassa, FAF, Martini, MC, Santos, MMAB, Felipe, PAN, Ferreira, HL, Arns, CW. Coronavirus in Bats shows Relationship to

Appalachian Ridge and Porcine Epidemic Diarrhea Viruses, Brazil. *Emerging Infectious Diseases (in press)*, 2015.

Simmons, NB. Order Chiroptera. In: Wilson, DE.; Reeder, DM. (Eds.).

**Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference. 3. ed.** Baltimore: Johns Hopkins University Press, 2005. v. 1, p. 312-529.

Smith, I, Wang, LF. Bats and their virome: an important source of emerging viruses capable of infecting humans. *Curr Opin Virol.* Feb; 3 (1): 84-91. 2013.

Song D, Park B. Porcine epidemic diarrhea virus: a comprehensive review of molecular epidemiology, diagnosis, and vaccines. *Virus Genes.* 44: 167-75. 2012.

Sonntag, M, Mühldorfer, K, Speck, S, Wibbelt, G, Kurth, A. New Adenovirus in Bats, Germany. *Emerg Infect Dis.* Dec; 15 (12): 2052-5. 2009.

Sotomayor-Bonilla, J., Chaves, A., Rico-Chávez, O., Rostal, M. K., Ojeda-Flores, R., Salas-Rojas, M., Suzán, G. Dengue Virus in Bats from Southeastern Mexico. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 91 (1), 129-31. 2014.

Stevenson, GW, Hoang, H, Schwartz, KJ, Burrough, ER, Sun, D, Madson, D, Cooper, VL, Pillatzki, A, Gauger, P, Schmitt, BJ, Koster, LG, Killian, ML, Yoon, KJ. *J Vet Diagn Invest.* Sep; 25 (5): 649-54. 2013.

Sturman LS, Holmes K, Behnke, J. Isolation of coronavirus envelope glycoproteins and interaction with the viral nucleocapsid. *J. Virol.* 33 449-62. 1980.

Suzuki, J., Sato, R., Kobayashi, T., AOI, T., Harasawa, R. Group B Betacoronavirus in Rhinolophid Bats, Japan. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 76 (9), 1267-9. 2014.

Tamura, K, Stecher, G, Peterson, D, Filipski, A, Kumar, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729, 2013.

Tan W, Xie Z. Research progress in a novel H17N10 subtype of bat influenza A virus. *Bing Du Xue Bao.* Jan, 31 (1): 80-4. 2015.

The Korean Society of Infectious Diseases, & Korean Society for Healthcare-associated Infection Control and Prevention. An Unexpected Outbreak of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Infection in the Republic of Korea, 2015. *Infection & Chemotherapy*, 47 (2), 120-2. 2015.

Thomas, T, Gilbert, J, Meyer, F. Metagenomics - a guide from sampling to data analysis. *Microbial Informatics and Experimentation*. 2: 3, 2012.

Tong, S, Li, Y, Rivaller, P, Conrardy, C, Castillo, DAA, Chen, LM, Recuenco, S, Ellison, JÁ, Davis, CT, York, IA, Turmelle, AS, Moran, D, Rogers, S, Shi, M, Tao, Y, Weil, MR, Tang, K, Rowe, LA, Sammons, S, Xu, X, Frace, M, Lindblade, KA, Cox, NJ, Anderson, LJ, Rupprecht, CE, Donis, RO. A distinct lineage of influenza A virus from bats. *PNAS*. 109 (11): 4269-74. 2012.

Tong, S, Zhu, X, Li, Y, Shi, M, Zhang, J, Bourgeois, M., Yang, H, Chen, X, Recuenco, S, Gomez, J, Chen, LM, Johnson, A, Tao, Y, Dreyfus, C, Yu, W, McBride, R, Carney, PJ, Gilbert, AT, Chang, J, Guo, Z, Davis, CT, Paulson, JC, Stevens, J, Rupprecht, CE, Holmes, EC, Wilson, IA, Donis, RO. (2013). New World Bats Harbor Diverse Influenza A Viruses. *PLoS Pathogens*, 9(10): 1-12. 2013.

Van der Hoek, L, Pyrc, K, Jebbink, MF, Vermeulen-Oost, W, Berkhout, RJ, Wolthers, KC. Identification of a new human coronavirus. *Nat Med*;10:368–73, 2004.

Vijgen, L, Moës, E, Keyaerts, E, Li, S, Van Ranst, M. A pancoronavirus RT-PCR assay for detection of all known coronaviruses. *Methods Mol Biol*.454: 3-12. 2008.

Wacharapluesadee, S, Duengkae, P, Rodpan, A, Kaewpom, T, Maneeorn, P, Kanchanasaka, B, Yingsakmongkon, S, Sittidetboripat, N, Chareesaen, C, Khlangsap, N, Pidthong, A, Leadprathom, K, Ghai, S, Epstein, JH, Daszak, P, Olival, KJ, Blair, PJ, Callahan, MV, Hemachudha, T. Diversity of coronavirus in bats from Eastern Thailand. *Virology Journal*, 12, 57. 2015.

Wang, L, Byrum, B, Zhang, Y. New Variant of Porcine Epidemic Diarrhea Virus, United States, 2014. *Emerging Infectious Diseases*, 20(5), 917-9. 2014.

Weller SK, Sawitzke JA. Recombination promoted by DNA viruses: phage  $\lambda$  to herpes simplex virus. *Annu Rev Microbiol*, 68:237-58. 2014.

Whitaker Jr, JO, Rodríguez-Duran, A. Seasonal variation in the diet of the Mexican free-tailed bats, *Tadarida brasiliensis antillarum* (Miller) from a colony in Puerto Rico. *Caribbean Journal of Science*, 35 (1-2): 23-28, 1999.

Wibbelt, G, Moore, MS, Schountz, T, Voigt, CC. Emerging diseases in Chiroptera: why bats? *Biol. Lett.* 6, 438–440, 2010.

Wilkins, KT. *Tadarida brasiliensis*. *Mammalian Species*, 331:1-10, 1989.

Wong, S, Lau, S, Woo, P, Yuen, KY. Bats as a continuing source of emerging infections in humans. *Rev Med Virol* 17: 67-91, 2007.

Woo, PC, Lau, SK, Chu, CM, Chan, KH, Tsoi, HW, Huang, Y. Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia. *J Virol*; 79:884–95, 2005.

Woo, PC, Lau, SK, Huang, Y, Yuen, KY. Coronavirus diversity, phylogeny and interspecies jumping. *Exp Biol Med (Maywood)*. Oct; 234 (10): 1117-27, 2009.

Woo, PC, Lau, SK, Li, KS, Poon, RW, Wong, BH, Tsoi, HW, Yip, BC, Huang, Y, Chan, KH, Yuen, KY. Molecular diversity of coronaviruses in bats. *Virology* 351:180–187, 2006.

Wood, JLN, Leach, M, Waldman, L, MacGregor, H, Fooks, AR, Jones, KE, Restif, O, Dechmann, D, Hayman, DTS, Baker, KS, Peel, AJ, Kamins, AO, Fahr, J, Baidu, YN, Suu-Ire, R, Breiman, RF, Epstein, JH, Field, HE, Cunningham, AA. A framework for the study of zoonotic disease emergence and its drivers: spillover of bat pathogens as a case study. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 367, 2881-92. 2012.

Wood-Charlson, EM, Weynberg, KD, Suttle, CA, Roux S, van Oppen, MJ. Metagenomic characterization of viral communities in corals: mining biological signal from methodological noise. *Environ Microbiol.* Feb. 2015.

World Health Organization. Ebola Virus Disease. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs103/en/>. Acesso em 21 de julho de 2015, às 18h17.

Yamada, Y, Liu, XB, Fang, SG, Tay, FP, Liu, DX. Acquisition of cell–cell fusion activity by amino acid substitutions in spike protein determines the infectivity of

a coronavirus in cultured cells. PLoS ONE 4:e6130 10.1371/journal.pone.0006130. 2009.

Young, PL, Halpin, K, Selleck, PW, Field, H, Gravel, JL, Kelly, MA, Mackenzie, JS. Serologic evidence for the presence in Pteropus bats of a paramyxovirus related to equine morbillivirus. *Emerging Infectious Diseases* 2, 239–240, 1996.

Zortéa, M, Taddey, VA. Taxonomic status of Tadarida espiritosantensis Ruschi, 1951 (Chiroptera: Molossidae). *Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão*, (N. Sér.), 2: 15-21, 1995.

## 9. Apêndices

### 9.1. Apêndice 1: Diversity of viruses in bats from the urban area of Campinas-SP Brazil using metagenomic analyses

Daniel Ferreira de Lima Neto<sup>1\*</sup>, Paulo Vitor Marques Simas<sup>1\*</sup>, Ana Caroline de Souza Barnabé<sup>1\*</sup>, Matheus Cavalheiro Martini<sup>1</sup>, Márcia Mercês Aparecida Bianchi dos Santos<sup>1</sup>, Fabio André Facco Jacomassa<sup>2</sup>, Leonardo Caserta<sup>1</sup>, Paulo Anselmo Nunes Felipe<sup>1</sup>, Helena Lage Ferreira<sup>4</sup>, Felipe Ferraz<sup>3</sup>, Paulo Oliveira<sup>3</sup>, Clarice Weis Arns<sup>1</sup>.

1 – State University of Campinas, Biology Institute, Department for Genetics, Evolution and Bioagents, Animal Virology Laboratory. Campinas – Sao Paulo/Brazil.

2 – Sao Paulo State University, Biology Institute, Department for Zoology. Rio Claro – Sao Paulo/Brazil.

3 – National Laboratory for Biosciences, Computational Biology Laboratory, National Research Center for Energy and Materials – CNPEM. Campinas – Sao Paulo/Brazil.

4 – State University of Sao Paulo, Faculty of Animal Science and Food Engineering, Pirassununga – Sao Paulo/Brazil.

\* These authors contributed equally to this article.

## ABSTRACT

*Tadarida brasiliensis* is a bats' typical species of the Americas adapted to urban areas, enabling contact and spread of several viral agents. Since bats have been reported as reservoirs for a wide viruses range, it's necessary to conduct epidemiological studies focusing on these animals. The goal of this study was to perform viral metagenomics (metavirome) in *T. brasiliensis* bats. We used 10 anal and 10 tracheal swabs 10 of *T. brasiliensis* bats' specimens collected in 2011 Jequitibás Wood, Campinas, São Paulo, Brazil. Samples were subjected to Next Gen-Sequencing (NGS) using the Illumina platform HiSeq 2500, yielding 345 409 110 reads paired ends of which 76.47% had  $Q \geq 30$ . Contigs and scaffolds assembly was performed with Metavir 2. BLAST similarity search was conducted from different specific databases for viral sequences, there was 827 matches, of which 6 with Alphacoronavirus unclassified. About 85% of sequences showed similarity to dsDNA virus no RNA stage while 15% were divided in ssRNA virus (5%), Orthoretrovirinae (4%), dsRNA viruses (2%), Unclassified phage (2%), ssDNA virus (0.8%) and 0.2% of the sequences showed similarity to Muska hytrovirus. We identify viral sequences

of importance in human and veterinary medicine. Thus, we conclude that metagenomic approach performed with NGS represents a powerful methodology for epidemiological studies. Considering the zoonotic impact of many viruses, our results contribute greatly to a better understanding of the molecular eco-epidemiology in their evolution.

## **INTRODUCTION**

Diseases continue to emerge, despite the most comprehensive efforts made by health authorities. According to the reports most of the identified causes of these infections are zoonotic in origin 1. Infections originated by RNA viruses are now recognized as major human health threats, particularly in developing countries. The significance of species that act as reservoirs of such emerging infectious diseases have been, similarly, understood 2. Reports describing new viruses in bats are published on regular basis, even though most of them are still in need of further characterization to better understand the roles played by each one, regarding public health and veterinary contexts 3–5.

One strategy to access and map the outbreaks of emerging or re-emerging viral diseases in order to detect the transmission of viruses from wildlife is through the monitoring of which viruses are currently being held by its natural hosts and vector animals 6. Such a goal can now be achieved by next generation sequencing (NGS), this technology can provide the investigators with detailed information of the viruses within a given sample, their diversity and the distribution of their populations therein 7.

Infectious diseases of humans are caused by interactions with a plethora of wild and domesticated animals, it has been suggested that over 60% of emerging diseases came from wildlife animals alone. Our main objective was to identify the most common pathogens present in animals that maintain close contact with humans on regular basis.

## **MATERIALS AND METHODS**

**Sample information:** Samples were collected in sterile swabs and promptly stored in RNA later® for processing. Data collection was conducted at the Jequitibás Wood, in Campinas, São Paulo State, Brazil (22°54'31.34"S 47°02'58.01"W). The entire collection procedure was carried out with prior authorization from environmental

agencies and performed by veterinarian Paulo Anselmo Nunes Felipe, professional registered in Authorization and Biodiversity Information System. Mist nets were used (9x3m about 0.5m of soil) to capture willing bats coming under the colony. We reviewed every 20 minutes to prevent the animal was injured or killed.

They were collected 20 swabs (10 oral and 10 rectal swabs) from 10 specimens of the species *Tadarida brasiliensis* bats. The swabs were transported at low temperature to the Animal Virology Laboratory, Department of Genetics, Evolution and Bioagents, Biology Institute, Unicamp and stored in MEM at -80°C.

**Samples treatment:** To carry out the experimental procedure for NGS through metagenomic, samples were subjected to filtration and treatment with DNase and proteinase k. **Filtration:** Samples were homogenized and resuspended in 500µL of MEM medium (Invitrogen, USA). All steps were carried out at low temperatures. Supernatants were filtered through a membrane 0,45µm. The filtered solution was centrifuged at 1500g during 20 minutes at 4°C. **DNase I treatment:** The reaction was performed with sample (1/2 v/v), buffer solution A (25% Glycerol, 100mM Tris-HCl pH 7.5, 25mM CaCl<sub>2</sub> and 5mM MgCl<sub>2</sub>) and DNase I (Invitrogen, USA) (520U). After homogenization, the reaction was incubated at 37°C during one hour. **Proteinase K treatment:** Proteinase K (Invitrogen, USA) reaction was performed with sample (1/2 v/v), buffer A (25% Glycerol, 100mM Tris-HCl pH 7.5, 25mM CaCl<sub>2</sub> and 5mM MgCl<sub>2</sub>), Proteinase K (solution) RNA Grade (Invitrogen, USA) (0.08mg/µl). The reaction was homogenized and incubated at 55°C during one hour. After incubation, the reaction was subjected to heat shock at 70°C during one minute.

**Viral RNA Extraction:** After completion treatment, the viral RNA was extracted using QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, USA) according to manufacturer's instructions. Samples quantification was performed with Qubit® Fluorometric Quantitation (Life Technologies). It was carried out equimolar pool (50µl per sample) containing the 20 samples from RNAs already eluted. This pool was subjected to the same RNA extraction procedure with QIAamp Viral RNA Mini Kit, following the manufacturer's instructions.

**Library, sequencing, assembly and annotation of viral genomes:** Samples were sent to the High Performance Technology Center Laboratory - LaCTAD (Unicamp) for RNA-Seq sequencing procedure HiSeq 2500 Sequencing System - Illumina. RNA library was prepared according to manufacturer's instructions (Illumina) and sequenced using paired-end technology (Illumina). Reads were trimmed and quality

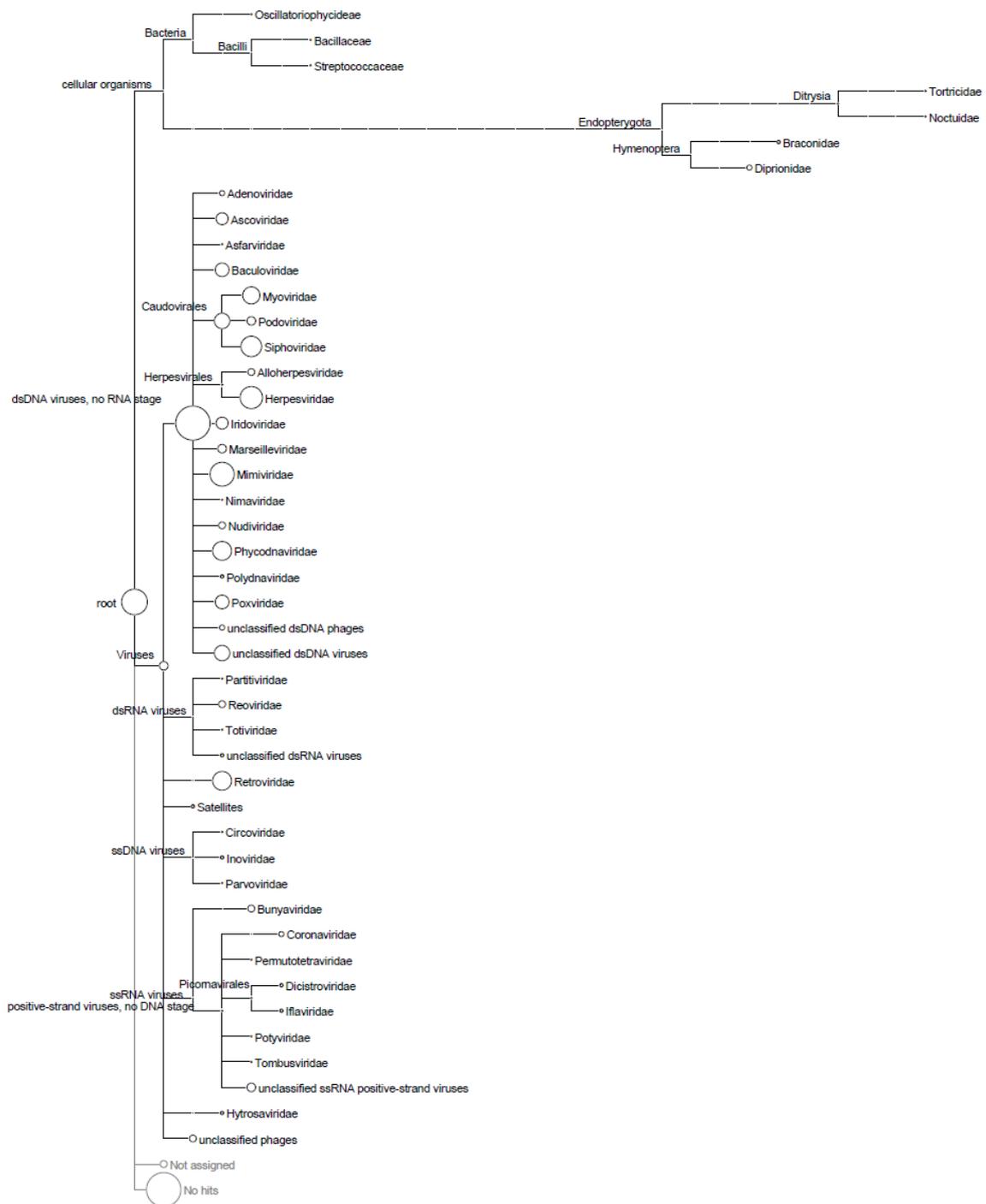
filtered with FASTX quality trimmer, assembly was made using Velvet and in parallel with SPAdes, present in UGene software package 9, scaffolds were annotated using tBlastx against the nr database locally. The virus reference database (NCBI) to cluster the scaffolds was used to generate frequencies and hierarchy. Taxonomic data and frequencies were parsed and visualized with Krona in Firefox. It was held the assembly procedure again the RNA library Metavir 2 server 11 (<http://metavir-meb.univ-bpclermont.fr/>), a projected server to annotate viral metagenomic sequences (from the assembled reads or contigs).

## RESULTS

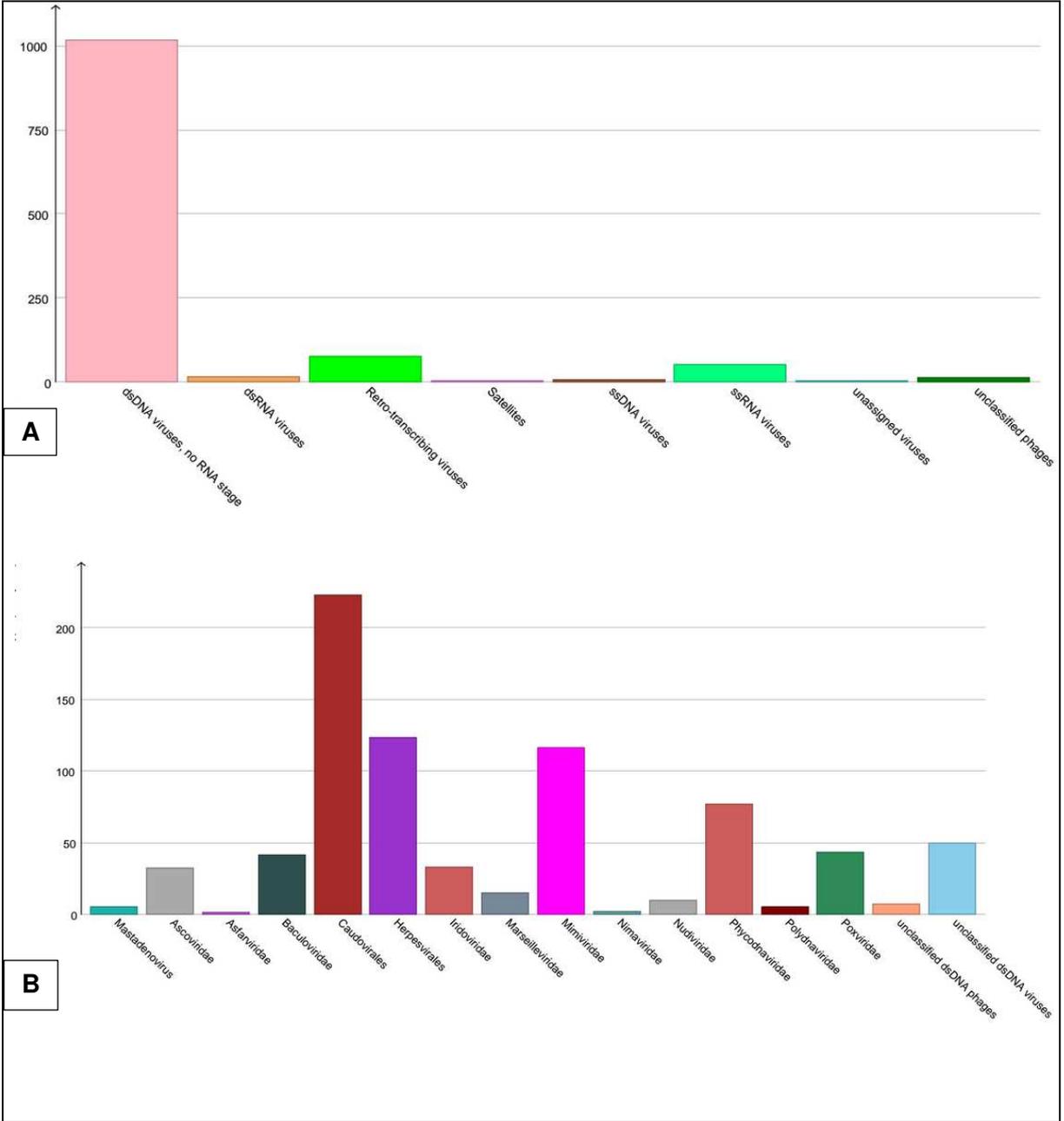
Using the online server Metavir 2 11, we identify 827 matches our sequences with viral genomes, of which 44 to RNA viruses and unclassified 6 Alphacoronavirus (figure 1). About 85% of all matches clustered with dsDNA viruses no RNA stage, the remaining was divided amongst ssRNA (no DNA stage - 5%), orthoretrovirinae (4%), dsRNA viruses (2%), unclassified phages (2%), ssDNA viruses (0.8%) and 0.2% of the sequences clustered with the *Muska hytrovirus*, related to the *Musca domestica* salivary gland hypertrophy virus (A, figure 2).

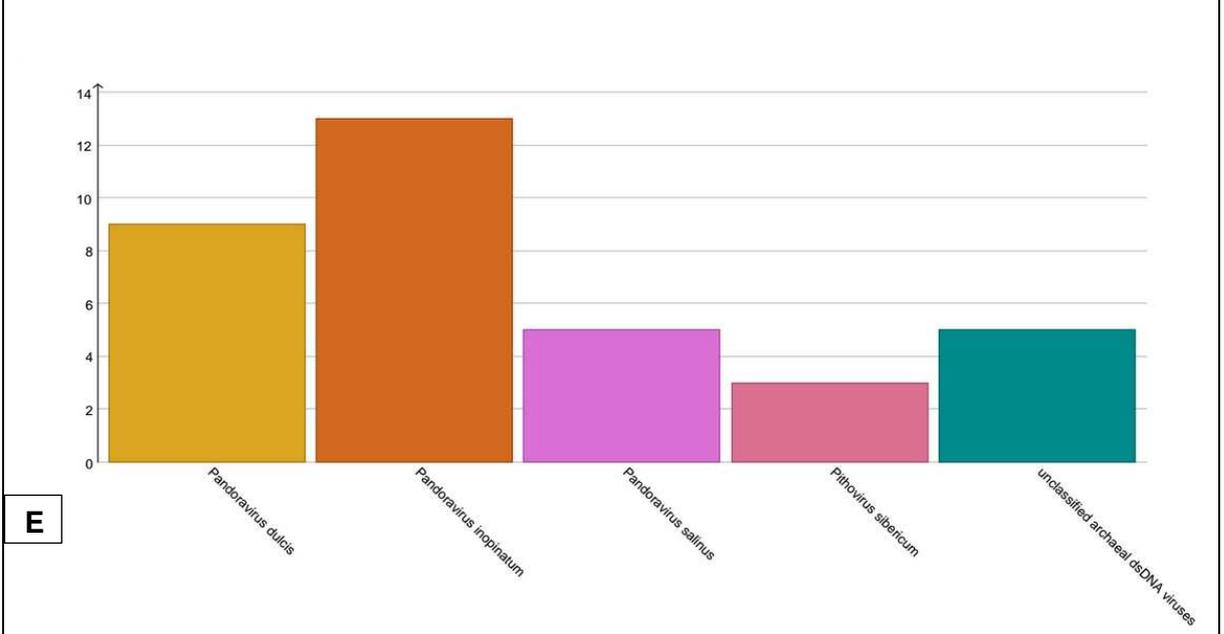
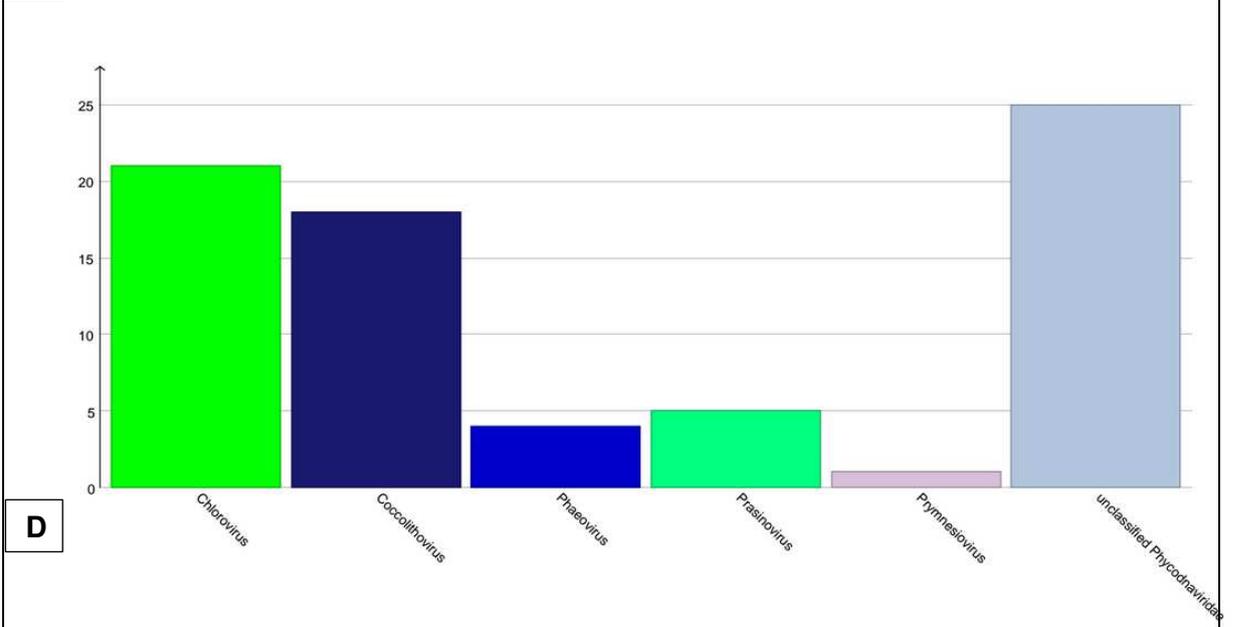
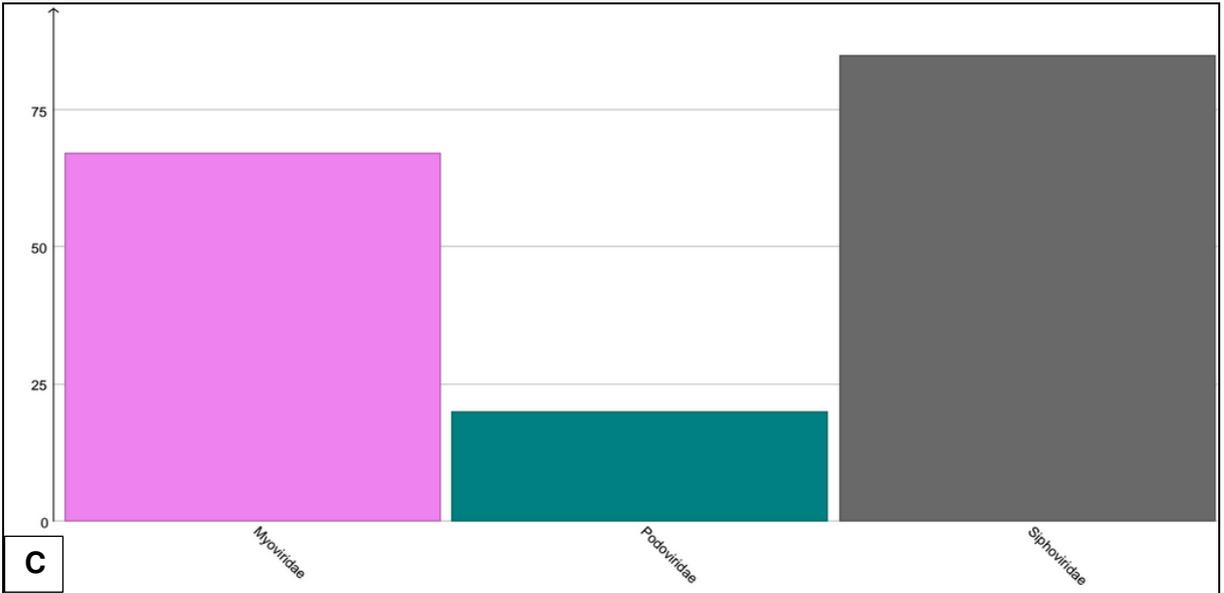
Among the dsDNA viruses (B, figure 2), there was prevalence of similarity with viruses belonging to Caudovirales and Herpesvirales orders, Mimivirus, Phycodnavirus and Poxvirus. Within the Caudovirales (C, figure 2), was identified similarity with members of Siphoviridae. Also found similarities with all genus of Phycodnaviridae family (large viruses - 100-560kb - that infect eukaryotic algae marine or freshwater - D, figure 2) and giant virus that infects amoebas (Pandoravirus dulcis, Pandoravirus inopinatum, Pandoravirus salinum , Pithovirus sibericum); further, a small number of sequences were similar to those obtained dsDNA unclassified viruses that infect archaea (E, figure 2).

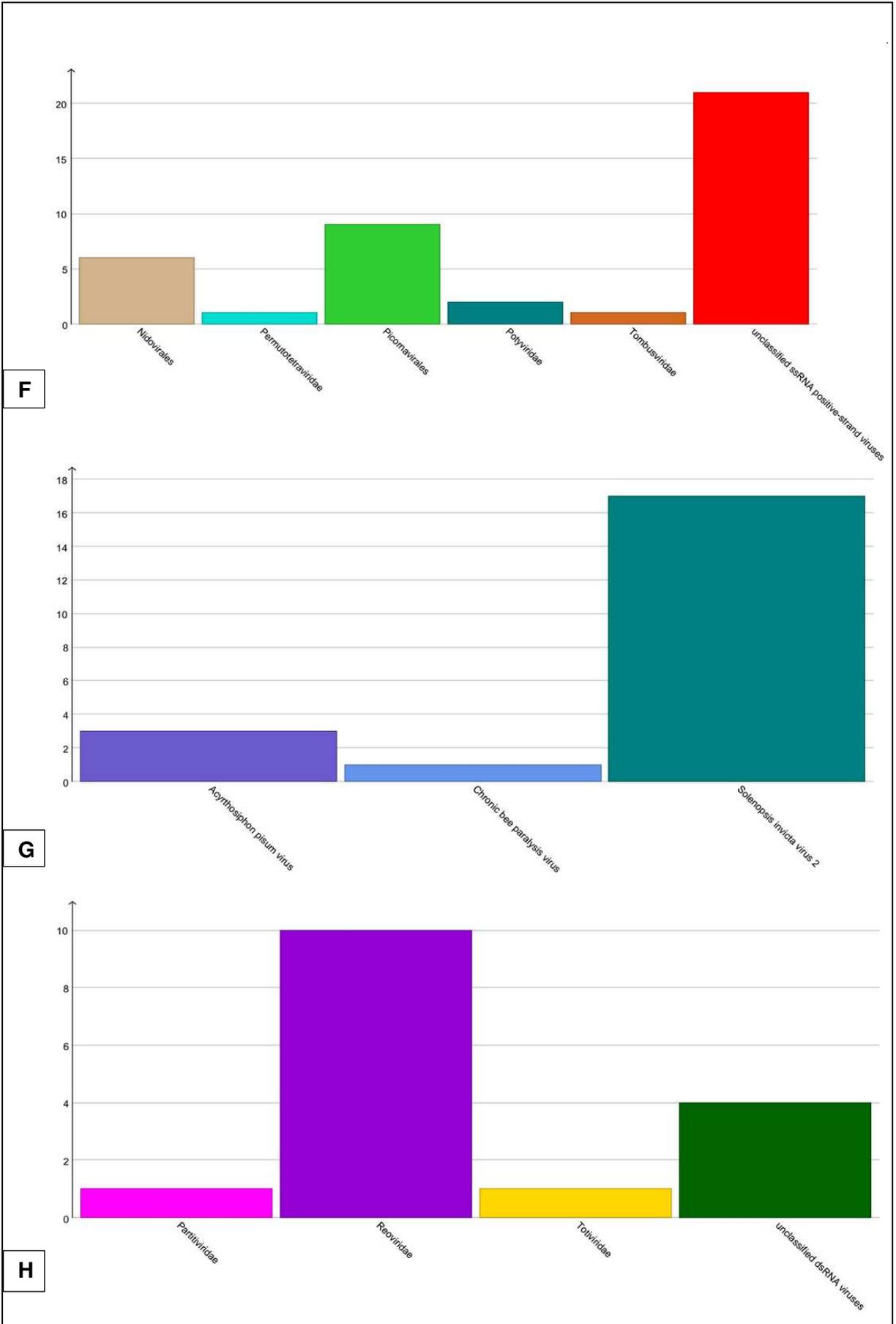
Of all the RNA viruses identified, there was obtained similarity Picornavirus, Alphacoronavirus, Tombusvirus Mitovirus and unclassified (F and G, figure 2). The subfamily Orthoretrovirinae was represented by Betaretrovirus Mason-Pfizer Monkey Virus, Mouse Mammary Tumor Virus, Squirrel Monkey retrovirus, unclassified: Simian retrovirus and enzootic nasal tumor virus. A small number of reads was similar to known dsRNA viruses belonging Partitiviridae, Reoviridae, Totiviridae families well as unclassified virus (H, figure 2).



**Figure 1:** Distribution by families of viral diversity identified through metagenomics obtained by next generation sequencing in *Tadarida brasiliensis*. The circles shown at the end of each branch represents the sequences proportion per viral family.







**Figure 2:** Viral diversity identified in oral and anal swabs of *Tadarida brasiliensis* bats based on similarity analysis conducted by Metavir 2. The vertical axis represents the reads number and the colored bars, the taxa. A. Distribution of viral diversity identified in accordance Baltimore classification. B. dsDNA viruses, no RNA stage. C. Caudovirales Order. D. Phycodnaviridae Family. E. Giant viruses that infect amoeba (*Pandoravirus dulcis*, *Pandoravirus inopinatum*, *Pandoravirus salinum*, *Pithovirus sibericum*) and dsDNA viruses that infect archaea unclassified. F. ssRNA viruses. H. dsRNA viruses.

## DISCUSSION

The most commonly used virology techniques still rely on the detection of individual genomes in a given sample. However, when you do not have information about the viral agents present in the sample, seek such information by classical methods can be time consuming, not meeting the needs of epidemiological surveillance services. Isolating the pathogen used as gold standard can hinder the process as a whole, especially since most of these organisms are unable to grow in cell culture, either due to a lack of susceptible cell lines either by low viral titers in the samples.

Even though the public awareness of zoonosis has increased, the full range of pathogens transmissible by those agents remains poorly understood. Bats are also known to be major reservoirs of viruses, and being the only flying mammal with highly diverse members. The viral populations that inhabits them are quite distinct 5. Altogether, these animals are ideal vectors of emerging and re-emerging viruses including viral encephalitis by Nipah virus, Lyssavirus, Hendra virus and hemorrhagic fever as Ebola virus and Marburg virus 10. A more detailed description of the Brazilian bat virome is not available and the infection dynamics of pathogens in wild bat populations remains poorly understood.

Bat virome is now being thoroughly investigated. Several reports have suggested an extensive viral diversity within these hosts 5,10. Increasing urbanization and the destruction of their natural habitat prompted wild animal communities into the inner region of cities. The proximity to human communities allows the introduction of various viral pathogens as lyssavirus, Ebola, Marbug, Japanese encephalitis virus among others. However, the importance of bats in the transmission and perpetuation of bacterial infections is poorly studied.

Our work identified through an unusual but revolutionary technology - viral metagenomics obtained by next generation sequencing - different viral agents in a typical bat specie from Brazil and the Americas. We identified Siphoviridae family, phages which have genome of 50 kb comprising 70 genes and infect several bacteria species that are pathogenic to humans (*Enterobacteria*, *Shigella*, *Mycobacterium*, *Bacillus*, among others).

Another important discover was the presence of many sequences belonging to Herpesviridae. It is known that viral agents of this family are important causes of a wide variety of human pathogens, including various types of cancer. Further, since they have a great capacity to infect many cell types or tissues 15, bats may be serving as a reservoir for recombination and emergence of new strains capable of infecting other animals even cause human infections. Recombination between herpesvirus and phagos (Caudovirales) has already been described 16. Thus, the concomitant detection phage and herpesvirus also indicates that bats can serve as environment for recombination between them.

Betaretrovirus also were found by us. These viruses are causing various types of tumors in primates, sheep and mice. Sano et al. 17 (2015) found different viral genes belonging to the Retroviridae and Herpesviridae families from bats in the Philippines. Dacheux and colleagues (2014) 18 determined the viral diversity of five different species of French insectivorous bats (9 specimens) and also found these and others viral agents. All these results seem to indicate that retroviruses as well herpesvirus are widely distributed in bat populations.

Many RNA viruses are highly pathogenic and exhibit a broad cell tropism, being able to infect a wide variety of host cells and (HEV NIV, EBOV, SARS coronavirus). Viruses such as HEV, lyssavirus VIN and show high conservation within the genome of their host bats, suggesting that they are under strong selective constraints 5. From all the RNA viruses identified by our work, there was obtained similarity Picornavirus, Alphacoronavirus, Tombusvirus Mitovirus and unclassified.

Since many members of Picornaviridae family are involved in many human and animal diseases (polio, hepatitis A and mouth disease, for example), the identification of these viral agents have strong economic and medical relevance. Sasaki et al. (2015) 19, studying the enteric metaviroma of shrews (*Crocidura* genus), small insectivorous mammals like rodents, also picornavirus and several picorna-like

viruses. Because it is enteroviruses that have cytolytic potential, poliovirus have great ability to spread and it must be learned about their wild reservoirs.

We also detected the presence of dsRNA viruses. Knowing that many members of this group are causing gastroenteritis in children (rotavirus) and also pathogens of economic importance in cattle and sheep identification in bats contribute to the understanding of its circulation in ecosystems. Another Brazilian study from samples of bat droppings also identified rotavirus and phylogenetic analyzes indicated shares a clade with bovine sequences and human strains, suggesting the existence of recombination between strains in animal hosts foregoing transmission to humans 20. Our work identified Alphacoronavirus unclassified in the annotation by metagenomic analysis. The subsequent validation by conventional RT-PCR find one sample containing genetic material from PEDV 8. Once it has caused a major epidemic in the USA in 2013 (Wang et al., 2014), the PEDV identification in typical wild animals of the Americas, as *Tadarida brasiliensis* bats, can help to understand the evolution of these agents in animal reservoirs.

Many studies have indicated that coronaviruses, agents capable of causing disease in birds, mammals and human beings have first appeared in bats. In humans, they are usually associated with episodes of common cold. However, since the occurrence of SARS-CoV (coronavirus that causes Severe Acute Respiratory Syndrome) in 2003, it has increased scientific interest in the molecular evolution of these viral agents in bats. It had already been reported that insectivorous bats can be original carriers of the SARS virus. Approximately 10 years after the emergence of SARS, another highly pathogenic coronavirus was identified in the Middle East - MERS-CoV (Middle East Respiratory Syndrome). Thus, understanding the molecular evolution of these agents as control strategy and prevention of epidemics caused by highly pathogenic agents is needed, such as SARS and MERS-CoV.

Epidemiological studies still care about the disease only from the moment it emerges. This approach will certainly not be enough to meet the new demands of infectious diseases. Therefore, conservation medicine, science that seeks to promote environmental health through the interaction between human health, animal and environmental, comes up with the proposal that all health is thought together so that it has a sustainable condition of existence.

From this perspective, it is essential to conduct epidemiological studies on a large scale in key animals like bats. For this, the use of NextGen Sequencing by

metagenomas approach - genetic material recovered directly from environmental samples - is able to reveal the previously hidden microbial diversity. Thus, this work aims to contribute in facilitating epidemiological studies through the adoption of simple strategies, but effective, to identify viral pathogens of interest in animal and public health. Since little is known about the presence of coronavirus in bats from Brazil, this study provides important data on the molecular eco-epidemiology of these viral agents.

## **CONCLUSIONS**

In search of a quick and effective alternative for epidemiological surveillance in healthy *Tadarida brasiliensis* bats, a typical specie of Brazil and the Americas, we can identify many viral agents through NGS by metagenomic analysis.

## **FINANCIAL SUPPORT**

This work was supported by FAPESP (grant 2011/50919-5) and CNPq (grant 307738/2011-6).

## **REFERENCES**

1. Domingo, E. Mechanisms of viral emergence. *Vet. Res.* 41, 38 (2010).
2. Pike, B. L. et al. The origin and prevention of pandemics. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 50, 1636–1640 (2010).
3. Kohl, C. & Kurth, A. European bats as carriers of viruses with zoonotic potential. *Viruses* 6, 3110–3128 (2014).
4. O’Shea, T. J. et al. Bat flight and zoonotic viruses. *Emerg. Infect. Dis.* 20, 741–745 (2014).
5. Smith, I. & Wang, L.-F. Bats and their virome: an important source of emerging viruses capable of infecting humans. *Curr. Opin. Virol.* 3, 84–91 (2013).
6. Temmam, S., Davoust, B., Berenger, J.-M., Raoult, D. & Desnues, C. Viral metagenomics on animals as a tool for the detection of zoonoses prior to human infection? *Int. J. Mol. Sci.* 15, 10377–10397 (2014).
7. Mokili, J. L., Rohwer, F. & Dutilh, B. E. Metagenomics and future perspectives in virus discovery. *Curr. Opin. Virol.* 2, 63–77 (2012).
8. Simas, P. V. M. et al. Bat coronavirus in Brazil related to appalachian ridge and porcine epidemic diarrhea viruses. *Emerg. Infect. Dis.* 21, 729–731 (2015).

9. Okonechnikov, K., Golosova, O., Fursov, M. & Team, the U. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics* *bts091* (2012). doi:10.1093/bioinformatics/bts091
10. Ondov, B. D., Bergman, N. H. & Phillippy, A. M. Interactive metagenomic visualization in a Web browser. *BMC Bioinformatics* *12*, 385 (2011).
11. Plowright, R. K. et al. Ecological dynamics of emerging bat virus spillover. *Proc. Biol. Sci.* *282*, 20142124 (2015).
12. Roux, S., Tournayre, J., Mahul, A., Debroas, D. & Enault, F. Metavir 2: new tools for viral metagenome comparison and assembled virome analysis. *BMC Bioinformatics* *15*, 76 (2014).
13. Modi, S. R., Lee, H. H., Spina, C. S. & Collins, J. J. Antibiotic treatment expands the resistance reservoir and ecological network of the phage metagenome. *Nature* *499*, 219–222 (2013).
14. Valles, S. M. et al. A picorna-like virus from the red imported fire ant, *Solenopsis invicta*: initial discovery, genome sequence, and characterization. *Virology* *328*, 151–157 (2004).
15. Chayavichitsilp P, Buckwalter JV, Krakowski AC, Friedlander SF. Herpes simplex. *Pediatr Rev* *30* (4): 119–29; 2009. doi:10.1542/pir.30-4-119
16. Weller SK, Sawitzke JA. Recombination promoted by DNA viruses: phage  $\lambda$  to herpes simplex virus. *Annu Rev Microbiol*, *68*:237-58 (2014). doi: 10.1146/annurev-micro-091313-103424.
17. Sano K, Okazaki S, Taniguchi S, Masangkay JS, Puentespina R Jr, Eres E, Cosico E, Quibod N, Kondo T, Shimoda H, Hatta Y, Mitomo S, Oba M, Katayama Y, Sassa Y, Furuya T, Nagai M, Une Y, Maeda K, Kyuwa S, Yoshikawa Y, Akashi H, Omatsu T, Mizutani T. Detection of a novel herpesvirus from bats in the Philippines. *Virus Genes*. Aug; *51*(1):136-9 (2015). doi: 10.1007/s11262-015-1197-6.
18. Dacheux, L, Cervantes-Gonzalez, M, Guigon, G, Thiberge, JM, Vandenbogaert, M, Maufrais, C, Caro, V, Bourhy, H. A preliminary study of viral metagenomics of French bat species in contact with humans: identification of new mammalian viruses. *PLoS One*. Jan; *9* (1): e87194 (2014).
19. Sasaki, M, Orba, Y, Ueno, K, Ishii, A, Moonga, L, Hang'ombe, BM, Mweene, AS, Ito, K, Sawa, H. Metagenomic analysis of the shrew enteric virome reveals novel viruses related to human stool-associated viruses. *J Gen Virol*. Feb; *96* (Pt 2):440-52 (2015).

20. Luchs A, Timenetsky Mdo C. G8P[6] rotaviruses isolated from Amerindian children in Mato Grosso do Sul, Brazil, during 2009: close relationship of the G and P genes with those of bovine and bat strains. *J Gen Virol.* Mar; 95(Pt 3):627-41 (2014). doi: 10.1099/vir.0.058099-0.

## 10.2 Apêndice 2: Análise de similaridade do *4936\_scaffold\_0* utilizando ViPR (Virus Pathogen Resource)

(<http://www.viprbrc.org/brc/home.spg?decorator=corona>)

Query= scaffold\_0

Length=24668

Score E

Sequences producing significant alignments:

(Bits) Value N

|  |      |     |    |
|--|------|-----|----|
| gi 531967705 ref NC_022103.1  Bat coronavirus CDPHE15/USA/2006,... | 4548 | 0.0 | 7  |
| gi 19387576 ref NC_003436.1  Porcine epidemic diarrhea virus, c... | 2842 | 0.0 | 6  |
| gi 152994036 ref NC_009657.1  Scotophilus bat coronavirus 512, ... | 2808 | 0.0 | 7  |
| gi 409188582 ref NC_018871.1  Rousettus bat coronavirus HKU10, ... | 2805 | 0.0 | 3  |
| gi 169822558 ref NC_010438.1  Bat coronavirus HKU8, complete ge... | 2764 | 0.0 | 9  |
| gi 169822550 ref NC_010437.1  Bat coronavirus 1A, complete genome  | 2762 | 0.0 | 7  |
| gi 169822542 ref NC_010436.1  Bat coronavirus 1B, complete genome  | 2750 | 0.0 | 7  |
| gi 49169782 ref NC_005831.2  Human coronavirus NL63, complete g... | 2748 | 0.0 | 9  |
| gi 160707867 ref NC_009988.1  Bat coronavirus HKU2, complete ge... | 2747 | 0.0 | 5  |
| gi 12175745 ref NC_002645.1  Human coronavirus 229E, complete g... | 2679 | 0.0 | 10 |
| gi 594135072 ref NC_023760.1  Mink coronavirus strain WD1127, c... | 2595 | 0.0 | 5  |
| gi 315192962 ref NC_002306.3  Feline infectious peritonitis vir... | 2508 | 0.0 | 6  |
| gi 126030132 ref NC_009021.1  Bat coronavirus HKU9-1, complete ... | 1228 | 0.0 | 3  |
| gi 556333860 ref NC_022643.1  Betacoronavirus Erinaceus/VMC/DEU... | 1225 | 0.0 | 7  |
| gi 126030112 ref NC_009019.1  Bat coronavirus HKU4-1, complete ... | 1225 | 0.0 | 7  |
| gi 113882957 ref NC_008315.1  Bat coronavirus (BtCoV/133/2005),... | 1223 | 0.0 | 7  |
| gi 667489388 ref NC_019843.3  Middle East respiratory syndrome ... | 1221 | 0.0 | 4  |
| gi 126030122 ref NC_009020.1  Bat coronavirus HKU5-1, complete ... | 1218 | 0.0 | 2  |
| gi 30271926 ref NC_004718.3  SARS coronavirus, complete genome     | 1217 | 0.0 | 14 |
| gi 304633675 ref NC_014470.1  Bat coronavirus BM48-31/BGR/2008,... | 1213 | 0.0 | 9  |
| gi 693764258 ref NC_025217.1  Bat Hp-betacoronavirus/Zhejiang20... | 1207 | 0.0 | 19 |
| gi 253756605 ref NC_012950.1  Human enteric coronavirus strain ... | 1197 | 0.0 | 10 |

|  |      |       |    |
|--|------|-------|----|
| gi 253756580 ref NC_012948.1  Bovine respiratory coronavirus AH... | 1197 | 0.0   | 10 |
| gi 253756593 ref NC_012949.1  Bovine respiratory coronavirus bo... | 1197 | 0.0   | 10 |
| gi 15081544 ref NC_003045.1  Bovine coronavirus, complete genome   | 1197 | 0.0   | 11 |
| gi 85718614 ref NC_007732.1  Porcine hemagglutinating encephalo... | 1196 | 0.0   | 10 |
| gi 167600353 ref NC_010327.1  Equine coronavirus, complete genome  | 1195 | 0.0   | 11 |
| gi 38018022 ref NC_005147.1  Human coronavirus OC43, complete g... | 1195 | 0.0   | 9  |
| gi 394935448 ref NC_017083.1  Rabbit coronavirus HKU14, complet... | 1192 | 0.0   | 11 |
| gi 744692653 ref NC_026011.1  Betacoronavirus HKU24 strain HKU2... | 1191 | 0.0   | 10 |
| gi 187251953 ref NC_010646.1  Beluga Whale coronavirus SW1, com... | 1187 | 0.0   | 4  |
| gi 253750530 ref NC_012936.1  Rat coronavirus Parker, complete ... | 1179 | 0.0   | 10 |
| gi 9629812 ref NC_001846.1  Murine hepatitis virus strain A59, ... | 1178 | 0.0   | 10 |
| gi 568319712 ref AC_000192.1  Murine hepatitis virus strain JHM... | 1171 | 0.0   | 4  |
| gi 85667876 ref NC_006577.2  Human coronavirus HKU1, complete g... | 1170 | 0.0   | 10 |
| gi 9626535 ref NC_001451.1  Avian infectious bronchitis virus, ... | 834  | 0.0   | 9  |
| gi 189313868 ref NC_010800.1  Turkey coronavirus, complete genome  | 827  | 0.0   | 11 |
| gi 383080795 ref NC_016996.1  Common-moorhen coronavirus HKU21,... | 286  | 0.0   | 30 |
| gi 383081743 ref NC_016992.1  Sparrow coronavirus HKU17, comple... | 282  | 0.0   | 29 |
| gi 383080765 ref NC_016993.1  Magpie-robin coronavirus HKU18, c... | 285  | 0.0   | 31 |
| gi 212681378 ref NC_011549.1  Thrush coronavirus HKU12-600, com... | 283  | 0.0   | 31 |
| gi 383080775 ref NC_016994.1  Night-heron coronavirus HKU19, co... | 292  | 0.0   | 30 |
| gi 383081734 ref NC_016991.1  White-eye coronavirus HKU16, comp... | 284  | 0.0   | 32 |
| gi 212681388 ref NC_011550.1  Munia coronavirus HKU13-3514, com... | 286  | 0.0   | 32 |
| gi 383081726 ref NC_016990.1  Porcine coronavirus HKU15, comple... | 280  | 0.0   | 30 |
| gi 383080784 ref NC_016995.1  Wigeon coronavirus HKU20, complet... | 283  | 0.0   | 29 |
| gi 116536735 ref NC_008516.1  White bream virus, complete genome   | 58.0 | 3e-13 | 3  |
| gi 77118348 ref NC_007447.1  Breda virus, complete genome          | 41.8 | 4e-11 | 5  |
| gi 557745614 ref NC_022787.1  Porcine torovirus strain SH1, com... | 42.4 | 5e-11 | 4  |
| gi 807743898 ref NC_026812.1  Chinook salmon bafinivirus isolat... | 49.4 | 2e-09 | 3  |
| gi 612064067 ref NC_023986.1  Casuarina virus isolate 0071, com... | 45.1 | 4e-08 | 3  |

gi|338209349|ref|NC\_015668.1| Cavally virus, complete genome  
43.1 2e-07 3  
gi|341926380|ref|NC\_015874.1| Nam Dinh virus, complete genome  
43.4 2e-07 3  
gi|674660326|ref|NC\_024709.1| Ball python nidovirus strain 07-5...  
45.4 2e-07 3  
gi|475994026|ref|NC\_020899.1| Hana virus strain A4/CI/2004, com...  
43.1 4e-07 2  
gi|166851932|ref|NC\_010306.1| Gill-associated virus, complete g...  
34.8 5e-07 3  
gi|475994034|ref|NC\_020900.1| Meno virus strain E9/CI/2004, com...  
43.4 7e-07 2  
gi|475994041|ref|NC\_020901.1| Nse virus strain F24/CI/2004, com...  
43.1 1e-06 2  
gi|571031196|ref|NC\_023177.1| Choristoneura murinana alphabacul...  
43.4 7e-04 1

## 10.3 Apêndice 3: Bat coronavirus in Brazil related to appalachian ridge and porcine epidemic diarrhea viruses

### LETTERS

therapy. Sequence analysis of the viral protein 1 gene revealed that both of these viruses clustered with the major outbreak strain from the United States. Partial gene sequences of viral protein 1 were deposited in the GenBank database under accession nos. KP247599 and KP247600.

We next used CLART PneumoVir to retest samples that had been positive for enterovirus/rhinovirus by FilmArray during September–October 2013 and 2014. The number of overall samples tested for respiratory viruses did not increase from 2013 to 2014 (227 and 218, respectively), but the percentage of enteroviruses detected increased strikingly (from 2.6% to 14.6%). We then compared clinical characteristics and their frequency of occurrence among enterovirus-positive patients hospitalized during September–October 2013 and September–October 2014. The clinical features of 24 enterovirus-positive patients hospitalized during 2014 differed from those of 5 enterovirus-positive children hospitalized during 2013. Hospitalization in 2014 was mostly for asthmatic crisis in children 2.5 to 7 years of age; this pattern is less clear for the few patients hospitalized in 2013 (Table). A substantial proportion of patients hospitalized in 2014 required oxygen support and admission to the pediatric intensive care unit.

In conclusion, we report 2 confirmed cases of EV-D68 in a Southern Hemisphere country during the 2014 outbreak reported in the United States. That these cases are virologically and clinically related to those reported in the United States documents that the virus had been introduced to the Southern Hemisphere during the spring of 2014. A substantial increase in enterovirus cases displaying a notably similar clinical pattern (asthmatic crisis in children) strongly suggests that EV-D68 infections are increasingly rapidly. This virus has been previously identified in the region (3) but only sporadically. The virus could spread to other areas in Santiago and to other cities, and similar situations could occur in other Latin American countries, especially those with many residents who travel to the United States. Public health officials need to be notified of this potential, and appropriate surveillance and treatment strategies need to be implemented.

#### Acknowledgments

We are indebted to and pleased to acknowledge W. Allan Nix and his team for their analysis of the samples from Chile; we also thank Grupo Bios Chile for their valuable support and for providing a CLART PneumoVir kit.

#### References

- Midgley CM, Jackson MA, Selvarangan R, Turabelidze G, Obring E, Johnson D, et al. Severe respiratory illness associated with enterovirus D68—Missouri and Illinois, 2014. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2014;63:798–9.
- Nix WA, Oberste MS, Pallansch MA. Sensitive, seminested PCR amplification of VP1 sequences for direct identification of all enterovirus serotypes from original clinical specimens. *J Clin Microbiol*. 2006;44:2698–704. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00542-06>
- García J, Espejo V, Nelson M, Soviero M, Villaran MV, Gomez J, et al. Human rhinoviruses and enteroviruses in influenza-like illness in Latin America. *Virology*. 2013;10:305. <http://dx.doi.org/10.1186/1743-422X-10-305>

Address for correspondence: Juan P. Torres, Clínica Las Condes Lo Fontecilla 441, Las Condes, Santiago, Chile; email: jptorres@clc.cl

### Bat Coronavirus in Brazil Related to Appalachian Ridge and Porcine Epidemic Diarrhea Viruses

Paulo Vítor Marques Simas,<sup>1</sup>  
Ana Caroline de Souza Barnabé,<sup>1</sup>  
Ricardo Durães-Carvalho,<sup>1</sup>  
Daniel Ferreira de Lima Neto,<sup>1</sup>  
Leonardo Cardia Caserta,<sup>1</sup> Luiza Artacho,  
Fábio André Facco Jacomassa,  
Matheus Cavalheiro Martini,  
Márcia Mercês Aparecida Bianchi dos Santos,  
Paulo Anselmo Nunes Felipe,  
Helena Lage Ferreira, Clarice Weis Arns

Author affiliations: University of Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil (P.V.M. Simas, A.C.S. Barnabé, R. Durães-Carvalho, D.F. Lima-Neto, L.C. Caserta, L. Artacho, M.C. Martini, P.A.N. Felipe); São Paulo State University, Rio Claro, São Paulo (F.A.F. Jacomassa); Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, Brazil (M.M.A. Bianchi dos Santos); São Paulo University, Pirassununga, Brazil (H.L. Ferreira).

DOI: <http://dx.doi.org/10.3201/eid2104.141783>

**To the Editor:** *Tadarida brasiliensis* (I. Geoffroy, 1824) is a species of free-tailed bat that has resident and migratory populations in Brazil (1). This species has adapted to urban areas, occupying roofs, ceilings, and other human constructions, and often coexists with other bat species and humans (2), enabling epidemiologic risks (3). In recent studies, an alphacoronavirus has been detected in urban bat species *Molossus molossus*, *M. rufus*, and *Tadarida brasiliensis* in Brazil (4,5). Evidence suggests that alphacoronaviruses may use bats as hosts to spread human coronavirus (HCoV) NL63, which originated by evolution of Appalachian Ridge CoV strain 2 (ARCoV.2) (6).

<sup>1</sup>These authors contributed equally to this article.

**10.4 Apêndice 4: Análise Filogenética utilizando um fragmento de RdRp dos quatro gêneros de Coronavírus – Alpha, Beta, Gamma e Delta – com o *4936\_scaffold\_0*.**



Phylogenetic analysis of the putative coronavirus found in metagenomic analysis. Maximum likelihood phylogenetic tree of 262 samples of RNA dependent RNA polymerase protein obtained from the CoVDB (site) from the four coronavirus groups. Sequences were aligned with the T-Coffee (site), edited in AliView (site) and sampled over 1000 bootstrap replicates in PhyML 3.0 (site) and visualized in FigTree version 1.3.1 (site). Values at branches show the result of the approximate likelihood ratio; values <0.70 are not shown. Scale bar indicates nucleotide substitutions per site.

## 10. Anexos:

### 10.1. Anexo 1: Declaração referente a Bioética e Biossegurança



COORDENADORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
Universidade Estadual de Campinas  
Caixa Postal 6133, 13082-970, Campinas, SP, Brasil  
Fone: (19) 5721-6378, email: cogibe@unicamp.br



#### DECLARAÇÃO

Em observância ao **§4º do Artigo 1º da Informação CCGP-UNICAMP/002/13**, de 14/08/2013, referente a Bioética e Biossegurança, declaro que o conteúdo de minha Tese de Doutorado, intitulada "*Metaviroma de morcegos *Tadarida brasiliensis**", desenvolvida no Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular do Instituto de Biologia da Unicamp, não versa sobre pesquisa envolvendo seres humanos, animais ou temas afetos a Biossegurança.

Assinatura: \_\_\_\_\_

Nome do(a) aluno(a): Paulo Vitor Marques Simas

Assinatura: \_\_\_\_\_

Nome do(a) orientador(a): Clarice Weis Arns

Profª Drª Clarice Weis Arns  
Laboratório de Virologia  
Departamento de Genética, Evolução e Biogeografia  
Instituto de Biologia - UNICAMP  
13082-970 - Campinas - SP

Data: 31 de agosto de 2015.

## 10.2. Anexo 2: Declaração de Autoria

### DECLARAÇÃO

As cópias dos documentos de minha autoria ou de minha coautoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Tese de Doutorado intitulada "**Metaviroma de morcegos *Tadarida brasiliensis***" não infringem os dispositivos da Lei nº 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 31 de agosto de 2015



Paulo Vitor Marques Simas  
RG 350524439 SSP/SP  
Autor



Clarice Weis Arns  
RG 5003388001 SSP/RS  
Orientadora

Profª Drª Clarice Weis Arns  
Laboratório de Virologia  
Dpto. Genética, Evolução e Biogerontologia  
Instituto de Biologia - UNICAMP  
13083-070 - Campinas - SP