

**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOEXPERIMENTAÇÃO**

**QUIRÓPTEROS: POPULAÇÃO E POTENCIAL ZONÓTICO EM
GRANJAS DE SUÍNOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Flávia Stefanello

**Passo Fundo, RS, Brasil
2015**

QUIRÓPTEROS: POPULAÇÃO E POTENCIAL ZONÓTICO EM GRANJAS DE SUÍNOS

Flávia Stefanello

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação, Área de Concentração em Bioexperimentação, da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo (UPF), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestra em Bioexperimentação**

Orientador: Prof. Eraldo Lourenso Zanella

**Passo Fundo, RS, Brasil
2015**

**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOEXPERIMENTAÇÃO**

A comissão examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado

**QUIRÓPTEROS: POPULAÇÃO E PONTENCIAL ZONÓTICO EM GRANJAS DE
SUÍNOS NO SUL DO BRASIL**

Elaborada por
Flávia Stefanello

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestra em Bioexperimentação

Comissão Examinadora



**Eraldo Lourenço Zanella, Dr., UPF
(Orientadora/Presidente)**



Ricardo Zanella, Dr., UPF



Maurício Egidio Cantão, Dr., EMBRAPA

**Passo Fundo, RS, Brasil
2015**

CIP – Catalogação na Publicação

S816q Stefanello, Flávia
Quirópteros : população e potencial zoonótico em
granjas de suínos / Flávia Stefanello. – 2015.
69 f. : il., color. ; 30 cm.

Orientador: Prof. PhD. Eraldo Lourenso Zanella.
Dissertação (Mestrado em Bioexperimentação) –
Universidade de Passo Fundo, 2015

1. Morcego- Zoonoses. 2. Influenza A (H1N1).
3. Suíno - Zoonoses. I. Zanella, Eraldo Lourenso,
orientador. II. Título.

CDU: 599.4

Catalogação: Bibliotecária Jucelei Rodrigues Domingues - CRB 10/1569

AGRADECIMENTOS

À Universidade de Passo Fundo, pela bolsa de isenção de mensalidade, ao Curso de Medicina Veterinária, professores, funcionários, estagiários envolvidos e demais colaboradores;

Ao meu orientador Eraldo Lourenso Zanella, por todo apoio e incentivo, e principalmente por não ter deixado desistir quando todos acharam que não seria possível;

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS), pelo financiamento de bolsa auxílio;

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, EMBRAPA Suínos e Aves (CNPSA), nas pessoas de Janice Ciacci dos Reis Zanella, Ricardo Zanella e Adriana Mercia Ibelli;

À Universidade FEEVALE, nas pessoas de Fernando Rosado Spilki e Rodrigo Staggemeier;

Aos alunos do Curso de Graduação em Medicina Veterinária: Francine Daros, Franciele Lanzarini, Janine de Camargo, Mairi Badalotti e Paulo Ricardo Michelin. Além de toda a vivência de campo, agradeço pela amizade, carinho e apoio ao longo desses dois anos.

Deixo a todos o meu muito obrigado e a certeza do reconhecimento, sem a participação de cada um de vocês, não seria possível realizar este trabalho.

DEDICATÓRIA

Só se torna realidade a vivência de um sonho se você acreditar nele. Dedico esse trabalho a todos aqueles que acreditam que o primeiro passo para se concretizar um sonho, é acreditar nele e na sua capacidade de torná-lo real. É a esperança, seguida da coragem, determinação e a vontade de chegar ao fim. Dedico em especial a minha maior incentivadora e que nunca me deixou desistir: minha amada mãe, Elenita Stefanello, “*in memoriam*”. Se eu dei mais este passo, com certeza foi com a tua infinita capacidade de me dizer que eu era capaz.

EPÍGRAFE

“Sua tarefa é descobrir o seu trabalho e, então, com todo o coração, dedicar-se a ele”.

Buda

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS	xii
1. INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 ORDEM CHIROPTERA.....	17
2.2 MORCEGOS: PERFIL ZOONÓTICO.....	18
2.3 SUINOCULTURA, BIOSSEGURIDADE E ZOONOSES.....	22
2.4 AGENTES ENCONTRADOS EM MORCEGOS.....	23
2.4.1 Vírus Da Influenza A.....	23
2.4.2 Vírus Da Hepatite E.....	26
2.4.3 Adenovírus.....	27
3 CAPÍTULO 1	30
Bat species (Mammalia, Chiroptera) identified in swine farms in southern Brazil.....	30
Abstract.....	31
Introduction.....	31
Materials and Methods.....	32
Results and Discussion.....	34
Acknowledgment.....	36
Appendices.....	36
References.....	37
4 CAPÍTULO 2	40
Molecular markers for zoonotic potential assessment bats in swine farms in southern Brazil.....	40
Abstract.....	41
Introduction.....	41
Materials and Methods.....	43
Results and Discussion.....	45
Phylogenetic analysis.....	46
Final Considerations.....	47

References	50
5 CONCLUSÕES	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
ANEXOS	59

LISTA DE FIGURAS

1. INTRODUÇÃO

- FIGURA 1. Infecções emergentes e reemergentes: 70% são transmitidas por vetores ou são zoonóticas, entre os animais que se incluem nessa categoria, estão os morcegos, com ampla distribuição geográfica..... 14

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- FIGURA 1. Ilustração esquemática da estrutura de Vírus da Influenza, indicando a localização das proteínas na partícula vírica. Glicoproteínas do envelope: HA: hemaglutinina; NA: neuraminidase; M2: canal de íons; M: proteína da matriz. Componentes do complexo ribonucleoproteína: RNA: recoberto pela NP; NP: nucleoproteína; PA: polimerase ácida; PB1: polimerase básica 1; PB2: polimerase básica 2..... 23
- FIGURA 2. Fotografia de microscopia eletrônica de vírions da família *Orthomyxoviridae* (Influenza A)..... 23
- FIGURA 3. Evolução do vírus da influenza A H5N1 por meio de infecções em várias espécies..... 24
- FIGURE 4. Imagem microscópica do Vírus da Hepatite E..... 25
- FIGURE 5. Partículas virais de AdV encontradas em fezes de morcegos..... 27
- FIGURE 6. Eletromicrografia de partículas de AdV isolado de morcegos da espécie *Pipistrellus Pipistrellus* na Alemanha. Coloração a 1% de acetato de uranila. Partículas virais com 70-90nm de diâmetro e forma icosaédrica. 28

3. CAPÍTULO 1

- FIGURE 1. Location of farms pigs indicating where the capture sessions of bats were performed (Camargo/RS, Vila Maria/RS and Concordia/SC)..... 35

4. CAPÍTULO 2

- FIGURE 1. Nested PCR indicating the samples positive for Adv 46
- FIGURE 2. Phylogenetic Tree showing the positive samples of Adv found in liver of bat, from the molecular technique Nested PCR. Individuals 08, 43, 44.50, 59, 60 and 66. Serotypes found HumanAdV5 and BovineAdV3... 47

LISTA DE TABELAS**3. CAPÍTULO 1**

TABLE 1.	List of bats recorded during the period from September to December 2014, in farms of pigs in the interior of the state of Rio Grande do Sul and Santa Catarina, Brazil.....	36
----------	---	----

4. CAPÍTULO 2

TABLE 1.	Species of bats that use shelters in swine farms and pathogens tested through molecular diagnosis specific to each virus.....	47
TABLE 2.	Species of bats and viral strains of Adenovirus identified in individuals who use swine farms as a shelter. Serotypes HumanAdV5 and BovineAdV3.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS

µg	Micrograma
µL	Microlitro
AAV	Adenovírus Associados
AdV	Adenovírus
cDNA	Ácido Desoxirribonucléico Complementar
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CNPISA	Centro Nacional de Pesquisa em Suínos e Aves
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
E1A	Proteínas ativadoras de genes virais
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FLU-AV	Vírus Influenza A
FLU-BV	Vírus Influenza B
FLU-CV	Vírus Influenza C
HA	Hemaglutinina
HEV	Vírus da Hepatite E
HRM	Melt de Alta Resolução
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente
ICMBIO	Instituto Chico Mendes
M	Proteína de Matriz
M2	Canal de íons
MERS-CoV	Síndrome Respiratória Humana do Oriente Médio Coronavírus
ml	Mililitros
NA	Neuranimidase
NP	Nucleoproteína
NVI	Nipah Vírus
PA	Polimerase Ácida
PB1	Polimerase Básica 1
PB2	Polimerase Básica 2
pM	Picomol
qPCR	Reação da Polimerase em cadeia em tempo real
RNA	Ácido Ribonucléico
RNP	Ribonucleoproteína
RT-PCR	Transcrição Reversa da Reação da Polimerase em Cadeia
SARS	Síndrome Respiratória Aguda
SARS-CoV	Síndrome Respiratória Aguda Coronavírus
SISBIO	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
UPL	Unidade Produtora de Leite

RESUMO

**Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação
Universidade de Passo Fundo**

QUIRÓPTEROS: POPULAÇÃO E POTENCIAL ZONÓTICO EM GRANJAS DE SUÍNOS

Autor: Flávia Stefanello

Orientador: Eraldo Lourenso Zanella
Passo Fundo, Agosto de 2015.

O presente estudo avalia o potencial zoonótico de morcegos que utilizam granjas de suínos ou seu entorno como abrigo para suas colônias, na região Sul do Brasil, incluindo áreas rurais dos municípios de Camargo/RS, Vila Maria/RS e Concórdia/SC, além disso, descreve a identificação das famílias encontradas (Molossidae e Vespertilionidae) e também as espécies (*Molossus molossus*, *Histiotus velatus* e *Molossus rufus*). Conforme autorização do órgão nacional competente (SISBIO/ICMBIO) e a Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade de Passo Fundo (CEUA-UPF) capturamos 80 indivíduos, sendo os mesmos pertencentes a duas famílias e três espécies. Na mesma área foi coletado amostra de 37 suínos na fase de creche. Todos os animais passaram por procedimentos de captura através de redes de neblina, sedação inalatória, procedimentos de transporte, anestesia, identificação de famílias/espécies, coleta de sangue através de punção cardíaca, eutanásia, necropsia, coleta de tecidos de interesse (pulmão, fígado). Após a coleta de tecidos, realizou-se a extração de RNA, feita com Trizol®, de amostras de sangue de morcegos e de 37 suínos, pulmão e fígado de morcegos. Investigamos em amostras de sangue (morcegos e suínos) e pulmão (morcegos) se havia ou não a presença do vírus Influenza A, através de RT-PCR (reação da transcriptase reversa, seguida Reação da Polimerase em Cadeia). Posteriormente amostras de RNA de fígado, foram analisadas através de Nested-RT-PCR e ensaios de RT-PCR para o vírus da Hepatite E, a partir da síntese de cDNA obtendo apenas resultados negativos para tais agentes. As amostras de RNA de fígado também foram avaliadas quanto a presença de Adenovírus, através do ensaio HRM. Foi realizado qPCR, em tal reação, obtivemos ampliações inespecíficas em 35 amostras, as quais foram novamente testadas com primers através da técnica Nested PCR, para diferentes espécies de AdV, resultando em 7 amostras positivas, as quais foram sequenciadas e construída uma árvore filogenética.

Palavras chaves: Quirópteros, Influenza A, Hepatite E, Adenovírus.

ABSTRACT

Master's Dissertation
Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação
Universidade de Passo Fundo

BATS: POPULATION ZOONOTIC AND POTENTIAL IN PIG FARMS

Autor: Flávia Stefanello

Orientador: Eraldo Lourenso Zanella

Passo Fundo, Agosto de 2015.

This study evaluates the zoonotic potential of bats that use pig farms or their surroundings as lodgings for their colonies in southern Brazil, including rural areas of the municipalities of Camargo/RS, Vila Maria/RS and Concordia/SC also describes the identification of families found (Molossidae and Vespertilionidae) and also species (*Molossus molossus*, *Histiotus velatus* and *Molossus rufus*). As authorized by the national committee (SISBIO / ICMBIO) and the Ethics Committee on Animal Use at the University of Passo Fundo (CEUA-UPF), were captured 80 individuals, and they belong to two families and three species. In the same area blood samples were collected from 37 pigs in the nursery phase. All bats underwent capturing procedures through mist nets, inhalation sedation, transport procedures, anesthesia, identify families/species, collection of blood through cardiac puncture, euthanasia, necropsy, collecting tissues of interest (lung, and liver). After collecting tissues RNA extraction was done using Trizol®, of blood samples from bats and pigs, also bats lungs and liver. It was investigated in blood samples (bats and pigs) and lung (bats) or if there was not the presence of influenza virus by RT-PCR (reverse transcriptase reaction, followed by Polymerase Chain Reaction). Subsequently liver RNA samples were analyzed by nested RT-PCR and RT-PCR assays for hepatitis E virus from the cDNA synthesis obtaining only negative for these agents. The liver RNA samples were also evaluated for the presence of adenovirus by HRM assay. qPCR was performed in such a reaction, we obtained nonspecific amplifications in 35 samples, which were tested again with primers for different species of AdV resulting in 7 positive samples, which were sequenced and are shown in phylogenetic trees.

Key words: Bats, Influenza A, Hepatitis E, Adenovirus

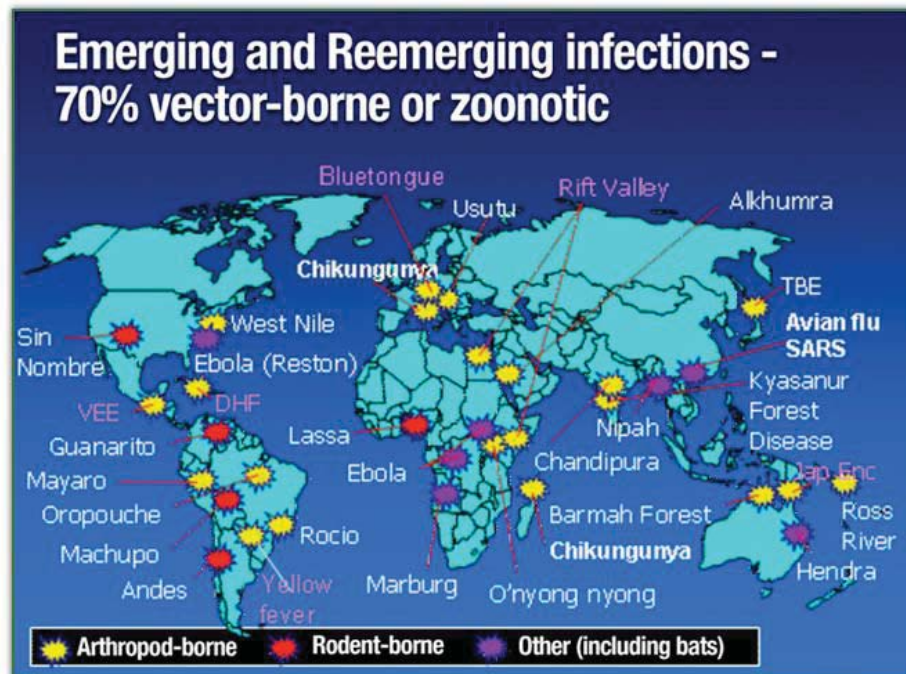
1. INTRODUÇÃO

Morcegos são animais considerados vetores móveis de agentes patogênicos, possuem um perfil completamente susceptível para hospedar uma grande quantidade de vírus zoonóticos com distribuição mundial. Embora, aparentemente, não patogênicos em seus hospedeiros, alguns vírus de morcegos podem afetar de forma severa outros mamíferos (domésticos, de produção e silvestres), incluindo os seres humanos (1). De uma forma geral podemos citar alguns exemplos como: Coronavírus, Ebola, Marburg, Nipah Hendra vírus, todos já identificados em morcegos. Considerando uma escala evolutiva pode se afirmar que essa interação hospedeiro-vírus é bem sucedida nos morcegos, e resultou numa grande diversidade de vírus zoonóticos, que incluem os ciclos urbano, silvestre e rural (1).

Pertencentes à ordem Chiroptera, os morcegos ocupam a segunda posição em número de espécies no mundo, com 1.120 espécies conhecidas e catalogadas (2). São mamíferos com hábitos noturnos e crepusculares, que vivem tanto em ambiente rural, quanto em ambientes urbanos, desde que o local seja apropriado para alojar sua colônia e ofereça recursos mínimos de sobrevivência, como alimentação (3). Possuem ampla importância ambiental, uma vez que espécies insetívoras realizam o controle biológico de vários insetos, e as fitófagas, que fazem a polinização de plantas, como orquídeas, além de dispersarem sementes, contribuindo assim para o equilíbrio do ecossistema (4).

Apesar da contribuição ambiental, morcegos também são vistos como reservatórios de doenças, abrindo um leque grande de doenças infecciosas que podem ser transmitidas ao homem. De acordo com o Centro de Controle de Zoonoses e Doenças de Transmissão Vetorial de Niterói (CCZ), RJ, os morcegos podem servir de fonte de infecção para agentes de diversas enfermidades, como a histoplasmose e a raiva, pois, além do ciclo urbano, onde os principais envolvidos são o cão e o gato, a raiva silvestre envolvendo principalmente primatas e morcegos também é considerada um problema de saúde pública, com crescimento expansivo de transmissão no Brasil (5).

Figura 1: Infecções emergentes e reemergentes: 70% são transmitidas por vetores ou são zoonóticas, entre os animais que se incluem nessa categoria, estão os morcegos, com ampla distribuição geográfica. Fonte: One Health Initiative



Na região Sul do Brasil, já existem estudos relatando as principais espécies de morcego e seus hábitos alimentares, bem como habitat e ecologia. Porém, quando se trata de um perfil epidemiológico, ainda existe deficiência e poucas condições de investigação. Portanto, visando questões de saúde pública, relacionadas à produção de suínos, o estudo a seguir teve como principais linhas de pesquisa, identificar famílias e espécies de morcegos que utilizam granjas de suínos como abrigo nos municípios de Camargo/RS, Vila Maria/RS e Concórdia/SC na região sul do Brasil (incluindo o Norte gaúcho e Oeste catarinense), avaliar o potencial de vetor zoonótico de morcegos em agentes específicos: Influenza A, Hepatite E e Adenovírus, identificar a presença vírus RNA e DNA através de técnicas moleculares (RT-PCR, Nested-PCR e qPCR) em morcegos e suínos, com primers específicos e posterior seqüenciamento genético.

A dissertação compreende, além desta breve introdução, uma revisão de literatura que irá abordar uma visão geral sobre a ordem Chiroptera e questões epidemiológicas relacionadas a doenças emergentes e re-emergentes causadas por esses mamíferos, atual situação da suinocultura brasileira e aspectos de biossegurança, além de dados sobre os agentes pesquisados: Influenza A, Hepatite E e Adenovírus.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ORDEM CHIROPTERA

Morcegos são mamíferos que pertencem à ordem Chiroptera, e atualmente ocupam a segunda posição em número de espécies no mundo, possuindo registro de aproximadamente 1.120 espécies catalogadas (2). São mamíferos com hábitos noturnos e crepusculares, que vivem tanto em ambiente rural, quanto em ambientes urbanos, desde que o local seja apropriado para alojar sua colônia e haja oferta de recursos mínimos de sobrevivência, como alimentação (3).

São mamíferos voadores, com tamanhos variados, dependendo da subordem que se classificam: Megachiroptera e Microchiroptera. Morcegos da subordem Megachiroptera são frugívoros, e de tamanho maior, são popularmente chamados de “raposas voadoras”. Dormem durante o dia em galhos de árvores, pendurados com a cabeça para baixo e com as asas dobradas como um capote em redor do corpo. Estão distribuídos na Ásia, África do Sul e Austrália. Já a ordem Microchiroptera, são morcegos encontrados em continente Americano, de tamanho pequeno, e em sua grande maioria tem hábito alimentar insetívoro, preferem alojar-se em fendas de rochas, ocos de árvores e edificações urbanas(6).

São animais de ampla distribuição geográfica, considerados cosmopolitas. No Brasil, o clima subtropical predominante, faz com que muitas espécies neotropicais estejam distribuídas em todo território nacional (7).

A dieta alimentar dos morcegos é diversificada. Baseia-se em frutos, pólen, néctar, pequenos peixes, insetos e sangue de outros mamíferos e aves. No Brasil, já foram encontrados morcegos de hábito alimentar insetívoro das famílias Phyllostomidae, Molossidae, Emballonuridae, Noctilionidae, Thyropteridae e Vespertilionidae (8). Estudos comprovam que morcegos insetívoros têm preferência por regiões onde ocorra além da oferta de alimento, riqueza de flora e recursos hídricos, tais como lagoas ou açudes (4,8). Ambientes onde existem recursos hídricos, com vegetação aquática, são mais ricos em termos de concentração e produção de matéria orgânica, podendo assim sustentar maior diversidade de insetos, invertebrados aquáticos e peixes (9).

Apesar da contribuição ambiental, morcegos também são vistos como reservatórios de doenças, abrindo um leque grande de doenças infecciosas que podem ser transmitidas ao homem (4).

2.2 MORCEGOS: PERFIL ZONÓTICO

Possuem seus membros anteriores adaptados para o vôo, com isso morcegos conseguem se deslocar em grandes distâncias, logo, um animal que não está saudável torna-se um vetor móvel de agentes patogênicos (1). Possuem um perfil completamente susceptível para hospedar uma grande quantidade de vírus zoonóticos com distribuição mundial. Embora, aparentemente, não patogênico em seus hospedeiros, alguns vírus de morcegos podem afetar de forma severa outros mamíferos (domésticos, de produção e silvestres), incluindo os seres humanos. De uma forma geral podemos citar alguns exemplos como: Coronavírus, Ebola, Marburg, Nipah Hendra vírus, todos já identificados em morcegos. Considerando uma escala evolutiva pode-se afirmar que essa interação hospedeiro-vírus é bem sucedida nos morcegos, e resultou numa grande diversidade de vírus zoonóticos, que incluem os ciclos urbano, silvestre e rural (1).

Recentemente o CDC (2014) mencionou que morcegos são responsáveis pela grande proliferação de doenças virais em todo o mundo. De acordo com as pesquisas realizadas, durante o voo o metabolismo e a temperatura corporal desses animais elevam-se, o que hipoteticamente explica a evolução das infecções virais sem sinais evidentes de doenças em morcegos, uma vez que o vôo auxilia na ativação do sistema imune. O vôo de fato, pode ter sido um potente fator seletivo para a redução da virulência nesses hospedeiros naturais (1).

Estudos recentes, afirmam que morcegos estão ligados diretamente com várias doenças infecciosas emergentes, e seu organismo é propício para o desenvolvimento de doenças principalmente virais. É o caso do Coronavírus, que provoca uma síndrome respiratória aguda grave (SARS) em humanos, e utiliza morcegos como reservatórios naturais para SARS-CoV. Outra doença que está diretamente ligada a morcegos é a MERS-CoV (Síndrome Respiratória Humana do Oriente Médio-Coronavírus) pode infectar uma ampla variedade de células de mamíferos (humanos, suínos, macacos). De acordo com análises filogenéticas de todos os CoVs conhecidos em mamíferos, sugere-se que os morcegos são hospedeiros ideais para ambos os Alphacoronavírus e Betacoronavírus (10). O Vírus Hendra, que foi identificado em 1994 como agente causador de uma doença respiratória aguda em cavalos na Austrália, é naturalmente hospedado por morcegos frugívoros, e representa uma série de ameaças para o gado na Austrália, com transmissões esporádicas letais para os seres humanos quase todos os anos. Em 1998, na Malásia, identificou-se o Nipah vírus (NVI), este encontrado em suínos e humanos, induzindo

encefalite com 40% de letalidade. Doenças hemorrágicas agudas fatais, causadas por Filovírus, que incluem o vírus ebola, também estão presentes em algumas espécies de morcegos, de acordo com dados sorológicos e genéticos (10).

Em muitas pesquisas já realizadas no Brasil e em outros países, verificou-se que esses mamíferos também apresentam em seu organismo, hemoparasitas, como *Tripanossoma cruzi*, já encontrado em cerca de 30 espécies. Os estados que lideram essa marca são Pará, Minas Gerais, São Paulo e Bahia (11). Outro estudo epidemiológico (12) confirma que quirópteros foram infectados com *T. cruzii*, em zona urbana de Teresina, PI, e simultaneamente identificaram-se casos positivos para humanos da região, concluindo que esses animais estão ligados ao ciclo de transmissão desta doença.

Estudos recentes, afirmam que morcegos estão ligados diretamente com várias doenças infecciosas emergentes, e seu organismo é propício para o desenvolvimento de doenças principalmente virais. É o caso do Coronavírus, que provoca uma síndrome respiratória aguda grave (SARS) em humanos, e utiliza morcegos como reservatórios naturais para SARS-CoV. Outra doença que está diretamente ligada a morcegos é a MERS-CoV (Síndrome respiratória humana do Oriente Médio-coronavírus) pode infectar uma ampla variedade de células de mamíferos (humanos, suínos, macacos). De acordo com análises filogenéticas de todos os COVs conhecidos em mamíferos, sugere-se que os morcegos são hospedeiros ideais para ambos os Alphacoronavírus e Betacoronavírus (10). O Vírus Hendra, que foi identificado em 1994 como agente causador de uma doença respiratória aguda em cavalos na Austrália, é naturalmente hospedado por morcegos frugívoros, e representa uma série de ameaças para o gado na Austrália, com transmissões esporádicas letais para os seres humanos quase todos os anos. Em 1998, na Malásia, identificou-se o NVI, este encontrado em suínos e humanos, induzindo encefalite com 40% de letalidade. Doenças hemorrágicas agudas fatais, causadas por Filovírus, que incluem o vírus ebola, também estão presentes em algumas espécies de morcegos, de acordo com dados sorológicos e genéticos (10).

Estudos epidemiológicos indicam que vírus do tipo Reovírus são, provavelmente, de origem de morcegos, e causam infecções leves em homens e animais. Além disso um grande número de novos vírus diretamente relacionados a de morcegos foram descobertos em todo mundo e classificados em diferentes famílias, incluindo: Adenoviridae, Astroviridae, Coronaviridae, Circoviridae, Filoviridae, Flaviviridae, Hepadnaviridae, Hepeviridae, Herpesviridae, Orthomyxoviridae, Parvoviridae, Picornaviridae, Papillomaviridae,

Paramyxoviridae e Poxviridae (10). Porém nenhum dos vírus citados foram confirmados como prevalentes em populações humanas e a transmissão direta dos mesmos, de animais silvestres para humanos seja rara.

Estudos recentes (13) em vários países africanos forneceram as primeiras evidências para a presença de coronavírus em morcegos da África do Sul, através da extração de RNA, de amostras processadas com material fecal e amostras retais coletadas com suabes, foi possível reconhecer a presença de CoV em 14 gêneros de morcegos insetívoros, em pesquisa realizada na África do Sul, afirmando pela primeira vez a detecção coronavírus em quirópteros.

Identificou-se em pelotas fecais de morcegos, colhidas entre 2011 e 2012, presença de CoV, confirmando amostras positivas para alphacoronavirus e para betacoronavirus em espécies distintas de morcegos. A análise filogenética permitiu a comparação de sequências de aminoácidos de espécies de morcegos infectados com CoV em outros locais, como Tailândia e China (14). Além disso, sabe-se que morcegos insetívoros, da família Vespertilionidae são considerados hospedeiros em alto potencial para CoV e Mers-CoV.

Através de estudos metagenômicos, mais de 60 vírus têm sido identificados em tecidos de morcegos, sendo esses vírus, altamente patogênicos e associados ao organismo humano também. Inclui-se nessa gama: henipavirus, o vírus Ebola, vírus de Marburg, o vírus da dengue, Lyssavirus e SARS-coronavírus. Mais recentemente, Bokeloh e Shimoni também foram isolados em morcego, além dos circovírus, retrovírus, astrovírus e vírus Cedar que foram identificados como novos vírus de morcegos, e alguns nunca foram relatados em outros animais, o que sugere que os morcegos têm um organismo que age como um grande depósito de carga viral (15).

Sendo esses animais hospedeiros de grande potencial, é necessário que se tenha controle de surtos de doenças virais emergentes ou re-emergentes, prevenindo a transmissão do vírus de animais selvagens, especialmente morcegos, aos seres humanos, monitorando a situação de infecção por vírus em hospedeiros naturais e animais vetores. Para isso, sequenciamentos de última geração se fazem necessários, e isso é possível através de metagenômica, sendo essa uma ferramenta poderosa para a detecção em grande escala de vírus conhecidos e desconhecidos existentes em animais hospedeiros. Esta nova tecnologia tem sido utilizada para explorar a constituição de comunidades virais em ambientes como oceanos, lagos, vários tecidos, vísceras e fezes de animais, incluindo, principalmente morcegos, já que a variedade de vírus que podem carregar em seu organismo é muito grande, proporcionando um paradigma de sucesso para o futuro com descoberta rápida de novos vírus na natureza (15).

A frequência de descoberta de novos vírus em morcegos tem aumentado rapidamente e mais de 20 novos vírus de mamíferos ou variantes distantemente relacionados de vírus de mamíferos conhecidos, juntamente com um número de vírus desconhecidos, foram identificados nos últimos anos, por alguns laboratórios. As comparações de seqüências genômicas têm descoberto vírus inéditos em morcegos, ampliando ainda mais a gama de composição dos vírus na população de morcegos (15).

Em amostras de tecidos mistos é possível, através da metagenômica, fornecer um perfil mais completo de vírus que podem estar presentes no organismo. Por exemplo, Hepadnavírus são vírus estritamente transmitidos pelo sangue e, normalmente, não secretados pelas vias fecal e oral, esta pode ser a razão pela qual anteriormente não fora encontrado Hepadnaviridae em quaisquer espécies de morcegos, uma vez que as investigações direcionam-se para estes tipos de amostras biológicas. Porém, a amostragem de fígados de morcegos permitiu a identificação bem-sucedida de um hepadnavírus em morcego, indicando que os morcegos são reservatórios bem sucedidos de hepadnavírus (15).

A família Circoviridae possui dois gêneros, Circovírus e Gyrovirus, e uma ampla diversidade de hospedeiros de mamíferos de espécies de aves. Através de estudos metagenômicos de guano de morcego, encontrados na América do Norte, foi possível pela primeira vez identificar a sua presença em morcegos. Desde então, essa espécie de vírus têm sido comumente encontrados em morcegos e têm demonstrado uma grande diversidade genética (15).

Devido estar associados com o aumento do número de vírus emergentes e re-emergentes, morcegos são considerados uma ameaça para a saúde pública. Através de uma análise metagenômica viral de seis espécies de morcegos de Mianmar (Sul da Ásia) revelou-se um grande número de vírus, do gênero Orthohepadnavirus (família Hepadnaviridae) nestes animais. Este gênero consiste de patógenos que infectam mamíferos, e atualmente contém quatro espécies: vírus da hepatite B, vírus da hepatite da marmota, vírus da hepatite do esquilo da terra, e vírus da hepatite B do macaco lanoso. Pelo menos uma espécie de morcegos, *M. Fuliginosus*, foi positiva para Orthohepadnavirus, evidenciando a presença de mais um tipo de vírus presente no organismo de quirópteros (15).

2.3 SUINOCULTURA, BIOSSEGURIDADE E ZOONOSES

A suinocultura brasileira é uma atividade responsável pela geração de 605 mil empregos no país, sendo a quarta maior produtora e exportadora de carne suína do mundo, com a produção de 3,49 milhões de toneladas e exportação de 581 mil toneladas em 2014, segundo a Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína (16). Santa Catarina é o maior produtor de carne suína do Brasil, responsável por 25,1% da suinocultura, seguido pelo Rio Grande do Sul, com 19,3% e Paraná com 17% da produção brasileira.

A produção em granjas comerciais é equivalente a 1.6 milhões de matrizes (64%) e de 870 mil porcas (36%) em criações de subsistência (16,17). Desta forma a suinocultura é considerada uma atividade essencial para a economia deste país

A Biosseguridade é um componente fundamental na cadeia reprodutiva de animais para consumo. Granjas de suínos são susceptíveis a contaminação através de agentes infecciosos, e a proliferação de patógenos é rápida, um animal infectado passa para um animal susceptível. A doença é considerada contagiosa, quando a transmissão ocorre através de contatos físicos com animais infectados ou através de suas secreções e ou excreções (18). A transmissão de agentes patogênicos também está relacionada com vetores móveis, contato direto com outros indivíduos contaminados e até mesmo aerossóis.

Mesmo em condições sanitárias adequadas, suínos podem estar infectados com algumas doenças de perfil zoonótico. Existe um elevado risco de contaminação para pessoas envolvidas por exemplo em abates clandestinos, consumidores e população em geral (19). A brucelose demonstra risco potencial de infecção de brucélica zoonótica associado a suínos abatidos clandestinamente.

As granjas de suínos podem ser focos de doenças de risco de contaminação para humanos, uma vez que tratadores de suínos estão expostos diretamente com agentes biológicos. Entre os principais agentes patogênicos que podem comprometer a saúde de tratadores estão: brucelose, campilobacteriose, clamidiase, erisipela animal e erisipelóide humana, leptospirose, pasteurelose, Nipah vírus, raiva, dermatofitoses, *Streptococcus suis* II, salmonelose, Influenza, *Taenia solium*, triquinelose, tuberculose, toxoplasmose, doenças vesiculares, giárdia, criptosporidia, yersinia enterocolitica, sarcosporidiosis e Hepatite E (20).

Até o momento, existem mais de 40 zoonoses relatadas envolvendo suínos, sendo algumas de etiologia bacteriana ou viral e outras parasitárias. No primeiro grupo estão: meningite

estreptocócica, influenza, micobacterioses, brucelose, erisipelose, leptospirose e salmonelose. As parasitárias incluem a triquinelose, tungíase, toxoplasmose e cisticercose. Existem outras zoonoses de menor importância, como as causadas por *Bacillus anthrax*, *Clostridium perfringens*, Cytomegalovirus, *Pasteurella multocida*, *Brachyspira pilosicoli*, *Staphylococcus spp.* e *Yersinia spp* (21).

Problemas de perfil sanitário graves podem comprometer a exportação e consumo interno dos produtos derivados de suínos, bem como aves, bovinos e demais animais de produção, portanto existem medidas que devem ser adotadas visando tanto à obtenção de melhores resultados de produção quanto ao comprometimento do setor com a produção regional e nacional. O manejo de granjas feito de forma adequada diminui os riscos dos colaboradores e plantéis adquirirem enfermidades vinculadas aos roedores e insetos (22), além de melhorar o status sanitário dos animais de produção, maximizar seus lucros e aperfeiçoar a produção.

2.4 AGENTES ENCONTRADOS EM MORCEGOS

2.4.1 Vírus Da Influenza A

O vírus Influenza, pertence à família *Orthomixoviridae*, existindo os seguintes gêneros: *Influenzavirus A* (FluAV), vírus da influenza A (humanos, aves, eqüinos, suínos, recentemente cães e felídeos); *Influenzavirus B* (FluBV),: vírus da influenza B (humanos), *Influenzavirus C* (FluCV), vírus da influenza C (humanos, suínos)(23). Os vírus Influenza do tipo A podem ainda dividir-se em subtipos que se caracterizam pelas diferenças encontradas nas duas glicoproteínas, a hemaglutinina (HA) e a neuraminidase (NA), que fazem parte do envelope lipídico do vírus. O genoma de RNA dos vírus de Influenza é constituído por oito segmentos (sete segmentos no caso de Influenza C). Cada um destes segmentos encontra-se fortemente associado a uma nucleoproteína formando uma nucleocapsídeo helicoidal ou ribonucleoproteína (RNP). Por sua vez, cada RNP está associada a uma RNA polimerase constituída por três polipeptídios, o PB1, o PB2 e o PA. Cada segmento de RNA, do vírus Influenza, codifica uma proteína (23).

Figura 1: Ilustração esquemática da estrutura de Vírus da Influenza.(Fonte:Flores, 2007)

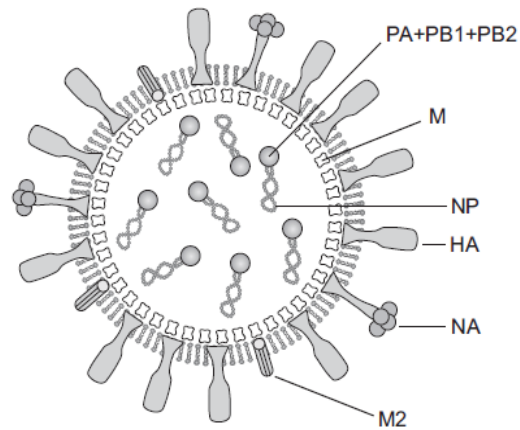
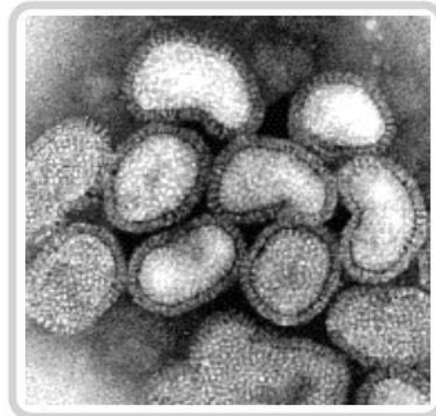


Figura 2: Fotografia de microscopia eletrônica de vírions da família Orthomyxoviridae (Influenza A). (Fonte: Flores, 2007)

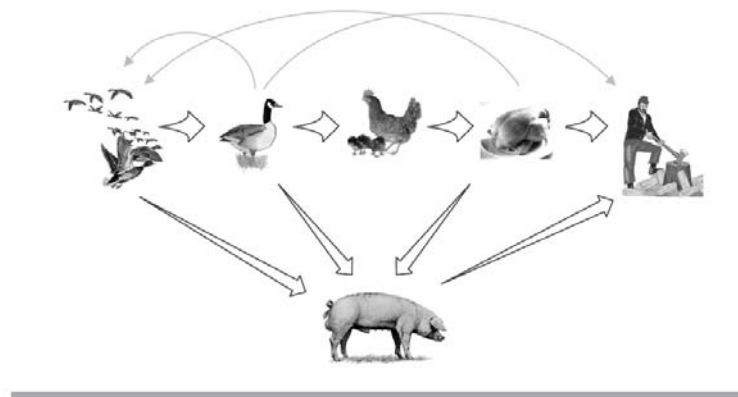


A Influenza A, é uma doença que leva anualmente o surgimento de pandemias em humanos, o vírus circula em aves e mamíferos, e esses representam o maior risco para a propagação de zoonoses em seres humanos e à geração de vírus pandêmicos. Foi identificado na Guatemala, em morcegos do ombro amarelo, uma variante do vírus Influenza, divergente da conhecida, conseqüentemente, adicionando os morcegos na lista dos mamíferos hospedeiros de Influenza. O novo subtipo descoberto nesses animais (H17N10), sugere que além dessa espécie, outras hospedam distintas linhagens do vírus (24).

No Peru, estudos recentes identificaram outra linhagem de Influenza, H18N11, em morcegos da espécie *Artibeus planirostris*, espécie esta de morcegos com hábito alimentar

frugívoro, sugerindo assim, uma distribuição mais ampla e uma diversidade ainda maior do vírus (24). Os dados foram comparados com os encontrados na Guatemala, e combinados com uma alta prevalência em várias espécies de morcegos são indicativos de uma infecção já estabelecida, e a transmissão viral do morcego para outras espécies é sugestiva (24).

Figura 3: Evolução do vírus da influenza A H5N1 por meio de infecções em várias espécies (Fonte:Flores, 2007)



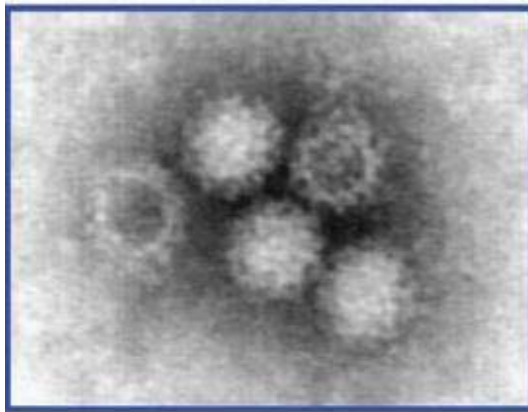
Os vírus da Influenza A são conhecidos por causar epidemias devastadoras, como exemplo, o ocorrido em 1918, conhecida como “Gripe Espanhola”, pandemia causada pela variante H1N1, a qual causou cerca de 50 milhões de mortes humanas. A capacidade do vírus da gripe A para recombinar seu genoma segmentado facilita ainda mais a geração de vírus pandêmicos. Suínos em particular, são animais conhecidos por apresentarem receptores que permitem uma “mistura” para o rearranjo genético, pois apresentam alta susceptibilidade para co-infecções associadas a gripe A, e isolados de várias outras espécies (25). Em pesquisas realizadas com morcegos da espécie *Sturninia lilium*, na Guatemala, revelaram a presença de um novo tipo de vírus, denominado como H17N10 (25).

Outra característica importante do vírus tipo A da gripe, é a possibilidade da troca de segmentos de RNA genômico entre outros vírus também de gripe A, resultando em novos genótipos e fenótipos com potencial zoonótico (25).

2.4.2 Vírus Da Hepatite E

O vírus da Hepatite E não possui envelope, é pequeno, esférico com um diâmetro de 27-34 nm (média de 30), e está classificado como um membro do gênero Hepevirus, da família Hepeviridae (38). A hepatite E tem sido tradicionalmente considerada uma doença endêmica dos países em desenvolvimento. Geralmente sua contaminação se dá através da água contaminada, no entanto, estudos de soroprevalência tem mostrado que infecções causadas pelo vírus da hepatite E (HEV) não são incomuns nos países industrializados (26).

Figura 4: Imagem microscópica do Vírus da Hepatite E (Fonte: Aggarwal & Jamell 2011)



O número de casos de pessoas contaminadas com HEV tem aumentado de maneira significativa, até mesmo em países desenvolvidos e podem ser rastreados a partir da ingestão de matéria orgânica contaminada, alimentos mal cozidos (como carne de porco e derivados) (26).

Várias espécies de animais, incluindo suínos, são conhecidos como reservatórios de HEV, podendo transmitir o vírus para os seres humanos, colocando a infecção entre uma das principais emergentes atuais, além de ser um agente zoonótico de grande importância (26).

No Japão, a HEV é considerada uma doença hepática rara, que pode ser importada acidentalmente de países endêmicos da Ásia e África, onde o saneamento é precário e as demais condições de higiene estão abaixo do ideal. No entanto, uma vez que a identificação do primeiro caso autóctone de HEV em suínos domésticos, em 2001 no Japão, criou uma situação de alerta e a partir disso, os riscos de infecção tem sido investigados de forma acentuada (27).

2.4.3 Adenovírus

Os Adenovírus (AdVs) pertencem à família *Adenoviridae*, são vírus DNA grandes, não-envelopados, que infectam vertebrados e produzem enfermidade leve no trato respiratório, gastrointestinal e genitourinário. Tem capacidade de infectar uma grande variedade de células que não estão em divisão, com isso, têm sido muito utilizados como vetores para a transferência de genes e também para vacinas vetoriais (23).

Os Adenovírus são responsáveis pela codificação de uma série de produtos envolvidos na interferência com os mecanismos de regulação do ciclo celular. As proteínas E1A são ativadores em potencial de vários genes virais e também induzem a célula a entrar em fase S. Mesmo com esses efeitos indiretos dessa ativação, podem levar a célula infectada à apoptose (morte celular). Por isso os AdV codificam também produtos com atividade antiapoptótica, a partir daí o vírus se torna suficiente para completar o seu ciclo replicativo. No hospedeiro, os AdVs interferem com o reconhecimento de células infectadas pelo sistema imunológico, também com o objetivo de preservar a integridade das células infectadas pelo tempo necessário para a conclusão do ciclo (23).

As infecções causadas por AdV podem ser identificadas em mamíferos, pássaros, anfíbios, répteis e peixes, no total AdVs já foram isolados em pelo menos 40 espécies de vertebrados (28,29,30,31).

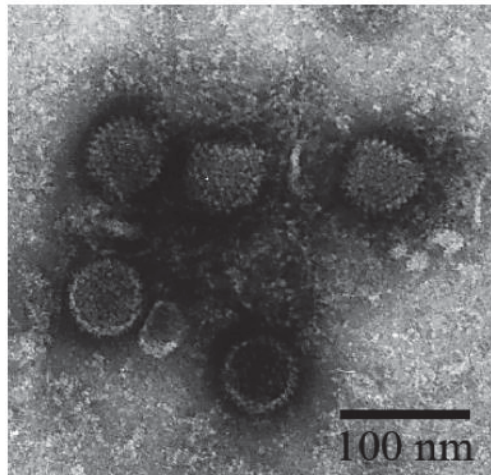
Em humanos, cerca de 52 sorotipos já foram identificados e classificados em sete grupos diferentes, designados entre A e G. São AdV altamente prevalentes na população humana e podem causar infecções graves que variam de doença respiratória (principalmente pela AdV-B e C) e conjuntivite (AdV-B e D), a gastroenterite (Adv-F sorotipos 40 e 41). Em animais, temos a identificação do AdV canino tipo 1 (CAV-1) e AdV canino tipo 2 (CAV-2), que podem causar hepatite e doenças respiratórias e entéricas em cães (32).

Outro reservatório, recentemente identificado, para AdV é o morcego. O vírus foi isolado em amostras fecais, e recebeu a classificação taxonômica de adenovírus estirpe TJM (BtAdV-TJM), esse é capaz de infectar vários tipos de células do vertebrado, e pode induzir um efeito citopático (32).

Na investigação epidemiológica, as espécies de morcego positivas para AdV são *Myotis sp* e *Scotophilus kuhlii* de hábito alimentar insetívoro, o que comprova mais uma vez que morcegos

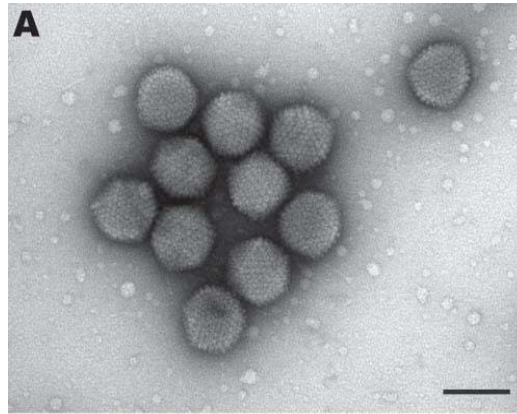
são reservatórios naturais de vários vírus (RNA e DNA), além disso foi descoberto que ocorre em morcegos um grupo de diversidade genética de “ adenovírus associados” (AAV) e isso pode se dar pelo contato direto de humanos com esses animais (32).

Figura 5: Partículas virais de AdV encontradas em fezes de morcegos (Fonte: Sonntag et al 2009)



Estudos realizados em 2008/2009 na Alemanha, comprovam que morcegos da família Vespertilionidae (hábito alimentar insetívoro), através de técnicas de ensaios moleculares (PCR) apresentaram alterações histopatológicas associadas com agentes infecciosos. Foi detectado através de Nested-PCR a presença do gênero Mastadenovírus, na espécie de morcego *Pipistrellus pipistrellus*. Neste estudo, a identidade encontrada para o AdV isolado nesta espécie de morcegos é a mesma encontrada em caninos, tendo entre 68% a 74% de similaridade. O mesmo foi batizado com o nome BtAdV PPV1-2. (33).

Figura 6: Eletromicrografia de partículas de AdV isolado de morcegos da espécie *Pipistrellus Pipistrellus* na Alemanha. (Fonte: Sonntag et al 2009).



Um segundo estudo envolvendo morcegos, identificou AdV em microquirópteros da espécie *Myotis ricketti*, na Ásia (BtAdV-3 estirpe TJM). Além disso, na China, Hungria e Alemanha e Estados Unidos (34,35,36), através de metagenômica detectaram em guano de morcegos BtAdV-2, originalmente encontrado em cães (CadVs) (37). A relação filogenética entre essas duas estirpes virais, leva a crer na hipótese que ocorra um evento de transmissão interespecies de um AdV de morcegos para carnívoros.

3 CAPÍTULO 1

Bat species (Mammalia, Chiroptera) identified in swine farms in southern Brazil

Flávia Stefanello¹, Francine Daros², Franciele Lanzarini², Janine de Camargo², Paulo Michelon²,
Eraldo Lourenso Zanella³

Article submitted to the journal Chiroptera Neotropical

¹ Master's student Postgraduate Program of Bioexperimentation, Universidade de Passo Fundo-UPF, Passo Fundo, RS, Brazil

² Student of Veterinary Medicine, University of Passo Fundo-UPF, Passo Fundo, RS, Brazil.

³ Professor of the Postgraduate Program of Bioexperimentation, UPF, Passo Fundo, RS, Brazil
Corresponding author: Stefanello, F. Universidade de Passo Fundo-UPF, Passo Fundo, RS, Brazil, Campus I, BR 285, São José, Passo Fundo, RS, Brazil. CEP 99052-900. Phone +55 54 9970 0029. E-mail: flavia.stefanello@hotmail.com

Abstract

Bats are mammals of varying eating habits. They can feed on pollen, nectar, fruit, blood, small fish and insects, depending on their species. Pig farms produce a lot of organic matter every day, therefore the number of insects also becomes abundant in places where there is no presence of anaerobic digesters. For insectivorous bat species, this type of site becomes favorable to house their colonies, because the abundance of food, ensuring the survival of all individuals. After the authorization of SISBIO/ICMBIO and CEUA-UPF, they were captured 80 bats in swine farms in southern Brazil, including the cities of Camargo/RS, Vila Maria/RS and Concordia/SC. Captures occurred in the months when higher temperatures were found (October, November and December/2014), always at dawn and dry weather. We identified three different species of bats (*Histiotus velatus*, *Molossus molossus* and *Molossus rufus*), belonging to two families (Vespertilionidae and Molossidae). We used to catch with mist-nets, and shortly after the animals were sedated with ether anesthesia and sent to the Veterinary Hospital of the University of Passo Fundo, for species identification and collection of biological material. Bats beyond the key role in the ecology (biological control, pollination of plants and spread seeds), are considered potential hosts for pathogens, so the presence of these mammals around swine farms creates an alert against public health, therefore, know what are the species that use these places to house their colonies becomes crucial face to prevent future epidemics.

Keywords: Bats, pig farms, Molossidae, Vespertilionidae.

Introduction

Bats are mammals belonging to the order Chiroptera, and are the second in number of species in the world, there are currently cataloged 1.120 species [1]. They have nocturnal and crepuscular habits are adapted to live in both rural, as in urban environments, since the site is

suitable to house their colony and provide minimal resources for survival, particularly food [2]. In Brazil, it is known the occurrence of at least 174 species of bats, but it is necessary for wildlife studies continue to be conducted, since the class has a great diversity of species with broad geographic distribution [3]. In southern Brazil usually studies related to bats are conducted in Atlantic Forest fragments, or conservation units, reporting the occurrence and ecology of the species [4]. Recent studies show that neotropical bats have responded significantly the loss of habitats, with this wealth of species has declined and these animals need lodge their colonies in alternative areas where there is plenty of food [5]. The choice of shelters is directly linked to temperature needs, light and suitable conditions for those females have their young and can create them. In forest environments, typically the most popular sites among bats are caves, crevices in rocks, foliage, canopy trees and palms, as in urban or rural areas, these mammals often use buildings, settling on roofs, expansion joints, basements, attics [6]. Through evaluation and identification of bat population in a region, you can determine the status of environmental conservation and preservation of that area, whether urban or rural [4]. Studies evaluating the richness of bat fauna have been conducted in southern Brazil [7], both in forest fragments as in urban and rural areas.

Materials and Methods

Study Area

Captures were carried out during the months of September to December 2014 in swine farms, located in the northern region of Rio Grande do Sul, in Lodi and Daros Farms in the inner cities of Camargo and Vila Maria, and the National Center for Swine and Poultry Research (EMBRAPA/CNPSA), located in the city of Concordia, Santa Catarina, Brazil (Figure 1). Catches of bats have been previously authorized by IBAMA/SISBIO/ICMBIO, who provided the

license to capture zoological material (authorization number: 42864, date of issue: 03.18.2014). In addition, the project was submitted to the Ethics Committee on Animal Use at the University of Passo Fundo (CEUA), which authorized the use of these animals for research for scientific purposes. The areas where the catches of bats were held, swine farms are composed of buildings (sheds) where pigs are being bred with production purpose. Surrounding the farms, there is variety of crops, and the vegetation consists of Atlantic, divided into four regions and phytoecological considered as a transition zone: Savannah, Araucaria Forest, Deciduous Forest and Ecological Transition Areas. Still can be seen various environments where the natural vegetation is in satisfactory level of preservation, located on the steep slopes of the valleys, inaccessible and inappropriate agricultural practices. The farms where the catches were made, were made up of UPL (Production Unit Piglets) and termination phase.

Animal capture and collection of samples

Eight evening sessions of bats were trapped, preferably in dry weather nights, usually initiated at dusk (6:00 pm) and were completed between five and seven hours later. For catches, it was used two networks mist (mist nets) with wire mesh nylon less than 2cm, of approximately 6 m wide and 2.5 m long, arranged about 3m high. The nets were placed across, close to the lodgings of the colonies, intercepting flight paths. The review was conducted every 15 minutes for the withdrawal of individuals. The captured animals were anesthetized with inhaled isoflurane and accommodated in cotton bags and shipping boxes with the dark, avoiding any discomfort. Then we perform the identification of families and species, with the help of taxonomic keys. For the identification of families and species were used identification keys (1973) [8] in addition to the manual of bats from Argentina [9]. Sexing was conducted of individuals, external morphological weighing and identification of members as: wing, forearm tail. Subsequently,

some animals were euthanized with intravenous Zelotil®, collecting biological samples was performed: blood (cardiac puncture) tissue removed (the respiratory tract, gastrointestinal tract, heart, brain, kidneys, spleen). Pregnant females were diagnosed by abdominal palpation. Some specimens captured were sent for laboratory examination in order to carry out molecular techniques (RT-PCR, Nested PCR and qPCR) for investigation of specific pathogens.

Results and Discussion

The capture resulted in a total of 80 individuals, of which 46 belonged to *Molossus molossus* species, 8 *Molossus rufus* (Family Molossidae) and 26 *Histiotus velatus* (Vespertilionidae), the three species are insectivorous food habits (Table 1). This wealth represents about 1.74% of the species of bats found in Brazil. Table 1 lists the families and species of bats as well as the number of individuals registered each, sex, type of housing and location.

Among the three species captured and identified in swine farms, it occurred prevalence for females, totaling 67, while the number of males did not exceed 13 individuals. Both species, even in different families have insectivore feeding habit. All individuals were caught with their colonies housed in buildings and/or warehouses of the farms, being captured at dusk and at night. For species identification, external morphological considerations were taken, often used in the systematization of bats and conventional nomenclature, such as ear (gulf), nasal leaf, tail, wing membrane and interfemoral, tail, hands and feet.

The Molossidae family showed greater wealth, represented by two species 67.5%. It is considered cosmopolitan, form colonies varying size between small, medium and large (up to having thousands of individuals). While Vespertilionidae, a sort 32.5%, family widely distributed and can be solitary or large colonies, *H. velatus* species found shelter with dividing *M. rufus*.

Both species are abundant in southern Brazil, and not at risk in their conservation status. ***M. molossus* (Pallas, 1776 Chiroptera: Molossidae)**: the species is considered as an opportunistic choice of their shelters, as it explores a variety of building structures. Typically this species is observed at lower buildings with asbestos cement tiles, where the spacing with the backing does not exceed 50 cm. Species not bloodsucking presents positive individuals records for rabies. In the catches during this study we showed that most of this species present in the colony were young females (n = 41), and occurrence of males was improperly lowest (n = 5). Individuals leave the colony before dark, tracing the flight path for about 30 meters high and fast, shift occurred about three individuals one time. In Brazil, there is record of this species in five major biomes (Amazon, Atlantic Forest, Cerrado, Caatinga and Pantanal). In the RS has the record for Sulinos Campos [10] beyond the plateau of pines plateau missions, depression and central coastal plain [13; 11]. The coloring of the was light brown to dark brown, and the belly fur had lighter color.

***M. rufus* (É. Geoffroy, 1805. Chiroptera: Molossidae)**: Individuals of this species have wide geographic distribution, with records in Sinaloa (Mexico), Central America to South America, except Uruguay and Chile [12]. In the RS, there are records in the plain of pines plateau of missions and southern grasslands [13]. Presented forearm dimensions ranging from 46 to 52mm. Coat dark brown varying to reddish-brown. They were found in shelters with clay tiles, along with individuals of the species *H. velatus*. The total number of animals of this species found did not exceed the 8, and 7 were female and one was male, all in the state of Santa Catarina.

***H. velatus* (I. Geoffroy, 1824. Chiroptera: Vespertilionidae)**: In the case of individuals of the species *H. velatus*, there is a tendency to remain on roofs, inside not solid bricks holes 26 individuals were found, and which 19 were females and 7 males. They presented sharp features for taxonomic identification, such as a gray-brown dorsal coloration, having almost whitish belly,

and his big ears triangular in shape. The height of the ears varied between 27 mm and 30 mm height, having a membranous link between them. This species is found in Bolivia, Paraguay, north of Argentina and Brazil. In southern Brazil has records on the plateau of pines and plateau of the missions in the central depression and the coastal plain, in tropical rain forest mixed, dense rain and seasonal deciduous and altered areas [14].

The three species of bats recorded between Rio Grande do Sul and Santa Catarina are common species in the region but not yet had notice of such animals using shelters in swine farms. Bats beyond the ecological role as seed dispersers and pollinators, have a fundamental role in the biological control of insects. Pig farms daily produce an immense amount of organic matter, which attracts insects of various species to feed on such substrate generated. With the growth and advancement of cities to rural areas, wild animals end up seeking safe havens and supply of basic natural resources (water and food), in the case of insectivorous feeding habits of bats, farms become favorable for the housing of colonies. However, it is of great importance bats associate with the risk of contamination by pathogens, since they are natural hosts of various viruses, bacteria and fungi zoonotic potential. It is noteworthy that future studies should occur in these areas in particular, in order to investigate other species using swine farms of buildings for housing / shelter and evaluate their health profile.

Acknowledgment

Universidade de Passo Fundo/FAMV and Hospital Veterinário/UPF, CAPES/FAPERGS, CNPSA, Daros & Lodi Pigs Farms.

Appendices

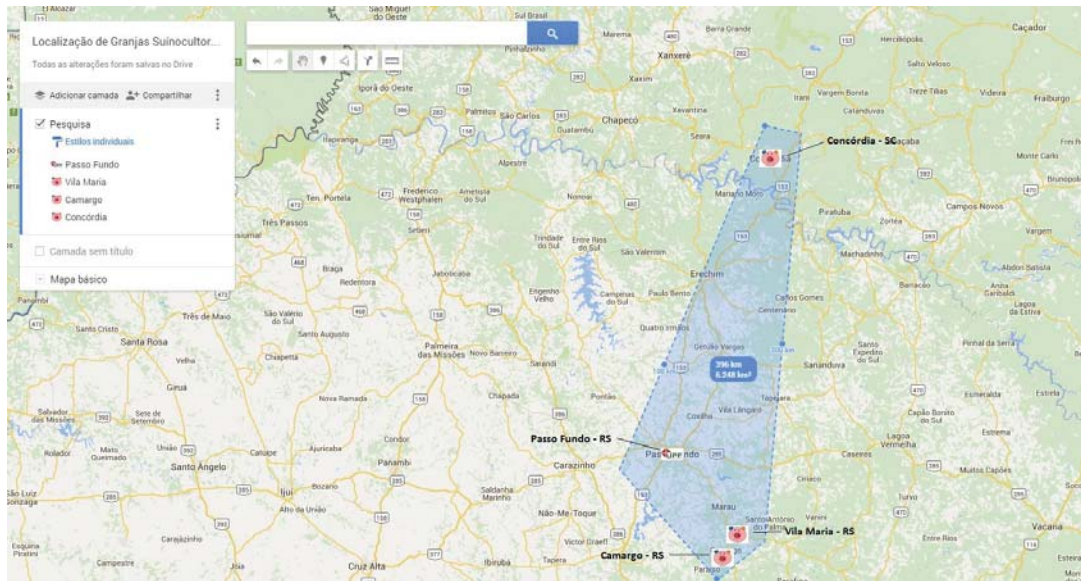


Figure 1. Location of farms of pigs indicating where the sessions of capture of bats were carried out (Camargo/RS, Vila Maria / Rio Grande do Sul and Concórdia/SC).

Table 1. List of bats registered during the period of September to December of 2014, in Farms of Pigs in the interior of Rio Grande do Sul and Santa Catarina states, Brazil

<i>Family/Species</i>	<i>N</i>	<i>Gender/N</i>	<i>Type of accommodation</i>	<i>Location</i>
Molossidae				
<i>Molossus molossus</i>	46	♀ 41 ♂ 5	Building/hangar	RS
<i>Molossus rufus</i>	8	♀ 7 ♂ 1	Building/hangar	SC
Vespertilionidae				
<i>Histiotus velatus</i>	26	♀ 19 ♂ 7	Building/hangar	RS (9/SC(17)
TOTAL	80	♀ 67 ♂ 13		

References

1. Sodré, M. M., Gama A. R., Almeida M. F. Updated List Of Bat Species Positive For Rabies In Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, v.52, p.75-81, março/abril de 2010.
2. Uieda, W., Harmani, M. E. S., Silva, M. S. M., Raiva em morcegos insetívoros (Molossidae) do Sudeste do Brasil. *Revista de Saúde Pública*, v.29, p. 393-397, 1995.

3. Paglia, A. P. et al. 2012. Lista Anotada dos Mamíferos do Brasil / Annotated Checklist of Brazilian Mammals. 2ª Edição/2nd Edition. *Occasional Papers in Conservation Biology*, No. 6. Conservation International, Arlington, VA. 76pp.
4. Reis, N. R. dos et al. Mamíferos do Brasil. 2. Ed. Londrina: Nelio R. dos Reis, 2011. 439 p. 153 p.
5. Sato, T. M. et al. Estrutura da comunidade de morcegos (Mammalia, Chiroptera) da Estação Experimental de Itirapina, estado de São Paulo, Brasil. *Papéis Avulsos de Zoologia*. Volume 55(1):1-11, 2015
6. Bredt, A. et al. Morcegos em áreas urbanas e rurais: manual de manejo e controle. Brasília, DF: *Fundação Nacional de Saúde. Ministério da Saúde*. 1996. 117 p.
7. Pacheco, S. M., et al, Morcegos Urbanos: Status do Conhecimento e Plano de Ação para a Conservação no Brasil. *Chiroptera Neotropical*, v. 16, julho de 2010.
8. Vizotto, L. D. & Taddei, V. A. . Chave para a determinação de quirópteros brasileiros. São José do Rio Preto, Francal, 72p.
9. Marquez, R., De la Riva, I. & Bosch, J. Advertisement calls of Bolivian species of Hyla (Amphibia, Anura, Hylidae). *Biotropica*, 25, 426–443, 1993.
10. Fonseca, G. A. B. et al. Lista anotada dos mamíferos do Brasil. *Occasional Papers in Conservation Biology*, Washington, v. 4, p. 1-38. 1996.
11. Marques, A. A. B. de et al. Lista das espécies da fauna ameaçadas de extinção no Rio Grande do Sul. Decreto nº 41.672, de 11 de junho de 2002. Porto Alegre: FZB/MCTPUCRS/PANGEA, 2002. 52p. (Publicações Avulsas FZB, n.11).
12. Borne, B. Ecologia de quirópteros da Estação Ecológica do Taim, com ênfase na família Molossidae. 1985. 88 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia) - Curso de Pós-Graduação em

Ecologia, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1985.

13. Barquez, R. M.; Mares, M. A.; Braun, J. K. The Bats of Argentina. Special Publications Museum of Texas Tech University, Oklahoma, v. 42, p. 1-275, jan. 1999.

14. Pacheco, S. M. & Marques, R.V. Conservação de morcegos no Rio Grande do Sul. In: Freitas, R. O. F. et al. (Org.) Mamíferos do Brasil: genética, sistemática, ecologia e conservação. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2006. 170 p.

4 CAPÍTULO 2

Molecular markers for zoonotic potential assessment bats in swine farms in southern Brazil

Flavia Stefanello¹, Fernando Rosado Spilki², Rodrigo Staggemeier², Ricardo Zanella³, Janice Reis Ciacci Zanella³, Mônica Corrêa Ledur³, Eraldo Lourenso Zanella⁴

Molecular diagnosis used in zoonotic potential assessment in bats

(Article submitted to the Reports in Public Health)

¹ Master's student of the Postgraduate Program of Bioexperimentation, Universidade de Passo Fundo - UPF, Passo Fundo, RS, Brazil.

* Corresponding author: Stefanello, F. Universidade de Passo Fundo - UPF, Passo Fundo, RS, Brazil, Campus I, BR 285, São José, Passo Fundo, RS, Brazil. CEP 99052-900. Phone +55 54 9970 0029. E-mail: flavia.stefanello@hotmail.com

² FEEVALE, Novo Hamburgo, Brazil

³ EMBRAPA, Concórdia, SC, Brazil

⁴ Professor of the Program of Bioexperimentation, UPF, Passo Fundo, RS, Brazil.

Abstract

Bats are animals considered potential hosts for zoonoses causing agents. Their forelimbs are adapted to flight allowing rapid displacement, and access restricted sites. This allows carry with them a number of microorganisms that can cause diseases in humans and other animals. Bats choose their shelters aiming accomplish basic survival needs: availability of food, water, protection from light during the day. Due to abundance of organic matter generated by swine farms, the amount of insects is often big, attracting insectivorous bats using sheds and buildings of these properties or surroundings as shelter for their colonies. In this study, we conducted bats shots in the Southern region pig farms in Brazil, and perform biological material collection (blood and tissue), extracted RNA agents for Influenza and Hepatitis E and performed cDNA synthesis for Adenovirus agent subsequently then use the Polymerase Chain Reaction (PCR) for identification of influenza A, hepatitis E and Adenoviruses, viral agents that may affect pigs, bats and humans. We obtained samples tested positive for adenovirus, and non-reactive results for Influenza A and Hepatitis E. In positive samples identified human and bovine adenovirus-like sequences were found liver samples from bats through nested PCR assay and nucleotide sequencing followed by phylogenetic analysis.

Keywords: Adenovirus, Bats, Hepatitis E, Influenza A, pig farms.

Introduction

Bats are currently considered major reservoirs for zoonotic pathogens causing emerging and re-emerging infectious diseases². Although apparently not pathogenic in their hosts, some bat viruses may affect harshly other mammals (domestic, production and wild), including humans².

Previous studies indicate that a new influenza A (H17N10) circulates in fruit bats in Guatemala¹⁷. Another subtype of influenza virus A (H18N11), was isolated from fruit bats in Peru, proving through phylogenetic analyzes the genetic diversity of influenza viruses in flock of bats in Central America¹⁸. Other viral agents as Alphacoronavirus and Betacoronavirus¹⁴, Nipah virus, hepadnavirus, Ebola virus, Marburg virus, *dengue* virus, and SARS-coronavirus

Lyssavirus, Circovirus, Bocavirus, Retroviruses, Astrovirus also been identified using bat as reservoir/host⁷.

Epidemiological research done by molecular diagnosis also allowed the identification for the presence of adenoviruses in insectivorous bats. The first report is related to the isolation of a virus from fecal specimens, which was given the taxonomic classification of a new adenovirus species called Bat adenovirus TJM (BtAdV-TJM), that is capable of infecting various types of vertebrate cells¹¹. The family of Adenovirus is currently divided into four genera: Mastadenovirus, Aviadenovirus, Atadenovirus and Siadenovirus¹⁻³. Infections caused by AdV can be identified in mammals, birds, amphibians, reptiles and fish. At least 40 species of vertebrates already had positive records of AdV⁹⁻¹⁵⁻⁸. Studies conducted in 2008/2009 in Germany, show that family Vespertilionidae bats (insectivorous feeding habits), through molecular testing techniques (PCR) showed also histopathological changes which were thought to be associated with these infectious agents. Was detected by nested PCR the presence of Mastadenovirus gender, bat species *Pipistrellus Pipistrellus*¹⁶. A second study of bats identified in AdV microchiropteran the species *Myotis ricketti*, Asia (BtAdV-3 strain TJM). Also China, Hungary and Germany and the United States⁴⁻⁹⁻¹⁹ through metagenomics detected in guano BtAdV-2 bats, virus originally found in dogs (CadVs). The phylogenetic relationship between these two viral strains, suggests the hypothesis that there is an interspecies transmission event of a AdV bat for carnivores¹⁰. In epidemiological research, the species of bat positive for AdV are insectivorous food habits, saying that bats are natural reservoirs of various viral agents (RNA and DNA) also was discovered that occurs in bats one genetic diversity group "associated adenovirus" (AAV) and this can occur by direct contact of these human animals¹¹. The number of cases of people infected with HEV has increased so significantly, even in developed countries and can be traced from the ingestion of contaminated organic matter, food badly cooked (such as pork and derivatives)²¹. Several species of animals, including pigs, are known as HEV reservoirs, may convey the virus to humans, infection by placing between one of the main current emerging, and is a zoonotic agent of great importance²¹. Targeting the public health issues related `pig production, our goals were to identify families and species of bats that use pig farms as a shelter in southern Brazil, to evaluate the zoonotic vector potential of bats in specific agents (Influenza A, Hepatitis E and adenovirus) and identify the presence of RNA and DNA viruses using molecular techniques (RT-PCR, nested-PCR and qPCR) in pigs and bats with specific primers and subsequent genetic sequencing.

Materials and Methods

Study location

Collections were carried out during the months of September to December 2014 in swine farms, located in the northern region of Rio Grande do Sul, inner cities of Camargo and Vila Maria, and the National Swine Research Center and Poultry (EMBRAPA/CNPSA), located inside the city of Concórdia, Santa Catarina, Brazil. Catches of bats have been previously authorized by IBAMA/SISBIO/ICMBIO, who provided the license to capture zoological material (authorization number: 42864, date of issue: 18/03/2014). In addition, the project was submitted to the Ethics Committee on Animal Use at the Universidade de Passo Fundo (CEUA), which authorized the use of these animals for research for scientific purposes. The areas where the catches of bats were held, swine farms are composed of buildings (sheds) where pigs are being bred with production purpose. The farms where the catch has been taken, are composed of UPL (Production Unit Piglets) and termination phase.

Samples

Various biological samples were collected 80 bats (blood samples, lung and liver). The tissue samples were immediately frozen in liquid nitrogen, blood samples collected into 2 ml cryovials, and the other containing EDTA containing solution of RNA extraction^a in order to preserve RNA, and frozen in liquid nitrogen. After they were kept in freezer -80°C.

RNA extraction: RNA was extracted from blood samples solution of RNA extraction^a and the lung and liver tissue samples using the protocol. For fabrics weigh 0.10g of each sample, add 1ml solution of RNA extraction^a in 2ml eppendorf tubes, beads added about 5, and all samples were brought to stir for 8 minutes until the samples were completely liquid to follow the protocol (Annex). The same protocol was performed with the blood samples.

Molecular analysis with RNA extracted samples were first resuspended and quantitated in spectrophotometer^b, according to dilute and RNA concentration of each sample. For the Influenza A tests, we used RNA extracted from lung and blood of bats and RNA extracted from pig blood. We performed RT-PCR (reverse transcriptase reaction, followed by Polymerase Chain Reaction) using the detection gene matrix kit^c and primers Uni12/Inf-5G: (5'-GGG GGG AGC AGA AGC

AGG- 3') and Uni13/Inf-1 (5'-CGG GTT ATT AGT AGA AAC AAG G-3), specific for the virus in bats, assigned by the CDC (Center for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA). To a volume of 23 μ L reaction, use 3 μ L of each primer, 2 μ L of each RNA sample, 12.5 μ L RT-PCR buffer, 1 μ L of enzyme mix, 1.67 μ L of detection of enhancer and 1.83 μ L Deionized water and purified^d water. The reaction was performed in a conventional thermal cycler using the temperature 50°C denaturation step for 30 min once. The annealing step is consolidate for 40 cycles at 95 for 15 sec, followed by another cycle of 45°C for 30 min ending with 72°C for 1h: 45min. Then, this extension process was performed for 7 min at 72°C. The final product of this reaction was taken to implementing electrophoresis on agarose 1% gel, the PCR products were stained with non-toxic dye xylene cyanol bromophenol blue and visualized under UV light. Hepatitis E, we use bats liver samples, the technique we used was Nested PCR, Promega kit. cDNA synthesis was performed using the High Capacity cDNA Reverse Transcription^e with the aid of random primers and RNAase inhibitor^f. To a volume of 20 μ L reaction, 10 μ L of total RNA used previously obtained, were added 2.0 μ L buffer, 0.8 μ L dNTP mix, 2.0 μ L random primer, 3.2 μ L DNAase / RNAase-free water, 1.0 μ L RNAase inhibitor and 1.0 μ L enzyme reverse transcriptase. The reaction was performed in using a conventional thermocycler^g one cycle (at 25°C for 10 min, 37°C for 120min 85°C (for 5min).

The detection of the HEV genome was performed by the adaptation of standard nested RT-PCR and RT-PCR assays (Erker et al, 1999 ; Wang et al., 1999) and (Dos Santos et al, 2011). It used positive control pigs, donated by FIOCRUZ/RJ; Deionized water and purified^d water was used as a negative control. The reactions were performed in a final volume of 50 μ L, containing 25 μ L of a commercial read mix^h , 18 μ L DNAase / RNAase-free water, 1 μ L of each of the oligonucleotides and 5 μ L of DNA obtained from cDNA . Oligonucleotides and cycling conditions were the same proposed by Erker et al. (1999) and Wang et al. (1999). Oligonucleotides RT-PCR with internal primers from the target gene ORF1 CTGGCATYACTACTGCYATTGA 5'-3' (outbound); CATCRARRCAGTAAGTGCGGTC 5'-3' (external antisense) and 5'-CTGCCYTKGCGAATGCTGTGG-3' (internal direction); GGCAGWRTACCARGCTGAACATC 5'-3' (antisense internal). The reaction consisted of an initial step of 5min at 94°C followed by 30 cycles of denaturation (94°C for 30s), 1min at 57°C for annealing of primers, and 1min at 72°C for extension. Then, the mixture was left for 7min at 72°C for final extension. After performing electrophoresis on agarose 2% gel, the PCR products were stained with non-toxic cyanine dyeⁱ and visualized under UV light.

For the analysis of the presence of adenovirus and subsequent study of the genetic diversity of the virus, We use bats liver samples, we perform nested PCR Touchdown, where the temperature reduced each cycle by 0.5°C the annealing step. In the first round, to a total of 50µl of reaction, we used 5µl of DNA, 25 µL of GoTaq® Green Master Mix (Promega, USA), 18 µL of nuclease-free water and 1 µL of each primer (20 pM) (pol-F [5'-CAGCCKCKGTTRTYAGGGT-3'] and pol-R [5'-GCHACCATYAGCTCCAACCTC-3']). After initial incubation at 94°C for 5min, it was performed 30 cycles of amplification. The denaturing step was performed at 94°C for 1min, the annealing was carried out 50°C for 1min and extension step at 72°C for 1min, being completed at 72°C for 10min. For the second round of amplification, we use 5µl of the first PCR reaction product as template and the amplification was performed with forward primer NF-POL (GGGCTCRTTRGTCCAGCA 5'-3') and reverse primer NR-inch (5'-TAYGACATCTGYGGCATGTA-3'). In each of the PCR assays were used negative controls. The end products of this reaction were conducted to agarose gel, which conducted an electrophoresis. The sequencing was carried out by Ludwig Biotec (Sequencing Service), who used the automated sequencer¹.

Results and Discussion

In tests for viral agents Influenza A and Hepatitis E, there were no positive results for the samples analyzed (Table 1). All samples tested by nested PCR for AdV test primers used for different species of AdV resulting in 7 positive samples, which were sequenced. From the sequencing of the seven positives samples AdV, phylogenetic analysis showed that six individuals had the HumanAdV5 strain, and 4 belonged to species of bat *M. Molossus* (Molossidae family) and one species *H. velatus* (vespertilionidae family) and 1 sample (sort *H. velatus*, vespertilionidae) presented the viral strain BovineAdV3 (Table 2). Although several studies have shown positive results and a variety of animals serve as hosts for HEV (pigs, boars, deer, mice, ferrets and bats)⁴⁻¹³, this study none of the liver samples tested from nested PCR they showed record or similarity para HEV. Viral strains of Influenza A longer detected in bats, suggest two new types of viral strain, H17N10 and H18N11¹⁷⁻¹⁸, these isolates were found in frugivorous feeding habits of bats, both in Central America. Phylogenetic analysis showed that some segments of genes harboring these bats greater genetic diversity of the virus of all other species of mammals and birds, it indicates a possible association with the host and the virus has

already occurred for a long time¹⁷⁻¹⁸. In this study, the primers were specific for the identification of viruses in, a further comparison is required with other members of the family Orthomixoviridae to analyze the possible interactions of viruses and other records in bats. Positive samples of AdV, are different in location individuals (at least 15km away) captured on different dates. The two serotypes found in bats are unconventional types of bats and Human AdV5 BovineAdV3. Various types of adenovirus can infect genus Mastadenovirus a variety of different mammals, causing a number of these problems are causes of respiratory, ocular or even enteritis and other gastrointestinal diseases¹⁵.

In this study, 7 of bats infected with AdV (Mastadenovirus). The genus uses only mammalian species as host¹⁵, thus allowing a kind of co-infection between viruses and their host⁶. The results were obtained from a nested PCR, which permitted the viral detection of amplification from a number of copies of the genetic material (bats liver cDNA). Figure 1 shows the samples amplified with molecular weight of 261pb¹¹ in accordance with the positive control (HumanAdV5) and amplified samples from 500 and 600pb. Depending on the region that will amplify after the PCR is possible to distinguish which species and serotypes of AdV present in that sample¹²⁻²⁰. The electrophoresis (Figure 1) indicates samples with approximately amplification 261pb, HumanAdV5 corresponding to the wells 42, 44, 59, 66, 08 and 60. Samples 66 and 60 show magnifications of between 500 and 600pb.

Phylogenetic analysis

Phylogenetic analysis shows that the samples belonging to two subtypes of AdV, human and bovine. The sequencing of amplified fragments of approximately 261pb, although the present AdV size 7.151pb. . The primers used are located in the conserved region of the genes of all species of AdV subsequently compared to sequences contained in the GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) using the BLAST program, to determine the type and identity of the viral confirmation, and noted that there is great similarity between the samples 50 and 60, 42 and 44 and 08 and 59. The sample 08, *M. molossus*, comes from the surrounding pig farms in the municipality of Camargo/RS, in October and presents similarity to the liver sample of 59 individuals belonging to *H. velatus* species, captured in swine farm of the town of Vila Maria/RS. Individuals 42 and 44, are from *M. molossus* species have similarity as to sequencing, were captured on the same date and the same place, there is still similarity among individuals 50 and

60, and these two species (*M. molossus* and *H. velatus*), different locations and dates. All found sequences have the same ancestral origin, and logging 46 variants of AdV.

Final Considerations

All samples that showed positive results in phylogenetic trees are individual found in swine farms in northern of Rio Grande do Sul, Brazil, in a radius about 15km away. The environment of the study area is occupied by rural population, features a variety of crop, and the vegetation consists of Atlantic, divided into four regions and phytoecological considered as a transition zone (Savannah, Araucaria Forest, Deciduous Forest and Areas Ecological voltage). There is the presence of springs, streams, ponds and lakes and there is intense creation of farm animals. In addition to pigs, there is rearing cattle, goats, sheep and poultry, generating organic matter in abundance and can contaminate effluent. The presence of enteric viruses such as AdV, disposed in large numbers in the faeces by infected individuals in the environment suggests contamination of effluents and represents a great risk to the health of the population, since these are often found in rural environments. A justification for the presence of both HumanAdV5 and BovineAdV3 in bats is directly linked to the risk of groundwater contamination, ease of penetration of virus particles in the soil should be considered, especially in rural areas, which are located in pits, landfills and also which makes use of waste water untreated or poorly treated in agriculture. Molecular techniques used in this study (RT-PCR and Nested PCR) showed satisfactory results, but we understand that more agents should be investigated, to register a possible co-evolution of viruses and their hosts bat. The zoonotic potential of these mammals is high, and the environment where they were captured is susceptible to various microbiological infections, which generates alerts in biosecurity sector, public health and the risk of zoonotic pandemics.

Acknowledgement

Universidade de Passo Fundo / FAMV; FAPERGS; CNPSA; FEEVALE.

Sources and manufacturers

- A. Trizol ®: Ambion, Life Technologies
- B. Nanodrop: spectrophotometer Thermo Scientific NanoDrop 2000

- C. Kit detection gene matrix: Ambion AgPath One-Step Matrix Gene Detection Kit
- D. MiliQ®: Deionized water and purified, Millipore Corporation
- E. High Capacity cDNA Reverse Transcription™ commercial kit, Applied Biosciences™
- F. RNAase inhibitor, Applied Biosciences™
- G. Labnet®: thermocycler using conventional
- H. Promega kit, commercial ready mix
- I. SYBR Safe™ :Cyanine dye, Invitrogen
- J. ABI-PRISM 3500 Genetic Analyzer Applied Biosystems:
automated sequencer

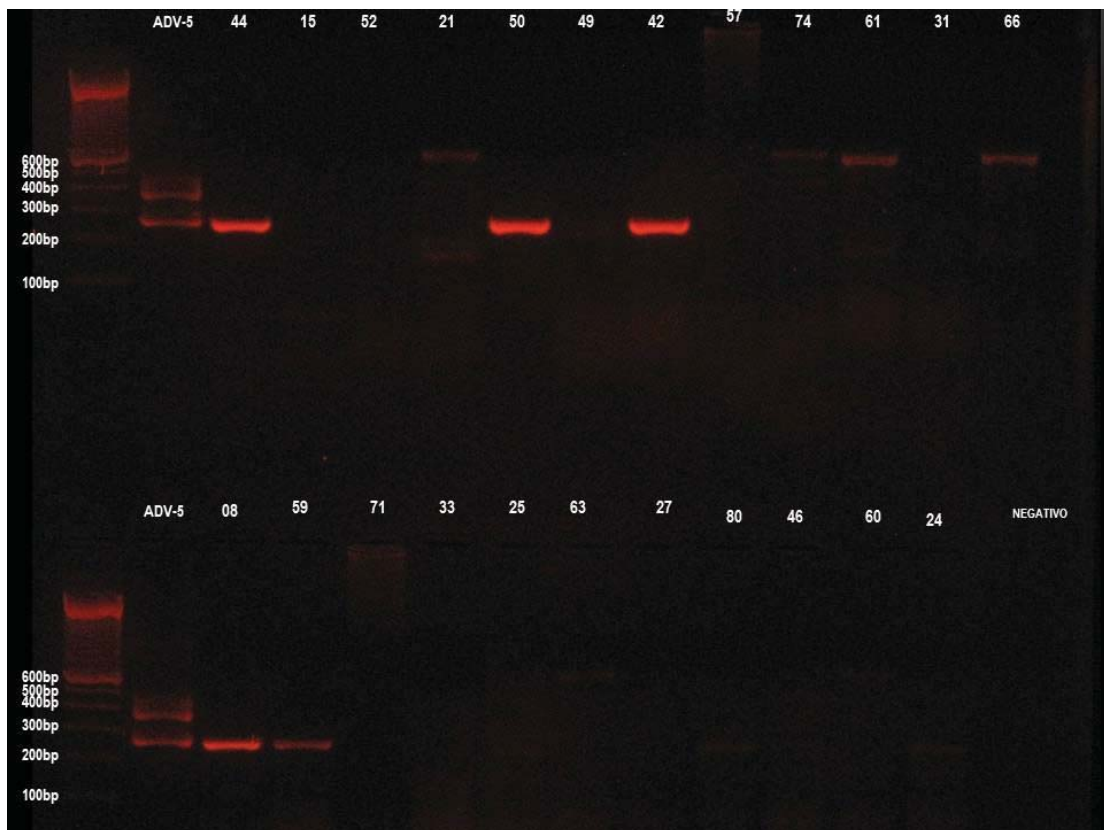


Figure 1. Nested PCR. Samples amplified of Adenovirus, from liver of bats. AdV5: positive Control. Amplifications of 261pb and between 500 and 600pb.

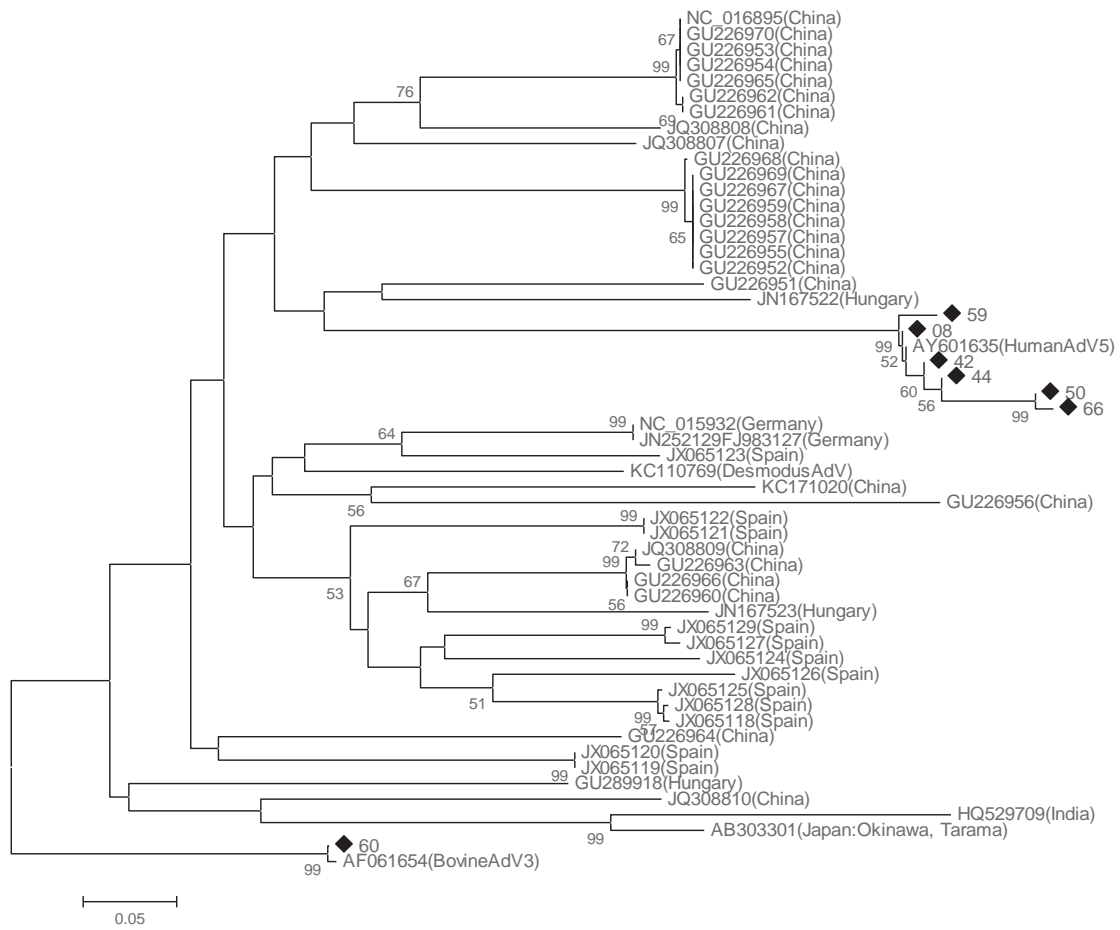


Figure 2. Phylogenetic Tree showing the positive samples found in liver of bat. An individual who had the viral strain HumanAdV5 and BovineAdV3.

Table 1- species of bats that use shelters in swine farms and pathogens tested through molecular diagnosis specific to each virus.

<i>Species of Bats</i>	Pathogens/Molecular Technique		
	Influenza A	Hepatitis E	Adenovirus
	RT-PCR	Nested PCR	Nested PCR
<i>M. molossus</i>	0	0	4
<i>M. rufus</i>	0	0	0
<i>H. velatus</i>	0	0	3
TOTAL	0	0	7

Table 2-species of bats and viral strains of Adenovirus identified in individuals who use swine farms as a shelter.

<i>Species of Bats</i>	<i>Positive Samples</i>	<i>Viral Strain</i>
<i>M. molossus</i>	4	HumanAdV5
<i>M. rufus</i>	0	-
<i>H. velatus</i>	3	HumanAdV5/BovineAdV3
Total	7	

Declaration of conflicting interests

The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Funding

The author(s) disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: This research was supported by the general research funding of EMBRAPA (Brazilian Agricultural Research Corporation) and FAPERGS (Research Foundation of the state of Rio Grande do Sul).

References

1. Benko, M., and B. Harrach. 2003. Molecular evolution of adenoviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 272:3–35.
2. CDC. Center of Diseases Control. Emerging Infectious Diseases. Disponível em: <http://www.cdc.gov/eid>. Vol. 20, No. 5, May 2014. Acesso em: 10 de maio de 2015.
3. Davison, A. J., K. M. Wright, and B. Harrach. 2000. DNA sequence of frog adenovirus. *J. Gen. Virol.* 81:2431–2439.
4. Drexler JF, et al. 2011. Amplification of emerging viruses in a bat colony. *Emerg. Infect. Dis.* 17:449–456.
5. Harrach and Benk, M. 2003. Molecular evolution of adenoviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 272:3–35.
6. Harrach B. Adenoviruses: general features. In: Mahy BW, van RegenmortelMH, editors. *Encyclopedia of virology*. Oxford: Elsevier; 2008. p. 1–9.

7. He, B., et al., Virome Profiling of Bats from Myanmar by Metagenomic Analysis of Tissue Samples Reveals More Novel Mammalian Viruses. *Plos*, v.8, p. 1-14, abril de 2013.
8. Jacobson, E. R. et al.,. Detection and analysis of six lizard adenoviruses by consensus primer PCR provides further evidence of a reptilian origin for the at adenoviruses. *J. Virol.* 78:13366–13369, 2004.
9. Jánoska M, et al. 2011. Novel adenoviruses and herpesviruses detected in bats. *Vet. J.* 189:118–121.
10. Kohl, C. et al. Genome Analysis of Bat Adenovirus 2: Indications of Interspecies Transmission. *Journal of Virology*. February 2012 Volume 86 Number 3.
11. Li, Y. et al. Host Range, Prevalence, and Genetic Diversity of Adenoviruses in Bats.
12. Lu L, Li C, Hagedorn CH. Phylogenetic analysis of global hepatitis E virus sequences: genetic diversity, subtypes and zoonosis. *Rev Med Virol* 2006; 16: 5-36.
13. Raj, V. S. Smits SL, Pas SD *et al.* Novel hepatitis E virus in errets, the Netherlands. *Emerg Infect Dis* 2012; 18: 1369–70.
14. Schi, Z. et al. Emerging infectious diseases associated with bat viruses. *Science China.* v.56, nº.8, p. 678–682, agosto de 2013.
15. Schrenzel, M., J. L. Oaks, D. Rotstein, G. Maalouf, E. Snook, C. Sandfort, and B. Rideout. 2005. Characterization of a new species of adenovirus in falcons. *J. Clin. Microbiol.* 43:3402–3413.
16. Sonntag M, Mühldorfer K, Speck S, Wibbelt G, Kurth A. 2009. New adenovirus in bats, Germany. *Emerg. Infect. Dis.* 15:2052–2055.
17. Tong, S., et al, A distinct lineage of influenza A virus from bats. *PNAS*, v.109, p. 4269-4274, março de 2012.
18. Tong S, Zhu X, Li Y, Shi M, Zhang J, et al. (2013) New World Bats Harbor Diverse Influenza A Viruses. *PLoS Pathog* 9(10): e1003657. doi:10.1371/ journal.ppat.1003657.
19. Vidovszky MZ, Boldogh S. Detection of adenoviruses in the Northern Hungarian bat fauna. *Magy. Allatorv.* 133:747–753. (In Hungarian.)
20. Xu W, McDonough MC, Erdman DD. Species-specific identification of human adenoviruses by a multiplex PCR assay. *J Clin Microbiol.* 2000. Nov;38(11):4114-20.
21. Song, Y. J., et al. Hepatitis E virus infections in humans and animals. *Clin Exp Vaccine Res* 2014;3:29-36

5 CONCLUSÕES

Investigações epidemiológicas tem se tornado cada vez mais importante no cenário de prevenção de doenças relacionadas à saúde pública. Atualmente, epidemias causadas por agentes zoonóticos têm representado cerca de 70% das infecções emergentes e re-emergentes, fazendo-se necessário um avanço na área da pesquisa, diagnóstico laboratorial molecular, bem como conhecer os microorganismos causadores de doenças, hospedeiros e vetores. Nesse estudo, investigamos o potencial zoonótico e vetor de morcegos que utilizam granjas de suinocultura como abrigos para suas colônias.

O estudo descrito nesta dissertação, além de registrar a diversidade de espécies de morcegos na região Sul do Brasil, abrangendo os municípios de Camargo, Vila Maria e Concórdia, mostra que esses mamíferos voadores são de fato hospedeiros de agentes patogênicos. Através de técnicas moleculares e utilização de primers específicos, identificamos em 7 morcegos a presença de Adenovírus, sendo esse do gênero Mastadenovirus, estirpes HumanAdV5 e BovineAdV3. Para outros agentes testados (Influenza A e Hepatite E) não obtivemos resultados positivos, porém ressaltamos importância da continuidade da investigação epidemiológica, fatores de contaminação e potencial zoonótico desses animais.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Doenças emergentes e re-emergentes são consideradas grandes geradoras de epidemias e pandemias, sendo a maioria delas causadas por animais potencialmente zoonóticos, ou seja, com alta capacidade de transmitir doenças ao homem. Morcegos atualmente são considerados o maior reservatório de agentes patogênicos entre os animais silvestres, a facilidade de deslocamento, proporcionada pelo vôo permite que, a disseminação de doenças seja rápida e eficiente. Muito se sabe sobre ecologia e conservação de espécies de morcegos, porém na questão sanitária o conhecimento é limitado. A partir deste estudo avaliamos o potencial de transmissão de zoonoses em morcegos de granjas de suinocultura e seu entorno. A pesquisa se baseou na questão simplificada de que no Brasil, grande parte dos morcegos é de hábito alimentar insetívoro, logo, granjas de suinocultura, produtoras em grande escala de matéria orgânica, atraem uma quantidade gigantesca de insetos, servindo assim como local ideal para que colônias de morcegos passem a viver. Há abundância de alimentos, fonte de água e edificações que garantem a sobrevivência de espécies.

Analisamos através de diagnóstico molecular três agentes específicos: Influenza A, Hepatite E e Adenovírus. Todos já diagnosticados em morcegos, porém em locais que não fossem vinculados a produção de suínos. Tais agentes foram testados com técnicas diferentes: RT-PCR, Nested-PCR e QPCR. Com os resultados, concluímos que sim, morcegos que estão no entorno de granjas, apresentam potencial zoonótico, e precisam ser avaliados constantemente frente a presença de agentes. O ideal ainda seria aplicar em amostras aleatórias a técnica de metagenômica, pois assim saberíamos possivelmente todos os tipos de vírus ou bactérias hospedados no organismo de tais animais. A maior preocupação em relação a estes resultados está direcionada a questões de saúde pública, biossegurança, e epidemiologia.

Vírus como a Influenza, possuem diversidade genética ampla, conseguindo fazer mutações do tipo drift ou shift em suas estruturas, drift é quando algumas mutações no genoma do vírus surgem fazendo com que o sistema imune se torne incapaz de reconhecer e se proteger desta nova variante viral, já o shift pode ocorrer quando uma pessoa se infecta com dois vírus diferentes da gripe ao mesmo tempo e um terceiro vírus é produzido com fragmentos grandes e mistos dos dois vírus originais por um processo conhecido como recombinação ou rearranjo. Desta forma um vírus completamente novo emerge. permitindo assim que outros vírus possam se auto reformular e infectar células de outros organismos, e gerar uma epidemia. Em nossos resultados, percebemos que amostras de fígado de morcegos, apresentaram duas variações de Adenovírus, AdV5

(humano) e AdV3 (bovino). A hipótese levantada está relacionada à questão da água. Vírus entéricos em geral, como é o caso do Adenovírus, são transmitidos através de água contaminada. Em propriedades rurais nem sempre o tratamento de dejetos é feito de maneira adequada, e muitas vezes as fezes dos animais (suínos, ovinos, bovinos e aves) pode contaminar lençóis freáticos ou poluir nascentes, açudes e lagos. Sendo assim, existe a possibilidade desses animais estarem consumindo água contaminada e hospedando em seu organismo vírus entéricos, sem apresentar sintomatologia alguma.

Nesse contexto, podemos considerar que potencial zoonótico dos morcegos que estão no mesmo ambiente que suínos e homens, além dos danos referentes à saúde pública, pode comprometer a economia nacional, considerando que o consumo de carne suína tem aumentado consideravelmente. A biossegurança em ambientes de intensa produção favorece não somente ao produtor, que ao eliminar vetores mantém o rebanho saudável, mas também a sanidade de seus colaboradores e evita o risco de infecções. Portanto, julgamos necessário e fundamental a continuidade desta pesquisa, conhecer vetores e a epidemiologia de zoonoses em granjas garante biossegurança animal e humana, qualidade e garantia de consumo, evita o risco de epidemias e não gera perdas econômicas no setor, além de obter conhecimento específico da quiropterofauna que vive altruistamente com outras espécies animais.

Por outro lado, pensamos na questão relacionada à geração de resíduos orgânicos. Uma vez que dejetos passam a ter destinação do tipo biodigestor, a quantidade de insetos será reduzida significativamente, e os morcegos passarão a ocupar outros locais, evitando por exemplo o consumo de água em propriedades rurais, podendo essa estar contaminada ou não por vírus entéricos de outras espécies. A implementação de um sistema assim se torna viável se comparada ao retorno sanitário.

Nesse estudo, o diagnóstico molecular apresentou resultados satisfatórios. Conseguimos identificar pelo menos um dos agentes pesquisados. A utilização da técnica de PCR é eficiente, e a utilização de primers específicos permite avanços na avaliação de doenças e prevenção de epidemias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. O'Shea TJ, et al. Bat Flight and Zoonotic Viruses. *Emerging Infectious Diseases*. Disponível em: <http://www.cdc.gov/eid>. Vol. 20, No. 5, May 2014. Acesso em: 10 de maio de 2015.
2. Sodré, MM, Gama, AR, Almeida MF, Updated List Of Bat Species Positive For Rabies In Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, v.52, p.75-81, março/abril de 2010.
3. Uieda, W, Haramani, MES, Silva, M. S. M. Raiva em morcegos insetívoros (Molossidae) do Sudeste do Brasil. *Revista de Saúde Pública*, v.29, p. 393-397, 1995.
4. Pacheco, SM, et al, Morcegos Urbanos: Status do Conhecimento e Plano de Ação para a Conservação no Brasil. *Chiroptera Neotropical*, v. 16, julho de 2010.
5. Moutinho, FF et al. Reclamações da comunidade à Seção de Controle de População Animal do Centro de Controle de Zoonoses de Niterói, Rj, Brasil, no período 2006-2010. *Revista Brasileira de Ciências veterinárias*, v. 20, n. 1, p. 26-31, jan./abr. 2013.
6. Storer, Tracy I. *Zoologia geral*. 6. ed. São Paulo: Nacional, 1984. 816 p
7. Passos, FC, Therys MS, Carvalho MC, Uieda, W. Estrutura da comunidade de morcegos (Mammalia, Chiroptera) da Estação Experimental de Itirapina, estado de São Paulo, Brasil. *Papeis avulsos de Zoologia*. Volume 55(1):1-11, 2015
8. Costa, LM, et al. Riqueza de morcegos insetívoros em lagos no Rio de Janeiro, Brasil. *Papeis Avulsos de Zoologia*. Volume 52(2):7-19, 2012
9. Esteves, FA. Et al. Neotropical coastal lagoons: an appraisal of their biodiversity, functioning, threats and conservation management. *Revista Brasileira de Biologia*, 68(4):967-981, 2008.

10. Zhengli. S, Emerging infectious diseases associated with bat viruses. *Science China*. v.56, nº.8, p. 678–682, agosto de 2013.
11. Alencar, JE et al. Estudo Sobre A Epidemiologia Da Doença De Chagas No Ceara V. Quirópteros Infectados Com Tripanosomo Cruzi. *Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. Pernambuco, v.10, p. 312-320, novembro/dezembro de 1976.
12. Bento NC et al. Epidemiologic Studies Of Chagas' Disease In The Urban Zone Of Teresina. State Of Piauí, Northeastern Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.1,p. 199-203, Out-Dez, 1984.
13. Geldenhuys, M, Weyer, J, Nel, LH, Markotter, W. Coronaviruses in South african bats. *Vector Borne Zoonotic Diseases*. v.13, p.516-519, julho de 2013.
14. Shahraki, HA, e tal. Close Relative of Human Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus in Bat, South Africa. *Emerging Infectious Diseases*, v.19, p. nº. 10, outubro de 2013
15. He, B, et al., Virome Profiling of Bats from Myanmar by Metagenomic Analysis of Tissue Samples Reveals More Novel Mammalian Viruses. *Plos*, v.8, p. 1-14, abril de 2013.
16. ABIPECS. Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína. Disponível em: <<http://www.abipecs.org.br/pt/estatisticas.html>>. Acesso em: 17 de março de 2015.
17. CEPEA. Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada. Disponível em: <<http://cepea.esalq.usp.br/suino/>>. Acesso em: 20 de maio de 2015.
18. Geneticporc. Genética Produtiva para Carne Suína. Disponível em: <http://www.genetiporc.com/pt/Lider_em_saude.shtml>. Acesso em: 12 de maio de 2015.

19. Freitas, JA, et al. Zoonotic brucellosis risk associated with clandestine slaughtered porks. Rev Saúde Pública 2001;35(1):101-2
20. Fernandes, FC et al. Possíveis infecções ocupacionais em tratadores de suínos. Arquivos Catarinenses de Medicina. Vol.15, n ° 3, 2006.
21. S.O.S. suínos. Biosseguridade. Disponível em: <<http://www.sossuinos.com.br/Tecnicos/info161.htm>>. Acesso em 17/06/2015.
22. Bayer Aves e Suínos. Manual de Biosseguridade. Disponível em: <<http://www.bayeravesesuinos.com.br/scripts/pages/pt/biossegurana/index.php>>. Acesso em 17/06/2015.
23. Flores, EF Virologia Veterinária. Santa Maria : Ed. da UFSM, 2007. p. 30; 54; 151.
24. Tong, S, et al, A distinct lineage of influenza A virus from bats. PNAS, v.109, p. 4269-4274, março de 2012.
25. Juozapaitis, M. et al. An infections bats-derived chimeric influenza virus harbouring the entry machinery of an influenza A virus. Nature communications 5, 4448.
26. Song, YJ, et al. Hepatitis E virus infections in humans and animals. Clin Exp Vaccine Res 2014;3:29-36
27. Sonoda , H. et al .Prevalence of Hepatitis E Virus (HEV) Infection in Wild Boars and Deer and Genetic Identification of a Genotype 3 HEV from a Boar in Japan. Journal of Clinical Microbiology. 42(11): 5371–5374. Nov. 2004
28. Harrach, B and Benk, M. Molecular evolution of adenoviruses. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 272:3–35, 2003.

29. Harrach B and Davison, AJ. DNA sequence of frog adenovirus. *J. Gen. Virol.* 81:2431–2439, 2000.
30. Schrenzel, M, et al. Characterization of a new species of adenovirus in falcons. *J. Clin. Microbiol.* 43:3402–3413, 2005.
31. Jacobson ER et al. Detection and analysis of six lizard adenoviruses by consensus primer PCR provides further evidence of a reptilian origin for the atadenoviruses. *J. Virol.* 78:13366–13369, 2004.
32. Li, Y. et al. Host Range, Prevalence, and Genetic Diversity of Adenoviruses in Bats. 2010.
33. Sonntag M, Mühldorfer K, Speck S, Wibbelt G, Kurth A. New adenovirus in bats, Germany. *Emerg. Infect. Dis.* 15:2052–2055, 2009.
34. Drexler JF, et al. Amplification of emerging viruses in a bat colony. *Emerg. Infect. Dis.* 17:449–456, 2011.
35. Jánoska M, et al. Novel adenoviruses and herpesviruses detected in bats. *Vet. J.* 189:118–121, 2011.
36. Vidovszky MZ, Boldogh S. Detection of adenoviruses in the Northern Hungarian bat fauna. *Magy. Allatorv.* 133:747–753. (In Hungarian.)
37. Kohl, C et al. Genome Analysis of Bat Adenovirus 2: Indications of Interspecies Transmission. *Journal of Virology.* February 2012 Volume 86 Number 3.

ANEXOS

Anexo I - Protocolo de Eutanásia e Necropsia de Morcegos

Inicialmente os animais devem ser anestesiados antes da eutanásia (mediante o emprego de anestésicos voláteis como isoflurano ou sevoflurano), para reduzir o risco de mordidas ou contato com secreções e excreções. Após ser induzido o plano anestésico e ser assegurada a plena inconsciência e ausência de nocicepção, o morcego pode então ser induzido à morte por injeção de barbitúricos (tiopental sódico) por via intravenosa, intraóssea, intracárdica, ou mesmo na cisterna magna, injeção de substâncias, decapitação com substâncias como Zelotil.

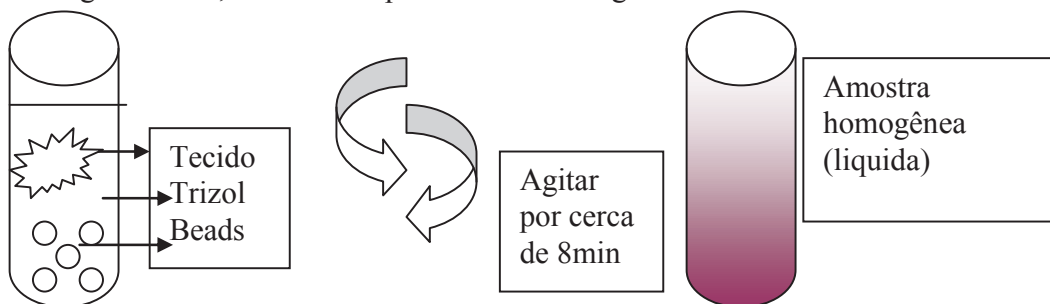
O procedimento de necropsia deverá ocorrer em capela de fluxo laminar, evitando qualquer contaminação com possíveis patógenos, além do uso de EPIs (luvas, óculos de proteção, máscara). A capela deverá ser preparada antes do uso, para posterior utilização. Ligar a lâmpada germicida por 15 minutos, desligar, fazer assepsia com álcool 70%. A necropsia ocorrerá da seguinte forma:

1. O morcego deverá ficar posicionado em decúbito dorsal, com membros inferiores e asas estendidas.
2. Através de uma incisão abdominal, do apêndice xifoide ao púbis, com o auxílio de um bisturi.
3. Inserindo a tesoura no tecido subcutâneo, a pele é rebatida para os lados, juntamente com a musculatura.
4. Neste momento, os órgãos e tecidos de interesse deverão ser retirados, começando por traquéia, esôfago e pulmões. Para a remoção do trato gastrointestinal, o mesmo deverá ser removido da cavidade peritoneal, com o auxílio de pinça dente de rato e agulha histológica. Os demais órgãos como fígado e rins deverão também ser retirados, expostos, examinados e em seguida colocados em nitrogênio líquido, mantendo a temperatura de -80°C.
5. As carcaças dos espécimes deverão ser encaminhadas ao setor responsável pelo descarte.

Anexo II - Protocolo de extração de RNA com Trizol® (adaptado de Chomczynski e Sacchi, 1987)

1. Coletar 200 μ L de sangue total;
 2. Adicionar 1,8 mL de trizol (em tubo de polipropileno de 1,5 mL);
Homogeneizar em vórtex – (congelado em nitrogênio);
 3. Dividir o tubo Trizol + Sangue em dois tubos, com mais ou menos 1 mL cada um;
 4. Incubar 5 min à temperatura ambiente;
 5. Acrescentar 400 μ L de clorofórmio;
 6. Agitar vigorosamente com as mãos por 15 segundos;
 7. Incubar durante 5 minutos à temperatura ambiente;
 8. Centrifugar a 16.000 xg a 4°C durante 15 min;
 9. Remover a fase aquosa para microtubo limpo;
 10. Adicionar 500 μ L de isopropanol. Homogeneizar com as mãos;
 11. Incubar por 10 min à temperatura ambiente;
 12. Centrifugar a 13.000 xg a 4°C por 10 min;
 13. Descartar o sobrenadante;
 14. Lavar com 1 mL de etanol 75% (feito com água DEPC);
 15. Centrifugar a 10.500 xg a 4°C por 5 min;
 16. Secar o *pellet* durante 15 min à temperatura ambiente;
- Obs. Não pode ficar nada de etanol.*
17. Ressuspender o *pellet* em água DEPC (20 μ L a 50 μ L);
 18. Manter a 55°C por 10 min;
 19. Avaliar a integridade (por eletroforese) e a quantidade de RNA (em espectrofotômetro).

OBS.: Amostras de tecidos (pulmão e fígado) inicialmente foram “trituradas” até obter homogeneidades, conforme representado na imagem abaixo:



Anexo III - First-Strand cDNA Synthesis Using SuperScript™ II RT

A 20 - μ L reaction volume can be used for 1 ng-5 μ g of total RNA or 1-500 ng of mRNA.

1. Add the following components to a nuclease-free microcentrifuge tube:

Oligo (dT)₁₂₋₁₈ (500 μ g/mL) *or*

50-250ng random primers *or*

2 pmol gene-specific primer (GSP)

1 ng to 5 μ g total RNA *or, incubate*

1-500 ng of mRNA

1 μ L dNTP Mix (10mM each)

Sterile, distilled water

2. Heat mixture to 65°C for 5 min and quick chill on ice. Collect the contents of the tube by brief centrifugation and add:

5X First-Strand Buffer

0.1 M DTT

RNaseOUT™ (40 units/ μ L) (optional)*

*RNaseOUT™ (Cat. No. 10777-019) is required if using <50 ng starting RNA.

3. Mix contents of the tube gently. If you are using oligo(dT)₁₂₋₁₈ or GSP, incubate at 42°C for 2 min. If you are using random primers, incubate at 25°C for 2 min.

4. Add 1 μ L (200 units) of SuperScript™ II RT and mix by pipetting gently up and down.

If you are using less than 1 ng of RNA, reduce the amount of SuperScript™ II RT to 0.25 μ L final volume.

If you are using random primers, incubate tube at 25°C for 10 min.

5. Incubate at 42°C for 50 min;

6. Inactivate the reaction by heating at 70°C for 15 min.

Anexo IV - RT-PCR INFLUENZA A

Realizamos RT-PCR (Reação da Transcriptase Reversa, seguida Reação da Polimerase em Cadeia), utilizando o kit *Ambion AgPath One-Step Matrix Gene Detection*, e os primers específicos Uni12/Inf-5G: (5'-GGG GGG AGC AGA AGC AGG-3') e Uni13/Inf-1 (5'-CGG GTT ATT AGT AGA AAC AAG G-3). Para um volume de reação de 23 ul, utilizamos 3ul de cada primer, 2ul de RNA de cada amostra, 12,5 ul de buffer RT-PCR, 1ul de enzyme mix, 1,67 ul de detection enhancer e 1,83 ul de água MiliQ®. A reação foi realizada em um termociclador convencional, utilizando na fase de desnaturação temperatura de 50°C durante 30 min, uma vez. A etapa de anelamento consistiu-se por 40 ciclos a 95°C por 15 seg, seguido de mais um ciclo de 45°C por 30 min, finalizando com 72°C por 1h:45min. Depois, disso o processo de extensão será realizado durante 7 min a 72°C. O produto final desta reação será levado para execução de uma electroforese em gel de agarose a 1%, os produtos de PCR derá ser corados com o corante não-tóxico xileno cianol azul de bromofenol e visualizado sob luz UV

Anexo V - NESTED-PCR HEPATITE E

Synthesis of cDNA was carried out using the High Capacity cDNA Reverse Transcription™ commercial kit (Applied Biosciences™, USA), with the aid of random primers and RNase Inhibitor (Applied Biosciences™, USA). To a 20µl reaction volume, 10µl of total RNA obtained in the previous step were added by 2µl of Buffer, 0.8µl of dNTP Mix, 2.0µl of Random Primers, 4.2µl of DNase/RNase free water and 1.0µl Reverse Transcriptase enzyme. The reaction was performed in a conventional Labnet® thermal cycler using a single cycle (at 25°C for 10 min, 37°C por 120 min, 85°C for 5 min).

Detection of HEV genome was performed by adaptation of previously published conventional Nested-RT-PCR and RT-PCR assays (Erker *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1999). A Swine-HEV genotype 3 positive sample (dos Santos *et al.*, 2011), kindly provided by Dr. Marcelo Alves Pinto (FIOCRUZ, RJ) was used as positive control throughout; MilliQ® water was used as negative control. The reactions were made in a final volume of 50µl, containing 25µl of a **commercial kit Promega** ready mix, 18µl of DNase/RNase free water, 1µL of each of the oligonucleotides and 5µl of DNA obtained from cDNA. The oligonucleotides and the cycling conditions were the same proposed by Erker *et al.* (1999) and Wang *et al.* (1999). The Nested-RT-PCR oligonucleotides targeted the ORF1 gene 5'-CTGGCATYACTACTGCYATTGA-3' (external sense); 5'-CCATCRARRCAGTAAGTGCGGTC-3' (external anti-sense) and 5'-CTGCCYTKGCGAATGCTGTGG-3' (internal sense); 5'-GGCAGWRTACCARGCTGAACATC-3' (internal anti-sense). The reaction consisted of an initial step of 5 min at 94°C, followed by 30 cycles of 94oC for denaturation (30s), 1 min at 57°C for annealing of primers, and 1 min 72°C for extension. After, the mixture was left for 7 min at 72oC for final extension.

All procedures were performed in safety cabinets to avoid cross-contamination of the samples. After running in a 1% agarose gel electrophoresis, the PCR products were stained with the non-toxic dye SYBR Safe™ (Invitrogen®) and viewed under UV light. The ORF1 expected amplicons were of 287bp.

Anexo VI - qPCR ADENOVIRUS

HRM assay, which consists of PCR amplification and melting acquisition and analysis were conducted in a thermal cycler iQ5™ Bio-Rad (Biorad™, Hercules, California 94547, USA). AdV species were performed by qPCR using commercial kit SYBR®GreenPlatinun®qPCRSupermix-UDG (Life Technologies™ Corporation, Carlsbad, California 92008, USA) in accordance with manufacturer's instructions. The qPCR reactions have been optimized and carried out under the same conditions, using as controls for absolute quantification of viral DNA from prototype samples of HAdV-2. For each 25 µL reaction, 12.5 µL of the mix were used, 1 µL of each primer (20 pM), 5.5 µL of DNase/RNase free sterile water and 5.0 µL of the nucleic acid extracted from each sample. Each reaction was composed of a denaturation cycle of 95°C by 10 min., followed by 50 cycles of 95°C for 20 s and 58°C for 1 minute. The fluorescence data were collected during the annealing/extension step. After, a denaturing curve was made to check the specificity of amplification products (melting step between 55 and 95°C). For generating standard curves, 10-fold serial dilutions of standard controls from 10⁻¹ to 10⁻⁶ were prepared, starting at 6.88 x 10⁷ (HAdV-2), all standard controls and samples were run in duplicates. No template control (NTC) and negative control were used in each run to confirm that there was not contamination in the assay. Melting curve analysis was done using High Resolution Melting (HRM) to verify PCR product specificity, each viral specie has a specific temperature: HAdV (88°C), BAV (85.5°C), PoAdV (83.5°C), CAV (82°C) and AvAdV (80.5°C). Primers ADV-F1 5'-CAGTGGTCGTACATGCACAT-3' e ADV-R1 5'-TCGGTGGTGACGTCGTGG-3

Anexo VII - NESTED PCR ADENOVÍRUS

Na primeira rodada, para um total de 25ul de reação, utilizamos 2ul de DNA, 2,5ul de tampão PCR, 20 pmol de cada primer específico Pol-F [5' CAGCCKCKGTTRTGYAGGGT-3'] e pol-R [5'-GCHACCATYAGCTCCAATC-3'], 0,2 mM de DNTP e 0,5 U de Taq polimerase de DNA (Promega). Após incubação inicial a 94°C durante 5 min, foram realizados 30 ciclos de amplificação. A etapa de desaturação foi realizada a 94°C durante 30s, o anelamento foi realizado a 48°C durante 30s e a etapa de extensão a 72°C durante 30s, sendo finalizada a 72°C durante 10min. Para a segunda rodada de amplificação, utilizamos 1ul do produto da primeira reação da PCR, como matriz e a amplificação foi realizada com o primer forward POL-NF (5'-GGGCTCRTTRGTCCAGCA-3') e o primer reverse pol-NR (5'-TAYGACATCTGYGGCATGTA-3'). Um controle negativo foi utilizado em todos os ensaios de PCR. Os produtos dessa PCR são consuzidos ao gel de agarose, onde realizamos uma eletroforese.

**LICENÇAS ESPECÍFICAS PARA CAPTURA, MANEJO E PESQUISA COM FINS
CIENTÍFICOS UTILIZANDO ANIMAIS
SILVESTRES**



UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
VICE-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

PARECER Nº 011/2014

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade de Passo Fundo, em reunião no dia 16/05/14, analisou o projeto de pesquisa "**Quirópteros, potencial vetor zoonótico em granjas de suínos no Sul do Brasil**", registro na CEUA Nº 011/2014, de responsabilidade do pesquisador **Eraldo Lourenso Zanella**.

Como objetivo de detectar agentes patogênicos como vírus e bactérias causadores de doenças em suínos em diferentes espécies de morcegos que servem como seus hospedeiros naturais, e correlacionar com os achados em granjas de suínos, 80 morcegos e 80 suínos serão utilizados. Os morcegos serão eutanasiados e amostras de secreção nasal, oral, e retal. Será realizada necropsia e retirada de órgãos para extração de DNA e RNA para análise virológica. Nos suínos oriundos das mesmas propriedades aonde os morcegos forem capturados será coletado amostras de sangue e suabes nasais para análises de DNA e RNA.

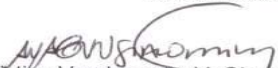
Em relação aos aspectos éticos, a Comissão considerou o projeto relevante e com relação custo-benefício adequada. O pesquisador e seus colaboradores estão comprometidos com a observância dos procedimentos para o uso científico de animais estabelecidos na Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008.

Diante do exposto, a Comissão, de acordo com suas atribuições definidas na Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa na forma como foi proposto.

O pesquisador deverá apresentar relatório à CEUA ao final do estudo.

Situação: PROTOCOLO APROVADO

Passo Fundo, 16 de maio de 2014.


Prof. Ana Cristina Vendrametto V. Giacomin
Coordenadora – CEUA – UPF



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

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 42864-1	Data da Emissão: 18/03/2014 17:03	Data para Revalidação*: 17/04/2015
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: ERALDO LOURENSO ZANELLA	CPF: 427.644.240-00
Título do Projeto: Quirópteros, potencial vetor de agentes em granjas de suínos na Região Sul do Brasil	
Nome da Instituição : FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO	CNPJ: 92.034.321/0001-25

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Revisão de Literatura (bibliográfica)	03/2014	05/2015
2	Execução do projeto - captura de morcegos, coleta de amostras de morcegos e suínos	03/2014	05/2015
3	Execução do projeto - processamento das amostras no laboratório e análise das amostras	05/2014	05/2015
4	Seleção dos locais de coleta de amostras	05/2014	05/2015
5	Redação de artigo científico e encaminhamento para revista científica	01/2015	07/2015
6	Redação da dissertação	01/2015	07/2015
7	Análise dos dados	05/2015	05/2015
8	Defesa da dissertação na UPF	07/2015	08/2015

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa IBAMA nº 154/2007 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

Outras ressalvas

1	As redes de neblinas deverão ser verificadas no mínimo de 30 em 30 minutos. Não está autorizada a coleta, transporte de fêmeas grávidas ou em processo de amamentação
---	--

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Flávia Stefanello	Executor	008.427.430-14	1061393292 SSP-RS	Brasileira
2	Marcelo D.N. Xavier	Apoio	428.584.100-20	1021602626 SSP-SE	Brasileira
3	JANICE REIS CIACCI ZANELLA	Apoio	586.812.306-97	4450683 SSP-SC	Brasileira
4	Michelli Westphal de Ataíde	Medica Veterinaria	000.832.370-46	43883788-2 SSP-SP	Brasileira

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 55918496



Página 1/3



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

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 42864-1	Data da Emissão: 18/03/2014 17:03	Data para Revalidação*: 17/04/2015
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: ERALDO LOURENSO ZANELLA	CPF: 427.644.240-00
Título do Projeto: Quirópteros, potencial vetor de agentes em granjas de suínos na Região Sul do Brasil	
Nome da Instituição : FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO	CNPJ: 92.034.321/0001-25

5	Renan Idalencio	Medico Veterinario	009.051.200-60	3077069973 SJC-RS	Brasileira
---	-----------------	--------------------	----------------	-------------------	------------

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	CARAZINHO	RS	Proximo a granjas de suinos	Fora de UC Federal
2	PASSO FUNDO	RS	Proximo a granjas de suinos	Fora de UC Federal
3	CHARRUA	RS	Proximo a granjas de suinos	Fora de UC Federal
4	CONCORDIA	SC	Proximo a granjas de suinos	Fora de UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Captura de animais silvestres in situ	Molossidae, Vespertilionidae, Noctilionidae, Phyllostomidae
2	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Noctilionidae, Phyllostomidae, Molossidae, Vespertilionidae
3	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Molossidae (*Qtde: 20), Phyllostomidae (*Qtde: 20), Vespertilionidae (*Qtde: 20), Noctilionidae (*Qtde: 20)

* Quantidade de indivíduos por espécie, por localidade ou unidade de conservação, a serem coletados durante um ano.

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Outros mamíferos)	Animal encontrado morto ou partes (carcaça)/osso/pele, Secreção, Fragmento de tecido/órgão, Regurgitação/conteúdo estomacal, Sangue, Fezes
2	Método de captura/coleta (Outros mamíferos)	Captura manual, Outros métodos de captura/coleta(Comunidade entrega morcegos), Puçá, Rede de neblina

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO	coleção
2	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa	

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 55918496





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

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 42864-1	Data da Emissão: 18/03/2014 17:03	Data para Revalidação*: 17/04/2015
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: ERALDO LOURENSO ZANELLA	CPF: 427.644.240-00
Título do Projeto: Quirópteros, potencial vetor de agentes em granjas de suínos na Região Sul do Brasil	
Nome da Instituição : FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO	CNPJ: 92.034.321/0001-25

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº154/2007, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de amostra	Qtde.	Data

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 55918496



Página 3/3