

Sequências Retrovirais de interesse em Medicina Veterinária identificadas em Morcegos urbanos da Amazônia

Retroviral Sequences of interest in Veterinary Medicine identified in urban bats from the Amazon
Secuencias retrovirales de interés en Medicina Veterinaria identificadas en murciélagos urbanos de la Amazonia

Recebido: 14/07/2022 | Revisado: 25/07/2022 | Aceito: 27/07/2022 | Publicado: 05/08/2022

Wandercleyson Uchôa Abreu

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9217-1170>
Universidade Federal do Oeste do Pará, Brasil
E-mail: uchoa_vet@yahoo.com.br

Luis Reginaldo Ribeiro Rodrigues

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2849-0382>
Universidade Federal do Oeste do Pará, Brasil
E-mail: luisreginaldo.ufpa@hotmail.com

Antonio Charlys da Costa

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5516-5177>
Universidade de São Paulo, Brasil
E-mail: charlysbr@yahoo.com.br

Vanessa dos Santos Morais

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3813-3154>
Universidade de São Paulo, Brasil
E-mail: va.morais@usp.br

Adriane Castro de Paula

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9027-7542>
Universidade da Amazonia, Brasil
E-mail: drianydipaula@gmail.com

Eduardo Alves Barreiros

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9922-6725>
Instituto Brasileiro de Recursos Avançados, Brasil
E-mail: medvet.rise@gmail.com

Resumo

Os morcegos são reservatórios de uma diversidade de vírus. Dentre os viromas registrados em morcegos, os retrovírus estão entre as famílias de vírus mais significativas, pois causam infecção persistente nos animais. Relatórios recentes de retrovírus circulando em populações de morcegos tem identificado vários retrovírus de outros animais nesses mamíferos. Objetivou-se a partir de Metagenômica viral, identificar sequências retrovirais de interesse em Medicina Veterinária, em espécies de morcegos urbanos da Amazônia. A partir do Sequenciamento de Nova Geração (SNG) na Plataforma Illumina e baseado no BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), analisamos 168 amostras (56 de sangue, 56 de *swab* oral e 56 de *swab* anal) de 56 morcegos das espécies *Noctilio albiventris* (n= 18), *N. leporinus* (n=1), *Artibeus lituratus* (n=13), *Myotis* sp. (n= 6) e *Molossus molossus* (n=18). Como resultado observamos que quatro gêneros de retrovírus tiveram leituras, sendo eles: Alpharetrovirus, Betaretrovirus, Gammaretrovirus e Lentivirus. Os *pools* de *swab* oral apresentaram mais número *contigs* virais identificados por similaridade no BLAST. As sequências retrovirais totais foram: *Duck infectious anemia virus*, *Feline leukemia virus*, *Gibbon ape leukemia virus*, *Avian leukosis virus*, *Reticuloendotheliosis virus*, *Feline immunodeficiency virus*, *Mason Pfizer monkey virus*, *Enzootic nasal tumour virus of goat* e *Simian retrovirus Y*. Mostramos a partir de nossa análise metagenômica, que há circulação de retrovírus de outros reservatórios, como felinos, ovinos e aves, na quiropterofauna da região e reportamos tais registros com o intuito de alertar sobre a vigilância permanente de morcegos para novos retrovírus e investigações de características biológicas e potencial infeccioso de tais vírus.

Palavras-chave: Viroma; Quirópteros; Metagenômica; Illumina.

Abstract

Bats are reservoirs of a diversity of viruses. Among the viruses recorded in bats, retroviruses are among the most significant virus families because they cause persistent infection in the animals. Recent reports of retroviruses circulating in bat populations have identified several retroviruses from other animals in these mammals. We aimed from viral Metagenomics, to identify retroviral sequences of interest in Veterinary Medicine, in Amazonian urban bat species.

Using Next Generation Sequencing (SNG) on Illumina Platform and based on BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), we analyzed 168 samples (56 from blood, 56 from oral swab and 56 from anal swab) from 56 bats of the species *Noctilio albiventris* (n=18), *N. leporinus* (n=1), *Artibeus lituratus* (n=13), *Myotis* sp. (n=6) and *Molossus molossus* (n=18). As a result, we observed that four genera of retroviruses had readings, these being: Alpharetrovirus, Betaretrovirus, Gammaretrovirus and Lentivirus. The oral swab pools had more number of viral contigs identified by similarity in BLAST. The total retroviral sequences were: *Duck infectious anemia virus*, *Feline leukemia virus*, *Gibbon ape leukemia virus*, *Avian leukosis virus*, *Reticuloendotheliosis virus*, *Feline immunodeficiency virus*, *Mason Pfizer monkey virus*, *Enzootic nasal tumour virus of goat* e *Simian retrovirus Y*. We show from our metagenomic analysis, that there is circulation of retroviruses from other reservoirs, such as felines, sheep and birds, in the chiropterofauna of the region and report such records in order to warn about permanent surveillance of bats for new retroviruses and investigations of biological characteristics and infectious potential of such viruses.

Keywords: Viroma; Chiroptera; Metagenomics; Illumina.

Resumen

Los murciélagos son reservorios de una gran variedad de virus. Entre los virus registrados en los murciélagos, los retrovirus se encuentran entre las familias de virus más significativas porque causan una infección persistente en los animales. Los informes recientes sobre los retrovirus que circulan en las poblaciones de murciélagos han identificado varios retrovirus de otros animales en estos mamíferos. Este estudio tuvo como objetivo identificar secuencias retrovirales de interés en medicina veterinaria en especies de murciélagos urbanos de la región amazónica, utilizando la metagenómica viral. A partir de la secuenciación de nueva generación (NGSS) en la plataforma Illumina y basándonos en BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), analizamos 168 muestras (56 de sangre, 56 de hisopo oral y 56 de hisopo anal) de 56 murciélagos de las especies *Noctilio albiventris* (n=18), *N. leporinus* (n=1), *Artibeus lituratus* (n=13), *Myotis* sp. (n=6) y *Molossus molossus* (n=18). Como resultado observamos que cuatro géneros de retrovirus tenían lecturas, estos son: Alfaretrovirus, Betaretrovirus, Gammaretrovirus y Lentivirus. Los grupos de hisopos orales presentaron un mayor número de *contigs* virales identificados por similitud en BLAST. Las secuencias retrovirales totales fueron las siguientes: *Duck infectious anemia virus*, *Feline leukemia virus*, *Gibbon ape leukemia virus*, *Avian leukosis virus*, *Reticuloendotheliosis virus*, *Feline immunodeficiency virus*, *Mason Pfizer monkey virus*, *Enzootic nasal tumour virus of goat* e *Simian retrovirus Y*. Demostramos, a partir de nuestro análisis metagenómico, que hay circulación de retrovirus de otros reservorios, como felinos, ovejas y aves, en la quiropterofauna de la región e informamos de tales registros para alertar sobre la vigilancia permanente de los murciélagos en busca de nuevos retrovirus y las investigaciones de las características biológicas y el potencial infeccioso de tales virus.

Palabras clave: Viroma; Chiroptera; Metagenómica; Illumina.

1. Introdução

Os morcegos são reservatórios de diversas famílias virais e estão implicados na transmissão de numerosos vírus altamente patogênicos para humanos e outros mamíferos (Hayman, 2016). E estudos recentes sugeriram que o número de espécies que a ordem Chiroptera (morcegos) apresenta, em relação a maioria das demais espécies entre os mamíferos, está diretamente associada a variedade de vírus encontrados nesses animais (Mollentze et al., 2020).

Dentre os viomas já descritos em morcegos, os retrovírus, que causaram um impacto global importante na saúde humana e animal, ainda tem seu papel pouco esclarecido em quirópteros (Hayman, 2016). Os retrovírus são vírus de RNA de sentido positivo de fita simples que incorporam seus genomas como pro-vírus em genomas cromossômicos do hospedeiro após transcrição reversa para cDNA. Membros da família Retroviridae infectam uma grande variedade de espécies hospedeiras (Goff, 2013). Quando os retrovírus se integram às células da linhagem germinativa, eles se tornam “verticalmente” transmissíveis de pais para filhos e são chamados de retrovírus endógenos (ERVs) e quando são transmitidos para outras espécies, tornando-se infecciosos, são chamados de retrovírus exógenos (XRVs) (Stoye, 2012).

Alguns retrovírus infecciosos circulantes em morcegos foram relatados recentemente (Hayward et al., 2020). O conhecimento sobre esses vírus em morcegos, tem crescido constantemente nas últimas duas décadas, a partir dos estudos de sequências retrovirais dentro de genomas de morcegos, que estão presentes devido às principais características do ciclo de replicação retroviral (Tachedjian et al., 2015).

Vários retrovírus causam imunodeficiência (por exemplo, HIV) e doenças malignas como leucemia (por exemplo, retrovírus de coala (KoRV) (Tarlinton et al., 2006). Em animais, são também relevantes as doenças que os retrovírus exógenos (XRV) estabelecem, sendo os principais representantes desta família na veterinária: o Vírus da Anemia Infecciosa Equina

(EIAV), o Vírus da Leucose Bovina (BLV), os Lentivirus de pequenos ruminantes, incluindo os Vírus da Artrite-encefalite Caprina (CAEV) e o Vírus da pneumonia progressiva dos ovinos (Maedi-Visna), o Vírus da Imunodeficiência Felina (FIV), o Vírus da Leucemia Felina (FeLV) e o Vírus da Leucose aviária (Reis, 2012).

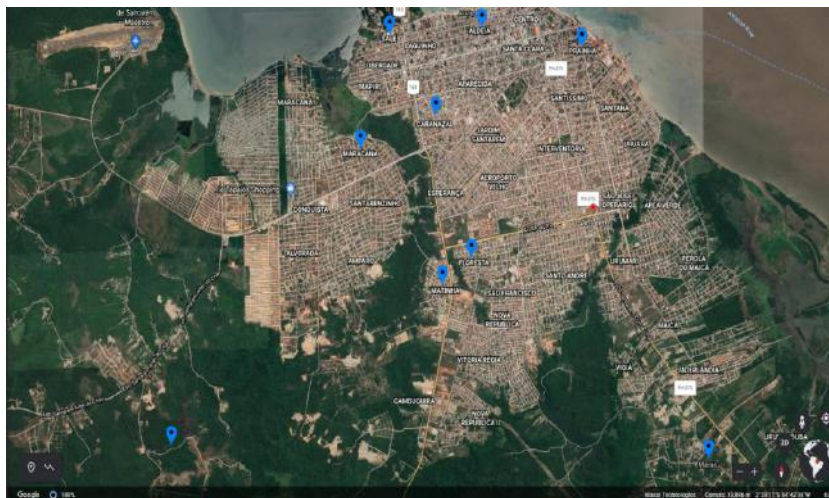
Assim, como a contínua variedade de dados em escala genômica do viroma de quirópteros gera a oportunidade para registrar a ocorrência da diversidade de retrovírus de outras espécies de mamíferos circulando em morcegos, objetivou-se, a partir do estudo de Metagenômica viral, identificar sequências de gêneros e espécies retrovirais de interesse em Medicina Veterinária em morcegos urbanos.

2. Metodologia

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Oeste do Pará (CEUA/UFOPA N° 0220220128) e autorizado pelo Sistema de Informação e Autorização da Biodiversidade (SISBIO; N°18313-1).

Obtivemos a amostragem de material biológico (56 amostras de sangue (S) – 56 amostras de *swab* anal (SA) e 56 amostras de *swab* oral (SO), de 56 morcegos pertencentes a 4 famílias (Phyllostomidae, Molossidae, Vespertilionidae e Noctilionidae) das espécies *Noctilio albiventris* (n= 18), *N. leporinus* (n=1), *Artibeus lituratus* (n=13), *Myotis* sp. (n= 6) e *Molossus molossus* (n=18), capturados em 09 locais do Município de Santarém-PA (Latitude: 2° 26' 22" Sul, Longitude: 54° 41' 55" Oeste), Mesorregião do Baixo Amazonas (Figura 1).

Figura 1. Mapa do Município de Santarém-PA-Brasil e localizações dos pontos de capturas dos morcegos (pontos em azul).



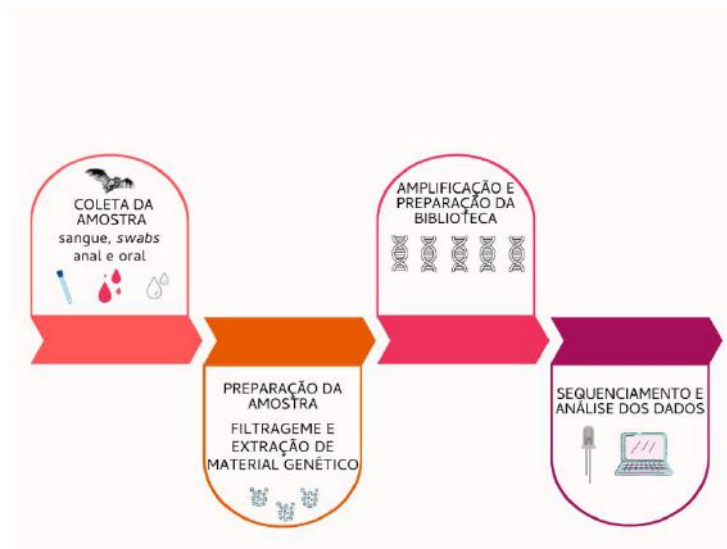
Fonte: Adaptação de imagem do earth.google.com/web/search/Santarém/Pa.

Inicialmente as amostras (sangue, *swabs* oral e anal) foram diluídas em 500 µL de solução salina tamponada de Hanks (HBSS), adicionada a um tubo de 2 ml contendo matriz de lise C (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, EUA) e homogeneizado em Vórtex. Em seguida foram submetidas a um “giro suave”, 8000 rpm, por 5 min para remover detritos grandes, e os sobrenadantes foram colocados através de filtros de 0,45 µM (Merck Millipore, Billerica, MA, EUA) para remover partículas do tamanho de células eucarióticas e bacterianas. As alíquotas dos filtrados foram ressuspensas com 250 µl de PBS para tratamento com enzimas nucleases.

A etapa seguinte foi a realização da extração dos ácidos nucleicos virais, realizada utilizando o QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Alemanha) que purifica o RNA e o DNA, e as etapas seguiram-se de acordo com as instruções do fabricante. O fluxo de trabalho para o sequenciamento seguiu-se das etapas de preparação das

amostras, com filtragem e extração dos ácidos nucleicos virais até a etapas de sequenciamento de nova geração (SNG) e estão resumidas na Figura 2 e descritas logo em seguida.

Figura 2. Resumo em Fluxograma das atividades no estudo Metagenômico viral das amostras biológicas dos morcegos para o sequenciamento na plataforma Illumina.



Fonte: Autores.

Para a preparação das bibliotecas da plataforma Illumina, os produtos de PCR foram verificados em gel de agarose em seguida coletados fragmentos de DNA de 500-1000 pb com esferas Ampure - SAGE BluePippin Targeted Size Selection (1,5% agarose, 250bp - 1,5kb). A preparação das bibliotecas foi feita como o kit Nextera XT DNA Sample Preparation Kit (Illumina Inc.) seguindo as orientações do fabricante. O sistema Agilent 2100 Bioanalyzer e o kit KAPA foram utilizados para fazer a qualificação e quantificação da biblioteca.

Em seguida as Bibliotecas, agrupadas em *pools*, foram sequenciadas na plataforma Illumina NovaSeq-6000, para fornecer leituras emparelhadas de 100 bp, com o kit TruSeq PE Cluster v3 e o kit TruSeq SBS v3 (Illumina). As leituras brutas obtidas do sequenciamento Illumina foram pré-processadas, onde: a) os registros de sequência de extremidades emparelhadas foram removidos de ambas as extremidades, b) as sequências com baixa qualidade (dados brutos gerados de leituras com comprimento inferior a 100 bp) e as sequências do adaptador e dos *primers* foram cortadas, usando o VecScreen baseado em BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) nos parâmetros padrão (McGinnis & Thomas, 2004) e por fim, c) as leituras que continham homopolímero e leituras duplicadas foram identificadas e removidas.

Os dados de bioinformática foram analisados de acordo com o protocolo descrito em outros estudos (Denget et al., 2015). Os *contigs* resultantes de retrovírus de interesse em Medicina Veterinária foram comparados utilizando o BLASTx e BLASTn para pesquisar similaridade com proteínas virais e nucleotídeos, respectivamente, a partir do banco de dados de sequências genéticas GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Os melhores resultados das pesquisas no BLAST (com maior percentual de similaridade de sequência já depositada no Genbank) foram selecionados e para reduzir o número de correspondências aleatórias, os valores E (e-value) foram definidos em cada busca.

3. Resultados

A análise dos 33 pools das amostras (sangue, *swabs* oral e anal) por Illumina NovaSeq gerou cerca de 1,3 milhões de sequências de leitura bruta. E embora a plataforma apresente alto rendimento de leituras, com um grande número de resultados

para diferentes famílias virais, nos detemos neste estudo apenas a exposição de leituras para família Retroviridae. Do total de *contigs* obtidos, foram identificados 04 gêneros de retrovírus (alpha -, beta – gamma e lentivírus) registrados em todas as espécies de morcegos do estudo.

O maior número de registros de sequências virais que apresentam interesse em Medicina Veterinária, foram nas amostras de *swab* oral (nº=7), seguido das amostras de sangue (nº = 4) (Tabela 1). Dois importantes Lentivírus apresentaram leituras nas amostras de *swab* oral, sendo eles *Simian retrovirus Y* e o *Feline immunodeficiency virus* (FIV).

Tabela 1. Visão geral de retrovírus identificados nos Pools de *swab* oral, *swab* anal e Sangue.

Gênero	Pool <i>swab</i> Oral (vírus de interesse)	Pool <i>swab</i> anal de interesse)	(vírus	Pool Sangue (vírus de interesse)
Gammaretrovirus	<i>Duck infectious anemia virus</i> <i>Feline leukemia virus</i> <i>Gibbon ape leukemia virus</i>			<i>Duck infectious anemia virus</i> <i>Reticuloendotheliosis virus</i> <i>Feline immunodeficiency virus</i>
Alpharetrovirus	<i>Avian leukosis virus</i>			
Betaretrovirus	<i>Mason Pfizer monkey virus</i>	<i>Enzootic nasal tumour virus of goat</i>		<i>Enzootic nasal tumour virus of goat</i>
Lentivirus	<i>Feline Immunodeficiency virus</i> <i>Simian retrovirus Y</i>	<i>Simian retrovirus Y</i>		

Fonte: Autores.

A Tabela 2 resume o número de leituras filtradas (comprimento/qualidade) obtidas por pool com o número de leituras virais e leituras virais correspondentes em todos os pools. As sequências retrovirais aqui identificadas representam nucleotídeos que codificam as proteínas polimerase (Pol), glicoproteínas de envelope (Env) e aquelas envolvidas no processo de replicação viral (Poliproteínas gag). Os vírus *Reticuloendotheliosis vírus*, *Duck infectious anemia vírus*, e *Feline leukemia vírus*, que causam doenças em aves e gato doméstico, respectivamente, foram os que tiveram maior número de leituras (Hits) (n=53, n=13 e n=23).

Tabela 2. Retrovírus identificados nas leituras por *pools* e o nº acesso dos melhores resultados recuperados no BLASTn e BLASTx do banco de dados NCBI e a proteína correspondente às sequências identificadas.

<i>Pools</i> *	Vírus Correspondente	Hits	Compr. (nt)*	Vírus Correspondente nº Acesso	Proteína Correspondente	ID %*	e-value*
SO	<i>Avian leukosis virus</i>	1	251	AUT36432.1	Poliproteína (Env)	55,88	0,035
SO	<i>Mason Pfizer monkey virus</i>	2	250	AAA47711.1	Poliproteína	70,37	3e-04
SO e SA	<i>Simian retrovirus Y</i>	2	251	BAM71050.1	Poliproteína	79,52	1e-39
SO e S	<i>Duck infectious anemia virus</i>	13	251	AGV92858.1	Proteína gag	66,67	0.011
SO e S	<i>Feline immunodeficiency virus</i>	1	251	AHZ63409.1	Proteína gag	41,67	3.3e-06
SO	<i>Feline leukemia virus</i>	23	251	AYG96585.1	Poliproteína (Env)	71,19	9e-07
SO	<i>Gibbon ape leukemia virus</i>	1	251	ALV83303.1	Poliproteína	50,00	1e-05
SA e S	<i>Enzootic nasal tumour virus of goats</i>	2	251	ANG58663.1	Proteína gag	44,44	1e-14
S	<i>Reticuloendotheliosis virus</i>	53	251	YP_223871.1	Polimerase (Pol)	51,72	4e-05

*SA: *swab* anal. SO: *swab* oral. S: Sangue. Env: envelope. Compr. (nt): comprimento do nucleotídeo. ID%: percentual de similaridade/identidade com o vírus correspondente do GenBank. Fonte: Autores.

4. Discussão

Estudos anteriores revelaram a presença dos gêneros *Betaretrovirus*, *Gammaretrovirus* e *Deltaretrovirus* dentro dos genomas de morcegos (Hayward et al., 2013; MCmichael et al., 2019), assim como observado em nossa pesquisa, e apesar de não termos feito a filogenia das sequências, as análises das relações evolutivas entre esses ERVs de morcegos e os de outros

mamíferos, seriam de grande relevância, pois sugerem que os morcegos desempenham um papel fundamental na transmissão de retrovírus entre diferentes espécies de mamíferos (Hayward et al. 2013; Cui, e al. 2015).

Relatamos aqui, sequências relacionadas a gammaretrovírus de morcego em todas espécies estudadas (*M. molossus*, *A. lituratus*, *Myotis* sp., *N. leporinus* e *N. albiventris*), tanto em amostras de *swab* oral quanto de sague. Os gammaretrovírus também foram detectados anteriormente em 10 outras espécies de morcegos, na China, Austrália e em Gana (Cui et al., 2012a; Cui et al., 2012b; Baker et al., 2013).

Similaridade quanto a nossos resultados, sobre a presença de Betaretrovírus em morcegos, pode ser observados também a partir de análises de transcriptoma e genoma de morcegos das espécies *Pteropus alecto* (raposa voadora preta) e *Pteropus vampyrus* (raposa voadora grande), *Myotis lucifugus* (morcego marrom), *Rhinolophus megaphyllus* (morcego-ferradura oriental) e *Rhinolophus ferrumequinum* (maior morcego-ferradura) (Hayward et al. 2013). Nesse estudo, foram verificados uma gama diversificada de Betaretrovirus ERVs, já em nossa pesquisa, apenas EXRs foram descritos.

De acordo com estudos anteriores em transcriptoma de sete espécies de morcego (*Rhinolophus ferrumequinum*, *R. pusillus*, *R. pearsoni*, *R. megaphyllus*, *R. affinis*, *Myotis ricketti* e *Pteropus alecto*), o registro de gammaretrovírus que exibem um padrão filogenético consistente, cogitou a possibilidade de que os gammaretrovírus existentes em mamíferos, podem ter sido originado de morcegos (Cui et al., 2012a). Para que possamos ter dados mais robustos a respeito desse padrão, os *contigs* gerados nos morcegos amostrados em Santarém-Pa, para esses retrovírus, devem ser submetidos as análises filogenéticas para que essa teoria precise claramente ser verificada em nosso estudo, e se podemos definir se nosso achado pode ser devido à integração de material genômico retroviral nos genomas do quirópteros ou de uma indicação de infecção viral.

Os morcegos são os únicos mamíferos capazes de voar ativamente, o que lhes permite atravessar barreiras físicas e se adaptar em paisagens de grande heterogeneidade ambiental, tais como áreas urbanas conectadas por ambientes seminaturais como parques, praças, quintais e jardins, o que pode formar um potencial elo de transmissão viral entre várias espécies de animais, selvagens e domésticos (Hayward & Tachedjian, 2021). Tal assertiva pode amparar os registros retrovirais na diversidade das amostras de morcegos que analisamos, uma vez que os morcegos são particularmente susceptíveis a receber retrovírus de outros mamíferos (Hayward et al., 2015).

O sequenciamento de alto rendimento adotado neste estudo é uma ferramenta de pesquisa, que permite “descobrir” uma grande diversidade de novos vírus, sendo que normalmente muitos não poderiam ser identificados por métodos tradicionais como de cultura de vírus (Delwart, 2007). Embora nossa abordagem metagenômica tivesse foco na a identificação novas sequências retrovirais, mineramos *contigs* de vírus de importância veterinária, por causarem doenças crônicas graves em animais, e mesmo que as informações sobre uma região limitada do genoma retroviral e os retrovírus possam sofrer recombinação, inclusive entre diferentes gêneros, impedindo a identificação precisa ou confiável com base em sequências curtas (centenas a milhares de nucleotídeos), os resultados obtidos mostram confiabilidade das sequências correspondentes, verificadas pelo BLAST, que são relatadas como pontuações de probabilidade (*e-value*) e é uma ferramenta que utiliza o GenBank, uma confiável fonte de dados genéticos.

5. Considerações Finais

Mostramos que na área urbana de Santarém-PA, há circulação de diferentes gêneros retrovirais de ocorrência natural em animais de interesse em Medicina Veterinária, na diversidade de morcegos da região, como pode ser constatada na análise Metagenômica das diferentes amostras biológicas pelo Sequenciamento na Plataforma Illumina. Todas as amostras tiveram leituras sequenciadas e os Gammaretrovírus mostraram-se mais abundantes, bem como os *pools* de saliva (*swab* oral) apresentaram numericamente mais leituras. Dentre os *contigs* dos morcegos, encontramos nucleotídeos e proteínas retrovirais de felinos, de ovinos e de patos e outras aves.

Diante de nossos resultados, podemos inferir que há necessidade de estudos permanentes de ecovigilância destes morcegos urbanos, e que a pesquisa metagenômica para novos retrovírus e investigações de características biológicas e potencial infeccioso dos vírus de morcegos, podem promover uma abordagem proativa no que diz respeito ao transbordamento de retrovírus para outros mamíferos e o homem. Outrossim, sugerimos futuramente a realização de estudos virais nas espécies animais envolvidas na transmissão desses vírus, para ampliar o entendimento da dinâmica viral entre eles e a quiropterofauna da região.

Agradecimentos

Este trabalho teve apoio da Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal – Bionorte, da Fundação Amazônia Paraense de Amparo à Pesquisa – Fapespa, Centro de Estudos do Genoma Humano – Instituto de Biociências – USP e do Instituto de Medicina Tropical – USP.

Referências

- Baker, K. S., Leggett, R. M., Bexfield, N. H., Alston, M., & Daly, G. (2013). Metagenomic study of the viruses of African straw-coloured fruit bats: Detection of a chiropteran poxvirus and isolation of a novel adenovirus. *Virology*, 441, 95–106.
- Cui, J., Tachedjian, G., Tachedjian, M., Holmes, E.C., & Zhang, S. (2012a). Identification of diverse groups of endogenous gammaretroviruses in mega- and microbats. *Journal of General Virology*, 93, 2037–2045. <https://doi.org/10.1099/vir.0.043760-0>.
- Cui, J., Tachedjian, G., & Wang, L.F. (2015). Bats and Rodents Shape Mammalian Retroviral Phylogeny. *Scientific Reports*, 9(5), 165561.
- Cui, J., Tachedjian, M., Wang, L., Tachedjian, G., & Wang, L. F. (2012b). Discovery of retroviral homologs in bats: implications for the origin of mammalian gammaretroviruses. *Journal of Virology*, 86, 4288–4293. <https://doi.org/10.1128/JVI.06624-11>.
- Denget, X., Naccache, S. N., Nig, T., Federman, S., Li, L., Chiu, C.Y., & Delwart, E.L. (2015). An ensemble strategy that significantly improves de novo assembly of microbial genomes from metagenomic next-generation sequencing data. *Nucleic Acids Research*, 20, 43(7), 46. 10.1093/nar/gkv002.
- Delwart, E. L. (2007). Viral metagenomics. *Reviews in medical virology*, 17 (2), 115–131. <https://doi.org/10.1002/rmv.532>.
- Goff, S. P. (2013). Retroviridae. In *Fields Virology*. (pp1424-1473). Edited by D. M. Knipe & P. M. Howley: Lippincott, Williams & Wilkins.
- Hayward, J. A., Grabherr, M., & Jern, P. (2013). Broad-scale phylogenomics provides insights into retrovirus-host evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 10(50), 20146-51. 10.1073/pnas.1315419110.
- Hayward, J. A., Tachedjian, M., Cui, J., Field, H., Holmes, E.C., Wang, L.F. & Tachedjian, G. (2013). Identification of diverse full-length endogenous betaretroviruses in megabats and microbats. *Retrovirology*, 27, 10-35. 10.1186/1742-4690-10-35.
- Hayward, J. A., Tachedjian, M., Kohl, C., Johnson, A., Dearnley, M., Jesaveluk, B., & Nitsche, A. (2020). Infectious KoRV-related retroviruses circulating in Australian bats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 28 (17), 9529-9536. 10.1073/pnas.1915400117.
- Hayward, J. A., & Tachedjian, G. (2021). Retroviruses of Bats: a Threat Waiting in the Wings? *Sociedade Americana de Microbiologia mBio*, 26(5), 19-41. 10.1128/mBio.01941-21.
- Hayman, D. T. (2016). Bats as Viral Reservoirs. *Annual Review of Virology*, 29 (1), 77-99. 10.1146/annurev-virology-110615-042203.
- McGinnis, S., & Thomas, L. M. (2004). “BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools.” *Nucleic acids research*, 32, 20-25. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh435>
- McMichael, L., Smith, C., Gordon, A., Agnihotri, K., Meers, J., & Oakey, J. (2019). A novel Australian flying-fox retrovirus shares an evolutionary ancestor with Koala, Gibbon and Melomys gamma-retroviruses. *Virus Genes*, 55(3), 421-424. 10.1007/s11262-019-01653-3.
- Mollentze, N., & Streicker, D. G. (2020). Viral zoonotic risk is homogenous among taxonomic orders of mammalian and avian reservoir hosts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 28(17), 9423-9430. 10.1073/pnas.1919176117.
- Reis, J. K. P. (2012). Retrovírus Animais. *Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia*. 64, 65-76.
- Stoye, J. P. (2012). Studies of endogenous retroviruses reveal a continuing evolutionary saga. *Nature Reviews Microbiology*, 8(6), 395-406. 10.1038/nrmicro2783.
- Tachedjian, G., Hayward, J. A., & Cui, J. (2015). Bats and reverse transcribing RNA and DNA viruses (pp 177–201. In Wang L-F. *Cowled C (ed), Bats and viruses: a new frontier of emerging infectious diseases*. John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, NJ. 10.1002/9781118818824.ch7.
- Tarlinton, R. E., Meers, J., & Young, P. R. (2006). Retroviral invasion of the koala genome. *Nature*. 442, 79–81.