

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

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE VÍRUS EM MORCEGOS DO RIO GRANDE DO SUL,
BRASIL**

PRISCILLA MEDEIROS DUPONT

Porto Alegre

2016

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

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE VÍRUS EM MORCEGOS DO RIO GRANDE DO SUL,
BRASIL**

Priscilla Medeiros Dupont

**Dissertação apresentada como requisito
parcial para a obtenção do grau de Mestre
em Ciências Veterinárias na área de
Virologia**

Orientador: Cláudio Wageck Canal

Porto Alegre

2016

CIP - Catalogação na Publicação

Medeiros Dupont, Priscilla
Detecção e caracterização de vírus em morcegos do
Rio Grande do Sul, Brasil / Priscilla Medeiros
Dupont. -- 2016.
78 f.

Orientador: Cláudio Wageck Canal.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias,
Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. Chiroptera. 2. Vírus emergentes. 3. Técnicas
moleculares. 4. Rio Grande do Sul. I. Wageck Canal,
Cláudio, orient. II. Título.

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

PRISCILLA MEDEIROS DUPONT

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE VÍRUS EM MORCEGOS DO RIO GRANDE DO
SUL, BRASIL**

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

Prof. Dr. Cláudio Wageck Canal
Orientador e Presidente da Comissão

Prof. Dr. Fernando Rosado Spilki
Membro da Comissão

Prof. Dr. Sérgio Luiz Althoff
Membro da Comissão

Dra. Susi Missel Pacheco
Membro da Comissão

Porto Alegre

2016

Priscilla Medeiros Dupont

DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE VÍRUS EM MORCEGOS DO RIO GRANDE DO
SUL, BRASIL

Aprovado em 08 ABR 2016

APROVADO POR:

Prof. Dr. Cláudio Wageck Canal
Orientador e Presidente da Comissão

Prof. Fernando Rosado Spilki
Membro da Comissão

Prof. Dr. Sérgio Luiz Althoff
Membro da Comissão

Dra. Susi Missel Pacheco
Membro da Comissão

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais, pelo constante incentivo à pesquisa e por nunca me deixarem desistir dos meus sonhos. Merci!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Jacques e Isabel, por todo apoio, suporte, carinho e paciência durante todos esses anos em que estou longe de casa.

Ao pentelho do meu irmão Jacques e à pentelha da minha irmã de coração Cris, por todas as broncas e choques de realidade que me fizeram ter o pé mais no chão.

Ao Jeferson, meu amor, pela ajuda, paciência e os bons momentos que passamos durante esse período turbulento.

À minha querida família (*Nonna*, tias, tio e primas), que mesmo longe não deixam de estar presentes, sempre me incentivando a ir em busca do que me faz feliz.

Às minhas queridas amigas e colegas Carine e Mariana por toda ajuda, conselhos e amizade nas horas de folga.

O meu mais que obrigada ao Matheus, Ana Cristina, Renata, Cíntia e Samuel, por todo suporte no laboratório, na parte de bancada e na “terrível” bioinformática.

A todos meus colegas do “Lab.” pela amizade, ajuda e paciência durante todo esse tempo.

Ao meu orientador Cláudio W. Canal pela oportunidade e aprendizado durante esses anos.

À Dra. Susi M. Pacheco por ter me introduzido, desde a época da graduação, no mundo dos incríveis animais que são os morcegos. Obrigada por todos os conselhos durante esses anos.

Ao Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor pela obtenção das amostras, em especial ao Júlio A. Rosa.

Aos meus amigos paulistanos e gaúchos por entenderem a minha ausência.

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para eu finalizar mais uma etapa da minha vida.

Muito Obrigada!

RESUMO

Algumas espécies de morcegos têm sido reconhecidas como reservatórios naturais de várias famílias virais, desempenhando um importante papel na transmissão e manutenção desses micro organismos. Devido à descaracterização e fragmentação de habitats naturais, esses mamíferos buscam alternativas de abrigo e alimento, e assim, ficam cada vez mais expostos aos meios antrópicos e em contato com humanos e animais domésticos. Com exceção do vírus rábico, existem poucos trabalhos realizados na detecção de vírus em morcegos no Brasil. Em virtude disso, o presente estudo objetivou a detecção de vírus (circovírus, astrovírus, coronavírus e lyssavírus relacionados ao vírus da raiva) em amostras de órgãos de morcegos do estado do Rio Grande do Sul. Os ácidos nucleicos foram extraídos das amostras de órgãos de morcegos e submetidos à detecção por PCR e RT-PCR. Após a detecção, os fragmentos obtidos foram sequenciados para realizar análise filogenética dos vírus encontrados. Ao total foram analisadas 108 amostras de diferentes espécies e localidades, das quais dez foram positivas para circovírus, seis para coronavírus e 25 para astrovírus, este último sendo o primeiro registro do vírus em morcegos para o Brasil. Todas as amostras foram negativas para lyssavírus relacionados ao vírus da raiva. Análises filogenéticas revelaram que as sequências de circovírus agruparam em ambos os gêneros *Circovirus* e *Cyclovirus*, coronavírus no gênero *Alphacoronavirus* em dois clados diferentes e astrovírus no gênero *Mamastrovirus* junto com outros astrovírus de morcegos, o qual formam um clado separado dos outros mamíferos. Os resultados demonstram uma diversidade genética entre os vírus encontrados em diferentes espécies de morcegos, que possuem dietas alimentares e habitats distintos.

Palavras-chave: Chiroptera, PCR, RT-PCR, Circovírus, Astrovírus, Coronavírus.

ABSTRACT

Some bat species have been recognized as natural reservoirs of several viral families, playing an important role in the transmission and maintaining of these microorganism. Due to mischaracterization and fragmentation of natural habitats, these mammals seek shelter alternatives and food, and thus are increasingly exposed to anthropism, which make the contact with humans and domestic animals closer. With the exception of the rabies virus, there are few studies on the detection of viruses in bats in Brazil. Therefore, the present study aimed the detection of viruses (circovirus, astrovirus, coronavirus and rabies-related virus) in bats organs samples from Rio Grande do Sul state. Nucleic acids were extracted from bat organs samples and submitted to detection by PCR and RT-PCR. After detection, the obtained fragments were sequenced to perform phylogenetic analysis of the viruses found. From a total of 108 samples analyzed of different species and locations, ten were positive for circoviruses, six for coronaviruse and 25 for astrovirus, which was the first report of this virus in bats in Brazil. All samples were negative for rabies-related virus. Phylogenetic analyzes revealed that the sequences of circoviruses grouped in both Circovirus and Cyclovirus genus, coronaviruses in Alphacoronavirus genus in two different clades and astroviruses in Mamastrovirus genus along with other bats astrovirus, which form a separate clade from other mammals. Results demonstrate a genetic diversity among viruses found in different species of bats, which have different diets and habitats.

Keywords: Chiroptera, PCR, RT-PCR, Circoviruses, Astroviruses, Coronaviruses.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1. Morcegos: Aspectos gerais	13
2.2. Paramixovírus	15
2.3. Filovírus	19
2.4. Coronavírus	21
2.5. Lyssavírus relacionados ao vírus da Raiva	24
2.6. Circovírus	27
2.7. Astrovírus	29
3. ARTIGO CIENTÍFICO	31
4. CONCLUSÕES.....	53
REFERÊNCIAS	54

1. INTRODUÇÃO

A importância de estudar espécies de vírus reside no fato de que a maioria dos seres vivos podem ser reservatórios desses micro organismos, sem necessariamente transmitir viroses (TAYLOR *et al.*, 2001). Os vírus se mantêm na natureza através de espécies reservatórias, o que pode acarretar na eventual transmissão em diferentes hospedeiros. Com isso, muitos fatores podem contribuir para a emergência de novos patógenos, como mudanças ambientais e climáticas, atividades antrópicas e a expansão urbana, a evolução do vírus e até mesmo o aprimoramento nas técnicas de detecção (WANG, 2009).

Morcegos, como qualquer outro mamífero, possuem vírus associados a distintas espécies, localidades e mesmo conforme a dieta alimentar (CALISHER *et al.*, 2006). Na natureza, além dos morcegos, outros animais também servem de reservatório de agentes virais, como roedores, primatas não-humanos, carnívoros, marsupiais, aves, e artrópodes (KUIKEN *et al.*, 2005). Atualmente, os morcegos vêm sendo relacionados como hospedeiros reservatórios de alguns vírus, podendo acarretar no cruzamento da barreira interespecie, e assim, infectar humanos e outros mamíferos, tanto domésticos, quanto silvestres (WOOLHOUSE & GOWTAGE-SEQUEIRA, 2005).

O primeiro relato de morcegos como portadores de vírus surgiu durante a década de 20, quando o vírus da raiva foi identificado em morcegos na América do Sul e Central (WANG, 2009). Embora o estudo sobre a raiva nos morcegos continue em andamento até os dias de hoje, a importância dos morcegos como reservatórios de viroses zoonóticas foi largamente desvalorizada até meados dos anos 90 (CALISHER *et al.*, 2006). Nas últimas duas décadas, a importância dos quirópteros como vetores potenciais de doenças virais significativas, especialmente as zoonoses, tem recebido uma atenção crescente (MÜHLDORFER *et al.*, 2011). Além do vírus da raiva, que vem sendo estudado há mais de um século, extensas pesquisas estão sendo desenvolvidas para identificar um grande número de agentes microbianos (WIBBELT *et al.*, 2009), incluindo importantes vírus zoonóticos emergentes detectados em todo o mundo (HALPIN *et al.*, 2000; KUZMIN *et al.*, 2011). Apesar dos riscos que alguns vírus carregados por morcegos representam para a saúde humana, deve-se reconhecer que a maioria dos surtos de transmissão de zoonoses é uma consequência da expansão urbana (WYNNE & WANG, 2013).

Em razão disso, o trabalho teve como objetivo identificar e caracterizar circovírus, astrovírus, coronavírus e lyssavírus relacionados ao vírus da raiva, presentes em morcegos do

estado do Rio Grande do Sul, através da técnica de PCR e RT-PCR, sequenciar as amostras positivas e realizar as análises filogenéticas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Morcegos: Aspectos gerais

Os morcegos pertencem à ordem Chiroptera e estão entre os táxons mais abundantes do Planeta, compreendendo 18 famílias, 202 gêneros e cerca de 1.300 espécies (FENTON & SIMMONS, 2014), o que representa um quarto de todas as espécies conhecidas de mamíferos no mundo (WILSON & REEDER, 2005; SIMMONS, 2005). Possuem ampla distribuição mundial, com exceção dos pólos (KUNZ & LUMSDEN, 2003) e algumas ilhas oceânicas (RICHARDSON, 2002). No Brasil, são conhecidas nove famílias, 65 gêneros e 174 espécies (PAGLIA *et al.*, 2012), sendo a segunda ordem de maior riqueza, superada somente pela ordem Rodentia, com 234 espécies (PAGLIA *et al.*, 2012). Para o Rio Grande do Sul foram descritas 40 espécies, distribuídas em quatro famílias e quinze gêneros (BERNARDI *et al.*, 2007; PACHECO, 2010).

Esses mamíferos desempenham um papel importante na manutenção de ecossistemas devido à diversidade de hábitos alimentares (frugívoros, insetívoros, nectarívoros, polinívoros, carnívoros, piscívoros e hematófagos) e assim, atuando como polinizadores, dispersores de sementes e no controle de populações de insetos e outros invertebrados, bem como pequenos vertebrados (PACHECO, 2004; KUNZ *et al.*, 2011). A importância dos morcegos na dispersão de sementes é tão ampla, que pode chegar a influenciar uma estrutura da comunidade vegetal através das espécies de frutos que consomem, o que os diferenciam das geralmente consumidas por aves e outros mamíferos não-voadores (FLEMING & HEITHAUS, 1981; KALKO, 1997).

Os quirópteros podem desempenhar estratégias de vida diferentes de outros mamíferos (RACEY & ENTWISTLE, 2000). A maioria dos mamíferos de pequeno porte são caracterizados por uma reprodução rápida e vida curta, os morcegos têm vida longa, diversos eventos reprodutivos e um baixo número de filhotes por gestação (GAISLER, 1989; RACEY & ENTWISTLE, 2000). Essa baixa taxa reprodutiva pode ser compensada pelo fato dos morcegos viverem cerca de quinze anos ou mais do que outros mamíferos do seu porte (NOWAK, 1999).

A maioria dos morcegos possui hábitos noturnos e, durante o dia, permanecem em abrigos que podem ser em ambientes naturais, como cavernas, ocos de árvores, fendas de rochas, folhagens e copas de árvores ou em ambientes artificiais, que incluem sótãos, forros, porões, telhados, minas, pontes, vãos de prédios, entre outros (KUNZ *et al.*, 2011). Nos

últimos anos, com o aumento dos impactos ambientais, como a destruição das florestas e outros ecossistemas terrestres e o esgotamento de recursos alimentares, têm contribuído para a dispersão desses animais do ambiente natural, para ambientes mais próximos aos humanos e, conseqüentemente, animais domésticos e de produção, o que pode facilitar a transmissão interespecie de alguns agentes infecciosos (DOBSON, 2005; WONG *et al.*, 2007).

Os morcegos são os únicos mamíferos com a capacidade de voo (NOWAK, 1999), e podem voar longas distâncias em busca de alimento e/ou temperatura (SPEAKMAN & THOMAS, 2003). Essa habilidade de voo os remetem a uma teoria em que os morcegos e os vírus co-evoluíram por um tempo muito longo e essa habilidade de voar os têm ajudado a adaptar-se aos vírus. Quando os morcegos estão voando, a taxa metabólica pode aumentar até 15 vezes, e o resultado disso é que eles estão em constante estado febril, o que poderia, de alguma maneira, inativar o vírus (O'SHEA *et al.*, 2014). Há também evidências de seleção positiva de genes de reparo de DNA (ZHANG *et al.*, 2013) que desempenham um papel na reparação de danos do DNA, que pode ocorrer devido à taxa metabólica elevada durante o voo. A segunda hipótese é que os morcegos teriam uma resposta imune inata melhor para estes vírus, o que poderia ajudá-los a montar uma resposta imune melhor para essas infecções. Uma boa resposta imune inata é necessária para iniciar a resposta imune adaptativa (KOYAMA *et al.*, 2008). Por fim, a maioria desses vírus (ex. Henipavírus) codifica várias proteínas acessórias, que desempenham um papel chave na evasão da resposta imune do hospedeiro. Os morcegos podem vir a ter um mecanismo para regular ou superar estas proteínas acessórias e inibir a evasão da resposta imune do hospedeiro pelo vírus (MARSH & WANG, 2012).

Em muitos aspectos, os morcegos representam o reservatório perfeito para patógenos zoonóticos. Algumas espécies vivem em grandes colônias ou abrigos, podem, por meio de voo, viajar e disseminar vírus a longas distâncias e possuem longevidade notável para o seu tamanho corporal. As atividades antrópicas estão acarretando em um aumento nas interações entre morcegos, humanos e animais, e conseqüentemente o incremento do potencial zoonótico conferido por essas características (WYNNE & WANG, 2013). Segundo Luis *et al.* (2013), morcegos abrigam mais viroses zoonóticas por espécie que os roedores, e atualmente representam uma fonte significativa de agentes zoonóticos.

Nos últimos anos, morcegos têm sido identificados como reservatórios naturais de uma série de patógenos virais emergentes que têm causado surtos de doenças em seres humanos (CALISHER *et al.*, 2006; SHI, 2010). Esses surtos incluem viroses causadas pelo vírus da Raiva, vírus Hendra, vírus Nipah e o vírus Ebola (MACKENZIE, 2005; CALISHER

et al., 2006; VAN DER POEL *et al.*, 2006; OMATSU *et al.*, 2007; WONG *et al.*, 2007; WIBBELT *et al.*, 2009). A recente identificação de viroses derivadas de morcegos relacionadas com patógenos humanos, incluindo hepacivírus, pegivírus (QUAN *et al.*, 2013), influenzavírus A (TONG *et al.*, 2012), hantavírus (GUO *et al.*, 2013), alguns paramyxovírus (DREXLER *et al.*, 2012a), vírus de Marburg (TOWNER *et al.*, 2007) e a síndrome respiratória coronavírus do Oriente Médio (MERS-CoV) (MEMISH *et al.*, 2013), também são exemplos notáveis.

Até os dias de hoje, mais de 80 espécies de vírus já foram isolados ou detectados nos morcegos utilizando métodos baseados na detecção de ácidos nucleicos. Vírus recentemente descobertos nesses animais incluem as famílias *Adenoviridae* (MAEDA *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2010), *Astroviridae* (CHU *et al.*, 2008; ZHU *et al.*, 2009; XIAO *et al.*, 2011), *Arenaviridae* (CALISHER *et al.*, 2006), *Bunyaviridae* (CALISHER *et al.*, 2006), *Circoviridae* (LI *et al.*, 2010b; GE *et al.*, 2012a; WU *et al.*, 2012), *Coronaviridae* (LAU *et al.*, 2010; TSUDA *et al.*, 2012), *Filoviridae* (NEGREDO *et al.*, 2011), *Flaviviridae* (WU *et al.*, 2012; HE *et al.*, 2013), *Hepadnaviridae* (HE *et al.*, 2013), *Hepeviridae* (DREXLER *et al.*, 2012b), *Herpesviridae* (WATANABE *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2012), *Orthomyxoviridae* (TONG *et al.*, 2012), *Papillomaviridae* (MCKNIGHT *et al.*, 2006), *Parvoviridae* (LI *et al.*, 2010b; CANUTI *et al.*, 2011), *Picornaviridae* (LAU *et al.*, 2011), *Poliomaviridae* (MISRA *et al.*, 2009), *Poxviridae* (LI *et al.*, 2010b; HE *et al.*, 2013), *Reoviridae* (CHUA *et al.*, 2007), *Rhabdoviridae* (CALISHER *et al.*, 2006), *Togaviridae* (CALISHER *et al.*, 2006) e alguns vírus adeno-associados (LI *et al.*, 2010b; GE *et al.*, 2012b).

No Rio Grande do Sul, embora poucos trabalhos tenham sido realizados, algumas famílias virais como *Adenoviridae* (LIMA *et al.*, 2013b), *Circoviridae* (LIMA *et al.*, 2015a,b) e *Coronaviridae* (LIMA *et al.*, 2013a) já foram detectadas em morcegos através de métodos moleculares.

2.2. Paramixovírus

A família *Paramyxoviridae* é classificada na ordem *Mononegavirales*, onde estão incluídas duas subfamílias: *Paramyxovirinae* e *Pneumovirinae*. São vírus envelopados, na sua maioria esféricos, com projeções glicoprotéicas de superfície, os vírions possuem um nucleocapsídeo helicoidal que envolve o genoma de RNA fita simples não-segmentado com polaridade negativa e o tamanho do genoma pode variar de 15 a 19 kilobases (kb). Os genomas da subfamília *Paramyxoviridae* possuem entre seis e sete genes codificadores de

proteínas, enquanto que a subfamília *Pneumovirinae* codifica entre oito e dez, dependendo do gênero (MCCARTHY & GOODMAN, 2010).

Os paramixovírus são responsáveis por inúmeras doenças em animais e humanos. Em animais podemos citar, por exemplo, o vírus da cinomose, da peste bovina, da peste dos pequenos ruminantes e da doença de Newcastle. Em humanos, importantes representantes incluem o vírus da parainfluenza humana tipo 1, 2, 3 e 4, da caxumba, do sarampo e o metapneumovírus (WONG *et al.*, 2007).

O primeiro relato de paramixovírus em morcegos foi descrito em 1966, quando o vírus da parainfluenza tipo 2 foi isolado na Índia, em um morcego frugívoro (*Rousettus leschenaulti*) (PAVRI *et al.*, 1971). O segundo paramixovírus encontrado foi o Mapuera vírus, isolado de glândula salivar de um morcego frugívoro da espécie *Sturnira lilium*, no Brasil, em 1979 (HENDERSON *et al.*, 1995). Em ambos os casos, causas de infecções humanas não foram encontradas. Entretanto, a significância dos paramixovírus em morcegos se tornou evidente nos anos 90, com a ocorrência de dois surtos em humanos e animais. A criação de um novo gênero, *Henipavirus*, foi proposto para englobar duas novas espécies de vírus patogênicos aos humanos, nomeados de *Hendra virus* e *Nipah virus* (BALDOCK *et al.*, 1996; CHUA *et al.*, 2000).

O primeiro relato do Hendra virus (HeV) foi em 1994, quando um surto fatal de doença respiratória aguda acometeu cavalos, no estado de Queensland, Austrália. O tratador e o veterinário que tiveram contato com esses cavalos foram infectados e desenvolveram uma doença semelhante à gripe. Um deles acabou falecendo por pneumonia, insuficiência respiratória e renal, e um vírus foi isolado do paciente e também dos cavalos. O vírus foi inicialmente chamado de morbilivírus equino e mais tarde, nomeado Hendra vírus (SELVEY *et al.*, 1995). No ano de 1995, outro surto ocorreu e mais um paciente foi a óbito (O'SULLIVAN *et al.*, 1997). Após a ocorrência desses surtos, uma investigação sorológica avaliou 5264 soros pertencentes a 46 espécies de animais terrestres, mas não mostraram evidências de infecção por HeV. No entanto, soropositividades foram detectadas em morcegos da família Pteropodidae, comumente conhecidos como raposas voadoras (YOUNG *et al.*, 1996). Uma análise retrospectiva em soros desses morcegos evidenciou que o vírus circulava nesses animais antes de 1982, demonstrando prevalência superior a 47% (FIELD *et al.*, 2001). Como no caso de muitas outras infecções associadas aos morcegos, o HeV não causa doença ou patologia nesses animais e a transmissão placentária para o feto é possível. Embora a rota de transmissão dos pteropodídeos para os cavalos não tenha sido estabelecida, a exposição à urina infectada foi considerada como sendo uma possível fonte de infecção

(FIELD *et al.*, 2001). Além dos cavalos, gatos e cobaias são susceptíveis à infecção por HeV e podem excretar o vírus pela urina (BARCLAY *et al.*, 2000). Humanos adquirem a infecção unicamente através do contato com cavalos e não através dos morcegos. A rota de transmissão todavia, provavelmente tenha ocorrido através do contato com secreções respiratórias dos cavalos infectados (FIELD *et al.*, 2010).

Entre setembro do ano de 1998 e junho de 1999 um surto de encefalite ocorreu em granjas de suínos na Malásia. O agente etiológico dessa doença era um novo paramixovírus, nomeado de Nipah virus (NiV), o qual foi isolado de fluídos cérebro-espinhais dos pacientes humanos envolvidos no surto (CHUA *et al.*, 1999; GOH *et al.*, 2000). Dos 265 pacientes, 40% foram a óbito e 15% dos sobreviventes apresentaram sequelas neurológicas (GOH *et al.*, 2000; PARASHAR *et al.*, 2000). O surto ocasionado em humanos foi precedido de mortes massivas de suínos, devido a uma síndrome respiratória e encefalite, e o contato próximo com esses animais foi confirmado como sendo o principal fator de risco para adquirir a infecção (PARASHAR *et al.*, 2000). A provável rota de infecção apontada foi devido à presença do vírus na urina e em secreções respiratórias dos suínos infectados. Contudo, 8% dos pacientes que desenvolveram a doença não tinham tido contato com suínos, e os cães se tornaram suspeitos de serem outro possível vetor para a transmissão, uma vez que eles também podem ser infectados pelo NiV (MILLS *et al.*, 2009). O surto só foi controlado após o abate de mais de um milhão de suínos (JOHARA *et al.*, 2001).

Em março de 1999, Cingapura foi atingida por um surto envolvendo onze trabalhadores de abatedouros que tiveram contato com suínos importados da Malásia (PATON *et al.*, 1999). O contato com os suínos foi confirmado como sendo o fator de risco para a infecção (CHEW *et al.*, 2000). Entre 2001 e 2005, surtos de uma doença neurológica febril ocorreram em Bangladesh. Dos 102 casos de pacientes infectados, 77 foram a óbito (HSU *et al.*, 2004; HARCOURT *et al.*, 2005). Estudos mostraram que esses surtos foram causados mais uma vez pela infecção com NiV (HSU *et al.*, 2004; HARCOURT *et al.*, 2005). Em 2001, um surto de encefalite acometeu a Índia, também causado pelo NiV (CHADHA *et al.*, 2006).

Na busca por hospedeiros reservatórios do NiV, foi descoberto que, além dos suínos, javalis, cães e roedores poderiam ser secundariamente infectados, contudo, o principal reservatório natural apontava para os pteropodídeos. Estudos sorológicos conduzidos na Malásia mostraram que diversas espécies de morcegos da família Pteropodidae são soropositivas para o NiV, cuja maior soroprevalência é a espécie *Pteropus hypomelanus* (YOB *et al.*, 2001). Foi pressuposto que a combinação de desmatamento ocasionado pelo

homem e a seca causada pela oscilação do *El Niño*, levou esses morcegos a deixarem seus habitats naturais e irem para pomares próximos às granjas de suínos. Essa proximidade criada entre os morcegos e os suínos, resultou no cruzamento interespécies dos suínos e, subsequentemente, humanos (CHUA *et al.*, 2002).

Não houve evidência sugerindo que o NiV tenha sido transmitido diretamente de morcegos para humanos e de pessoa para pessoa nos surtos ocorridos na Malásia e em Cingapura, todavia, a presença do vírus nas secreções respiratórias e urina de pessoas infectadas foi documentada, sugerindo que o risco de propagação entre elas pode não ser zero (CHUA *et al.*, 2001). Um estudo realizado por Johara *et al.* (2001), na Malásia, apontou os pteropodídeos como prováveis hospedeiros do NiV, assim como outros estudos realizados no Camboja (OLSON *et al.*, 2002; REYNES *et al.*, 2005), na Tailândia (WACHARAPLUESADEE *et al.*, 2005) e na Indonésia (SENDOW *et al.*, 2006).

Além dos vírus Hendra e Nipah, outros paramixovírus foram encontrados em morcegos. No entanto, seu impacto na saúde humana e animal são menores.

No ano de 1997, a diminuição da taxa de prenhez e do tamanho da leitegada foram constatadas em porcas de Nova Gales do Sul, na Austrália. Houve um aumento do número de leitões mumificados, natimortos e com deformações. Nos animais natimortos foram constatadas severas degenerações no sistema nervoso central e alguns apresentavam miocardite. Posteriormente, um novo vírus, nomeado Menangle Virus (MeV), foi isolado dos leitões infectados (PHILBEY *et al.*, 1998). Das 251 pessoas que tiveram contato com os suínos das granjas, apenas duas eram soropositivas para o novo vírus. Os dois pacientes infectados desenvolveram uma doença febril, dor de cabeça, mal - estar, mialgia e erupções cutâneas, sem sequelas a longo prazo (CHANT *et al.*, 1998). Uma vez que a origem da infecção do MeV para os suínos era desconhecida, a presença de duas colônias maternidade de espécies de pteropodídeos a 200 m da granja afetada levantou a suspeita desses animais serem uma potencial fonte de infecção. Uma investigação foi realizada e constatada soropositividade para MeV nas espécies *Pteropus policephalus* e *Pteropus alecto*. Com isso, a hipótese dos pteropodídeos serem a fonte primária do vírus foi suportada (PHILBEY *et al.*, 1998).

Com o aumento da vigilância para os vírus associados a morcegos no Sudeste Asiático, o vírus Tioman foi descoberto. Esse vírus foi considerado um novo paramixovírus, isolado da urina do pteropodídeo *Pteropus hypomelanus*, na Malásia. Com base nas análises genômicas, esse vírus foi classificado no gênero *Rubulavirus*. Infecções humanas ocasionadas pelo vírus Tioman não foram relatadas (CHUA *et al.*, 2001; CHUA *et al.*, 2002).

Por fim, um outro vírus classificado no gênero *Henipavirus* foi descoberto na Austrália e nomeado Cedar vírus. Esse vírus foi isolado em células de cultivo primário de rins do morcego *P. alecto*, a partir de amostras de urina oriundas da mesma espécie (MARSH *et al.*, 2012).

2.3. Filovírus

Filovírus estão associados a uma doença aguda hemorrágica fatal em humanos e/ou primatas não-humanos.

A família *Filoviridae*, inserida na ordem *Mononegavirales*, compreende dois gêneros: *Marburgvirus* e *Ebolavirus*, que são vírus envelopados, com diâmetro de aproximadamente 80 nm, pleomórficos, cujos víriões podem aparecer em diversas formas, que incluem por vezes, filamentos longos ramificados, bem como filamentos mais curtos em forma de “6” e “U”, ou circular. O genoma é constituído de uma molécula de RNA fita simples, com polaridade negativa e comprimento de 19 kb, onde são codificadas sete proteínas: polimerase, glicoproteína, nucleoproteína e quatro proteínas estruturais (KUHN *et al.*, 2011).

O vírus Marburg (MARV) foi identificado pela primeira vez em 1967 durante uma epidemia hemorrágica na Alemanha e na antiga Iugoslávia, após a importação de macacos infectados provenientes de Uganda (LEROY *et al.*, 2005). As cinco linhagens conhecidas do MARV foram classificadas como sendo composta por dois vírus, RAVN e MARV (PAUL *et al.*, 1970).

O vírus Ebola (EBOV) foi identificado pela primeira vez na província Equatorial Ocidental do Sudão, em 1976. O gênero *Ebolavirus* é composto por cinco espécies distintas: *Tai forest ebolavirus*, *Sudan ebolavirus*, *Zaire ebolavirus*, *Reston ebolavirus* e *Bundibugyo ebolavirus* (ICTV, 2014).

Ambos os gêneros *Marburgvirus* e *Ebolavirus* são endêmicos da África, exceto a espécie *Reston ebolavirus*, que foi identificada nos Estados Unidos, na cidade de Reston, em primatas que foram importados das Filipinas (BARRETE *et al.*, 2009).

O surto mais recente causado pelo EBOV começou em março de 2014, atingindo vários países da África Ocidental, como Guiné, Libéria e Serra Leoa. Foi considerado o pior surto de Ebola da história e a Organização Mundial da Saúde só declarou o fim dessa epidemia em janeiro de 2016, totalizando 27.000 casos da doença, com 11.000 mortes (CDC, 2016).

Através da análise filogenética completa do vírus responsável pelo último surto, obtidas de amostras de sangue de pacientes infectados, confirmaram que forma um grupo separado dos EBOV caracterizados na Guiné. Porém, em relação à cepa do *Zaire ebolavirus*, apresentou 97% de identidade de nucleotídeo, sugerindo que esse vírus pode ter evoluído em paralelo com diferentes cepas (BAIZE *et al.*, 2014).

Infecções humanas causadas por filovírus ocorrem tipicamente em surtos devido à transmissão interpessoal e nosocomial, sendo que a taxa de mortalidade pode chegar até 90% (POURRUT *et al.*, 2005). Infecções humanas primárias, geralmente, são resultantes do contato com primatas, uma vez que a infecção por filovírus os faz adoecerem, ou até mesmo irem a óbito. No entanto, os primatas não são considerados o reservatório de filovírus na natureza, uma vez que não sobrevivem à infecção. Estudos virológicos e epidemiológicos sugeriram que os surtos regulares de infecção por filovírus em humanos, não acontece como resultado de transmissão interespecie, e sim, devido ao contato indireto com uma fonte animal ou ambiental (POURRUT *et al.*, 2005).

Evidências que morcegos estariam associados na cadeia de transmissão dos filovírus, surgiram após um estudo feito por Swanepoel *et al.* (1996), na qual espécies de vertebrados (entre eles os morcegos) e plantas, foram experimentalmente inoculados com EBOV e demonstraram que tanto os morcegos frugívoros, quanto os insetívoros podem replicar e disseminar esse vírus.

Com isso, os morcegos viraram alvo de diversas pesquisas, que os relacionam como prováveis potenciais reservatórios do EBOV. Um estudo realizado por Pourrut *et al.* (2005) revelaram a presença de anticorpos específicos da espécie *Zaire ebolavirus* em seis espécies de morcegos capturadas (*Epomops franqueti*, *Hypsignathus monstrosus*, *Myonycteris torquata*, *Micropteropus pussillus*, *Mops condylurus* e *Rousettus aegyptiacus*). Durante o surto de febre hemorrágica ocorrido entre 2001 e 2003, no Gabão e na República do Congo, espécies de filovírus foram detectadas em três espécies de morcegos frugívoros: *H. monstrosus*, *E. franqueti* e *M. torquata* (LEROY *et al.*, 2005). A circulação de filovírus nessas espécies de morcegos reforça os resultados obtidos previamente, onde amostras foram coletadas na mesma região, devido a um surto de MARV. O surto ocasionado pelo MARV acometeu trabalhadores de uma mina na República do Congo, onde um grande número de morcegos estava presente. Distintas linhagens de MARV foram detectadas em morcegos frugívoros (*R. aegyptiacus*) e insetívoros (*Rhinolophus eloquens* e *Miniopterus inflatus*) (SWANEPOEL *et al.*, 2007).

Devido a associação dos morcegos serem potenciais reservatórios de filovírus, estudos vêm sendo realizados, relatando a presença de filovírus nesses animais (BIEK *et al.*, 2006; TOWNER *et al.*, 2007, 2009; HAYMAN *et al.*, 2010). Embora a presença do EBOV tenha sido relatada em morcegos, na forma de anticorpos e ácidos nucléicos, o vírus nunca foi isolado diretamente deles e nem de qualquer outro animal. Devido ao isolamento do MARV, a partir de morcegos frugívoros, fortalece a suposição dos morcegos serem potenciais candidatos a reservatório do EBOV (TOWNER *et al.*, 2009). De acordo com essa hipótese, Muyembe-Tamfum *et al.* (2012) propuseram que a transmissão do vírus pelo morcego, poderia ser diretamente aos humanos e primatas, ou até mesmo um outro vetor desconhecido.

Recentemente, um novo gênero para a família *Filoviridae* foi proposto por Negredo *et al.* (2011). O vírus foi descoberto durante uma investigação em carcaças de morcegos, coletadas no solo de uma caverna em Astúrias, Espanha. O vírus foi nomeado Cueva vírus e foi detectado nas amostras de *Miniopterus schreibersii*. Estudos patológicos feitos a partir dessas carcaças coletadas, revelaram que esse vírus é patogênico aos morcegos, diferentemente do MARV e EBOV (NEGREDO *et al.*, 2011). De acordo com o resultado da caracterização do Cueva vírus, eles são mais relacionados com o EBOV do que com o MARV (MARUYAMA *et al.*, 2013). Análises filogenéticas sugerem que o Cueva vírus e o EBOV tenham o mesmo ancestral comum (NEGREDO *et al.*, 2011).

2.4. Coronavírus

Coronavírus pertence à ordem *Nidovirales* e família *Coronaviridae*, a qual possui duas subfamílias, *Torovirinae* e *Coronavirinae*. A subfamília *Coronavirinae* é composta pelos gêneros *Alphacoronavirus* e *Betacoronavirus*, cujos membros infectam mamíferos; e *Gammacoronavirus* e *Deltacoronavirus*, os quais infectam tanto aves quanto mamíferos (WOO *et al.*, 2012). São vírus envelopados, pleomórficos e com diâmetro que pode variar de 80 a 120 nm. O genoma é composto por uma molécula de RNA de cadeia simples, polaridade positiva, com aproximadamente 32 kb, contendo de 7 a 14 ORFs, das quais, seis codificam o complexo polimerase, a proteína do envelope, a glicoproteína spike, glicoproteína de membrana e a proteína do nucleocapsídeo (POON *et al.*, 2005).

Os coronavírus tornaram-se o foco de pesquisas desde a primeira epidemia global provocada pela Síndrome Respiratória Severa Aguda (SARS), causada pelo SARS-CoV, o qual foi inserido no gênero *Betacoronavirus*. Coronavírus são conhecidos por terem diversos hospedeiros animais, que variam de mamíferos a espécies de aves. Infecções por coronavírus

humano antes do surto de SARS eram relacionadas apenas aos coronavírus humanos 229E e NL43, o que geralmente provocavam resfriado comum (CHU *et al.*, 2009).

Os primeiros casos de SARS ocorreram no final do ano de 2002 na Província Chinesa de Guangdong. O surto acometeu, ao todo, 8.098 pessoas em todo o mundo, e destas, 774 foram a óbito. O primeiro caso confirmado de SARS foi de um chefe de cozinha que trabalhava em um restaurante local que teve contato prévio com animais silvestres (ZHONG *et al.*, 2003). O surgimento de uma nova infecção viral, juntamente com o histórico de contato com animais silvestres, induziu a busca por um animal reservatório do SARS-CoV. Um mercado de varejo de animais vivos, na região dos surtos, foi investigado e evidências de infecções foram encontradas em civetas (*Paguma larvata*) e em menor grau nas espécies de furão-texugo chinês (*Melogale moschata*) e cão-guaxinim (*Nyctereutes procyonoides*) (GUAN *et al.*, 2003). Evidências posteriores de transmissão zoonótica do SARS-CoV vieram a partir de estudos que mostraram que comerciantes de animais silvestres e funcionários de abatedouros tinham uma maior soroprevalência (20-45%) contra o SARS-CoV do que os comerciantes de vegetais e a população controle (0-5%) (GUAN *et al.*, 2003).

Um recente estudo mostrou que o contato com animais silvestres comercializados pode resultar em uma infecção assintomática com o SARS-CoV, mas que o indivíduo poderia ainda ter a antigenemia do coronavírus detectável e soroconversão. Restrições quanto à venda e consumo de animais silvestres, portanto, tornaram-se importantes medidas de controle durante a epidemia de SARS na China. Em contraste com outros patógenos zoonóticos, que podem cruzar a barreira interespecie para os humanos, o SARS-CoV é notável, na medida em que se espalha facilmente de pessoa para pessoa e, portanto, surtos dentro de instalações hospitalares foi uma característica proeminente durante a epidemia de SARS, com um quinto de todos os casos globais sendo de profissionais da área da saúde (WHO, 2003). O SARS também é o único entre os coronavírus em que se observa uma ampla gama de hospedeiros (com ou sem o desenvolvimento da doença) tanto humanos, furão-texugo e cão-guaxinim, quanto macaco-cinomoigo (*Macaca fascicularis*), macacos-verdes-africanos (*Cercopithecus atheiops* e *Chlorocebus sabeus*) e macaco-rhesus (*Macaca mulatta*) (MCAULIFFE *et al.*, 2004), furão (*Mustela putorius furo*) e gatos domésticos (*Felis domesticus*) (MARTINA *et al.*, 2003), hamster-sírio (*Mesocricetus auratus*) (ROBERTS *et al.*, 2005), sagui-de-tufo-branco (*Callithrix jacchus*) (GREENOUGH *et al.*, 2005), suínos e frangos (WEINGARTL *et al.*, 2004).

Uma vez que na busca pelo animal reservatório do SARS-CoV as civetas foram relacionadas inicialmente, estudos posteriores não confirmaram uma frequência significativa

de soropositividade e nem mesmo a presença do vírus em alguns casos, entre as civetas de cativeiro e as selvagens, sugerindo, assim, que essa espécie poderia não ser o reservatório primário do SARS-CoV na natureza e sim, um hospedeiro secundário, que por estarem diretamente em contato com humanos, facilitaram essa transmissão (LI *et al.*, 2005).

No ano de 2005, dois diferentes grupos de pesquisadores reportaram a descoberta de um vírus relacionado ao SARS-CoV em morcegos e sugeriram que os mesmos eram o reservatório natural do SARS-CoV (LAU *et al.*, 2005; LI *et al.*, 2005). Esse vírus relacionado ao SARS-CoV foi detectado em morcegos da espécie *Rhinolophus sinicus*, em Hong Kong e, tratava-se de um betacoronavírus (LAU *et al.*, 2005). Desde então, os SARS-CoV relacionados, geneticamente mais diversos, foram encontrados na China, Europa e África, sugerindo uma larga distribuição geográfica e uma origem antiga para esses vírus (REN *et al.*, 2006; TONG *et al.*, 2009; DREXLER *et al.*, 2010; YUAN *et al.*, 2010). Estudos demonstraram que esse vírus encontrado nos morcegos apresentava uma identidade de nucleotídeos entre 87%-92% e uma similaridade de amino ácidos entre 93%-100% com o SARS-CoV (LAU *et al.*, 2005; LI *et al.*, 2005; REN *et al.*, 2006; QUAN *et al.*, 2010; YUAN *et al.*, 2010). No entanto, os isolados encontrados na Europa e África são distantemente relacionados ao SARS-CoV a um nível genômico e possivelmente representam novas espécies de coronavírus (TONG *et al.*, 2009; DREXLER *et al.*, 2010; QUAN *et al.*, 2010). Com isso, foi pressuposto que os morcegos poderiam ser o reservatório natural do SARS-CoV, as civetas adquiririam o vírus e assim seria transmitido aos humanos (CHU *et al.*, 2008b).

Nessa busca pelos hospedeiros reservatórios primários do SARS-CoV, um outro novo coronavírus foi detectado em morcegos das espécies *Miniopterus pusillus*, *Miniopterus magnater* e *Miniopterus schreibersii*. Análises filogenéticas demonstraram que esses vírus pertencem ao grupo 1 dos coronavírus, que também inclui os coronavírus humanos 229E e NL63 (POON *et al.*, 2005). Em um outro estudo, seis outros coronavírus foram detectados por RT-PCR em amostras de suabes retais, em diferentes espécies: bat-CoV-HKU2 em *Rhinolophus sinicus*; bat-CoV-HKU4 em *Tylonycteris pachypus*; bat-CoV-HKU5 em *Pipistrellus abramos*; bat-CoV-HKU6 em *Myotis ricketti*; bat-CoV-HKU7 em *Miniopterus magnater* e bat-CoV-HKU8 em *Miniopterus pusillus* (WOO *et al.*, 2006). Essa associação do coronavírus com os morcegos também foi confirmada em outro estudo, onde foi documentada a presença de SARS-CoV relacionados em morcegos de duas províncias chinesas (LI *et al.*, 2005).

Em 2012, uma doença cujos sintomas são pneumonia aguda e subsequentemente insuficiência renal, similares aos provocados pelo SARS, surgiu na Arábia Saudita. Um novo coronavírus humano, chamado de Síndrome Respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV) foi suspeito de ser o responsável por essa doença fatal (ZAKI *et al.*, 2012). Desde o início do surto de MERS-CoV, até o momento, foram reportados 1.696 casos com 605 óbitos (WHO, 2016).

Análises filogenéticas mostraram que o MERS-CoV pertence ao gênero *Betacoronavirus* e, assim, filogeneticamente relacionado ao SARS-CoV (VAN BOHEEMEN *et al.*, 2012). Ao que tudo indica, o reservatório intermediário desse vírus seriam os dromedários, uma vez que estudos epidemiológicos feitos por Memish *et al.* (2013) demonstraram a presença de um betacoronavírus com 100% de identidade de nucleotídeos ao MERS-CoV em amostras de fezes da espécie *Taphozous perforatus*, na Arábia Saudita. De acordo com esse trabalho, é provável que os principais reservatórios do MERS-CoV também sejam os morcegos, assim como no SARS-CoV.

A partir dos surtos de infecções causadas pelo SARS-CoV, pelo menos 30 coronavírus, até então, desconhecidos, foram encontrados em diversos reservatórios animais, compreendendo os quatro gêneros da subfamília *Coronaviridae* (WOO *et al.*, 2012). O fato dos morcegos estarem relacionados com a maioria das novas descobertas de coronavírus os tornam prováveis fontes de introdução para outras espécies. Com isso, provavelmente os morcegos desempenham um importante papel na co-evolução desses micro organismos (CHU *et al.*, 2008).

No Brasil, alguns estudos já evidenciaram a presença de coronavírus em amostras de morcegos de diferentes espécies (BRANDÃO *et al.*, 2008; GOES *et al.*, 2013; LIMA *et al.*, 2013a; SIMAS *et al.*, 2015).

2.5. Lyssavírus relacionados ao vírus da Raiva

A presença de lyssavírus relacionados ao vírus da raiva (RRVs) circulam entre os morcegos do Hemisfério Oriental, e podem causar uma doença idêntica à raiva em humanos e animais domésticos (WONG *et al.*, 2007).

O vírus da raiva e os lyssavírus relacionados ao vírus da raiva pertencem à ordem *Mononegavirales*, família *Rhabdoviridae* e gênero *Lyssavirus*. Morfológicamente, esses vírus têm a forma de um projétil, são envelopados, com espículas em toda a superfície do envelope, com exceção da região plana. O diâmetro da partícula viral varia de 45 a 100 nm. O genoma é

constituído por uma molécula única de RNA não segmentado, de polaridade negativa. O tamanho do genoma é de aproximadamente 12 kb e codifica cinco proteínas: nucleoproteína, fosfoproteína, polimerase, proteína da matriz e glicoproteína (FAUQUET *et al.*, 2004).

O gênero *Lyssavirus* é composto por 14 espécies: *Rabies virus* (RABV), *Lagos bat virus* (LBV), *Mokola virus* (MOKV), *Duvenhage virus* (DUVV), *European bat lyssavirus 1* (EBLV 1), *European bat lyssavirus 2* (EBLV 2), *Australian bat lyssavirus* (ABLV), *Aravan virus* (ARV), *Khujand virus* (KHUV), *Irkut virus* (IRKV), *West Caucasian bat virus* (WCBV), *Ikoma lyssavirus* (IKLV), *Shimoni bat virus* (SHBV) e *Bokeloh bat lyssavirus* (BBL) (ICTV, 2014). Com a exceção do vírus Mokola, todas outras espécies podem ser encontradas em morcegos (WONG *et al.*, 2007).

RRVs podem causar uma doença neurológica idêntica à raiva. Casos clínicos têm sido reportados por LBV, DUVV, EBLV1, EBLV 2, ABLV, MOKV e IRKV em humanos e animais domésticos; IKLV foi detectado no cérebro de uma civeta Africana (*Civettictis civetta*) com sinais neurológicos (MARSTON *et al.*, 2012); SHBV, ARV, KHUV, BBL e WCBV foram encontrados, até o momento, somente em morcegos, mas podem vir a ser patogênicos para outras espécies. O MOKV foi detectado em mussaranhos (*Crocidura* sp.), roedores silvestres (*Lophuromys sikapusi*), cães e gatos domésticos, mas não em morcegos, e seu hospedeiro reservatório ainda é incerto, assim como o hospedeiro do IKLV (KEMP *et al.*, 1972; LE GONIDEC *et al.*, 1978; SALUZZO *et al.*, 1984; SABETA *et al.*, 2007).

A susceptibilidade de outras espécies de mamíferos com os RRVs não é completamente compreendida. Assim como o vírus da raiva, eles podem vir a ser capazes de infectar todos os mamíferos. Em 2012, uma doença neurológica fatal foi relatada em gatos, cães e um mangusto (*Atilax paludinosus*) infectados com o LBV (MARKOTTER *et al.*, 2006); cães e gatos infectados com o MOKV; gatos, ovelhas e uma marta com EBLV 1 (RONSHOLT, 2002; MÜLLER *et al.*, 2004; DACHEUX *et al.*, 2008); e uma civeta Africana infectada com IKLV (MARSTON *et al.*, 2012). Infecções experimentais com o EBLV 1 foram estabelecidas em ratos, ovelhas, raposas, furões, cães e gatos (VOS *et al.*, 2007). É provável que os animais domesticados também sejam afetados por outros lyssavírus, tais como o DUVV, o qual causou uma doença fatal em humanos (PAWESKA *et al.*, 2006). Todas as variantes da raiva são consideradas zoonóticas. Casos clínicos também têm sido reportados por DUVV, EBLV 1, EBLV 2, ABLV, MOKV e IRKV. Humanos são possivelmente susceptíveis a outros RRVs (PAWESKA *et al.*, 2006; MARKOTTER *et al.*, 2006a; MARKOTTER *et al.*, 2006b).

Como dito anteriormente, os RRVs foram relatados somente no Hemisfério Oriental e a informação da distribuição de cada vírus dentro dessa área é muito limitada. Na Europa, ocorrem EBLV 1, EBLV 2 e o BBL, IRKV e WCBV foram detectados na Rússia (MÜLLER *et al.*, 2007). Anticorpos contra o WCBV também foram encontrados na África, sugerindo que ele, ou um vírus relacionado a ele pode ter circulado naquela região (KUZMIN *et al.*, 2003). Os vírus que têm sido reportados somente na África incluem o DUVV, LBV, MOKV, SHBV e IKLV (JOHNSON *et al.*, 2010). O ABLV parece ser limitado à Austrália, mas anticorpos neutralizantes para este ou um vírus relacionado foram encontrados entre os morcegos nas Filipinas. RRVs não foram detectados na Américas, em que o vírus da raiva clássica é comum entre os morcegos. A presença de RRVs não previne um país de ser listado como livre de raiva (CALISHER & ELLISON, 2012).

Há pouca informação sobre a transmissão dos RRVs, embora provavelmente seja semelhante à raiva (CALISHER & ELLISON, 2012). Infecções por esses vírus têm sido relatados após mordidas, arranhões ou contato próximo com morcegos. Morcegos inoculados com ARV, KHUV e IRKV eliminaram o vírus na saliva pouco antes dos sinais clínicos se desenvolverem (HUGHES *et al.*, 2006). Em um experimento, não houve evidência de transmissão de morcegos inoculados para morcegos não inoculados mantidos na mesma gaiola (CLIQUET *et al.*, 2009). Informações sobre RRVs são limitadas a poucos casos e alguns relatos de inoculação experimental. Nos relatos de caso, esses vírus causaram uma doença neurológica fatal em vários animais silvestres e domésticos. Várias rotas de inoculação, incluindo intracerebral, intravenosa e injeção intramuscular, foram testadas em várias espécies de animais infectados experimentalmente. Alguns animais desenvolveram sinais neurológicos severos e foram a óbito, enquanto outros apresentaram-se assintomáticos ou com sinais clínicos mais leves, e sobreviveram. Esses casos considerados mais leves podem ter sido resultantes do uso de cepas virais menos virulentas. Imunidade pré-existente pode ter contribuído para a sobrevivência dos morcegos capturados no ambiente natural. A ocorrência de portadores de RRVs saudáveis entre os morcegos é controversa, uma vez que existe apenas um relato de morcegos aparentemente saudáveis dispersando EBLV 1 (CALISHER & ELLISON, 2012).

Embora alguns RRVs sejam comuns entre os morcegos, apenas poucos casos clínicos foram reportados em animais domésticos, porém, todos fatais. Em humanos, apenas algumas infecções com RRVs foram relatadas. Esses pacientes desenvolveram sinais neurológicos, semelhantes à raiva, e quase todos os casos foram fatais (FAMILIUSI *et al.*, 1972; PAWESKA *et al.*, 2006; VAN THIEL *et al.*, 2008). Infecções com RRVs parecem ser raras,

mas podem ser subdiagnosticadas, por serem facilmente confundidas com a raiva. Alguns desses vírus também ocorrem em áreas onde as capacidades de vigilância e de diagnóstico são limitadas.

2.6. Circovírus

Os circovírus são membros da família *Circoviridae*, constituída por vírus não-envelopados, com diâmetro que varia de 17 a 24 nm, capsídeo de simetria icosaédrica, o qual envolve um genoma constituído de uma molécula de fita simples de DNA circular com aproximadamente 2 kb de extensão (FAUQUET & FARGETTE, 2005). Os circovírus são conhecidos por serem os menores vírus capazes de infectar animais (TODD *et al.*, 2005). A família *Circoviridae* é composta por dois gêneros: *Gyrovirus* e *Circovirus*. Os membros da família *Circoviridae* possuem polaridades de genomas distintos, uma vez que os genomas dos circovírus são codificados por dupla polaridade (positivo e negativo) e os gyrovírus por polaridade negativa. Os genomas desses vírus são compostos por duas principais ORFs organizadas inversamente, responsáveis por codificar o gene da proteína iniciadora da replicação, a replicase (*Rep*) e da proteína do capsídeo (*Cap*). Essas ORFs, ainda, são separadas por uma região 3' intergênica entre os códons de terminação e uma região 5' entre os códons de iniciação (NIAGRO *et al.*, 1998; HATTERMANN *et al.*, 2003; TODD *et al.*, 2007; LI *et al.*, 2010a).

O gênero *Gyrovirus* engloba o vírus da anemia das galinhas (CAV) e dois outros vírus recentemente descritos, o gyrovírus aviário tipo 2 (AGV2) e o gyrovírus humano tipo 1 (HGV1) (NOTEBORN *et al.*, 1991; RIJSEWIJK *et al.*, 2011; SAUVAGE *et al.*, 2011; MAGGI *et al.*, 2012). O gênero *Circovirus*, pode infectar tanto aves quanto mamíferos. Espécies de aves incluem galinhas (LI *et al.*, 2011), patos (HATTERMANN *et al.*, 2003), gansos (TODD *et al.*, 2001), cisnes (HALAMI *et al.*, 2008), gaivotas (TODD *et al.*, 2007), pombas (MANKERTZ *et al.*, 2000; TODD *et al.*, 2001), tentilhões (TODD *et al.*, 2007), estorninhos (JOHNE *et al.*, 2006), corvos (STEWART *et al.*, 2006), canários e alguns psitacídeos (NIAGRO *et al.*, 1998). Nos mamíferos, os circovírus suínos tipo 1 e 2 (PCV-1 e PCV-2) foram as primeiras espécies de vírus reconhecidas por replicar nesse grupo, sendo o PCV1 não-patogênico, enquanto que o PCV-2 pode apresentar tanto uma infecção assintomática, quanto causar diversos sinais clínicos, o que pode acarretar em um significativo impacto econômico na suinocultura (ALLAN & ELLIS, 2000; MANKERTZ *et al.*, 2004; OPRIESSNIG *et al.*, 2007; FINTERBUSCH & MANKERTZ, 2009; GRAU-

ROMA *et al.*, 2011). Outros estudos vêm relatando a presença de circovírus em diferentes mamíferos, tais como, cães (KAPOOR *et al.*, 2012; LI *et al.*, 2013), raposas (BEXTON *et al.*, 2015) e martas (LIAN *et al.*, 2014).

Recentemente, um novo gênero foi incluído na família *Circoviridae*, nomeado *Cyclovirus*. Sua descoberta se deu a partir de um estudo realizado com fezes de humanos e chimpanzés feito por LI *et al.* (2010a), onde a presença de pequenos genomas circulares de DNA que continham o gene *Rep* foram detectados. Em comparação aos outros gêneros dos circovírus, os ciclovírus possuem um genoma menor, as proteínas Rep e Cap são menores, além da região intergênica 3' ser mais curta ou ausente e a 5' intergênica maior (LI *et al.*, 2010a). Esses genomas encontrados se assemelham aos circovírus, mas são filogeneticamente diferentes dos encontrados em aves e suínos (GE *et al.*, 2011), além de formarem um grupo distinto (DELWART & LI, 2011).

Em um estudo molecular realizado por LI *et al.* (2010a), direcionado à região da proteína replicase, a qual é a mais conservada entre os circos e ciclovírus, detectaram a presença desses vírus em distintas amostras, tais como: fezes humanas provenientes do Afeganistão, Nigéria, Tunísia e Paquistão; fezes de chimpanzés coletadas em diferentes países africanos e carnes provenientes de supermercados dos Estados Unidos (suína), Paquistão (bovina e caprina) e Nigéria (bovina, ovina, frango e camelo). Outros estudos também relataram a presença de circovírus em trato respiratório humano (WILLNER *et al.*, 2009), fezes de roedores (PHAN *et al.*, 2011), invertebrados, como corais (VEGA-THURBER *et al.*, 2008) e libélula (ROSARIO *et al.*, 2011), além de órgãos de peixes (LORINEZ *et al.*, 2011), sargaço (ROSARIO *et al.*, 2009), água do mar (CULLEY *et al.*, 2006; ROSARIO *et al.*, 2009), estuários (MC DANIEL *et al.*, 2008; ROSARIO *et al.*, 2009), lago Antártico (LOPEZ-BUENO *et al.*, 2009) e solo de plantação de arroz (KIM *et al.*, 2008).

Em morcegos, diversos estudos vêm apontando a presença de circovírus e ciclovírus. Na maioria deles, as detecções provêm de amostras de fezes (guano) em morcegos insectívoros (LI *et al.*, 2010b; GE *et al.*, 2011; GE *et al.*, 2012a,b; LIMA *et al.*, 2015a), porém, amostras de suabes orofaríngeos e retais (WU *et al.*, 2012; LIMA *et al.*, 2015b; WU *et al.*, 2015), assim como órgãos (LI *et al.*, 2011; HE *et al.*, 2013) também apontaram a presença desses vírus. A análise filogenética realizada com sequências de ciclovírus resultantes do estudo feito por Ge *et al.* (2011) formaram um novo clado na família *Circoviridae*, distinto de sequências obtidas de morcegos, aves e suínos provenientes de uma mesma região geográfica. Essas sequências se agruparam filogeneticamente fora do clado do gênero *Cyclovirus*.

2.7. Astrovírus

Os astrovírus pertencem à família *Astroviridae*, que é composta por pequenos vírus não envelopados de RNA fita simples de sentido positivo com aproximadamente 28-30 nm de diâmetro (FAUQUET *et al.*, 2005). O comprimento do genoma varia de 6,8 a 7,9 kb contendo uma região 5' não traduzida (UTR), seguida por três ORFs (*Open Reading Frames*), uma 3' UTR e uma cauda 3' poli A (MÉNDEZ & ARIAS, 2007). Duas ORFs localizadas na região 5' do genoma (ORF1a e ORF1b) codificam proteínas não estruturais (protease e a RNA polimerase RNA-dependente), enquanto a ORF2, que se localiza na região 3' do genoma viral, codifica a proteína do capsídeo (MÉNDEZ & ARIAS, 2007). A sequência dessas estruturas varia de acordo com a espécie e o sorotipo. A ORF1b parece ser a região menos divergente entre as espécies, enquanto a ORF2 é a que apresenta maior divergência entre as ORFs (STRAIN *et al.*, 2008), sendo isso um fenômeno já esperado, porque a região responsável por codificar a proteína do capsídeo está mais susceptível à pressão seletiva comparada à região que codifica proteínas não estruturais (BENEDICTIS, 2011).

O primeiro caso de astrovírus ocorreu em humanos no ano de 1975, em amostras oriundas de crianças com diarreia (MADELEY & COSGROVE, 1975; MATSUI & GREENBERG, 1996). Após esse primeiro relato, diversas espécies de animais domésticos foram descritos como hospedeiros de partículas virais de astrovírus. O primeiro relato de animais infectados ocorreu em cordeiros e bezerros sofrendo com sintomas de diarréia (SNODGRASS & GRAY, 1977; WOODE & BRIDGER, 1978). Até os dias de hoje, a lista de animais susceptíveis à infecção pelo astrovírus tem se expandido, incluindo animais domésticos, sinantrópicos e animais silvestres, espécies de aves e mamíferos terrestres e aquáticos, encontrados ao redor do mundo (KOCI & SCHULTZ-CHERRY, 2002; TOFFAN *et al.*, 2009; RIVERA *et al.*, 2010; BENEDICTIS, 2011).

Os astrovírus são divididos em dois gêneros, sendo denominados de *Mamastrovirus* (MAstVs) e *Avastrovirus* (AAstVs), os quais têm como hospedeiros os mamíferos e as aves, respectivamente (MÉNDEZ & ARIAS, 2007). A família *Mamastrovirus* compreende 19 espécies de vírus. Destas, sete espécies são astrovírus de morcegos, classificadas como: *Mamastrovirus 12*, *Mamastrovirus 14*, *Mamastrovirus 15*, *Mamastrovirus 16*, *Mamastrovirus 17*, *Mamastrovirus 18* e *Mamastrovirus 19* (ICTV, 2014).

Os astrovírus são conhecidos por causarem diarreia em crianças e em animais e são associados também à gastroenterites (SNODGRASS & GRAY, 1977; REYNOLDS & SAIF, 1986; SHIMIZU *et al.*, 1990; HERRMANN *et al.*, 1991). No entanto, a correlação ecológica

entre astrovírus humanos e outras espécies não está bem estabelecida, apesar da origem zoonótica do patógeno.

A maioria dos estudos de vigilância dos astrovírus são focados para humanos e animais domésticos e pouco se sabia sobre a prevalência desses vírus em animais silvestres (CHU *et al.*, 2008). A diversidade genética dos *Mamastrovirus* aumentou muito após o primeiro relato de astrovírus em morcegos e das novas técnicas de sequenciamento. A lista de espécies anterior a isso era composta de apenas seis espécies e aumentou para 19.

O primeiro caso de astrovírus em morcegos foi reportado no ano de 2008, em Hong Kong em espécies de morcegos insetívoros (CHU *et al.*, 2008). Após esse primeiro relato, poucos estudos apontaram os morcegos como hospedeiros naturais de astrovírus na Ásia (CHU *et al.*, 2009; ZHU *et al.*, 2009; XIAO *et al.*, 2011; HE *et al.*, 2013), América do Norte (LI *et al.*, 2010b) e Europa (DREXLER *et al.*, 2011; KEMENESI *et al.*, 2014a,b; DUFKOVA *et al.*, 2015). Astrovírus parecem ser altamente prevalentes em morcegos sem causar qualquer manifestação clínica (BENEDICTIS *et al.*, 2011). Análises filogenéticas de sequências parciais das ORFs revelaram que os astrovírus encontrados nos morcegos não são apenas divergentes dos astrovírus de humanos e de animais previamente descritos, mas também demonstram uma notável diversidade entre si (XIAO *et al.*, 2012). Com base na análise da região do capsídeo, os astrovírus de morcegos se agrupam junto com os de ovinos, minks e novos astrovírus humanos (BOSH *et al.*, 2011). Dessa maneira, sugere-se a indagação da possibilidade da recombinação entre astrovírus humano e animal, levando à doença em humanos e um risco zoonótico potencial (BENEDICTIS *et al.*, 2011). Recentes estudos realizados com outros mamíferos levantam a hipótese de esses vírus terem um ancestral comum ou terem participação em um evento de transmissão zoonótica (RIVERA *et al.*, 2010; ULLOA & GUTIERREZ, 2010).

3. ARTIGO CIENTÍFICO

Os resultados, bem como os materiais e métodos empregados para a realização dos experimentos que compõem esta dissertação, serão apresentados a seguir na forma de artigo científico, como segue:

1- Detection of astroviruses, coronaviruses and circoviruses from bats in Southern Brazil.

Manuscrito a ser submetido a publicação no periódico *Virus genes*.

3.1. Detection of astroviruses, coronaviruses and circoviruses from bats in Southern Brazil

Priscilla M. Dupont¹, Carine K. Souza¹, Matheus N. Weber¹, Mariana S. da Silva¹, Ana Cristina S. Mósena¹, Renata F. Budaszewski¹, Samuel Paulo Cibulski¹, Julio A. Rosa² and Cláudio W. Canal^{1*}

1 – Laboratório de Virologia, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9090, Porto Alegre, CEP: 91540-000, Rio Grande do Sul, Brazil.

2 – Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF), Estrada Municipal do Conde, 6000, Eldorado do Sul, CEP: 92990-000, Rio Grande do Sul (RS), Brazil.

* Corresponding author: Canal, C. W., Laboratório de Virologia, Faculdade de Veterinária (FAVET), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves, 9090, Porto Alegre, Zip code 91540-000, Rio Grande do Sul (RS), Brazil. Tel +55 51 3308 6926 E-mail: claudio.canal@ufrgs.br

Abstract

Many bat species are recognized as natural reservoirs of several viral families and this feature gives them an important role in the transmission and maintenance of these microorganisms. Due to climate changes and fragmentation of natural habitats, these animals seek shelter and food alternatives and thus become increasingly exposed to anthropic environments. This work aimed to detect fragments of the genome of astrovirus, coronavirus, circovirus and rabies-related virus in bats from Southern Brazil. The animals were submitted to official laboratory for rabies diagnosis routine when organs were collect. Negative rabies samples were pooled in 108 bats samples and further analysed to detect the presence of viruses by PCR or RT-PCR and nucleotide sequencing. Twenty five of these samples were positive for astrovirus, six for coronavirus and ten for circovirus. All samples were negative for rabies-related virus. Phylogenetic analysis revealed that the partial sequences of circoviruses clustered with the genus *Circovirus* and *Cyclovirus*, astroviruses with *Mamastrovirus* and coronaviruses with *Alphacoronavirus*. Our results demonstrate the presence of these viruses among different bat species from Southern Brazil.

Keywords: Chiroptera, bat viruses, coronavirus, cyclovirus and astrovirus

Introduction

Bats have been related to natural reservoirs of several important emerging viruses [1]. Bat diversity and their biological and ecological features can contribute to host a large number of important infectious agents, as viruses. Their unique characteristics, like the ancient evolutionary origins, the only flying mammals, the high size of the colonies, some species torpor, the gregarious habits and the population densities can favor them to host a diversity of viruses and facilitate their dissemination [1, 2, 3, 4, 5]. The distinct roosts that they can habit, ranging from natural to man-made structures, make them closer to humans, domestic animals and livestock [6].

Several DNA viruses, including circoviruses [7], adenoviruses and papillomaviruses [8], parvoviruses [9] and herpesviruses [10] have been detected in a number of bat species, although their pathogenic and potential zoonotic role are still unclear. However, is becoming clearer that bats are natural hosts of emerging zoonotic viruses such as SARS coronavirus (Severe Acute Respiratory Syndrome) [11], Ebola and Marburg hemorrhagic fever [12, 13] and Nipah and Hendra paramyxoviruses [14, 15, 16]. The emergence of these new zoonotic pathogens have been linked to environmental changes, the antropism, viral evolution and also the improvement of the technology to detect these viruses [3].

In Brazil, it is well documented the detection of rabies virus in bats [17, 18, 19], though there are few studies about others emerging bat viruses [20 - 25]. So, considering the environmental role of bats and the limited information about bat viruses in Brazil, it is important to study which viruses are present in bat species in our country. The aim of this study was to detect astroviruses (AstV), coronaviruses (CoV), circoviruses (CV) and rabies-related viruses (RRVs) in bat organs samples in order to assess phylogenetic characterization of viruses in bat species from Rio Grande do Sul state.

Materials and Methods

Bat samples

The samples were collected between 2008 and 2015 from bats that were submitted to IPVDF/FEPAGRO (Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor/ Fundação de Pesquisa Agropecuária) for rabies diagnosis routine by the DFA (Direct Fluorescent Antibody) technique, as part of the National Rabies Surveillance Program. Bats samples included 20 species belonged to four families (Table 1) from 39 locations (Figure 1). All experiments were performed in compliance with the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (European Treaty Series-No. 170 revised 2005) and the procedures of the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA). All the samples used in this study were negative for classical rabies virus. The organs of each bat (heart, intestine, kidney, liver, lung, spleen, stomach and brain from 15 bats) were pooled and 0.5 g were macerated with sterile sand, added 5 mL of Phosphate Buffer Saline (PBS) pH 7.2, centrifuged at 10,000 X g for 10 min, the supernatant collected and stored at -80°C.

Table 1 Family and scientific name of bat samples.

Family	Scientific name	N° of individuals	Family	Scientific name	N° of individuals
Noctilionidae	<i>Noctilio leporinus</i>	1	Vespertilionidae	<i>Lasiurus ega</i>	1
Phyllostomidae	<i>Artibeus fimbriatus</i>	2		<i>Myotis nigricans</i>	2
	<i>Carollia perspicillata</i>	1		<i>Myotis ruber</i>	1
	<i>Desmodus rotundus</i>	2	Molossidae	<i>Cynomops planirostris</i>	1
	<i>Glossophaga soricina</i>	2		<i>Eumops patagonicus</i>	8
	<i>Sturnira lilium</i>	2		<i>Molossus currentium</i>	1
Vespertilionidae	<i>Eptesicus diminutus</i>	1		<i>Molossus molossus</i>	22
	<i>Eptesicus furinalis</i>	1		<i>Molossus rufus</i>	9
	<i>Histiotus velatus</i>	1		<i>Promops nasutus</i>	3
	<i>Lasiurus cinereus</i>	1		<i>Tadarida brasiliensis</i>	46

PCR detection and sequencing

DNA was isolated from 100 μ L of each sample using NewGene Preamp kit (NewGene®, Simbios Biotecnologia, Cachoeirinha, RS, Brazil) following the manufacturer's recommendations. RNA was extracted from 250 μ L of each sample using TRIzol® LS Reagent (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The cDNA were synthesized with SuperScript® III Reverse Transcriptase Kit (Life Technologies) using Exo-Resistant Random Primer (Life Technologies) in a total volume of 20 μ L, as recommended by the manufacturer. The amplification of the genes fragments of AstV, CoV, CV and RRV were as previously described (Table 2) in a final volume of 25 μ L in a Veriti 60-well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, USA). Positive controls were included in each reaction for all tested viruses (canine astrovirus RNA, swine circovirus DNA, bovine coronavirus RNA and bat rabiesvirus RNA) and ultrapure water was used as negative control. The amplification products were electrophoresed in 2% agarose gels using 0,1 μ g/mL of Blue Green Loading Dye I (LGC Biotecnologia, Cotia, SP, Brazil) in Tris-acetate buffer-EDTA (1x concentrated) [26]. Visualization was done under UV light and the amplification products were compared with a molecular weight standards scale of 100 bp (Fermentas, Waltham, MA, USA). The positive PCR sample products were purified using the NucleoSpin Extract II Kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany). Both DNA strands were sequenced with BigDye Terminator v.3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems) and products were resolved through capillary electrophoresis with an ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Table 2 Virus tested, their PCR and RT-PCR targets, final amplification product length and reference bibliography.

Virus	Target (gene)	Amplification product (bp)	Reference
Astrovirus	RdRp	422	[27]
Circovirus	Rep	400	[28]
Coronavirus	RdRp	440	[29]
Rabies-related virus	Np	600	[30]

RdRp, RNA-dependent RNA polymerase; Rep, Replicase; Np, Nucleoprotein.

Phylogenetic analysis

The obtained sequences from this study were compared to sequences available in the GenBank nucleotide databases using BLASTn/BLASTx. Sequences edition and alignment were performed by the software Geneious version 8 [31] using CLUSTAL W [32] and Muscle alignment [33] method. Circovirus phylogenetic analysis was inferred by Neighbor-Joining criterion with p-distance substitution model using Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6 Software (MEGA 6) [34]. The robustness of the hypothesis was tested with 1,000 non-parametric bootstrap analyses. The astrovirus and coronavirus phylogenetic trees were constructed with MrBayes v3.2.1 [35] using Bayesian inference with Markov chain Monte Carlo methods of phylogenetic inference. The evolutionary model used was invariable + gamma and the substitution model was Poisson, which was applied for 100,000 generations, sampling 10 trees every 100 generations. Trees were obtained before convergent and stable likelihood values were discarded (i.e., a 5,000 tree burn-in). To compose all the trees, sequences of the same target for each virus were retrieved from Genbank® (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) representing the genus *Circovirus* and *Cyclovirus* for circoviruses, *Mamastrovirus* for astroviruses and *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* and *Deltacoronavirus* for coronaviruses.

Results

From a total of 108 samples analyzed, 25 were positive for astroviruses, ten for circoviruses, six for coronaviruses, being two positive for both, circoviruses and astroviruses and one positive for both coronaviruses and astroviruses. None sample was positive for rabies-related virus. All bat species positive samples are shown in Table 3. Due to the low amount of amplification product in seven samples positive for circovirus, 24 for astrovirus and three for coronavirus, it was not possible to perform sequencing in all the positive samples. Bats positive were from both urban and rural areas with a higher frequency in adults (73.6%) and predominant diet in insectivorous. Sequences detected in the present study used in phylogenetic analyses were named as BtCV-RS1387/9, BtCV-RS177/11 and BtCV-RS1286/11 for circoviruses, BtAstV-RS551/11 for astrovirus and BtCoV-RS328/11, BtCoV-RS169/11 and BtCoV-RS3442/9 for coronaviruses.

Circoviruses' phylogenetic tree was based in the amino acids sequences of partial Rep

genes (Fig. 2). The tree formed two clusters with the genus, *Cyclovirus* and *Circovirus*. Analysis revealed that two out of three samples clustered with the *Cyclovirus* genus, BtCV-RS1387/9 grouped with a sequence from China (JF938080) with 58.3% of identity at amino acid level and BtCV-RS177/11 grouped with a Brazilian sequence (NC025792) with 64.8% of amino acid identity; the other sample (BtCV-RS1286/11) clustered with the *Circovirus* genus, which showed 90% of amino acid identity with a sequence from Brazil (KT783484). The amino acid identity among the samples of the present study were 61.5% for BtCV-RS1387/9 and BtCV-RS177/11, 46.6% for BtCV-RS1387/9 and BtCV-RS1286/11 and 41.8% for BtCV-RS177/11 and BtCV-RS1286/11.

Partial RdRp sequences from astroviruses were used for a phylogenetic tree construction based on the amino acid level (Fig. 3). The sample of the present work clustered with the genus *Mamastrovirus*. The *Mamastrovirus* strains in the tree were subdivided into four groups: Group 1 contained a human and sea lion astroviruses; Group 2 only an astrovirus dolphin strain; Group 3 formed tree clusters, one by different strains of sea lion and human and also an ovine and a bat astrovirus, and the other two contained only astrovirus from bats, representing the families Miniopteridae, Emballonuridae, Hipposideridae, Vespertilionidae and Molossidae; Group 4 contained also a different human astrovirus. Our sample (BtAstV-RS551/11) showed a highest amino acid identity (81%) with a German bat astrovirus (HM368174).

The coronaviruses phylogenetic analysis was constructed with a tree based on amino acids sequences of the RdRp gene (Fig. 4). Phylogenetic analysis evidenced that all bat coronaviruses of the present study clustered with sequences of the genus *Alphacoronavirus*. Two of our samples (BtCoV-RS328/11 and BtCoV-RS169/11) grouped with a sequence from Trinidad and Tobago (EU769558) with a 97.2% and 96% of amino acid identity, respectively; the other sample from the present study (BtCoV-RS3442/9) clustered with a sequence from Brazil (KC886321) with a 98.3% of amino acid identity. The amino acid identity among our samples were 97.6% for BtCoV-RS169/11 and BtCoV-RS328/11, 78% for BtCoV-RS169/11 and BtCoV-RS3442/9 and 78.4% for BtCoV-RS328/11 and BtCoV-RS3442/9.

Discussion

Studies showed the importance of bats as natural hosts of a large variety of

mammalian viruses with a zoonotic potential to human and other animals (i.e., henipaviruses, ebolaviruses, SARS) [1, 6]. In the present study, 108 bats were tested for CV, AstV, CoV and RRVs. Ten samples were positive for CV, 24 for AstV and six for CoV. None samples was positive for rabies-related viruses. Similar findings were already reported by other studies [8, 36]. Although the pathogenic potential of these viruses is not yet clear, the environmental and ecological changes, anthropism, and demographic factors could facilitate the increased transmission rates and also new routes of transmission of these viruses from reservoirs to human and other animal populations [37, 38].

Bat samples from the present study were previously tested for classical rabies by the DFA technique. Since DFA technique can result in false-negative results [39 - 43], makes this technique not reliable. Even all samples were negative by the DFA test, it was attempted to screen RRVs with a set of primers that can detect a variety of RRVs species [30].

In the last years, circoviruses and cycloviruses have been detected and characterized in a range of mammals, insects and also environmental samples, evidencing a high level of diversity among these viruses, although no obvious disease syndrome was related with their presence [7, 25, 28, 44 - 49]. Although most of studies detected bat circoviruses in feaces [7, 24, 44, 50], our study showed the virus presence in bat organs samples which corroborates with previous studies made by Li *et al.* [45], Wu *et al.* [51] and He *et al.* [8], detected by metagenomic approaches and high-throughput sequencing techniques. According to our results, two partial CV sequences (BtCV-RS1387/9 and BtCV-RS177/11) clustered with *Cyclovirus* genus, a newly proposed genus of the *Circoviridae* family [28]. In addition, our study revealed that BtCV-RS1387/9 (*Molossus molossus*) grouped with a Chinese sequence detected in bat feaces [7] and showed 58.3% of amino acid identity. This Chinese bat species belongs to *Myotis* genus, an insectivorous species as well as our bat species (*M. molossus*). BtCV-RS177/11 sample also clustered with a Brazilian sequence, detected in feaces in a bat colony of *M. molossus* and *Tadarida brasiliensis*, from the same state of Brazil of the present study [24]. The distance between the cities is about 20Km, which can suggest that these strains are circulating very close due to displacement of bats. Brazilian, Chinese and our two cycloviruses sequences seems to be closely related, despite the geographical distance. The Chinese and Brazilian samples also showed amino acid similarity between each other and both were found in bat faeces, while we found in bat organs, which intestine was included.

The possibility of contamination from virus sequences of other animals, as insects cannot be excluded, since a cyclovirus bat sequence detected by Ge *et al.* [7] shared 60% amino acid identity with a sequence identified in a dragonfly. In our study, the amino acid

identity between our sequence (BtCV-RS1387/9) and the dragonfly sequence (JX18419) was low. The other partial CV sequence (BtCV-RS1286/11) clustered into the *Circovirus* genus. This sample grouped with another Brazilian sequence, detected in a pharyngeal swab [25] with high amino acid identity. This Brazilian sequence was also from the same state and bat species. In addition, our sequence formed a separated clade with the Brazilian and other Chinese bat sequence (*Rhinolophus ferrumequinum*), that are insectivorous bats. The amino acid identity between our sequence (BtCV-RS1286/11) and the Chinese was 72.5%, while the Brazilian and the Chinese was 75.4%. Lima *et al.* [25] suggested that according to the criteria of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), the newly discovered Brazilian sequence (KT783484) can be considered a new species of the *Circovirus* genus detected in a different bat species and geographically distant from the closest genome recovered in China.

Astroviruses have an important role causing gastroenteritis in human and other animal species [52 - 56]. The genetic diversity of mamastroviruses increased after the first bat astroviruses report and the new generation of sequencing techniques. The list of bat astroviruses expanded from six up to 19 species, with seven species related to bats [57]. In the present study, with the exception of *T. brasiliensis* [44], all the other bat species are reported for the first time as harboring astroviruses. Previous studies also found bat astroviruses in different sources, species and localities, but the majority of the most bat species harboring astroviruses are insectivorous [8, 27, 44, 58, 59, 60, 61, 62]. However it was also reported astroviruses in frugivorous species [60]. The high detection of astroviruses found in many species of insectivorous bats was previously shown in other studies [27, 58, 62, 63], what means that bats can carry many astroviruses species. In the phylogenetic analyses, our sequence (BtAstV-RS551/11) showed a highly amino acid identity (81%) with a German sequence [59]. In the tree, other sequences that clustered close to ours were both from China [27, 58]. These results can highlight that there is no phylogenetic clustering pattern in bat astroviruses among bat species and different geographical regions [58], where a single bat virus from a single habitat could cluster with different groups of astroviruses or a single group of astroviruses could be clustered by different bats from diverse locations. So, the newly diversity of bat astroviruses may provide new speculations about the ecology and evolution of astroviruses and also can elucidate the role of bats as reservoir of viruses that represent a threat to human health [27]. Although the etiology of bat astroviruses is still not understood, the continuous emergence of new mamastroviruses species and their genetic divergence in bats were reported [8].

Since the Asian SARS-CoV outbreak in humans, bat coronaviruses have received more attention and many bat coronavirus have been identified in different bat species worldwide [21, 23, 37, 44, 59, 61, 64 - 68]. In our study, we found six bats positive for coronaviruses in four different species, two insectivorous (*M. molossus* and *T. brasiliensis*) and two nectarivorous (*Glossophaga soricina* and *Sturnira lilium*), which corroborates with other studies that also found bat coronaviruses in the same species as our study [21, 22, 36, 44, 65, 69]. High rates of juvenile and females harboring coronaviruses were already documented [70, 71]. Moreover, young bats and also a significant risk of coronaviruses were identified in pregnant and lactating females [66]. This information corroborates with our findings, where a pregnant and a young bat were also positive for coronaviruses (Table 2), which can also explain the low rate of detection in the several male individuals as part of the study. In the phylogenetic analyses, two out of the three coronavirus sequences (BtCoV-RS328/11 and BtCoV-RS169/11) clustered with a sequence from *G. soricina* from Trinidad and Tobago [65]. The sequence from sample BtCoV-RS328/11 (*T. brasiliensis*) showed more amino acid identity with the sequence from Trinidad e Tobago. Ours sequences (BtCoV-RS328/11 and BtCoV-RS169/11) also formed a clade with a bat coronavirus sequence from Costa Rica [69] and a human coronaviruses from United States of America (USA) [72]. These findings may suggest the closely relationship between human and wild animals, which includes the bats roosts, the growing human invasion and also the destruction of the bat habitat [73]. Our other sample BtCoV-RS 3442/9 clustered with a sequence from Brazil [21] and both species belonged to the same genus, *Molossus*. In the same clade, a sequence from USA [74] also grouped together and the amino acid identity between ours was 92.6%. All coronaviruses found in this study were closely related to alphacoronaviruses.

In conclusion, the present study demonstrated a high diversity of CV, CoV and the first report of AstV found in different bat species from Southern Brazil and also showed that insectivorous, frugivorous and nectarivorous, as well as piscivorous bats could harbor these viruses in high diversity of species and geographic distribution, suggesting that viruses may have related to the environment and coevolved with bats.

Acknowledgements

Financial support was provided by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/Brazil), Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

References

1. C.H. Calisher, J.E. Childs, H.E. Field, K.V. Holmes, T. Schountz, *Clin. Microbiol. Rev.* **19**, 531–545 (2006)
2. C.H. Calisher, K.V. Holmes, S.R. Dominguez, T. Schountz, P. Cryan, *Microbe* **3**, 521–528 (2008)
3. L.F. Wang, *Virologica Sinica* **24**, 93-99 (2009)
4. G. Wibbelt, M.S. Moore, T. Schountz, C.C. Voigt, *Bio. Lett.* **6**, 438-440 (2010)
5. L.F. Wang, P.J. Walker, L.L.M. Poon, *Curr. Opin. Virol.* **1**, 649–657 (2011)
6. S. Wong, S. Lau, P. Woo, K.Y. Yuen, *Rev. Med. Virol.* **17**, 67–91 (2007)
7. X. Ge, J. Li, C. Peng, L. Wu, X. Yang, Y. Wu, Y. Zhang, Z. Shi Z, *J. Gen. Virol.* **92**, 2646–2653 (2011)
8. B. He, Z. Li, F. Yang, J. Zheng, Y. Feng, H. Guo, Y. Li, Y. Wang, N. Su, F. Zhang, Q. Fan, C. Tu, *Plos One* **8**, 4 (2013)
9. M. Canuti, A.M. Eis-Huebinger, M. Deijis, M. de Vries, J.F. Drexler, S.K. Oppong, M.A. Müller, S.M. Klose, N. Wellinghausen, V.M. Cottontail, E.K.V. Kalko, C. Drosten, L. Van Der Hoek, *Plos One* **6**, 12 (2011)
10. H. Zhang, S. Todd, M. Tachedjian, J.A. Barr, M. Luo, M. Yu, G.A. Marsh, G. Cramer, L.F. Wang, *J. Virol.* **86**, 8014-8030 (2012)
11. X. Ge, J. Li, X. Yang, A.A. Chmura, G. Zhu, J.H. Epstein, J.K. Mazet, B. Hu, W. Zhang, C. Peng, Y. Zhang, C. Luo, B. Tan, N. Wang, Y. Zhu, G. Cramer, S. Zhang, L. Wang, P. Daszak & Z. Shi, *Nature* **503**, 535–538 (2013)
12. E.M. Leroy, B. Kumulungui, X. Pourrut, P. Rouquet, A. Hassanin, P. Yaba, A. Délicat, J.T. Paweska, J.P. Gonzales, R. Swanepoel, *Nature* **438**, 575-576 (2005)
13. J.S. Towner, B.R. Amman, T.K. Sealy, S.A. Carroll, J.A. Comer, A. Kemp, R. Swanepoel, C.D. Paddock, S. Balinandi, M.L. Khristova, P.B.H. Formenty, C.G.

- Albarino, D.M. Miller, Z.D. Reed, J.T. Kayiwa, J.N. Mills, D.L. Cannon, P.W. Greer, E. Byaruhanga, E.C. Farnon, P. Atimmedi, S. Okware, E. Katongole-Mbidde, R. Downing, J.W. Tappero, S.R. Zaki, T.G. Ksiazek, S.T. Nichol, P.E. Rollin, *Plos Pathog.* **5**, 7 (2009)
14. K. Halpin, P.L. Young, H.E. Field, J.S. Mackenzie, *J. Gen. Virol.* **81**, 1927–1932 (2000)
 15. K.B. Chua, C.L. Koh, P.S. Hooi, K.F. Wee, J.H. Khong, B.H. Chua, Y.P. Chan, M.E. Lim, S.K. Lam, *Microb. Infect.* **4**, 145-151 (2002)
 16. J. F. Drexler, V.M. Corman, M.A. Müller, G.D. Maganga, P. Vallo, T. Binger, F. Gloza-Rausch, V.M. Cottontail, A. Rasche, S. Yordanov, A. Seebens, M. Knörnschild, S. Oppong, Y.A. Sarkodie, C. Pongombo, A.N. Lukashev, J. Schmidt-Chanasit, A. Stöcker, A.J.B. Carneiro, S. Erbar, A. Maisner, F. Fronhoffs, R. Buettner, E.K.V. Kalko, T. Kruppa, C.R. Franke, R. Kallies, E.R.N. Yandoko, G. Herrler, C. Reusken, A. Hassanin, D.H. Krüger, S. Matthee, R.G. Ulrich, E.M. Leroy, C. Drosten, *Nat. Commun.* **3**, 796 (2012)
 17. W. Uieda, *J. Public. Health* **32**, 484-485 (1998)
 18. E.S.T. da Rosa, I. Kotait, T.F.S. Barbosa, M.L. Carrieri, P.E. Brandão, A.S. Pinheiro, A.L. Begot, M.Y. Wada, R.C. de Oliveira, E.C. Grisard, M. Ferreira, R.J.S. Lima, L. Montebello, D.B.A. Medeiros, R.C.M. Sousa, G. Bensabath, E.H. Carmo, P.F.C. Vasconcelos, *Emerg. Infect. Dis.* **12**, 8 (2006)
 19. Y. Kobayashi, G. Sato, N. Mochizuki, S. Hirano, T. Itou, A.A.B. Carvalho, A. Albas, H.P. Santos, F.H. Ito, T. Sakai, *BMC Vet. Res.* **4**, 44 (2008)
 20. P.E. Brandão, K. Scheffer, L.Y. Villarreal, S. Achkar, R.N. Oliveira, W.O. Fahl, J.G. Castilho, I. Kotait, L.J. Richtzenhain, *Braz. J. Infect. Dis.* **12** (6), 466-468 (2008)
 21. L.G.B. Goes, S.G. Ruvalcaba, A.A. Campos, L.H. Queiroz, C. Carvalho, J.A. Jerez, E.L. Durigon, L.I.I. Dávalos, S.R. Dominguez, *Emerg. Infect. Dis.* **19**, 10 (2013)
 22. F. E. S. Lima, S.P. Cibulski, F. Elesbao, P. Carnieli Junior, H.B.C.R. Batista, P.M. Roehe, A.C. Franco, *Virus Genes* **47**(2), 378-381 (2013a)
 23. F.E.S. Lima, F.S. Campos, H.C.H. Kumert Filho, H.B.C.R. Batista, P. Carnieli Junior, S.P. Cibulski, F.R. Spilki, P.M. Roehe, A.C. Franco, *Virus Genes* (2013b) doi: 10.1007/s11262-013-0899-x
 24. F.E.S. Lima, S.P. Cibulski, H.F. dos Santos, T.F. Teixeira, A.P.M. Varela, P.M. Roehe, E. Delwart, A.C. Franco, *Plos One* (2015a) doi:10.1371/journal.pone.0118070
 25. F.E.S. Lima, S.P. Cibulski, A.G. Dall Bello, F.Q. Mayer, A.A. Witt, P.M. Roehe, P.A.

- d'Azevedo, Genome Announc. (2015b) doi:10.1128/genomeA.01393-15
26. J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis. *Molecular Cloning*. In: *A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. ed. New York. v. 1 – 3 (1989)
 27. D.K.W. Chu, L.L. Poon, Y. Guan J.S. Peiris, *J. Virol.* **82** (18), 9107–9114 (2008)
 28. L. Li, A. Kapoor, B. Slikas, O.S. Bamidele, C. Wang, S. Shaukat, M.A. Masroor, M.L. Wilson, J-BN. Ndjango, M. Peeters, N.D. Gross-Camp, M.N. Muller, B.H. Hahn, N.D. Wolfe, H. Triki, J. Bartkus, S.Z. Zaidi, E. Delwart, *J. Virol.* **84**, 1674–1682 (2010a)
 29. D.K.W. Chu, Y.H.C. Leung, M. Gilbert, P.H. Joyner, E.M. Ng, T.M. Tse, Y. Guan, J.S.M. Peiris, L.L.M. Poon, *J. Virol.* **85**, 12815–12820 (2011)
 30. P.R. Heaton, P. Johnstone, L.M. McElhinney, R. Cowley, E. O'Sullivan, J.E. Whitby, *J. Clin. Microbiol.* **35**, 2762–2766 (1997)
 31. M. Kearse, R. Moir, A. Wilson, S. Stones-Havas, M. Cheung, S. Sturrock, S. Buxton, A. Cooper, S. Markowitz, C. Duran, T. Thierer, B. Ashton, P. Mentjies, A. Drummond, *Bioinformatics* **28** (12), 1647-1649 (2012)
 32. M.A. Larkin, G. Blackshields, N.P. Brown, R. Chenna, P.A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I.M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J.D. Thompson, T.J. Gibson, D.G. Higgins, *Bioinformatics* **23** (21), 2947-2948 (2007)
 33. R.C. Edgar, *Nucleic. Acids. Res.* **32** (5), 1792-1797 (2004)
 34. K. Tamura, G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski, S. Kumar, *Mol. Biol. Evol.* **30**, 2725–2729 (2013)
 35. J.P. Huelsenbeck, F. Ronquist, *Bioinformatics* **17**, 754-755 (2001)
 36. V.M. Corman, A. Rasche, T.D. Diallo, V.M. Cottontail, A. Stöcker, B.F.C.D Souza, J.I. Corrêa, A.J.B. Carneiro, C.R. Franke, M. Nagy, M. Metz, M. Knörnschild, E.K.V. Kalko, S.J. Ghanem, K.D.S. Morales, E. Salsamendi, M. Spínola, G. Herrler, C.C. Voigt, M. Tschapka, C. Drosten, J.F. Drexler, *J. Gen. Vir.* **94**, 1984-1994 (2013)
 37. V. Misra, T. Dumonceaux, J. Dubois, C. Willis, S. Nadin-Davis, A. Severini, A. Wandeler, R. Lindsay, H. Artsob, *J. Gen. Virol.* **90**, 2015–2022 (2009)
 38. K.J. Olival, P. Daszak, *J. Neurovirol.* **11**, 440–445 (2005)
 39. R.J. Rudd, C.V. Trimarchi, *J. Clin. Microbiol.* **27**, 2522-2528 (1989)
 40. F-X. Meslin, M.M. Kaplan, in *Laboratory techniques in rabies* (WHO, Geneva, 1996) p. 9-27
 41. I. Kotait, M.L. Carrieri, in *Microbiologia*, (Atheneu, São Paulo, 2004) p. 651-657

42. M. Chhabra, M. Bhardwaj, R.L. Ichhpujani, S. Lal, *Ind. J. Path. Microbiol.* **48**, 190–193 (2005)
43. C.V. Trimarchi, S.A. Nadin-Davis, in: *Diagnostic evaluation* ed. By A.C. Jackson, W.H. Wunner. (Academic press, London, 2007) p. 411–462
44. L. Li, J.G. Victoria, C. Wang, M. Jones, G.M. Fellers, T.H. Kunz, E. Delwart, *J. Virol.* **84**, 6955–6965 (2010b)
45. L. Li, T. Shan, O.B. Soji, M.M. Alam, T.H. Kunz, S.Z. Zaidi, E. Delwart, *J. Gen. Virol.* **92**, 768–772 (2011)
46. M. Lorinez, A. Csagola, S.L. Farkas, C. Szekely, T. Tuboly, *J. Gen. Virol.* **92**, 187–1821 (2011)
47. T.G. Phan, B. Kapusinszky, C.L. Wang, R.K. Rose, H.L. Lipton, E.L. Delwart, *Plos Pathog.* (2011) doi: 10.1371/journal.ppat.1002218
48. K. Rosario, S. Duffy, M. Breitbart, *Arch. Virol.* (2012) doi: 10.1007/s00705-012-1391-y
49. T.L. Shan, L.L. Li, P. Simmonds, C.L. Wang, A. Moeser, E. Delwart, *J. Virol.* **85**, 11697–11708 (2011)
50. X. Ge, Y. Li, X. Yang, H. Zhang, P. Zhou, Y. Zhang, Z. Shi, *J. Virol.* **86**, 4620–4630 (2012)
51. Z. Wu, X. Ren, L. Yang, Y. Hu, J. Yang, G. He, J. Zhang, J. Dong, L. Sun, J. Du, L. Liu, Y. Xue, J. Wang, F. Yang, S. Zhang, Q. Jin, *J. Virol.* **86**, 10999–11012 (2012)
52. R.M. Dalton, E.R. Roman, A.A. Negredo, I.D. Wilhelmi, R.I. Glass, A. Sanchez-Fauquier, *Pediatr. Infect. Dis. J.* **21**, 1038–1041 (2002)
53. M.D. Koci, S. Schultz-Cherry, *Avian Pathol.* **31**, 213–222 (2002)
54. D.K.W. Chu, J.S.M. Peiris, L.L.M. Poon, *Virologica Sinica*, **24** (2), 100–104 (2009)
55. Toffan A, C.M. Jonassen, C. de Battisti, E. Schiavon, T. Kofstad, I. Capua, G. Cattoli, *Vet. Microbiol.* **139**, 147–152 (2009)
56. R. Rivera, H.H. Nollens, S. Venn-Watson, F.M. Gulland, J.F. Wellehan Jr., *J. Gen. Virol.* **91**, 166–173 (2010)
57. ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses). (**Virus Taxonomy**, 2014), <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>. Accessed 3 March 2016
58. H.C. Zhu, D.K. Chu, W. Liu, B.Q. Dong, S. Zhang, J.X. Zhang, L.F. Li, D. Vijaykrishna, G.J. Smith, H.L. Chen, L.L. Poon, J.S. Peiris, Y. Guan, *J. Gen. Virol.* **90**, 883–887 (2009)
59. J.F. Drexler, V.M. Corman, T. Wegner, A.F. Tateno, R.M. Zerbinati, F. Gloza-

- Rausch, A. Seebens, M.A. Müller, C. Drosten, *Emerg. Infect. Dis.* **17**, 449–456 (2011)
60. J. Xiao, J. Li, G. Hu, Z. Chen, Y. Wu, Y. Chen, Z. Chen, Y. Liao, J. Zhou, X. Ke, L. Ma, S. Liu, J. Zhou, Y. Dai, H. Chen, S. Yu, Q. Chen, *Arch. Virol.* **156**, 1415–1423 (2011)
61. G. Kemenesi, B. Dallos, T. Görföl, S. Boldogh, P. Estók, K. Kurucz, M. Oldal, V. Németh, M. Madai, K. Bányai, F. Jakab, *Acta Virol.* **58**, 95-98 (2014a)
62. L. Dufkova, P. Straková, J. Sirmarová, J. Salát, R. Moutelíková, T. Chrudimský, T. Bartonicka, N. Nowotny, D. Ruzek, *Vector-Borne Zoonot.* **15**, 8 (2015)
63. G. Kemenesi, B. Dallos, T. Görföl, S. Boldogh, P. Estók, K. Kurucz, A. Kutas, F. Földes, M. Oldal, V. Németh, V. Martella, K. Bányai, F. Jakab, *Vector Borne Zoonotic Dis.* **14**, 846–855 (2014b)
64. X.C. Tang, J.X. Zhang, S.Y. Zhang, P. Wang, X.H. Fan, L.F. Li, G. Li, B.Q. Dong, W. Liu, C.L. Cheung, K.M. Xu, W.J. Song, D. Vijaykrishna, L.L. Poon, J.S. Peiris, G.J. Smith, H. Chen, Y. Guan, *J. Virol.* **80**, 7481–7490 (2006)
65. C.V. Carrington, J.E. Foster, H.C. Zhu, J.X. Zhang, G.J. Smith, N. Thompson, A.J. Auguste, V. Ramkissoon, A.A. Adesiyun, Y. Guan, *Emerg. Infect. Dis.* **14**, 1890–1893 (2008)
66. F. Gloza-Rausch, A. Ipsen, A. Seebens, M. Gottsche, M. Panning, J.F. Drexler, N. Petersen, A. Annan, K. Grywna, M. Muller, S. Pfefferle, C. Drosten, *Emerg. Infect. Dis.* **14**, 626–631 (2008)
67. K. Shirato, K. Maeda, S. Tsuda, K. Suzuki, S. Watanabe, H. Shimoda, N. Ueda, K. Iha, S. Taniguchi, S. Kyuwa, D. Endoh, S. Matsuyama, I. Kurane, M. Saijo, S. Morikawa, Y. Yoshikawa, H. Akashi, T. Mizutani, *Virus Genes* **44**, 40-44 (2012)
68. A. Goffard, C. Demanche, L. Arthur, C. Pinçon, J. Michaux, J. Dubuisson, *Viruses* **7**, 6279–6290 (2015)
69. A. Moreira-Soto, L.T. Castillo, N.V. Vargas, B.R. Herrera, C. Jimenez, E.C. Aguilar *Zoonoses Public. Hlth.* (2015) doi: 10.1111/zph.12181
70. C. Osborne, P.M. Cryan, T.J. O’Shea, L.M. Oko, C. Ndaluka, C.H. Calisher, A.D. Berglund, M.L. Klavetter, R.A. Bowen, K. V. Holmes, and S. R. Dominguez, *Plos One* **6**, 11 (2011)
71. S.J. Anthony, R. Ojeda-Flores, O. Rico-Chavez, I. Navarrete-Macias, C. Zambrana Torrelío, M.K. Rostal, J.H. Epstein, T. Tipps, E. Liang, M. Sanchez-Leon, J. Sotomayor-Bonilla, A.A. Aguirre, R. Ávila-Flores, R.A. Mendellín, T. Goldstein, G. Suzán, P. Daszak, W.I. Lipkin, *J. Gen. Virol.* **94**, 1028–38 (2013)

72. S.R. Dominguez, G.E. Sims, D.E. Wentworth, R.A. Halpin, C.C. Robinson, C.D. Town, K.V. Holmes, *J. Gen. Virol.* **93**, 2387-2398 (2012)
73. M. Kolb & L. Galicia, *Geogr. J.* **178**, 147-161 (2012)
74. S.R. Dominguez, T.J. O'Shea, L.M. Oko, K.V. Holmes, *Emerg. Infect. Dis.* **13** (9), 1295-1300 (2007)

Figure 1 Geographical distribution of bats collected in Southern Brazil

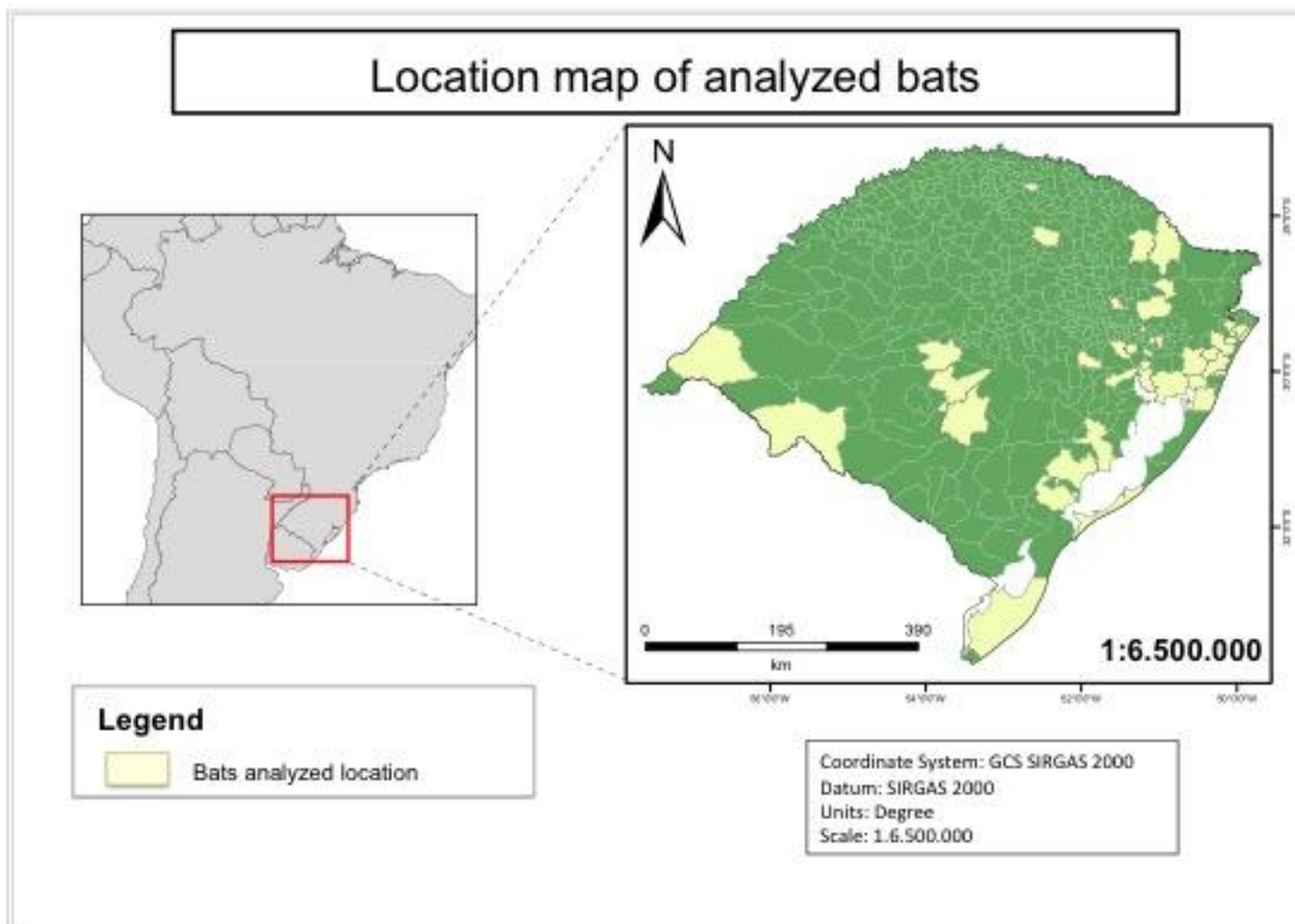


Table 3 Positive bat species samples

Species/ number of indiv.	Trophic guild	Gender	R A	U A	Age group/ number of indiv.	CV	CoV	AstV	RRLV	CV+AstV	AstV+CoV
<i>Eptesicus diminutus</i> (1)	Insectivorous	M	1	-	J	0	0	1	0	0	0
<i>Eumops patagonicus</i> (2)	Insectivorous	F(2)	2	-	A(2)	0	0	2	0	0	0
<i>Glossophaga soricina</i> (1)	Nectarivorous	F	1	-	S-A	0	1	0	0	0	0
<i>Molossus molossus</i> (11)*	Insectivorous	F(2) M(9)	1	10	A(7) S-A(3) J(1)	4	2	5	0	0	0
<i>Molossus rufus</i> (4)	Insectivorous	F(3) M(1)	4	-	A(4)	0	0	4	0	0	0
<i>Noctilio leporinus</i> (1)	Piscivorous	M	1	-	J	1	0	0	0	0	0
<i>Promops nasutus</i> (1)	Insectivorous	M	1	-	A	0	0	1	0	0	0
<i>Sturnira lillium</i> (2)	Frugivorous	M(2)	2	-	A(2)	0	1	0	0	0	1
<i>Tadarida brasiliensis</i> (15)	Insectivorous	F(5) M(10)	8	7	A(12) S-A(1) J(2)	3	1	9	0	2	0
Total	-	F(13) M(25)	21	17	A(28) S-A(5) J(5)	8	5	22	0	2	1

() number of positive individual; *, pregnant; F, female; M, male; R A, rural area; U A, urban area; A, adults; J, juvenile; S-A, sub-adults; indiv., individual; CV+AstV, co-infection between circoviruses and astroviruses; AstV+CoV, co-infection of astroviruses and coronaviruses.

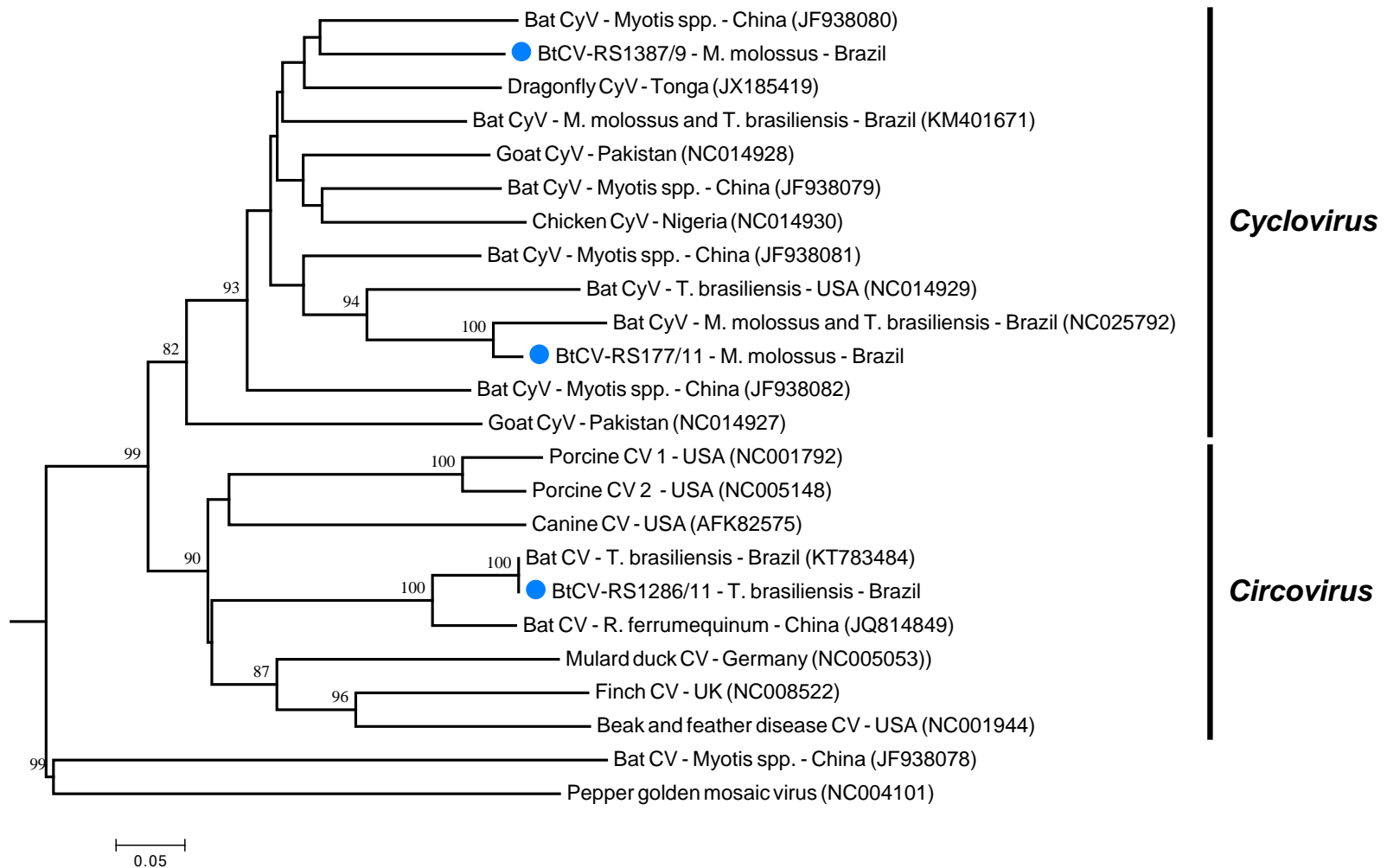


FIG. 2. Neighbor-Joining phylogenetic tree based on amino acids partial fragments of the Replicase gene. Sequences from cyclo and circoviruses were retrieved from GenBank (accession numbers represented in the tree). Sequence Pepper Golden mosaic virus was used as the outgroup. Numbers in the nodes indicate bootstrap value. Circovirus sequences from this study are represented with blue dot. Scale bar indicates number of nucleotide substitutions per site. Abbreviations: CyV, cyclovirus; CV, circovirus; *M. Molossus*, *Molossus molossus*; *R. ferrumequinum*, *Rhinolophus ferrumequinum*; *T. Brasiliensis*, *Tadarida brasiliensis*.

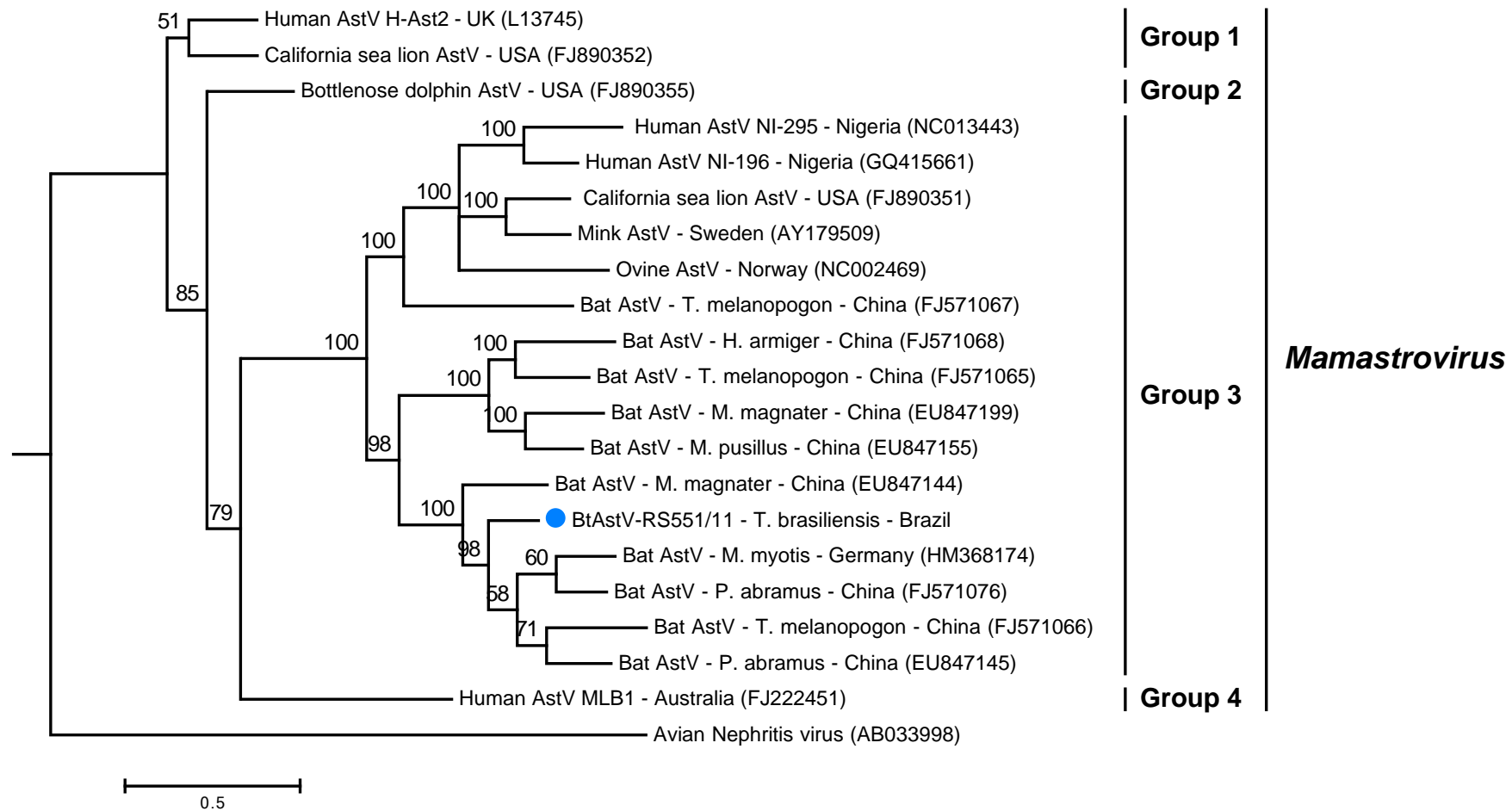


FIG. 3. Bayesian phylogenetic tree based on amino acids of the partial RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) gene from astroviruses retrieved from GenBank (accession numbers represented in the tree). Sequence Avian nephritis virus was used as the outgroup. Numbers in the nodes indicate Bayesian posterior probability. Astrovirus sequence determined in this study is represented in blue. Scale bar indicates number of nucleotide substitutions per site. Abbreviations: AstV, astrovirus; *T. melanopogon*, *Taphozous melanopogon*; *H. armiger*, *Hipposideros armiger*; *M. magnater*, *Miniopterus magnater*; *M. pusillus*, *Miniopterus pusillus*; *T. brasiliensis*, *Tadarida brasiliensis*; *M. myotis*, *Myotis myotis*; *P. abramos*, *Pipistrellus abramos*; UK, United Kingdom; USA, United States of America.

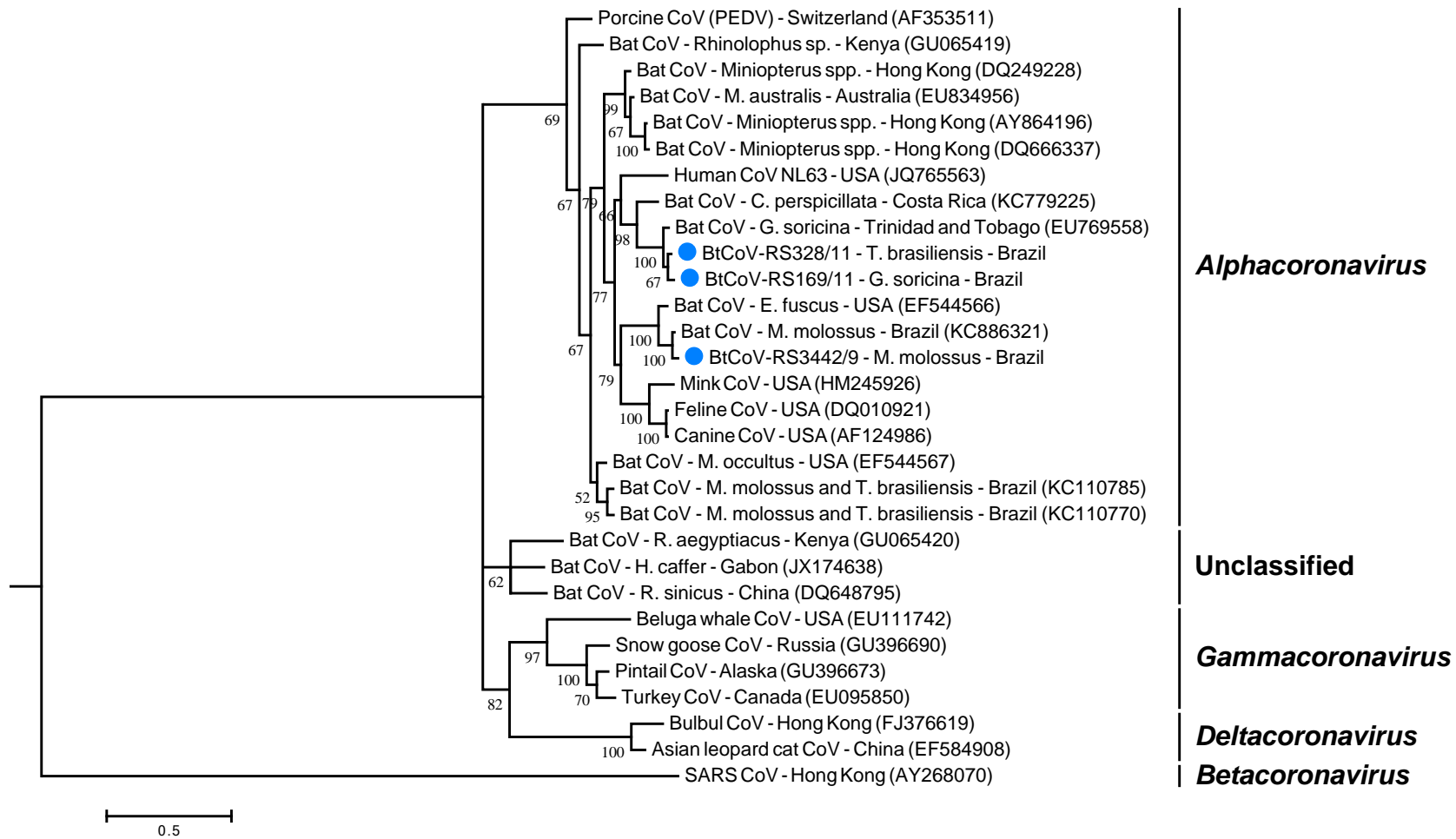


FIG. 4. Bayesian phylogenetic tree of the partial RNA-dependent RNA-polymerase (RdRp) gene of coronaviruses. Amino acid sequences were compared to 27 coronaviruses from mammals and birds, retrieved from GenBank (accession numbers represented in the tree). The sequence SARS coronavirus (AY268070) was used as outgroup. Numbers at nodes indicate posterior probability values. Coronavirus sequences determined in this study are represented in blue. Scale bar indicates number of nucleotide substitutions per site. Abbreviations: *M. australis*, *Miniopterus australis*; *C. perspicillata*, *Carollia perspicillata*; *G. soricina*, *Glossophaga soricina*; *T. brasiliensis*, *Tadarida brasiliensis*; *E. fuscus*, *Eptesicus fuscus*; *M. molossus*, *Molossus molossus*; *M. occultus*, *Myotis occultus*; *R. aegyptiacus*, *Rousettus aegyptiacus*; *H. caffer*, *Hipposideros caffer*; *R. sinicus*, *Rhinolophus sinicus*; USA, United States of America.

4. CONCLUSÕES

1. No presente trabalho, os vírus foram detectados a partir de *pools* de órgãos de morcegos, sendo 23,1% positivos para astrovírus, 9,2% para circovírus e 5,5% para coronavírus.
2. Circovírus, coronavírus e astrovírus do presente estudo estão presentes em morcegos do Rio Grande do Sul e este é o primeiro relato de detecção de astrovírus em morcegos no Brasil.
3. Co-infecções de circovírus com astrovírus e coronavírus com astrovírus foram detectadas em três espécimes, sendo duas da espécie *Tadarida brasiliensis*, que é um morcego urbano e outra da espécie *Sturnira lilium*, um morcego que habita ambientes naturais.
4. A análise filogenética realizada com as sequências encontradas de circovírus, demonstraram que elas podem ser tanto filogeneticamente relacionadas com sequências da China, quanto do Brasil.
5. A sequência de astrovirus do presente trabalho foi a primeira detectada em morcegos no Brasil, agrupando-se com uma sequência da China e outra da Alemanha.
6. Na análise filogenética do coronavírus, duas sequências do presente estudo agruparam-se com uma sequência de Trinidad e Tobago e outra com uma sequência de São Paulo, demonstrando a circulação desses vírus nessas localidades.

REFERÊNCIAS

ALLAN, G.M.; ELLIS, J.A. Porcine circoviruses: a review. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, 12 (1), 3-14, 2000.

BALDOCK, F.C.; DOUGLAS, I.C.; HALPIN, K. FIELD, H.; YOUNG, P.L.; BLACK, P.F. Epidemiological investigations into the 1994 equine morbillivirus outbreaks in Queensland, Australia. **Singapore Veterinary Journal**, 20: 57-61, 1996.

BARCLAY, A.J.; PATON, D.J. Hendra (equine morbillivirus). **Veterinary Journal**, 160: 169–176, 2000.

BAIZE, S.; PANNETIER, D.; OESTEREICH, L.; RIEGER, T.; KOIVOGUI, L.; MAGASSOUBA, N. Emergence of Zaire Ebola Virus Disease in Guinea – Preliminary Report. **N. England J. M.**, 1-8, 2014.

BARRETE, R.W.; METWALLY, S.A.; ROWLAND, J.M.; XU, L.; ZAKI, S.R.; NICHOL, S.T. Discovery of swine as a host for the Reston ebolavirus. **Science**, 325, 204-206, 2009.

BENEDICTIS, P.; SCHULTZ-CHERRY, S.; BURNHAM, A.; CATTOLI, G. Astrovirus infections in humans and animals – Molecular biology, genetic diversity, and interspecies transmissions. Review. **Infection, Genetics and Evolution**, v.11, p. 1529–1544, 2011.

BERNARDI, I.P.; PULCHÉRIO-LEITE, A.; MIRANDA, J.M.D.; PASSOS, F.C. Ampliação da distribuição de *Molossops neglectus* Williams e *Genoways* (Chiroptera, Molossidae) para o Sul da América do Sul. **Revista Brasileira de Zoologia**, 24: 505-507, 2007.

BEXTON, E.; WIERSMA, L.I.J.C.; GETU, S.; VAN RUN, P.R.; VERJANS, G.M.G.M.; SCHIPPER, D.; SCHAPENDONK, C.M.E.E.; BODEWES, R.; OLDROYD, L.; HAAGMANS, B.L., M.M.P.; SASKIA L. SMITS, S.L. detection of circovirus in foxes with meningoencephalitis, United Kingdom, 2009-2013. **Emerg. Infect. Dis.**, 21(7), 2015.

BIEK, R.; WALSH, P.D.; LEROY, E.M. *et al.* Recent common ancestry of Ebola zaire virus found in a bat reservoir. **Plos Pathog.** 2:e90, 2006.

BOSH, A.; GUIX, S.; KRISHNA, N.K.; MENDEZ, E.; *et al.* Astroviridae. In: KING, A.M.Q.; ADAMS, M.J.; CARSTENS, E.B.; LEFKOWITZ, E.J., eds. **Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. San Diego, CA: Elsevier: 953–959, 2011.

BRANDÃO, P.E.; SCHEFFER, K.; VILLARREAL, L.Y.; ACHKAR, S.; OLIVEIRA, R.N.; FAHL, W.O.; CASTILHO, J.G.; KOTAIT, I.; RICHTZENHAIN, L.J. A coronavirus detected in the vampire bat *Desmodus rotundus*. **Braz. J. Infect. Dis.**, 12 (6), 466-468, 2008.

CALISHER, C.H.; ELLISON, J.A. The other rabies viruses: the emergence and importance of lyssaviruses from bats and other vertebrates. **Travel Med Infect Dis**, 10:69-79, 2012.

CALISHER, C.H.; CHILDS, J.E.; FIELD, H.E.; HOLMES, K.V.; SCHOUNTZ, T. Bats: important reservoir hosts of emerging viruses. **Clin Microbiol Rev**, 19:531-545, 2006.

CANUTI, M.; EIS-HUEBINGER, A.M.; DEIJS, M.; DE VRIES, M.; DREXLER, J.F.; OPPONG, S.K.; MÜLLER M.A.; KLOSE S.M.; WELLINGHAUSEN, N.; COTTONTAIL, V.M.; KALKO, E.K.V.; DROSTEN, C.; VAN DER HOEK, L. Two Novel Parvoviruses in Frugivorous New and Old World Bats. **Plos One**, 6 (12), 2011.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2016. **Outbreaks Chronology: Ebola Virus Disease**.

<Disponível em: <http://www.cdc.gov/vhf/ebola/outbreaks/history/chronology.html>>

Acessado em 15/02/2016.

CHADHA, M.S.; COMER, J.A.; LOWE, L.; ROTA, P.A.; ROLLIN, P.E.; BELLINI, W.J.; KSIAZEK, T.G.; MISHRA, A.C. Nipah virus identified as the agent responsible for an outbreak of encephalitis in Siliguri, **India. Emerg. Infect. Dis.**, 12, 235-240, 2006.

CHANT, K.; CHAN, R.; SMITH, M.; DWYER, D.E.; KIRKLAND, P. Probable human infection with a newly described virus in the family Paramyxoviridae. **Emerg. Infect. Dis.**, 4: 273–275, 1998.

CHEW, M.H.; ARGUIN, P.M.; SHAY, D.K., *et al.* Risk factors for Nipah virus infection

among abattoir workers in Singapore. **J. Infect. Dis.**, 181: 1760–1763, 2000.

CHU D. K.; POON L. L.; GUAN Y.; PEIRIS J. S. Novel astroviruses in insectivorous bats. **Journal of Virology**, 82 (18), 9107–9114 , 2008a.

CHU, D.K.; PEIRIS, J.S.; CHEN, H.; GUAN, Y.; POON, L.L. Genomic characterizations of bat coronaviruses (1A, 1B and HKU8) and evidence for co-infections in *Miniopterus* bats. **J. Gen. Virol.**, 89, 1282-1287, 2008b.

CHU, D.K.; PEIRIS, J.S.M.; POON, L.L.M. Novel Coronaviruses and Astroviruses in Bats. **Virologica Sinica**, 24 (2): 100-104, 2009.

CHUA, K.B.; GOH, K.J.; WONG, K.T., *et al.* Fatal encephalitis due to Nipah virus among pig-farmers in Malaysia. **Lancet**; 354: 1257–1259, 1999.

CHUA, K.B.; BELLINI, W.; ROTA, P. HARCOURT, B.H.; TAMIN, A.; LAM, S.K.; KSIAZEK, T.G.; ROLLIN, P.E.; ZAKI, S.R.; SHIEH, W.; GOLDSMITH, C.S.; GUBLER, D.J.; ROEHRIG, J.T.; EATON, B.; GOULD, A.R. Nipah virus: a recently emergent deadly paramyxovirus. **Science**, 288: 1432-1435, 2000.

CHUA, K.B.; WANG, L.F.; LAM, S.K., *et al.* Tioman virus, a novel paramyxovirus isolated from fruit bats in Malaysia. **Virology**, 283: 215–229, 2001.

CHUA, K.B.; KOH, C.L.; HOOI, P.S., *et al.* Isolation of Nipah virus from Malaysian Island flying-foxes. **Microbes. Infect.**, 4: 145–151, 2002.

CHUA, K.B.; CRAMERI, G.; HYATT, A.; YU, M.; TOMPANG, M.R.; ROSLI, J.; MCEACHERN, J.; CRAMERI, S.; KUMARASAMY, V.; EATON, B.T.; WANG, L.F. A previously unknown reovirus of bat origin is associated with an acute respiratory disease in humans. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, 104: 11424–11429, 2007.

CLIQUET, F.; PICARD-MEYER, E.; BARRAT, J.; BROOKES, S.M.; HEALY, D.M.; WASNIEWSKI, M.; LITAIZE, E.; BIARNAIS, M.; JOHNSON, L.; FOOKS, A.R. Experimental infection of Foxes with European bat Lyssaviruses type-1 and 2. **BMC**

Veterinary Research, 5:19, 2009.

CULLEY, A.I.; LANG, A.S.; SUTTLE, C.A. Metagenomic analysis of coastal RNA virus communities. **Science**, 312: 1795–1798, 2006.

DACHEUX, L.; REYNES, J.; BUCHY, P.; SIVUTH, O.; DIOP, B.M.; ROUSSET, D.; RATHAT, C.; JOLLY, N.; DUFOURCQ, J.; NARETH, C.; DIOP, S.; IEHLE, C.; RAJERISON, R.; SADORGE, C.; BOURHY, H. A reliable diagnosis of human rabies based on analysis of skin biopsy specimens. **Clin. Infect. Dis.**, 47: 1410–1417, 2008.

DELWART, E.; LI, L. Rapid expanding genetic diversity and host range of the Circoviridae viral family and other Rep encoding small circular ssDNA genomes. **Virus Research**, 164: 114-121, 2011.

DOBSON, A.P. What links bats to emerging infectious diseases? **Science**, 310, 628–629, 2005.

DREXLER, J.F.; CORMAN, V.M.; GLOZA-RAUSCH, F.; SEEBENS, A.; ANNAN, A.; IPSEN, A.; KRUPPA, T.; MÜLLER, M.A.; KALKO, E.K.V.; ADU-SARKODIE, Y.; OPPONG, S.; DROSTEN, C. Henipavirus RNA in African bats. **PLoS One**, 4 (7), 2009.

DREXLER, J.F.; GLOZA-RAUSH, F.; GLENDE, J.; CORMAN, V.M.; MUTH, D.; GOETTSCHE, M. *et al.* Genomic characterization of SARS-related coronavirus in European bats and Classification of Coronaviruses based on partial RNA-dependent RNA polymerase gene sequences. **J. Virol.** Doi: 10.1128/JVI.00650-10, 2010.

DREXLER, J.F.; CORMAN, V.M.; WEGNER, T.; TATENO, A.F.; ZERBINATI, R.; GLOZA-RAUSCH, F.; SEEBENS, A. Amplification of emerging viruses in a bat colony. **Emerg. Infect. Dis.**, 17, 449-456, 2011.

DREXLER, J.F.; CORMAN, V.M.; MÜLLER, M.A.; MAGANGA, G.D.; VALLO, P.; BINGER, T.; GLOZA-RAUSCH, F.; COTTONTAIL, V.M.; RASCHE, A.; YORDANOV, S.; SEEBENS, A.; KNÖRNSCHILD, M.; OPPONG, S.; SARKODIE, Y.A.; PONGOMBO, C.; LUKASHEV, A.N.; SCHMIDT-CHANASIT, J.; STÖCKER, A.; CARNEIRO, A.J.B.;

ERBAR, S.; MAISNER, A.; FRONHOFFS, F.; BUETTNER, R.; KALKO, E.K.V.; KRUPPA, T.; FRANKE, C.R.; KALLIES, R.; YANDOKO, E.R.N.; HERRLER, G.; REUSKEN, C.; HASSANIN, A.; KRÜGER, D.H.; MATTHEE, S.; ULRICH, R.G.; LEROY, E.M.; DROSTEN, C. Bats host major mammalian paramyxoviruses. **Nat. Commun.** 3: 796, 2012a.

DREXLER, J.F.; SEELEN, A.; CORMAN, V.M.; TATENO, A.F.; COTTONTAIL, V.; ZERBINATI, R.M.; GLOZA-RAUSCH, F.; KLOSE, S.M.; ADU-SARKODIE, Y.; OPPONG, S.K.; KALKO, E.K.V.; OSTERMAN, A.; RASCHE, A.; ADAM, A.; MÜLLER, M.A.; ULRICH, R.G.; LEROY, E.M.; LUKASHEV, A.N.; DROSTEN C. Bats worldwide carry hepatitis E virus-related viruses that form a putative novel genus within the family Hepeviridae. **Journal of Virology**, 86: 9134–9147, 2012b.

DUFKOVA, L.; STRAKOVÁ, P.; SIRMAROVÁ, J.; SALÁT, J.; MOUTELÍKOVÁ, R.; CHRUDIMSKY, T.; BARTONICKA, T.; NOWOTNY, N.; RUZEK, D. Detection of Diverse Novel Bat Astrovirus Sequences in the Czech Republic. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, 15, 8, 2015.

FAMILIUSI, J.B.; MOORE, D.L. Isolation of rabies related virus from the cerebrospinal fluid of a child with 'aseptic meningitis'. **Afr. J. Med. Sci.**, 3, 93–96, 1972.

FAUQUET, C.M., MAYO, M.A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L.A. **Virus Taxonomy**: the classification and nomenclature of viruses. The eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Academic Press; p. 623–31, 2004.

FAUQUET, C.M.; FARGETTE, D. International Committee on Taxonomy of Viruses and the 3,142 unassigned species. **Virol. J.**, 2: 64, 2005.

FAUQUET, C.M.; MAYO, M.A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L.A. **Virus Taxonomy**: VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press. London, UK. 2005.

FENTON, M.B.; SIMMONS, N. **Bats**. A Word of Science and Mystery. Chicago: University of Chicago Press, 2014.

FIELD, H; YOUNG, P; YOB, J.M.; MILLS, J.; HALL, L.; MACKENZIE, J. The natural history of Hendra and Nipah viruses. **Microbes Infect.**, 3:307–314, 2001.

FIELD, H; SCHAAF, K.; KUNG, N. *et al.* Hendra virus outbreak with novel clinical features, Australia. **Emerg. Infect. Dis.**, 16: 338–340, 2010.

FINSTERBUSCH, T.; MANKERTZ, A. Porcine circoviruses – Small but powerful. **Virus Research**, 143, 177-183, 2009.

FLEMING, T.H.; HEITHAUS, E.R. Frugivorous bats, seed shadows, and the structure of tropical forests. **Biotropica**, 13, 45-53, 1981.

GAISLER, J. The r-K selection model and life history strategies in bats. In: HANAK, V.; HORÁČEK, I.; GAISLER, J. **European Bat Research**, Charles University Press, Prague, p. 117-124, 1989.

GE, X.Y.; LI, J.L.; PENG, C; WU, L.J.; YANG, X.L.; WU, Y.Q.; ZHANG, Y.Z.; SHI, Z.L. Genetic diversity of novel circular ssDNA viruses in bats in China. **J. Gen. Virol.**, 92:2646-2653, 2011.

GE, X.; LI, J.; PENG, C.; WU, L.; YANG, X.; WU, Y.; ZHANG, Y.; SHI, Z. Genetic diversity of novel circular ssDNA viruses in bats in China. **J. Gen. Virol.**, 92:2646–2653, 2012a.

GE, X.; LI, Y.; YANG, X.; ZHANG, H.; ZHOU, P.; ZHANG, Y.; SHI, Z. Metagenomic analysis of viruses from bat fecal samples reveals many novel viruses in insectivorous bats in China. **Journal of Virology**, 86:4620–4630, 2012b.

GOES, L.G.B.; RUVALCABA, S.G.; CAMPOS, A.A.; QUEIROZ, L.H.; CARVALHO, C.; JEREZ, J.A.; DURIGON, E.L.; DÁVALOS, L.I.I.; DOMINGUEZ, S.R. Novel Bat Coronaviruses, Brazil and Mexico. **Emerg. Infect. Dis.**, 19, 10, 2013.

GOH, K.J.; TAN, C.T.; CHEW, N.K., *et al.* Clinical features of Nipah virus encephalitis among pig farmers in Malaysia. **N. Engl. J. Med.**, 342:1229–1235, 2000.

GRAU-ROMA, L.; FRAILE, L. SEGALÉS, J. Recent advances in the epidemiology, diagnosis and control of diseases caused by porcine circovirus type 2. **Vet. J.**, 187, 23-32, 2011.

GREENOUGH, T.C.; CARVILLE, A.; CODERRE, J., *et al.* Pneumonitis and multi-organ system disease in common marmosets (*Callithrix jacchus*) infected with the severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus. **Am. J. Pathol.**, 167: 455–463, 2005.

GUAN, Y.; ZHENG, B.J.; HE, Y.Q., *et al.* Isolation and characterization of viruses related to the SARS coronavirus from animals in southern China. **Science**, 302: 276–278, 2003.

GUO, W.P.; LIN, X.D.; WANG, W.; TIAN, J.H.; CONG, M.L.; ZHANG, H.L.; WANG, M.R.; ZHOU, R.H.; WANG, J.B.; LI, M.H.; XU, J.; HOLMES, E.C.; ZHANG, Y.Z. Phylogeny and origins of hantaviruses harbored by bats, insectivores, and rodents. **PLoS Pathogens**, 9 (2), 2013.

HALAMI, M.Y.; NIEPER, H.; MÜLLER, H.; JOHNE, R. Detection of a novel circovirus in mute swans by using nested broad-spectrum PCR. **Virus Res.**, 132: 208–212, 2008.

HALPIN, K.; YOUNG P.L.; FIELD, H.E.; MACKENZIE, J.S. Isolation of Hendra virus from pteropid bats: a natural reservoir of Hendra virus. **J. Gen. Virol.**, 81: 1927–1932, 2000.

HARCOURT, B.H.; LOWE, L.; TAMIN, A., *et al.* Genetic characterization of Nipah virus, Bangladesh, 2004. **Emerg. Infect. Dis.**, 11: 1594–1597, 2005.

HATTERMANN, K. *et al.* Cloning and sequencing of Duck circovirus (DuCV). **Archives of Virology**, 148, 2471-2480, 2003.

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), 2013.

HENDERSON, G.W.; LAIRD, C.; DERMOTT, E.; RIMA, B.K. Characterization of Mapuera virus: structure, proteins and nucleotide sequence of the gene encoding the nucleocapsid protein. **J. Gen. Virol.**, 76: 2509–2518, 1995.

HERRMANN, J.E.; TAYLOR, D.N.; ECHEVERRIA, P.; BLACKLOW, N.R. Astroviruses as a cause of gastroenteritis in children. **N. Engl. J. Med.**, 324: 1757–1760, 1991.

HUGHES, G.J.; KUZMIN, I.V.; SCHMITZ, A.; BLANTON, J.; MANANGAN, J.; MURPHY, S.; RUPPRECHT, C.E. Experimental infection of big brown bats (*Eptesicus fuscus*) with Eurasian bat lyssaviruses Aravan, Khujand, and Irkut virus. **Arch. Virol.**, 151: 2021–2035, 2006.

HSU, V.P.; HOSSAIN, M.J.; PARASHAR, U.D., *et al.* Nipah virus encephalitis reemergence, Bangladesh. **Emerg. Infect. Dis.**, 10:2082–2087, 2004.

ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses). (2014) **Virus taxonomy**. Disponível em: < <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp> >. Acessado em 03/03/2016.

JOHARA M.Y.; FIELD H.; RASHDI A.M.; MORRISSY C.; VANDERHEIDE B.; ROTA P.; BINADZHAR A.; WHITE J.; DANIELS P.; JAMALUDDIN A.; KSIAZEK T. Nipah virus infection in bats (order Chiroptera) in peninsular Malaysia. **Emerg. Infect. Dis.**, 7, 439–441, 2001.

JOHNE, R.; FERNÁNDEZ-DE-LUCO, D.; HÖFLE, U.; MÜLLER, H. Genome of a novel circovirus of starlings, amplified by multiply primed rolling-circle amplification. **J. Gen. Virol.**, 87:1189–1195, 2006.

JOHNSON, N.; VOS, A.; FREULING, C.; TORDO, N.; FOOKS, A.R.; MUÜLLER, T. Human rabies due to lyssavirus infection of bat origin. **Veterinary Microbiology**, 142,151–159, 2010.

KALKO, E.K.V. 1997. Diversity in tropical bats, p. 13–43. In: H. ULRICH (Ed.). **Tropical diversity and systematics**. Proceedings of the International Symposium on Biodiversity and Systematics in Tropical Ecosystems, Bonn, Zoologisches Forschungsinstitut und Museum

Alexander Koenig, 197p., 1994.

KAPOOR, A.; DUBOVI, E.J.; HENRIQUEZ-RIVERA, J.A.; LIPKIN, W.I. Complete genome sequence of the first canine circovirus. **J. Virol.**, 86: 7018, 2012.

KEMENESI, G.; DALLOS, B.; GÖRFÖL, T.; BOLDOGH, S., *et al.* Novel European lineages of bat astroviruses identified in Hungary. **Acta Virol.**, 58: 95–98, 2014a.

KEMENESI, G.; DALLOS, B.; GÖRFÖL, T.; BOLDOGH, S., *et al.* Molecular survey of RNA viruses in Hungarian bats: Discovering novel astroviruses, coronaviruses, and caliciviruses. **Vector Borne Zoonotic Dis.**, 14: 846–855 2014b.

KEMP, G.E.; CAUSEY, O.R.; MOORE, D.L.; ODELOLA, A.; FABIYI, A. Mokola virus. Further studies on IbAn 27377, a new rabies-related etiologic agent of zoonosis in Nigeria. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 21: 356–9, 1972.

KIM, K.H.; CHANG, H.W.; NAM, Y.D.; ROH, S.W.; KIM, M.S.; SUNG, Y.; JEON, C.O.; OH, H.M.; BAE, J.W. Amplification of uncultured single-stranded DNA viruses from rice paddy soil. **Appl. Environ. Microbiol.**, 74: 5975–5985, 2008.

KOCI, M.D.; SCHULTZ-CHERRY, S. Avian astroviruses. **Avian Pathol.**, 31 (3), 213– 227, 2002.

KOYAMA, S.; ISHII, K. J.; COBAN, C.; AKIRA, S. Innate immune response to viral infection. **Cytokine**, 43: 336-341, 2008.

KUHN, S.; BECKER; EBIHARA, H.; GEISBERT, T.W.; JAHRLING, P.B.; KAWAOKA, Y.; NETESOV, S.V.; NICHOL, S.T. “family Filoviridae”, **Virus Taxonomy**. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Press. 665-671, 2011.

KUIKEN, T. *et al.* Public health. Pathogen surveillance in animals. **Science**, 309: 1680–1681. 2005.

KUNZ, T.H.; LUMSDEN, L.F. **Ecology of cavity and foliage roosting bats**. The university of Chicago Press: Chicago. 3-89, 2003.

KUNZ, T.H.; DE TORREZ, E.B.; BAUER, D.; LOBOVA, T.; FLEMING, T.H. Ecosystem services provided by bats. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, 223: 1–38, 2011.

KUZMIN, I.V.; BOZICK, B.; GUAGLIARDO, S.A.; KUNKEL, R.; SHAK, J.R.; TONG, S.; RUPPRECHT, C.E. Bats, emerging infectious diseases, and the rabies paradigm revisited. **Emerging Health Threats Journal**, 4: 7159, 2011.

LAU, S.K.P.; WOO, P.C.Y.; LI, K.S.M.; HUANG, Y.; TSOI, H.W.; WONG, B.H.L.; WONG, S.S.Y.; LEUNG, S.Y.; CHAN, K.H.; YUEN, K.Y. Severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in Chinese horseshoe bats. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 102: 14040–14045, 2005.

LAU, S.K.; LI, K.S.; HUANG, Y.; SHEK, C.T.; TSE, H.; WANG, M.; CHOI, G.K.; XU, H.; LAM, C.S.; GUO, R.; CHAN, K.H.; ZHENG, B.J.; WOO, P.C.; YUEN, K.Y. Ecoepidemiology and complete genome comparison of different strains of severe acute respiratory syndrome-related *Rhinolophus* bat coronavirus in China reveal bats as a reservoir for acute, self-limiting infection that allows recombination events. **Journal of Virology**, 84: 2808-2819, 2010.

LAU, S.K.P.; WOO, P.C.Y.; LAI, K.K.Y.; HUANG, Y.; YIP, C.C.Y.; SHEK, C.T.; LEE, P.; LAM, C.S.F.; CHAN, K.H.; YUEN, K.Y. Complete genome analysis of three novel picornaviruses from diverse bat species. **Journal of Virology**, 85: 8819–8828, 2011.

LE GONIDEC, G.; RICKENBACH, A.; ROBIN, Y.; HEME, G. Isolation of a strain of Mokola virus in Cameroon. **Ann. Microbiol. (Paris)**, 129: 245–9, 1978.

LEROY, E.M., *et al.* Fruit bats as reservoirs of Ebola virus. **Nature**, 438: 575–576, 2005.

LI, W., *et al.* Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses. **Science**, 310: 676–679, 2005.

LI, Y.; GE, X.; ZHANG, H.; ZHOU, P.; ZHU, Y.; ZHANG, Y.; YUAN J.; WANG, L. F.; SHI, Z. Host range, prevalence, and genetic diversity of adenoviruses in bats. **Journal of Virology**. 84: 3889–3897, 2010.

LI, L.; KAPOOR, A.; SLIKAS, B.; BAMIDELE, O.S.; WANG, C.; SHAUKAT, S.; MASROOR, M.A.; WILSON, M.L.; NDJANGO, J-B.N.; PEETERS, M.; GROSS-CAMP, N.D.; MULLER, M.N.; HAHN, B.H.; WOLFE, N.D.; TRIKI, H.; BARTKUS, J.; ZAIDI, S.Z.; DELWART, E. Multiple diverse circoviruses infect farm animals and are commonly found in human and chimpanzee feces. **J. Virol.**, 84: 1674–1682, 2010a.

LI, L.; VICTORIA, J.G.; WANG, C.; JONES, M.; FELLERS, G.M.; KUNZ, T.H.; DELWART, E. Bat guano virome: predominance of dietary viruses from insects and plants plus novel mammalian viruses. **Journal of Virology**, 84: 6955–6965, 2010b.

LI, L.L.; SHAN, T.L.; SOJI, O.B.; ALAM, M.M.; KUNZ, T.H.; ZAIDI, S.Z.; DELWART, E. Possible cross-species transmission of circoviruses and cycloviruses among farm animals. **J. Gen. Virol.**, 92: 768–772, 2011.

LI, F. Receptor recognition and cross-species infections of SARS coronavirus. **Antiviral Res.**, 100, 246-254, 2013.

LIAN, H.; LIU, Y.; LI, N.; WANG, Y.; ZHANG, S.; HU, R. Novel Circovirus from Mink, China. **Emerging Infectious Diseases**, 20 (9), 2014.

LIMA, F.E.S.; CAMPOS, F.S.; KUMERT FILHO, H.C.H.; BATISTA, H.B.C.R.; CARNIELI JUNIOR, P.; CIBULSKI, S.P.; SPILKI, F.R.; ROEHE, P.M.; FRANCO, A.C. Detection of Alphacoronavirus in velvety free-tailed bats (*Molossus molossus*) and Brazilian free-tailed bats (*Tadarida brasiliensis*) from urban area of Southern Brazil. **Virus Genes**, doi: 10.1007/s11262-013-0899-x, 2013a.

LIMA, F.E.S.; CIBULSKI, S.P.; ELESBAO, F.; CARNIELI JUNIOR, P.; BATISTA, H.B.C.R.; ROEHE, P.M.; FRANCO, A.C. First detection of adenovirus in the vampire bat (*Desmodus rotundus*) in Brazil. **Virus Genes**, 47 (2): 378–381, 2013b.

LIMA, F.E.S.; CIBULSKI, S.P.; DOS SANTOS, H.F.; TEIXEIRA, T.F.; VARELA, A.P.M.; ROEHE, P.M.; DELWART, E.; FRANCO, A.C. Genomic characterization of novel circular ssDNA viruses from insectivorous bats in Southern Brazil. **Plos One**, 10:e0118070, 2015a.

LIMA, F.E.S.; CIBULSKI, S.P.; DALL BELLO, A.G.; MAYER, F.Q.; WITT, A.A.; ROEHE, P.M.; D'AZEVEDO, P.A. A novel chiropteran circovirus genome recovered from a Brazilian insectivorous bat species. **Genome Announc.**, 3 (6):01393-15, 2015b.

LOPEZ-BUENO, A.; TAMAMES, J.; VELAZQUEZ, D.; MOYA, A.; QUESADA, A.; ALCAMI, A. High diversity of the viral community from an Antarctic lake. **Science**, 326: 858–861, 2009.

LORINEZ, M.; CSAGOLA, A.; FARKAS, S.L., SZEKELY, C., TUBOLY, T. First detection and analysis of a fish circovirus. **J. Gen. Virol.**, 92: 1817–1821, 2011.

LUIS, A.D.; HAYMAN, D.T. S.; O'SHEA, T.J.; CRYAN, P.M.; GILBERT, A.T.; PULLIAM, J.R.C.; MILLS, J.N.; TIMONIN, M.E.; WILLIS, C.K.R.; CUNNINGHAM, A.A.; FOOKS, A. R.; RUPPRECHT, C.E.; WOOD, J.L.N.; WEBB, C.T. A comparison of bats and rodents as reservoirs of zoonotic viruses: are bats special? **Proc. R. Soc. B.**, 280: 20122753, 2013.

MACKENZIE, J. S. Emerging zoonotic encephalitis viruses: lessons from Southeast Asia and Oceania. **J. Neurovirol.**, 11: 434–440, 2005.

MADELEY, C.R.; COSGROVE, B.P. Letter: viruses in infantile gastroenteritis. **The Lancet**. 306 (7925), 124, 1975.

MAEDA, K.; HONDO, E.; TERAOKAWA, J.; KISO, Y.; NAKAICHI, N.; ENDOH, D.; SAKAI, K.; MORIKAWA, S.; MIZUTANI, T. Isolation of novel adenovirus from fruit bat (*Pteropus dasymallus yayeyamae*). **Emerg. Infect. Dis.** 14: 347–349, 2008.

MAGGI, F.; MACERA, L.; FOCOSI, D.; VATTERONI, M.L.; BOGGI, H.; ANTONELLI, G.; ELOIT, M.; PISTELLO, M. Human Gyrovirus DNA in Human Blood, Italy. **Emerging Infectious Diseases**, 18, (6), 2012.

MANKERTZ, A.; HATTERMANN, K.; EHLERS, B.; SOIKE, D. Cloning and sequencing of columbid circovirus (coCV), a new circovirus from pigeons. **Arch. Virol.**, 145: 2469–2479, 2000.

MANKERTZ, A. *et al.* Molecular biology of Porcine circovirus: analyses of gene expression and viral replication. **Veterinary Microbiology**, 98, 81-88, 2004.

MARKOTTER, W.; RANGLES, J.; RUPPRECHT, C.E.; SABETA, C.T.; TAYLOR, P.J.; WANDELER, A.I., *et al.* Lagos bat virus, South Africa. **Emerg. Infect. Dis.**, 12: 504–6, 2006a.

MARKOTTER, W.; KUZMIN, I.; RUPPRECHT, C.E.; RANGLES, J.; SABETA, C.T.; WANDELER, A.I., *et al.* Isolation of Lagos bat virus from water mongoose. **Emerg. Infect. Dis.**, 12: 1913–8, 2006b.

MARSH, G.A.; DE JONG, C.; BARR, J.A.; TACHEDJIAN, M.; SMITH, C.; MIDDLETON, D.; YU, M.; TODD, S. *et al.* Cedar Virus: A novel henipavirus isolated from Australian bats. **Plos Pathogens**, 8: 8-e1002836, 2012.

MARSH, G.; WANG, L-F. Hendra and Nipah viruses: why are they so deadly? **Current Opinion in Virology**, 2 (3), 242-247, 2012.

MARSTON, D.A.; HORTON, D.L.; NGELEJA, C.; HAMPSON, K.; MCELHINNEY, L.M.; BANYARD, A.C.; HAYDON, D.; CLEAVELAND, S.; RUPPRECHT, C.E.; BIGAMBO, M.; FOOKS, A.R.; LEMBO, T. Ikoma lyssavirus, highly divergent novel lyssavirus in an African civet. **Emerg. Infect. Dis.**, 18: 664–667, 2012.

MARTINA, B.E.; HAAGMANS, B.L.; KUIKEN, T., *et al.* SARS virus infection of cats and ferrets. **Nature**, 425: 915, 2003.

MARUYAMA, J.; MIYAMOTO, H.; KAJIHARA, M.; OGAWA, H.; MAEDA, K.; SAKODA, Y.; YOSHIDA, R.; TAKADA, A. Characterization of the Envelope Glycoprotein of a Novel Filovirus, Lloviu Virus. **Journal of Virology**, 88 (1), 99-109, 2014.

MATSUI, S.M.; GREENBERG, H.B. **Astroviruses**. In: David, P.M.H., Knipe, M. (Eds.), Anonymous. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, pg. 811–824, 1996.

MCAULIFFE, J.; VOGEL, L.; ROBERTS, A.; *et al.* Replication of SARS coronavirus administered into the respiratory tract of African Green, rhesus and cynomolgus monkeys. **Virology**, 330: 8–15, 2004.

MC CARTHY, A.J.; GOODMAN, S.J. Reassessing conflicting evolutionary histories of the Paramyxoviridae and the origins of respiroviruses with Bayesian multigene phylogenies. **Infect. Genet. Evol.**, 10, 97-107, 2010.

MCDANIEL, L.; BREITBART, M.; MOBBERLEY, J.; LONG, A.; HAYNES, M.; ROHWER, F.; PAUL, J.H. Metagenomic analysis of lysogeny in Tampa Bay: implications for prophage gene expression. **Plos One**, 3:e3263, 2008.

MCKNIGHT, C.A.; WISE, A.G.; MAES, R.K.; HOWE, C.; RECTOR, A.; VAN RANST, M.; KIUPEL, M. Papillomavirus-associated basosquamous carcinoma in an Egyptian fruit bat (*Rousettus aegyptiacus*). **J. Zoo Wildl. Med.**, 37:193–196, 2006.

MEMISH, Z.A.; MISHRA, N.; OLIVAL, K.J.; FAGBO, S.F.; KAPOOR, V.; EPSTEIN, J.H.; ALHAKEEM, R.; AL ASMARI, M.; ISLAM, A.; KAPOOR, A.; BRIESE, T.; DASZAK, P.; AL RABEEAH, A.A.; LIPKIN, W. I. Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus in Bats, Saudi Arabia. **Emerging Infectious Diseases**, 19 (11), 2013.

MENDEZ, E.; ARIAS, C. F. Astroviruses. In: KNIFE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Eds.). **Fields Virology**. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p. 981–1000, 2007.

MILLS, J.N.; ALIM, A.N.; BUNNING, M.L.; LEE, O.B.; WAGONER, K.D.; AMMAN, B.R.; STOCKTON, P.C.; KSIAZEK, T.G. Nipah virus infection in dogs, Malasia, 1999. **Emerg. Infect. Dis.**, 15: 950-952, 2009.

MISRA, V.; DUMONCEAUX, T.; DUBOIS, J.; WILLIS, C.; NADIN-DAVIS, S.; SEVERINI, A.; WANDELER, A.; LINDSAY, R.; ARTSOB, H. Detection of polyoma and corona viruses in bats of Canada. **J. Gen. Virol.**, 90:2015–2022, 2009.

MÜHLDORFER, K.; SPECK, S.; KURTH, A.; LESNIK, R.; FREULING, C.; MÜLLER, T.; KRAMER-SCHADT, S.; WIBBELT, G. Diseases and Causes of Death in European Bats: Dynamics in Disease Susceptibility and Infection Rates. **Plos One**, 6 (12), 2011.

MÜLLER, T.; COX, J.; PETER, W.; SCHAFER, R.; JOHNSON, N.; MCELHINNEY, L.M.; *et al.* Spill-over of European bat lyssavirus type 1 into a stone marten (*Martes foina*) in Germany. **J. Vet. Med. B.**, 51:49–54, 2004.

MULLER, T.; JOHNSON, N.; FREULING, C.M.; FOOKS, A.R.; SELHORST, T.; VOS, A. Epidemiology of bat rabies in Germany. **Arch. Virol.**, 152: 273-288, 2007.

MUYEMBE-TAMFUM, J.J.; MULANGU, S.; MASUMU, J.; KAYEMBE, J.M.; KEMP, A.; PAWESKA, J.T. Ebola virus outbreaks in Africa: Past and present. **Journal of Veterinary Research**, 79: 8-12, 2012.

NEGREDO, A.; PALACIOS, G.; VÁZQUEZ-MORÓN, S.; GONZÁLEZ, F.; DOPAZO, H.; MOLERO, F.; JUSTE, J.; QUETGLAS, J.; SAVJI, N.; MARTÍNEZ, M.C.; HERRERA, J.E.; PIZARRO, M.; HUTCHISON, S.K.; ECHEVARRÍA, J.E.; LIPKIN, W.I.; TENORIO, A. Discovery of an Ebolavirus-like filovirus in Europe. **Plos Pathogens**, 7 (10), 2011.

NIAGRO, F.D.; FORSTHOEFEL, A.N.; LAWThER, R.P.; KAMALANATHAN, L.; RITCHIE, B.W.; LATIMER, K.S.; LUKERT, P.D. Beak and feather disease virus and porcine circovirus genomes: intermediates between the geminiviruses and plant circoviruses. **Arch. Virol.**, 143: 1723–1744, 1998.

NOTEBORN, M.H.; DE BOER, G.F.; VAN ROOZELAAR, D.J.; KARREMAN, C.; KRANENBURG, O. *et al.* Characterization of cloned chicken anemia virus DNA that contains all elements for the infectious replication cycle. **Journal of Virology**, 65: 3131-3139, 1991.

NOWAK, R.M. **Walker's Mammals of the World**. 6 ed., v. II. Baltimore: The Johns Hopkins University Press, 1936 p., 1999.

OLSON, J.G.; RUPPRECHT, C.; ROLLIN, P.E., *et al.* Antibodies to Nipah-like virus in bats

(*Pteropus lylei*), Cambodia. **Emerg. Infect. Dis.**, 8: 987–988, 2002.

OMATSU, T.; WATANABE, S.; AKASHI, H.; YOSHIKAWA, Y. Biological characters of bats in relation to natural reservoir of emerging viruses. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.**, 30: 357–374, 2007.

OPRIESSNIG, T.; MENG, X.J.; HALBUR, P.G. Porcine circovirus type 2 associated disease: update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. **J. Vet. Diag. Invest.**, 19: 591-615, 2007.

O'SHEA, T.J.; CRYAN, P.M.; CUNNINGHAM, A.A.; FOOKS, A.R.; HAYMAN, D.T.; LUIS, A.D.; PEEL, A.J.; PLOWRIGTH, R.K.; WOOD, J.L. Bat flight and zoonotic viruses. **Emerg. Infect. Dis.**, 20: 741-745, 2014.

O'SULLIVAN, J.D.; ALLWORTH, A.M.; PATERSON, D.L., *et al.* Fatal encephalitis due to novel paramyxovirus transmitted from horses. **Lancet**, 349: 93–95, 1997.

PACHECO, S. M. Técnicas de campo empregadas no estudo de quirópteros. **Caderno La Salle XI**, Canoas, v.2, nº 1, 280 p., 2004.

PACHECO, S.M.; SODRÉ, M.; GAMA, A.R.; BREDT, A.; CAVALLINI, E.M.S; MARQUES, R.V.; GUIMARÃES, M.M.; BIANCONI, G. Morcegos Urbanos: Status do conhecimento e Plano de ação para a conservação no Brasil. **Chiroptera Neotropical**, 16 (1), 2010.

PAGLIA, A.P.; DA FONSECA, G.AB.; RYLANDS, A.B.; HERRMANN, G.; AGUIAR, L.M.S.; CHIARELLO, A.G.; LEITE, Y.L.R.; COSTA, L.P.; SICILIANO, S.; KIERULFF, M.C.M.; MENDES, S.L.; TAVARES, V.C.; MITTERMEIER, R.A.; PATTON, J.L. Lista anotada dos Mamíferos do Brasil. 2a edição. **Conservation International Occasional Paper**, n. 6, 2012.

PARASHAR, U.D.; SUNN, L.M.; ONG, F., *et al.* Case-control study of risk factors for human infection with a new zoonotic paramyxovirus, Nipah virus, during a 1998–1999 outbreak of severe encephalitis in Malaysia. **J. Infect. Dis.**, 181: 1755–1759, 2000.

PATON, N.I.; LEO, Y.S.; ZAKI, S.R., *et al.* Outbreak of Nipahvirus infection among abattoir workers in Singapore. **Lancet**, 354: 1253–1256, 1999.

PAUL, S.D.; RAJAGOPALAN, P.K.; SREENIVASAN, M.A. Isolation of the West Nile virus from the frugivorous bat, *Rousettus leschenaulti*. **Indian J. Med. Res.**, 58: 1169–1171, 1970.

PAVRI, K.M.; SINGH, K.R.; HOLLINGER, F.B. Isolation of a new parainfluenza virus from a frugivorous bat, *Rousettus leschenaulti*, collected at Poona, India. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 20: 125–130, 1971.

PAWESKA, J.T.; BLUMBERG, L.H.; LIEBENBERG, C.; HEWLETT, R.H.; GROBELAAR, A.A.; LEMAN, P.A., *et al.* Fatal human infection with rabies-related Duvenhage virus, South Africa. **Emerg. Infect. Dis.**, 12: 1965–7, 2006.

PHAN, T.G.; KAPUSINSZKY, B.; WANG, C.; ROSE, R.K.; LIPTON, H.L.; DELWART, E.L. The fecal viral flora of wild rodents. **Plos Pathogens**, 7:e1002218, 2011.

PHILBEY, A.; KIRKLAND, P.; ROSS, A. An apparently new virus (family Paramyxoviridae) infectious for pigs, humans and fruit bats. **Emerg. Infect. Dis.**, 4: 269, 269-271, 1998.

PHAN, T.G.; KAPUSINSZKY, B.; WANG, C.L.; ROSE, R.K.; LIPTON, H.L.; DELWART, E.L. The fecal viral flora of wild rodents. **Plos Pathogens**, 7:e1002218, 2011.

POURRUT, X.; KUMULUNGUI, B.; WITTMANN, T., *et al.* The natural history of Ebola virus in Africa. **Microb Infect**, 7: 1005–1014, 2005.

QUAN, P.L.; FIRTH, C.; STREET, C., *et al.*, “Identification of a severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in a leafnosed bat in Nigeria,” **mBio**, vol. 1, no. 4, article e00208-10, 2010.

QUAN, P.L.; FIRTH, C.; CONTE, J.M.; WILLIAMS, S.H.; ZAMBRANA-TORRELIO, C.M.; ANTHONY, S.J.; ELLISON, J.A.; GILBERT, A.T.; KUZMIN, I.V.; NIEZGODA, M.;

OSINUBI, M.O.V.; RECUENCO, S.; MARKOTTER, W.; BREIMAN, R.F.; KALEMBA, L.; MALEKANI, J.; LINDBLADE, K.A.; ROSTAL, M.K.; OJEDA-FLORES, R.; SUZAN, G.; DAVIS, L.B.; BLAU, D.M.; OGUNKOYA, A.B.; CASTILLO, D.A.A.; MORAN, D.; NGAM, S.; AKAIBE, D.; AGWANDA, B.; BRIESE, T.; EPSTEIN, J.H.; DASZAK, P.; RUPPRECHT, C.E.; HOLMES, E.C.; LIPKIN, W.I.) Bats are a major natural reservoir for hepaciviruses and pegiviruses. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, 110: 8194–8199, 2013.

RACEY, P.A.; ENTWISTLE, A.C. **Life-history and reproductive strategies of bats**. In: CRICHTON, E.G.; KRUTZSCH, P.H. (eds) *Reproductive biology of bats*. Academic Press, London, p 363–414, 2000.

REN, W.; LI, W.; YU, M.; HAO, P.; ZHANG, Y.; ZHOU, P.; ZHANG, S.; ZHAO, G.; ZHONG, Y.; WANG, S.; WANG, L.F.; SHI, Z. Full-length genome sequences of two SARS-like coronaviruses in horseshoe bats and genetic variation analysis. **J. Gen. Virol.**, 87:3355–3359, 2006.

REYNES, J.M.; COUNOR, D.; ONG, S., *et al.* Nipah virus in Lyle's flying foxes, Cambodia. **Emerg. Infect. Dis.**, 11: 1042–1047, 2005.

REYNOLDS, D.L.; SAIF, Y.M. Astrovirus: a cause of an enteric disease in turkey poults. **Avian Dis.**, 30 (4), 728–735, 1986.

RICHARDSON, P. 2002. **Bats**. London: The Natural History Museum. 112p.

RIJSEWIJK, F.A.M.; DOS SANTOS, H.F.; TEIXEIRA, T.F.; CIBULSKI, S.P.; VARELA, A.P.M.; DEZEN, D.; FRANCO, A.C.; ROEHE, P.M. Discovery of a genome of a distant relative of chicken anemia virus reveals a new member of the genus *Gyrovirus*. **Arch. Virol.**, 156: 1097–1100, 2011.

RIVERA, R.; NOLLENS, H. H.; VENN-WATSON, S.; GULLAND, F. M.; WELLEHAN JR, J. F. Characterization of phylogenetically diverse astroviruses of marine mammals **Journal of Clinical Microbiology**, 91 (1), 166–173, 2010.

ROBERTS, A.; VOGEL, L.; GUARNER, J., *et al.* Severe acute respiratory syndrome

coronavirus infection of golden Syrian hamsters. **J. Virol.**, 79: 503–511, 2005.

RONSHOLT, L. Rabies. **Bull. Eur.**, 2 (15), 2002.

ROSARIO, K.; DUFFY, S.; BREITBART, M. Diverse circovirus-like genome architectures revealed by environmental metagenomics. **J. Gen. Virol.**, 90: 2418–2424, 2009.

ROSARIO, K.; MARINOV, M.; STANTON, D.; KRABERGER, S.; WILTSHIRE, E.J.; COLLINGS, D.A.; WALTERS, M.; MARTIN, D.P.; BREITBART, M.; VARSANI, A. Dragonfly cyclovirus, a novel single-stranded DNA virus discovered in dragonflies (Odonata: Anisoptera). **J. Gen. Virol.**, 92:1302–1308, 2011.

SABETA, C.T.; MARKOTTER, W.; MOHALE, D.K.; SHUMBA, W.; WANDELER, A.I.; NEL, L.H. Mokola virus in domestic mammals, South Africa. **Emerg. Infect. Dis.**, 13 (9):1371-3, 2007.

SALUZZO, J.F.; ROLLIN, P.E.; DAUGARD, C.; DIGOUTTE, J.P.; GEORGES, A.J.; SUREAU, P. Premier isolement du virus Mokola a partir d'une rongeur (*Lophuromys sikapusi*). **Annales de Institut Pasteur Virologie**. 135: 57–66, 1984.

SAUVAGE, V.; CHEVAL, J.; FOULONGNE, V.; GOUILH, M.A.; PARIENTE, K.; MANUGUERRA, J.C.; RICHARDSON, J.; DEREURE, O.; LECUIT, M.; BURGUIERE, A.; CARO, V.; ELOIT, M. Identification of the first human Gyrovirus, a virus related to chicken anemia virus. **J. Virol.**, 85: 7948–7950, 2011.

SELVEY, L.A.; WELLS, R.M.; MCCORMACK, J.G., *et al.* Infection of humans and horses by a newly described morbillivirus. **Med. J. Aust.**, 162: 642–645, 1995.

SENDOW, I.; FIELD, H.E.; CURRAN, J., *et al.* Henipavirus in *Pteropus vampyrus* bats, Indonesia. **Emerg. Infect. Dis.**, 12: 711–712, 2006.

SHI, Z. Bat and virus. **Protein Cell** 1:109–114, 2010.

SHIMIZU, M.; SHIRAI, J.; NARITA, M.; YAMANE, T. Cytopathic astrovirus isolated from

porcine acute gastroenteritis in an established cell line derived from porcine embryonic kidney. **J. Clin. Microbiol.**, 28 (2), 201–206, 1990.

SIMAS, P.V.M.; BARNABÉ, A.C.S.; DURÃES-CARVALHO, R.; LIMA NETO, D.F.; CASERTA, L.C.; ARTACHO, L.; JACOMASSA, F.A.F.; MARTINI, M.C.; DOS SANTOS, M.M.A.B.; FELIPPE, P.A.N.; FERREIRA, H.L.; ARNS, C.W. Bat Coronavirus in Brazil Related to Appalachian Ridge and Porcine Epidemic Diarrhea Viruses. **Emerg. Infect. Dis.**, 21 (4), 2015.

SIMMONS, N. B. Order Chiroptera. *In*: WILSON, D. E.; REEDER, D. M. (Ed.). **Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference**. Baltimore: Johns Hopkins University, 2005. 2000 p.

SNODGRASS, D.R. & GRAY, E.W. Detection and transmission of 30 nm virus particles (astroviruses) in faeces of lambs with diarrhoea. **Archives Virology**, 55 (4), 287–291, 1977.

SPEAKMAN, J.R.; THOMAS, D.W. Physiological ecology and energetics of bats. *In* T.H. Kunz, M.B. Fenton (Eds.), **Bat ecology**, The University of Chicago Press, Chicago, pp.430–90, 2003.

STEWART, M.E.; PERRY, R.; RAIDAL, S.R. Identification of a novel circovirus in Australian ravens (*Corvus coronoides*) with feather disease. **Avian Pathol.** 35:86–92, 2006.

STRAIN, E.; KELLEY, L. A.; SCHULTZ-CHERRY, S.; MUSE, S. V.; KOZI, M. D. Genomic analysis of closely related astroviruses. **Journal of Virology**. 82 (10), 5099–5103, 2008.

SWANEPOEL, R.; LEMAN, P.A.; BURT, F.J. Experimental inoculation of plants and animals with Ebola virus. **Emerg. Infect. Dis.**, 2: 321–5, 1996.

SWANEPOEL, R.; SMIT, S.B.; ROLLIN, P.E.; FORMENTY, P.; LEMAN, P.A.; KEMP, A.; BURT, F.J.; GROBBELAAR, A.A.; CROFT, J.; BAUSCH, D.G., *et al.* Studies of reservoir hosts for Marburg virus. **Emerg. Infect. Dis.**, 13, 1847–1851, 2007.

TAYLOR, L.H.; LATHAM, S.M.; WOOLHOUSE, M.E.J. Risk factors for human disease

emergence. **Phil. Trans. R. Soc. Lond.**, B 356, 983–989, 2001.

TODD, D.; WESTON, J.H.; SOIKE, D; SMYTH, J.A. Genome sequence determinations and analyses of novel circoviruses from goose and pigeon. **Virology**, 286: 354–362, 2001.

TODD, D.; HINO, S.; MANKERTZ, A.; MISHIRO, S.; RAIDAL, S.; RITCHIE, B.W.; BIAGINI, P.; OKAMOTO, H.; NIEL, C.; BENDINELLI, M.; TEO, C.G. Family Circoviridae. In: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA (eds) **Virus taxonomy**: eighth report of the international committee on taxonomy of viruses. Academic Press, San Diego, pp 327–341, 2005.

TODD, D.; SCOTT, A.N.; FRINGUELLI, E.; SHIVRAPRASAD, H.L.; GAVIER-WIDEN, D.; SMYTH, J.A. Molecular characterization of novel circoviruses from finch and gull. **Avian. Pathol.**, 36: 75–81, 2007.

TOFFAN, A; JONASSEN, C.M; DE BATTISTI, C.; SCHIAVON, E.; KOFSTAD, T.; CAPUA, I; CATTOLI, G. Genetic characterization of a new astrovirus detected in dogs suffering from diarrhoea. **Vet. Microbiol.**, 139: 147–152, 2009.

TONG, S.; LI, Y.; RIVAILLER, P.; CONRARDY, C.; CASTILLO, D.A. A.; CHEN, L.M.; RECUENCO, S.; ELLISON, J.A.; DAVIS, C.T.; YORK, I.A.; TURMELLE, A.S.; MORAN, D.; ROGERS, S.; SHI, M.; TAO, Y.; WEIL, M.R.; TANG, K.; ROWE, L.A.; SAMMONS, S.; XU, X.; FRACE, M.; LINDBLADE, K.A.; COX, N.J.; ANDERSON, L.J.; RUPPRECHT, C.E.; DONIS, R.O. A distinct lineage of influenza A virus from bats. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 109: 4269–4274, 2012.

TOWNER, J.S.; POURRUT, X.; ALBARINO, C.G.; NKOUE, C.N.; BIRD, B.H.; GRARD, G.; KSIAZEK, T.G.; GONZALEZ, J.P.; NICHOL, S.T.; LEROY, E.M. Marburg virus infection detected in a common African bat. **Plos One**, 2 (8), 2007.

TOWNER, J.S.; AMMAN, B.R.; SEALY, T.K.; CARROLL, S.A.; COMER, J.A.; KEMP, A.; SWANEPOEL, R.; PADDOCK, C.D.; BALINANDI, S.; KHRISTOVA, M.L., et al.. Isolation of genetically diverse Marburg viruses from Egyptian fruit bats. **Plos Pathog.**, 5, e1000536, 2009.

TSUDA, S.; WATANABE, S.; MASANGKAY, J.S.; MIZUTANI, T.; ALVIOLA, P.; UEDA, N.; IHA, K.; TANIGUCHI, S.; FUJII, H.; KATO, K.; HORIMOTO, T.; KYUWA, S.; YOSHIKAWA, Y.; AKASHI, H. Genomic and serological detection of bat coronavirus from bats in the Philippines. **Arch. Virol.**, 157: 2349–2355, 2012.

ULLOA, J.C.; GUTIERREZ, M.F. Genomic analysis of two ORF2 segments of new porcine astrovirus isolates and their close relationship with human astroviruses. **Canadian Journal of Microbiology**. 56 (7), 569–577, 2010.

VAN BOHEEMEN, S.; DE GRAAF, M.; LAUBER, C.; BESTEBROER, T.M.; RAJ, V.S.; ZAKI, A.M.; OSTERHAUS, A.D.M.E.; HAAGMANS, B.L.; GORBALENYA, A.E.; SNIJDER, E.J.; *et al.* Genomic Characterization of a Newly Discovered Coronavirus Associated with Acute Respiratory Distress Syndrome in Humans. **mBio**, 3, e00473-12, 2012.

VAN DER POEL, W.H.; LINA, P.H.; KRAMPS, J.A. Public health awareness of emerging zoonotic viruses of bats: a European perspective. **Vector Borne Zoonotic Dis.**, 6: 315–324, 2006.

VAN THIEL, P.; VAN DEN HOEK, J.; EFTIMOV, F.; TEPASKE, R.; ZAAIJER, H.; SPANJAARD, L. *et al.* Fatal case of human rabies (Duvenhage virus) from a bat in Kenya: the Netherlands, December 2007. **Euro Surveillance**, 13: 118, 2008.

VEGA THURBER, R.L.; BAROTT, K.L.; HALL, D.; LIU, H.; RODRIGUEZ-MUELLER, B.; DESNUES, C.; EDWARDS, R.A.; HAYNES, M.; ANGLY, F.E.; WEGLEY, L.; ROHWER, F.L. Metagenomic analysis indicates that stressors induce production of herpes-like viruses in the coral *Porites compressa*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 105: 18413–18418, 2008.

VOS, A.; KAIPF, I.; DENZINGER, A.; FOOKS, A.R.; JOHNSON, N.; MULLER, T. European bat lyssaviruses – an ecological enigma. **Acta Chiroterologica**, 9, 283–296. , 2007.

WACHARAPLUESADEE, S.; LUMLERTDACHA, B.; BOONGIRD, K.; WANGHONGSA, S.; CHANHOME, L., *et al.* Bat Nipah virus, **Thailand. Emerg Infect**

Dis, 11: 1949–1951, 2005.

WANG, L. F. Bats and Viruses: a Brief Review. **Virologica Sinica**, 24 (2), 93-99, 2009.

WATANABE, S.; UEDA, N.; IHA, K.; MASANGKAY, J.S.; FUJII, H.; ALVIOLA, P.; MIZUTANI, T.; MAEDA, K.; YAMANE, D.; WALID, A.; KATO, K.; KYUWA, S.; TOHYA, Y.; YOSHIKAWA, Y.; AKASHI, H. Detection of a new bat gammaherpesvirus in the Philippines. **Virus Genes**, 39, 90–93, 2009.

WEINGARTL, H.M.; COPPS, J.; DREBOT, M.A.; MARSZAL, P.; SMITH, G.; GREN, J.; ANDONOVA, M.; PASICK, J.; KITCHING, P.; CZUB, M. Susceptibility of pigs and chickens to SARS coronavirus. **Emerg. Infect. Dis.**, 10: 179–184, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Severe acute respiratory syndrome (SARS). **Wkly. Epidemiol. Rec.**, 78: 81–83, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Middle East respiratory syndrome (MERS-CoV). Disponível em: <<http://www.who.int/csr/don/23-march-2016-mers-saudi-arabia/en/>> Acessado 03/03/2016.

WIBBELT, G.; SPECK, S.; FIELD, H. Methods for assessing diseases in bats. *In*: Kunz TH, Parsons S, (ed.) **Ecological and Behavioral Methods for the Study of Bats**. 2nd Edition The Johns Hopkins University Press. pp 775–794, 2009.

WILLNER, D.; FURLAN, M.; HAYNES, M.; SCHMIEDER, R.; ANGLY, F.E.; SILVA, J.; TAMMADONI, S.; NOSRAT, B.; CONRAD, D.; ROHWER, F. Metagenomic analysis of respiratory tract DNA viral communities in cystic fibrosis and non-cystic fibrosis individuals. **Plos ONE**, 4:e7370, 2009.

WILSON, D.E.; REEDER, D.M. (Eds.). **Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference**. 3. ed. V.1. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 218p, 2005.

WONG, S.; LAU, S.; WOO, P.; YUEN, K.Y. Bats as a continuing source of emerging infections in humans. **Rev. Med. Virol.** 17: 67–91, 2007.

WOO, P.C.; LAU, S.K.; LI, K.S.; POON, R.W.; WONG, B.H.; TSOI, H.W. *et al.* Molecular diversity of coronaviruses in bats. **Virology**, 351(1), 180–7, 2006.

WOO, P.C.; LAU, S.K.; LAM, C.S.; LAU, C.C.; TSANG, A.K.; LAU, J.H.; BAI, R.; TENG, J.L.; TSANG, C.C.; WANG, M.; ZHENG, B.J.; CHAN, K.H.; YUEN, K.Y. Discovery of seven novel Mammalian and avian coronaviruses in the genus deltacoronavirus supports bat coronaviruses as the gene source of alphacoronavirus and betacoronavirus and avian coronavirus as the gene source of gammacoronavirus and deltacoronavirus. **Journal of Virology**, 86: 3995-4008, 2012.

WOODE, G.N.; BRIDGER, J.C. Isolation of small viruses resembling astroviruses and caliciviruses from acute enteritis of calves. **J. Med. Microbiol.**, 11 (4), 441– 452, 1978.

WOOLHOUSE, M. E. & GOWTAGE-SEQUEIRA, S. Host range and emerging and reemerging pathogens. **Emerg Infect Dis.** 11: 1842-1847, 2005.

WU, Z.; REN, X.; YANG, L.; HU, Y.; YANG, J.; HE, G.; ZHANG, J.; DONG, J.; SUN, L.; DU, J.; LIU, L.; XUE, Y.; WANG, J.; YANG, F.; ZHANG, S.; JIN, Q. Virome analysis for identification of novel mammalian viruses in bat species from Chinese provinces. **Journal of Virology**, 86: 10999–11012, 2012.

WU, Z.; YANG, L.; REN, X.; HE, G.; ZHANG, YANG, J.; QIAN, Z.; DONG, J.; SUN, L.; ZHU, Y.; DU, J.; YANG, F.; ZHANG, S.; JIN, Q. Deciphering the bat virome catalog to better understand the ecological diversity of bat viruses and the bat origin of emerging infectious diseases **The ISME Journal**, 1–12, 2015.

WYNNE, J. W. & WANG, L. F. Bats and Viruses: Friend or Foe? **PLoS Pathogens** 9 (10), 2013.

XIAO, J.; LI, J.; HU, G.; CHEN, Z.; WU, Y.; CHEN, Y.; CHEN, Z.; LIAO, Y.; ZHOU, J.; KE, X.; MA, L.; LIU, S.; ZHOU, J.; DAI, Y.; CHEN, H.; YU, S.; CHEN, Q. Isolation and phylogenetic characterization of bat astroviruses in southern China. **Arch. Virol.**, 156:1415–1423, 2011.

YOB, J.M.; FIELD, H.; RASHDI, A.M. *et al.* Nipah virus infection in bats (order Chiroptera) in peninsular Malaysia. **Emerg. Infect. Dis.**, 7: 439–441, 2001.

YOUNG, P.L.; HALPIN, K.; SELLECK, P.W., *et al.* Serologic evidence for the presence in Pteropus bats of a paramyxovirus related to equine morbillivirus. **Emerg. Infect. Dis.**, 2: 239–240, 1996.

YUAN, J.; HON, C.-C.; LI, Y.; WANG, D.; XU, G.; ZHANG, H.; ZHOU, P.; POON, L.L.M.; LAM, T.T.-Y.; LEUNG, F.C.-C.; *et al.* Intraspecies diversity of SARS-like coronaviruses in *Rhinolophus sinicus* and its implications for the origin of SARS coronaviruses in humans. **J. Gen. Virol.**, 91, 1058–1062, 2010.

ZAKI, A.M.; VAN BOHEEMEN, S.; BESTEBROER, T.M.; OSTERHAUS, A.D.M.E.; FOUCHIER, R.A.M. Isolation of a Novel Coronavirus from a Man with Pneumonia in Saudi Arabia. **N. Engl. J. Med.**, 367, 1814–1820, 2012.

ZHANG, H.; TODD, S.; TACHEDJIAN, M.; BARR, J. A.; LUO, M.; YU, M.; MARSH, G. A.; CRAMERI, G.; WANG, L. F. A novel bat herpesvirus encodes homologues of major histocompatibility complex classes I and II, c-type lectin, and a unique family of immune-related genes. **Journal of Virology**, 86: 8014–8030, 2012.

ZHANG, G., COWLED, C., SHI, Z., HUANG, Z., *et al.* Comparative analysis of bat genomes provides insight into the evolution of flight and immunity. **Science**, 339: 456-460. 2013.

ZHONG, N.S.; ZHENG, B.J.; LI, Y.M., *et al.* Epidemiology and cause of severe acute respiratory syndrome (SARS) in Guangdong, People's Republic of China, in February. **Lancet**, 362: 1353–1358, 2003

ZHU, H.C.; CHU, D.K.; LIU, W.; DONG, B.Q.; ZHANG, S.Y.; ZHANG, J.X.; LI, L.F.; VIJAYKRISHNA, D.; SMITH, G.J.; CHEN, H.L.; POON, L.L.; PEIRIS, J.S.; GUAN, Y. Detection of diverse astroviruses from bats in China. **J. Gen. Virol.**, 90:883–887, 2009.