



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE
MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Ketrin Ribeiro Fávaro Binda

**INVESTIGAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
CORONAVÍRUS EM QUIRÓPTEROS DO ESTADO DE SÃO
PAULO, BRASIL.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título
de Mestre em Doenças Tropicais.

Orientador: Dr. Benedito Donizete Menozzi

Botucatu

2024

Ketrin Ribeiro Fávaro Binda

Investigação e caracterização molecular de coronavírus
em quirópteros do Estado de São de Paulo, Brasil.

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de Mestre
em Doenças Tropicais.

Orientador: Dr. Benedito Donizete Menozzi.

Botucatu
2024

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: MARIA CAROLINA A. CRUZ E SANTOS-CRB 8/10188

Binda, Ketrin Ribeiro Fávaro.

Investigação e caracterização molecular de Coronavirus em
quirópteros do Estado de São Paulo, Brasil / Ketrin Ribeiro
Fávaro Binda. - Botucatu, 2024

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Benedito Donizete Menozzi
Capes: 40101096

1. Biologia molecular. 2. Morcego. 3. Saúde Única.
4. Vírus.

Palavras-chave: Biologia molecular; Quirópteros; Saúde
única; Vírus.

Ketrin Ribeiro Fávaro Binda

**INVESTIGAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
CORONAVÍRUS EM QUIRÓPTEROS DO ESTADO DE SÃO
PAULO, BRASIL.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de mestre em Doenças Tropicais.

Orientador: Dr. Benedito Donizete Menozzi

Comissão examinadora

Prof. Dr. Helio Langoni

Profa. Dra. Aline Rafaela da Silva Rodrigues Machado

Botucatu, 29 de fevereiro de 2024

Dedicatória

Deus,

Pois, sem Ele não teria chegado até aqui. Por ter dado a graça e capacidade de conseguir finalizar meu mestrado.

Meu marido, Bruno,

Por sempre estar ao meu lado, apoiando e incentivando a alcançar os meus sonhos. Obrigada por ter acreditado e confiado em mim.

Meus pais, Antonio e Romilda,

Por sempre me apoiarem, aconselharem, me abençoarem e sempre serem presentes na minha vida. Vocês investiram nos meus estudos, e acreditaram no meu potencial.

Ao meu orientador, Dr. Benedito Donizete Menozzi,

Ao me aceitar como pós-graduanda, acreditou em mim, e mesmo mediante as dificuldades, me ajudou a chegar até aqui.

Ao professor, Dr. Paulo Brandão, da Universidade de São Paulo, que abriu as portas do seu laboratório para que a pesquisa fosse adiante, além disso, agradeço pela oportunidade de conhecimento e crescimento na área da pesquisa.

Agradecimento especial

Agradeço a **Deus**, por ter cuidado de mim e ter sonhado coisas incríveis para mim. Por ter me abençoado, e nunca ter me deixado, que independente do tamanho do problema, Ele sempre esteve comigo. Sem Deus nada eu seria nada. Obrigada meu Deus pelo dom da vida e todas as bênçãos que me concedeu em todos esses anos.

Ao meu marido, **Bruno Roberto Binda**, que sempre acreditou no meu potencial, e me incentivou todos os dias a alcançar todos os meus sonhos. Obrigada por estar comigo, sempre confiar e acreditar que eu sou capaz de conquistar o que eu quiser. Você foi a pessoa mais importante para mim nessa fase da minha vida, que nunca deixou eu desistir, mesmo com todos os desafios. Eu te amo demais!

Aos meus querido e amados pais, **Antonio e Romilda**, por sempre falarem que o estudo é a maior herança que poderiam me deixar. Obrigada pelo esforço de me ajudarem a conquistar um sonho tão grande para mim. Amo demais vocês, são muito importantes para mim. Nunca conseguirei pagar tudo que fizeram por mim.

Ao meu querido orientador **Dr. Benedito Donizete Menozzi**, por ter acreditado em mim, me aceitado como e confiado em mim como sua primeira orientada. Pelas conversas e conselhos que me trouxeram grande aprendizado. Pelas correções que geraram crescimento pessoal e profissional. Agradeço a Deus pela sua vida e peço as mais ricas bênçãos para sua vida.

As minhas amigas e amigos da vida que me ajudaram no projeto, por me ensinarem algo e pelos momentos felizes que passamos juntos. Em especial, agradeço a Nássarah, que sempre esteve ao meu lado e ajudando em passos novos que precisavam ser dados. Obrigada por todo nosso aprendizado juntos. Amo vocês.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES)**, pelo apoio e a bolsa de mestrado (código de financiamento: 88887.700661/2022-00).

RESUMO

Nos últimos 15 anos, tivemos o surgimento e ressurgimento de diversas infecções zoonóticas causadas por vírus, como os Hantavírus, vírus Influenza, Nipah vírus, Mpox (varíola dos macacos), vírus da Dengue, Ebola vírus, vírus da Raiva e os Coronavírus. Pertencentes à família *Coronaviridae*, os coronavírus (CoV) são vírus RNA, envelopados, capazes de atingir uma vasta gama de hospedeiros, incluindo o ser humano. Os CoV têm ganhado notoriedade nos últimos anos devido aos impactos causados pelas recentes emergências em saúde pública, a exemplo da MERS e da SARS. Desde março de 2020, o mundo começou a enfrentar uma nova pandemia causada por um coronavírus denominado (SARS-CoV-2). Muitas ações antrópicas têm causado graves efeitos ao meio ambiente, algumas delas claramente visíveis, como as mudanças climáticas. Essas alterações são responsáveis por uma redistribuição geográfica de muitas espécies de quirópteros, principalmente pela transição de habitat, uma vez que esses animais saem do seu habitat natural migrando para áreas periurbanas e urbanas. Toda nova adaptação, pode contribuir para a propagação de novos patógenos, ou o surgimento de estirpes adaptadas a novos hospedeiros, que aumenta o contato dos quirópteros com os humanos e animais domésticos, facilitando o surgimento de novas pandemias e epidemias. O presente estudo teve como objetivo identificar e caracterizar geneticamente os CoV circulantes nos morcegos encaminhados por vigilância passiva para diagnóstico de raiva, uma vez que as pesquisas visando esses patógenos ainda são escassas no Brasil. As 100 amostras de conteúdos intestinais investigadas, com extração de ácidos nucleicos, síntese de DNA complementar (cDNA), Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), semi-NESTED; e os produtos da semi-NESTED submetidos a eletroforese em gel de agarose, apresentaram resultados negativos. Outros trabalhos com objetivos similares, apresentaram amostras positivas, principalmente em conteúdos intestinais, com menor importância para outros órgãos como, fígado, pulmão e rins, porém, com uma baixa prevalência de coronavírus em quirópteros.

Palavras-chave: quirópteros, vírus, biologia molecular, saúde única.

ABSTRACT

In the last 15 years, we have had the emergence and resurgence of several zoonotic infections caused by viruses, such as hantaviruses, influenza viruses, Nipah viruses, Mpox (monkeypox), dengue viruses, Ebola viruses, rabies viruses and coronaviruses. Belonging to the Coronaviridae family, coronaviruses (CoV) are enveloped RNA viruses capable of reaching a wide range of hosts, including humans. CoVs have gained notoriety in recent years due to the impacts caused by recent public health emergencies, such as MERS and SARS. Since March 2020, the world began to face a new pandemic caused by a coronavirus called (SARS-CoV-2). Many human actions have caused serious effects on the environment, some of them clearly visible, such as changes climate. These changes are responsible for a geographic redistribution of many chiropteran species, mainly due to habitat transition, as these animals leave their natural habitat and migrate to peri-urban and urban areas. Every new adaptation can contribute to the spread of new pathogens, or the emergence of strains adapted to new pathogens, hosts, which increases the contact of chiropterans with humans and domestic animals, facilitating the emergence of new pandemics and epidemics. The present study aimed to identify and genetically characterize the CoV circulating in bats sent by passive surveillance for rabies diagnosis, since research targeting these pathogens is still scarce in Brazil. The 100 samples of intestinal contents investigated, with extraction of nucleic acids, synthesis of complementary DNA (cDNA), Polymerase Chain Reaction (PCR), semi-NESTED; and semi-NESTED products subjected to agarose gel electrophoresis showed negative results. Other studies with similar objectives presented positive samples, mainly in intestinal contents, with lower importance for other organs such as the liver, lungs and kidneys, however, with a low prevalence of coronavirus in chiropterans.

Keywords: chiropterans, viruses, molecular biology, one health.

Lista de Figuras

Figura 1: Mapa do Brasil mostrando a localização de coleta dos morcegos.....**21**

Figura 2: Eletroforese em gel de agarose da PCR para a detecção de coronavírus nas amostras de morcegos. C+: Controle positivo (600 pb), C-: controle negativo, L: Ladder 100pb..... **25**

Figura 3: Eletroforese em gel de agarose da PCR para a detecção de coronavírus nas amostras de morcegos. C+: Controle positivo (600 pb), C-: controle negativo, L: Ladder 100pb..... **25**

Figura 4: Eletroforese em gel de agarose da PCR para a detecção de coronavírus nas amostras de morcegos. C+: Controle positivo (600 pb), C-: controle negativo, L: Ladder 100pb..... **26**

Figura 5: Eletroforese em gel de agarose da PCR para a detecção de coronavírus nas amostras de morcegos. C+: Controle positivo (600 pb), C-: controle negativo, L: Ladder 100pb..... **26**

Lista de Tabelas

Tabela 1: Planilha de dados dos quirópteros coletados.....	21
---	-----------

Lista de Quadros

Quadro 1: *Primers* utilizados no estudo.....23

Quadro 2: Protocolo de ciclagem utilizados na reação da PCR para o gene RdRp.....23

Quadro 3: Protocolo de ciclagem utilizados na reação da SEMI-NESTED para o gene RdRp.....24

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. OBJETIVO GERAL.....	20
3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
4.1. Declaração de ética.....	20
4.2. Amostras.....	20
4.3. Controle Positivo.....	22
4.4. Extração de Ácidos Nucleicos	22
4.5. Síntese de DNA complementar (cDNA)	22
4.6. Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)	23
5. RESULTADOS.....	24
6. DISCUSSÃO	27
7. CONCLUSÃO	30
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31

1. INTRODUÇÃO

As doenças infecciosas emergentes e reemergentes são uma grande ameaça ao bem-estar humano e animal, sendo a maioria dessas doenças infecciosas emergentes e, também, reemergentes zoonoses derivadas da vida selvagem (WYNNE & WANG *et al.*, 2013).

As doenças zoonóticas, comuns entre animais e humanos, são tópicos de extremo interesse devido ao alto risco à saúde pública e por sua capacidade de causar epidemias e até pandemias em seres humanos (OLIVAL *et al.*, 2017).

A origem da maioria das doenças infecciosas emergentes é de animais, principalmente de vida selvagem, e o seu surgimento em humanos acontece por interações dinâmicas entre populações de vida selvagem, gado, animais domésticos e pessoas (ALLEN *et al.*, 2017).

Segundo Zanella (2016), o aumento da dependência do ser humano aos animais, seja para alimentação, transporte, trabalho ou companhia, colabora para o desencadeamento de diversas doenças infecciosas. Além disso, a expansão da população humana, a globalização com o aumento no comércio e viagens e, também as mudanças climáticas, contribuem tanto na disseminação de doenças conhecidas, quanto no surgimento de novas enfermidades (PANDA *et al.*, 2008; MANZINI *et al.*, 2021).

As mudanças ambientais, como desmatamento, fragmentação de habitat ou mudanças climáticas, cooperam na adaptação de novos patógenos que anteriormente circulavam apenas na vida selvagem ou em reservatórios ambientais (SOKOLOW *et al.*, 2019).

Estima-se que pelo menos 75% das doenças infecciosas em humanos são classificadas como zoonoses, tendo como agentes causadores protozoários, bactérias, fungos, helmintos e, principalmente os vírus (United States Agency for International Development, 2009; ZANELLA, 2016).

Os vírus, especialmente os de RNA, possuem grande capacidade de adaptação rápida às mudanças nas condições ambientais, portanto, fatores como, mudanças ambientais e ecológicas colaboram para o surgimento e ressurgimento de doenças transmitidas por patógenos virais, aumentando o risco para a população humana (NOKER & LUDWING, 2003).

De acordo com Carlson *et al.* (2019), das 40.000 espécies de vírus existentes em mamíferos, 10.000 são de potencial zoonótico. Nos últimos 15 anos, houve o surgimento e ressurgimento de diversas infecções zoonóticas causadas por vírus, como os Hantavírus, vírus Influenza, Nipah vírus, Mpox (varíola dos macacos), vírus da Dengue, Ebola vírus, vírus da

Raiva e os Coronavírus (KALLIO-KOKKO *et al.*, 2005).

Os CoV são vírus envelopados, de cadeia simples, que possuem o genoma em uma fita de RNA de polaridade positiva não fragmentada, sendo o maior genoma (26 a 32 kb) descrito entre os RNA vírus\ (WOO *et al.*, 2012; SU *et al.*, 2016; BONFIM *et al.*, 2021). Esse grupo pertence a ordem *Nidovirales*, família *Coronaviridae*; e são classificados em quatro gêneros, *Alphacoronavirus* (α -CoV), *Betacoronavirus* (β -CoV) – podem ser agrupados nos clados 2a, 2b, 2c e 2d, *Deltacoronavirus* (δ -CoV) e *Gammacoronavirus* (γ -CoV), todos da sub-família *Orthocoronavirinae* (GOÉS *et al.*, 2016; ICTV, 2019).

Os *Alphacoronavirus* (α -CoV) e *Betacoronavirus* (β -CoV), infectam principalmente mamíferos, incluindo humanos, podendo ter como origem os morcegos; enquanto os *Deltacoronavirus* (δ -CoV) e *Gammacoronavirus* (γ -CoV) são detectados, principalmente, em espécies aviárias, peixes e também, mamíferos, sendo de possível origem suína; embora os *Gammacoronavirus* (γ -CoV) também infectem alguns cetáceos, incluindo baleias beluga e golfinhos-nariz-de-garrafa (LELLI *et al.*, 2013; MANZINI *et al.*, 2021; SINGH & YI *et al.*, 2021).

Relatos científicos reconhecem sete espécies de Coronavírus que podem infectar humanos (Human CoV): os alpha Coronavirus HCoV-NL63 e 229E e os beta Coronavírus HCoV-HKU1 e OC43, além dos causadores de síndromes respiratórias SARS-CoV, agente causador dos surtos em 2002 e 2003 na Província de Guangdong, na China, MERS-CoV responsável pelo surto em 2012 no Oriente Médio (PIMENTEM *et al.*, 2020), e o mais recente e de maior impacto mundial SARS-CoV2 (WHO, 2023).

A nomenclatura atribuída a família *Coronaviridae* se dá pela estrutura do vírion, uma vez que as proteínas de superfície (S), em forma de espícula, parecem uma coroa (BRITO *et al.*, 2020; BONFIM *et al.*, 2021). Além da proteína de superfície (S), outras proteínas importantes dos coronavírus são a do nucleocapsídeo (N), membrana (M) e envelope (E), formando a bicamada lipídica (SATIJA & LAL, 2007; BARBOSA, 2015; HAAKE *et al.* 2020).

A glicoproteína S é responsável pela ligação dos vírions aos receptores celulares, realizando a fusão do envelope com a célula do hospedeiro. A proteína M incorpora partes virais essenciais aos novos vírions, sendo muito importante na morfogênese, interagindo também com a proteína N, formando o revestimento do núcleo. Apesar da proteína E não ser a mais abundante no envelope dos coronavírus, ela é essencial para a maturação do envelope no momento da replicação; além de induzir a apoptose em células infectadas com vírus da hepatite murina (MHV) [(FLORES, 2007; WU *et al.*, 2012; BARBOSA, 2015;

HARTENIAN *et al.*, 2020)].

No geral, os coronavírus (CoV) são causadores de várias doenças, envolvendo os sistemas respiratório, entérico, hepático e neurológico, tanto em animais quanto em humanos. Além disso, eles apresentam uma grande capacidade de mutações e eventos de recombinação devido ao seu grande genoma (WOO *et al.*, 2012; LELLI *et al.*, 2013; LAU *et al.*, 2014; PENGO, 2016;).

Segundo Singh & Yi (2021), a recombinação do CoV se dá por animais portadores de diferentes coronavírus que entram em contato próximo e trocam esse vírus, resultando na recombinação entre as diferentes estirpes, levando à diversificação.

Em 1931, Schalk *et al.* identificaram uma doença respiratória aguda e fatal em galinhas jovens, que após vários diagnósticos como: pulorose, laringotraqueite ou intoxicação por gases, denominaram como bronquite infecciosa das galinhas, causada pelo vírus da Bronquite Infecciosa Aviária (IBV), sendo descrita como a primeira doença ligada a um coronavírus (MCINTOSH *et al.*, 1974; BRANDÃO, 2004).

Os CoV são responsáveis por doenças em outros animais de produção, como a Diarreia Epidêmica Suína (PED), Gastroenterite Transmissível Suína (TGE) e a Síndrome da Diarreia Aguda Suína (SADS), que acarretam grandes perdas econômicas (FEHR; PERLMAN, 2015). Além disso, afetam animais de companhia, como por exemplo, o Coronavírus Felino (FCov), dividido em dois patótipos, sendo o da Peritonite Infecciosa Felina (PIF) altamente letal (BRANDÃO, 2004; PEDERSEN, 2008; CUI; LI; SHI, 2019).

Outros animais se tornaram alvos desse vírus, por exemplo, o Coronavírus Bovino (B-CoV) que causa gastroenterites em bezerros e disenteria de inverno em bovinos adultos, detectado já em todos os continentes (CHO *et al.*, 2000; BRANDÃO, 2002; BRANDÃO, 2004; BARROS, 2010). Enquanto nos equinos, os coronavírus (E-CoV) causam enterocolite neonatal em potros, já detectado no Brasil, no estado de São Paulo e Rio Grande do Sul (DAVIS *et al.*, 2000; BRANDÃO *et al.*, 2006; MEIRELES *et al.*, 2008).

Apesar de ter sido descrito somente em 1965, os primeiros coronavírus humanos (H-CoV) foram isolados já em 1937 a partir de uma análise de secreções nasais de pacientes com resfriado. A partir disso, foi identificado que sete coronavírus infectam o ser humano provocando sintomas: HCoVNL63, HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-HKU1, SARS-CoV, MERS-CoV e mais recentemente o SARS-CoV-2 (CORMAN *et al.* 2018; ESTEVES, 2020; BONFIM *et al.*, 2021; GRENDENE *et al.*, 2021).

Os CoV afetando humanos, ganhou grande notoriedade desde a emergência da Síndrome Aguda Respiratória (SARS), causada pelo SARS-CoV, na China. No período entre

novembro de 2002 a julho de 2003, foram confirmados 8096 casos com 774 mortes em 27 países (ZHOU *et al.*, 2021). Aproximadamente 10 anos depois, em 2012, emergiu-se a Síndrome Respiratória do Oriente Médio (MERS) na Arábia Saudita, que apesar de se apresentar na forma de uma gripe comum em dromedários (*Camelus dromedarius*), nos humanos, o MERS-CoV é um agente oportunista, com uma taxa de mortalidade próxima a 40% (afetou 2519 pessoas, levando 866 a óbito) (MACKAY; ARDEN, 2015; RABAAN *et al.*, 2020; WHO, 2020).

Em dezembro de 2019, um novo coronavírus (CoV) começou a circular entre humanos em Wuhan, China. Desde então, este vírus, denominado “Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave 2” (SARS-CoV-2), classificado como um *Betacoronavírus* (β -CoV), devido ao seu sequenciamento completo do genoma (MAHDY, YOUNIS & EDWAIDA *et al.*, 2020; SINGH & YI *et al.*, 2021).

Assim, por causa da rápida propagação do CoV, em 11 de março de 2020, a Organização Mundial da Saúde (OMS) anunciou como uma pandemia global, a COVID-19, que notificou milhares de casos confirmados (SINGH & YI *et al.*, 2021).

De acordo com Mahdy, Younis & Ewaida (2020), no início da descoberta do SARS-CoV-2, uma possível infecção zoonótica foi associada ao comércio de animais vivos, como aves, morcegos, cobras, sapos, coelhos, marmotas e ouriços, isso devido aos pacientes hospitalizados em Wuhan apresentarem uma ligação com o mercado atacadista de frutos do mar de Huanan.

A COVID-19, que até 22 de outubro de 2023, notificou oficialmente mais de 771 milhões de casos confirmados e mais de seis milhões de mortes em todo o mundo (WHO, 2023). A Organização Mundial de Saúde nomeou a doença como COVID-19 (Coronavírus Disease -2019) e o vírus identificado, previamente chamado de 19-nCoV, foi intitulado SARS-CoV-2 por membros do Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) (HASÖKSÜZ; KILIÇ; SARAÇ, 2020; TIWARI *et al.*, 2020).

O início desta recente emergência em saúde pública se deu em dezembro de 2019, onde no período entre 31 de dezembro de 2019 a 3 de janeiro de 2020, foram reportados pela Organização Mundial da Saúde 44 pacientes com pneumonia de etiologia desconhecida na China (LIMA *et al.*, 2020).

Segundo Biancolella *et al.* (2022), a COVID-19 é uma doença que envolve o sistema respiratório, que pode provocar em casos mais graves pneumonia intersticial, insuficiência respiratória grave, resposta inflamatória sistêmica, entre outros. Os sintomas clássicos são semelhantes ao de resfriado comum: febre, tosse seca, congestão nasal, dificuldade

respiratória, entretanto, pode afetar outros órgãos ocasionando perda de paladar, insuficiência cardíaca, mialgia, dor abdominal, etc. (KUMAR *et al.*, 2021).

A origem do SARS-CoV- foi primeiramente associada ao comércio de civetas (*Paguma larvata*) vivas, destinados a alimentação humana, além de utilizar as fezes desses animais para a produção de café gourmet em vários países asiáticos (ESTEVES, 2020). Porém, após o aparecimento de outras zoonoses sabidamente originárias de morcegos como Nipah e Hendra, considerou-se a possibilidade do envolvimento dos quirópteros na origem do SARS-CoV, sendo eles o principal transmissor para as civetas (HU *et al.*, 2015).

Acredita-se que os CoV (*Alphacoronavirus* e *Betacoronavirus*) sejam transmitidos para os seres humanos por meio dos morcegos, isso porque todos os CoV capazes de infectar seres humanos foram originados a partir de reservatórios de animais, principalmente os morcegos que tem grande contato com populações humanas (BOLLES *et al.*, 2011; HUYNH *et al.*, 2012; CORMAN *et al.*, 2013; CHAN *et al.*, 2015).

O surgimento de doenças virais zoonóticas em humanos geralmente reflete a exposição a mamíferos selvagens. Os morcegos (ordem Chiroptera) são indiscutivelmente o reservatório mamífero mais importante para vírus zoonóticos, incluindo os coronavírus (BRUSSEL & HOLMES, 2022).

Evidências mostram que os morcegos foram os reservatórios originários do SARS-CoV e do MERS-CoV e ambos tiveram outro animal como hospedeiro intermediário para a infecção em humanos, neste caso, as civetas e os dromedários, respectivamente (HU *et al.*, 2015; HU *et al.*, 2017). No caso do SARS-CoV-2, estudos identificaram coronavírus com uma alta similaridade genética (até 92.4%) com pangolins (*Manis javanica*), o que sugere que estes animais podem ter desenvolvido um papel importante na emergência da COVID19, sendo os possíveis hospedeiros intermediários do SARS- CoV-2 (LAM *et al.*, 2020).

Além disso, outros estudos, realizaram uma análise do mecanismo de ligação estrutural dos receptores do SARS-CoV-2, resultando que as tartarugas (*Chrysemys picta bellii*, *Pelodiscus sinensis* e *Chelonia mydas*) e as cobras podem atuar como um dos potenciais hospedeiros intermediários que transmitem o SARS-CoV-2 para humanos. No entanto, os receptores da tartaruga e da cobra perderam a capacidade de se ligar à proteína do SARS-CoV-2, concluindo então, que estes répteis não devem ser considerados como potenciais hospedeiros do SARS-CoV-2 (LIU *et al.*, 2020).

Apesar do fator cultural de alguns países, houve grandes questionamentos quanto a transmissão de coronavírus para humanos devido ao consumo de carnes de animais selvagens, incluindo morcegos, entretanto, não se conseguiu elucidar essa hipótese

(GALHANO *et al.*, 2021; MAXMEN, 2021).

Estudos já comprovam que existe uma proximidade genética entre os coronavírus isolados de morcegos com o do ser humano, confirmando sua origem zoonótica. Segundo Duarte (2020), os bat-SLCoVZC45 e bat-SLCoVZXC21 apresentam 88% de semelhança genética com o SARS-CoV-2, enquanto Guo *et al.* (2020) afirmam que SARS-CoV-2 possui uma semelhança de 96,2% da sequência do genoma viral ao vírus de morcego (CoV RaTG13) [(GUO *et al.*, 2020; HELMY *et al.*, 2020; SHI *et al.*, 2020)].

A identificação de CoV em morcegos já foram relatados em vários continentes, como Ásia, África e Europa (TANG *et al.*, 2006; GLOZA-RAUSCH *et al.*, 2008; QUAN *et al.*, 2010), além de países da América do Sul, incluindo Brasil e México (GOÉS *et al.*, 2013, 2016).

Poon *et al.* (2005) relataram o primeiro coronavírus identificado em morcegos (Bat-CoV), da espécie *Miniopterus pusillus*; mas, atualmente várias regiões do mundo já identificaram a presença de coronavírus em morcegos, tanto *Alphacoronavirus* quanto *Betacoronavirus* (ASANO *et al.*, 2016).

O primeiro relato de CoV em morcegos, no Brasil, foi de um *Betacoronavirus* em um morcego hematófago (*Desmodus rotundus*) em 2008 (ASANO *et al.*, 2016). Já os *Alphacoronavirus* foram detectados nas espécies de morcegos *Molossus rufus*, *Molossus currentium*, *Molossus molossus*, *Carollia perspicillata*, *Carollia brevicauda*, *Tadarida brasiliensis*, e também em *Desmodus rotundus*, mostrando que os morcegos hematófagos podem albergar CoV pertencentes aos dois gêneros (CHU *et al.*, 2011; GOÉS *et al.*, 2013; LIMA *et al.*, 2013; ASANO *et al.*, 2016).

No ano de 2013, Goés e col., relataram na região Sul do Brasil, um possível novo *Alphacoronavirus* em um abrigo urbano de morcegos, com um agravante, eles apresentavam relato de contato conhecido e recorrente com humanos. No sul do México, oito novos *Alphacoronavirus* e quatro novos *Betacoronavirus*, foram relatados, onde um deles apresentou semelhança genética de 96% com o MERS-CoV.

No Brasil são encontradas cerca de 181 espécies de quirópteros, divididos em 68 gêneros e 9 famílias (GARBINO *et al.*, 2020). Porém, apesar da grande diversidade, existem poucos estudos relatando a ocorrência de CoV em morcegos no país, sendo majoritariamente visadas as pesquisas sobre o vírus rábico (SODRÉ *et al.*, 2010; ASANO *et al.*, 2016; MENOZZI *et al.*, 2019).

Os morcegos são conhecidos como grandes reservatórios naturais, principalmente, dos vírus, sendo capazes de causar doenças emergentes, tanto em humanos quanto em outros

animais (GOÉS *et al.*, 2013). Além disso, estudos relataram que os morcegos abrigam mais vírus zoonóticos, por espécie, do que os roedores, e são reconhecidos como uma fonte significativa de agentes zoonóticos (LUIS *et al.*, 2013).

A associação dos morcegos com as doenças emergentes e re-emergentes não é nova. Os quirópteros possuem um papel importante na transmissão do vírus da raiva, por exemplo. Além disso, são hospedeiros de diversos vírus encontrados em outros animais e em humanos, como o vírus da Caxumba, Sarampo, Hepatite C (HAN *et al.*, 2015). Alguns dos vírus encontrados são extremamente importantes para a saúde pública, a exemplo do MERS-CoV, SARS-CoV, também o Ebola vírus, Hendra vírus, Nipah vírus e o Marburg vírus (SCHOUNTZ, 2014).

Dentre as características que fazem dos membros da Ordem *Chiroptera* excelentes reservatórios de doenças infecciosas, muitas delas com potencial zoonótico, está a abundância de espécies de morcegos existentes e o fato de serem espécies muito antigas, datando de até 52,5 milhões de anos atrás e que, por consequência, são espécies que evoluíram junto aos patógenos, levando a uma mútua adaptabilidade (SIMMONS *et al.*, 2008; HAN *et al.*, 2015).

Os quirópteros desenvolveram uma série de adaptações, incluindo ecolocalização, hibernação e o voo, que permitiram que essa espécie ocupasse nichos ecológicos distintos, dando a eles, uma grande adaptação de habitat (WYNNE & WANG, 2013).

A evolução das características físicas, fisiológicas e comportamentais dos morcegos, como o fato de serem os únicos mamíferos capazes de voar verdadeiramente, fez com que esses animais se expandissem quase por todos os ecossistemas no planeta, exceto na Antártica. Ademais, essas mudanças evolutivas fizeram com que os morcegos expandissem seus nichos ecológicos para áreas periurbanas e urbanas, rurais, cavernas, minas e alguns tipos de vegetação (CASCIO *et al.*, 2011), além de também modificarem seus hábitos alimentares e seu papel no ecossistema (ZUBAID, 2005).

Outra característica dos morcegos, que permite que esses animais sejam considerados reservatórios persistentes de patógenos, é o fato de algumas espécies serem heterotérmicos facultativos, o que permite aos morcegos baixar sua temperatura corporal até adentrarem em um estado de letargia profunda durante períodos de estresse fisiológico, a fim de compensar seus déficits energéticos e de água, favorecendo a persistência de vírus no organismo dos morcegos, já que a diminuição das taxas metabólicas pode suprimir a resposta imune e atrasar a depuração viral (HAYMAN *et al.*, 2013).

A fim de reduzir sua massa corporal, os quirópteros evoluíram para desenvolver ossos

ocos, facilitando a aerodinâmica de voo, porém, impedindo a produção de linfócitos B, produzidos pela medula óssea nos demais mamíferos, e ausente nos morcegos. Essa ausência de linfócitos B, não permite aos morcegos uma resposta imune eficiente, tornando-os reservatórios assintomáticos de inúmeros vírus (HAN *et al.*, 2015).

Algumas características dos quirópteros podem garantir a manutenção da circulação viral entre as populações. Morcegos são animais sociais e muitos indivíduos podem ser encontrados em um único abrigo ou caverna. Alguns dos mecanismos propostos para essa transmissão entre colônias são por meio de aerossóis, pois as vibrações da laringe que ocorrem durante a ecolocalização, além de ondas ultrassônicas, ocasionam a liberação de aerossóis e, estes animais vivendo em contato tão próximo, pode ser uma grande fonte de disseminação, além do contato com demais secreções como matéria fecal e urina (CALISHER *et al.*, 2006). Segundo Canuti *et al.* (2011), inúmeros vírus emergentes podem ser amplificados em uma colônia de morcegos, durante o período reprodutivo. Além disso, apesar de seu tamanho reduzido, morcegos são animais relativamente longevos, vivendo entre 10 a 30 anos (BRUNET-ROSSINNI; AUSTAD, 2004), e essa longevidade também aumenta as possibilidades de dispersão viral.

Vários fatores ambientais por ações antrópicas, como as mudanças climáticas, são responsáveis pela distribuição geográfica de várias espécies, contribuindo para a propagação de patógenos, podendo ser o motivo principal para o surgimento de novas pandemias e epidemias, facilitando um fenômeno conhecido como transbordamento (*spillover*) que é a adaptação ou migração, pontual ou permanente, de um patógeno de uma espécie de hospedeiro para outra (BURROWS *et al.*, 2014; PLOWRIGHT, *et al.*, 2017; ACOSTA *et al.*, 2020; CARLSON *et al.*, 2022; MANTOVAN, *et al.*, 2023).

O *spillover* acontece por sua capacidade de saltar entre diferentes espécies, incluindo a habilidade de infectar humanos; afirmando que quanto maior a proximidade humana com os animais, maior será a exposição aos agentes infecciosos, aumentando o risco de *spillover* (PLOWRIGHT *et al.*, 2017; ACOSTA *et al.*, 2020).

Devido as alterações ambientais causadas pelo ser humano, diversas espécies de animais silvestres têm sido afetadas, por causa de uma transição de habitat, ou seja, esses animais estão saindo do seu habitat natural para áreas urbanas ou rurais, aumentando o contato com os seres humanos e animais domésticos (MAGLE *et al.*, 2012, ASANO *et al.*, 2016).

Além disso, a capacidade de alta frequência de recombinações dos coronavírus, e das recentes emergências em saúde, a pesquisa de CoV em quirópteros é uma estratégia

importante para predição de novas doenças que venham infectar humanos, auxiliando ainda a elucidar as interações entre morcegos e os CoV albergados por eles (GOÉS *et al.*, 2013).

A pesquisa de patógenos circulantes em quirópteros aliada a vigilância da raiva, alimentando uma base de dados confiável, é uma possibilidade importante para que possamos cada vez mais compreender a ecologia de diversas doenças infecciosas, prevenindo possíveis surtos e enfrentando de forma cada vez mais eficiente as futuras doenças que venham a emergir (PAZ *et al.*, 2018; MENOZZI *et al.*, 2019).

2. OBJETIVO GERAL

Nosso objetivo foi pesquisar a ocorrência de coronavírus em morcegos encaminhados pela Vigilância Ambiental em Saúde do município de Botucatu-SP, para diagnóstico de raiva ao Serviço de Diagnóstico de Zoonoses da FMVZ – UNESP – Botucatu/SP bem como executar o sequenciamento genético do material genético das amostras positivas.

3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Verificar a presença de CoV em diferentes órgãos;
- II. Realizar a caracterização molecular dos coronavírus encontrados;
- III. Padronizar/protocolar a técnica de PCR para coronavírus no LDZ-UNESP-Botucatu-SP.
- IV. Comparar as sequências obtidas com as disponíveis no GenBank;
- V. Elaboração da árvore filogenética;
- VI. Georreferenciamento dos locais de recolhimento dos animais.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Declaração de ética

O estudo foi aprovado pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) - 85973-1, e pela Comissão de Ética no Uso de Animais, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Botucatu, com protocolo 0259/2022 em anexo.

4.2. Amostras

Foram utilizados 100 espécimes de quirópteros não-hematófagos de 18 espécies distintas (Tabela 1) no período de janeiro a julho de 2023, encaminhados para diagnóstico de raiva ao Serviço de Diagnóstico de Zoonoses da FMVZ – UNESP – Botucatu/SP. Após a

eutanásia, realizada por anestesia subcutânea com cetamina 80mg/kg e xilazina 20mg/kg, foram coletadas, de maneira asséptica, utilizando tesouras e pinças estéreis, um total de 200 amostras dos órgãos: intestinos e pulmões, considerados órgãos de eleição para detecção de coronavírus em morcegos, entretanto, como método de triagem foram utilizados apenas os intestinos (BITTAR, *et al.*, 2019).



Figura 1. Mapa do Brasil mostrando a localização de coleta dos morcegos.

Todas as amostras foram acondicionadas a -80°C em microtubos livres de RNase/DNase até o momento da extração. As identificações das espécies foram realizadas utilizando as chaves para determinação de quirópteros brasileiros (VIZOTTO & TADDEI, 1973; REIS *et al.*, 2007). Além das espécies, foram obtidos dados sobre a data de entrada no laboratório e município responsável pelo recolhimento e envio, que se encontram sumarizados em anexo.

Espécies	Quantidade de amostras
<i>Anoura geoffroyi</i>	1
* <i>Anoura sp.</i>	1
<i>Artibeus lituratus</i>	2
<i>Eptesicus brasiliensis</i>	2
<i>Eumops auripendulus</i>	2
<i>Eumops glaucinus</i>	8
<i>Eumops perotis</i>	5
* <i>Eumops sp.</i>	2
<i>Glossophaga soricina</i>	4
<i>Histiotus nigricans</i>	1
<i>Lasiurus blossevillii</i>	3
<i>Molossus molossus</i>	52
<i>Molossus rufus</i>	10
* <i>Molossus sp.</i>	1

<i>Myotis nigricans</i>	3
<i>Platyrrhinus lineatus</i>	1
<i>Sturnira lilium</i>	1
<i>Tarida brasiliensis</i>	1

Tabela 1. Planilha de espécies de quirópteros coletados.

*A identificação da espécie depende do estado de conservação do espécime encaminhado ao laboratório.

4.3. Controle Positivo

Como amostra de controle positivo, foi utilizada uma vacina com vírus atenuado de coronavírus aviário - Bronquite infecciosa, que foi concedida pelo LABMAS – Laboratório de Biologia Molecular Aplicada e Sorologia, da Universidade de São Paulo (USP) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal.

4.4.Extração de Ácidos Nucléicos

Antes da extração dos ácidos nucleicos, as amostras foram submetidas a um preparo de suspensão. Todas as amostras de intestino e pulmão coletadas foram individualmente maceradas, com o auxílio de bisturi nº15, e depositadas em tubos tipo Eppendorf de 1 ml. Em cada tubo, foi adicionado 500µl de água DEPC (Água tratada com Dietil Pirocarbonato), e levado ao freezer -80°C por 10 minutos para o congelamento, e depois ao Banho Seco (Termobloco), a 56°C, até a amostra descongelar. Este processo foi repetido 3x para a liberação das células. Por fim, a solução foi centrifugada a 5000 x g por 5 minutos a 4°C. Após o preparo, as amostras foram submetidas à extração de RNA total usando o *Kit de RNA Invitrogen™ PureLink™* seguindo as instruções do fabricante; e armazenadas a -80°C.

A quantificação das amostras foi realizada pelo espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA).

4.5.Síntese de DNA Complementar (cDNA)

Os ácidos nucleicos extraídos dos intestinos coletados dos morcegos foram submetidos à síntese de cDNA usando o High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), de acordo com Goés *et al.* (2016).

Para a obtenção do cDNA, foi adicionado 3,5µl do RNA extraído de cada amostra em tubos tipo Eppendorf de 200µl e levado ao termociclador a 95°C por 5 minutos para a desnaturação da fita. Finalizado, as amostras foram colocadas no gelo por 5 minutos. Após,

foi adicionado ao RNA o mix para a transcrição reversa contendo 2,5µl 5x First Strand Buffer, 0,5µl de Reverse Transcriptase MMLV (200U/µl), 1µl de dNTPs 1mM, 1µl de DTT (100mM), 0,5µl de cada *primer* (senso pan-CoV_outF e anti-senso pan-CoV_R) e 0,5µl de água DEPC com um volume final de 6,5µl de mix, e levado ao termociclador a 42°C por 60 minutos e mais 15 minutos a 70°C.

Após a síntese de cDNA, foi realizada PCR para o controle endógeno, para verificar a qualidade do RNA, utilizando os *primers* do gene GAPDH.

4.6. Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

A presença de CoV nos órgãos foi testada por um pan-Coronavírus Semi NESTED-PCR conforme descrito por Xiu *et al.* (2020) visando a RNA polimerase dependente de RNA (RdRp), região nsP12, visto que são regiões extremamente conservadas e capazes de detectar todos os gêneros de coronavírus.

Os *primers* utilizados foram os pan-coronavírus, capazes de identificar a proteína RNA-dependente RNA polimerase [RdRp]. Os *primers* pan-CoV_outF, pan-CoV_R, pan-CoV_inF amplificam cerca de 599-603pb (Quadro 1) (XIU *et al.*, 2020)

Etapa	Primer	Sequência	Comprimento
RT-PCR	pan-CoV_outF pan-CoV_R	5' - CCAARTTYTAYGGHGGITGG - 3' 5' - TGTTGIGARCARAAAYTCATGIGG - 3'	670-673bp
SEMI-NESTED	pan-CoV_inF	5' - GGTTGGGAYTAYCCHAARTGTGA - 3'	599-602bp

Quadro 1. *Primers* utilizados no estudo.

Em microtubos foram adicionados 2,5µl do cDNA e 22,5µl do mix – 12,5µl do reagente Green Master Mix, 8µl de água ultrapura e 1µl de cada *primer* (senso pan-CoV_outF e anti-senso pan-CoV_R), totalizando um volume de 25µl, conforme as recomendações do fabricante. Após, os tubos foram colocados no termociclador no ciclo apresentado na Quadro 2.

Temperatura	Tempo	Ciclos
94°C	3 min	1x
94°C 53,4°C 72°C	30s 30s 45s	35x
72°C	10min	1x

Quadro 2. Protocolo de ciclagem utilizados na reação da PCR para o gene RdRp.

Após a PCR, foi realizada uma semi-nested, depositando em novos microtubos 1µl do produto da PCR e 24µl do mix - 12,5µl do reagente Green Master Mix, 9,5µl de água ultrapura e 1µl de cada *primer* (senso pan-CoV_inF e anti-senso pan-CoV_R), totalizando um volume de 25µl; e assim levados, novamente, ao termociclador com alteração na temperatura na fase de anelamento (Quadro 3).

Temperatura	Tempo	Ciclos
94°C	3 min	1x
94°C 54,5°C 72°C	30s 30s 45s	35x
72°C	10min	1x

Quadro 3. Protocolo de ciclagem utilizados na reação da SEMI-NESTED para o gene RdRp.

Os produtos da semi-nested foram submetidos à eletroforese em gel de agarose e 1% em tampão TBE 1X (0,1 M de Tris, 0,09 M de ácido bórico e 0,001 M de EDTA), adicionado de Nancy-520 e visualizados em um transiluminador UV (UVP®).

5. RESULTADOS

Um total de 100 morcegos foram coletados no município de Botucatu, SP, de 18 espécies diferentes. De 200 amostras coletadas (intestinos e pulmões), foram processadas 100 amostras de conteúdo intestinal.

As amostras entéricas foram testadas pelo do método de PCR, resultando em todas negativas conforme é observado nas figuras a seguir.

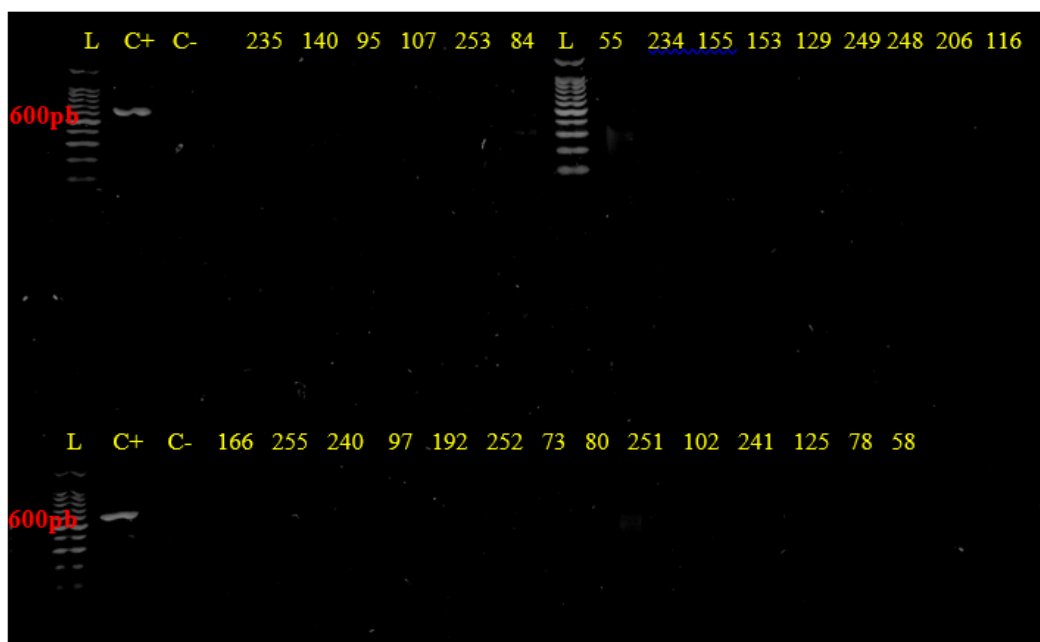


Figura 2. Eletroforese em gel de agarose da PCR para a detecção de coronavírus nas amostras de morcegos. C+: Controle positivo (600 pb), C-: controle negativo, L: Ladder 100pb.

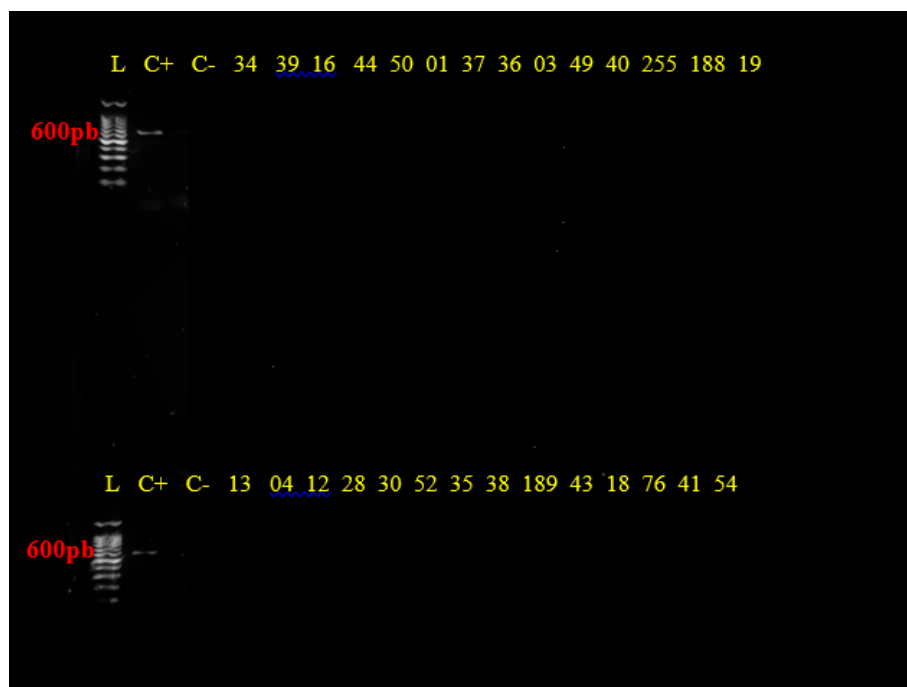


Figura 3. Eletroforese em gel de agarose da PCR para a detecção de coronavírus nas amostras de morcegos. C+: Controle positivo (600 pb), C-: controle negativo, L: Ladder 100pb.



Figura 4. Eletroforese em gel de agarose da PCR para a detecção de coronavírus nas amostras de morcegos. C+: Controle positivo (600 pb), C-: controle negativo, L: Ladder 100pb.

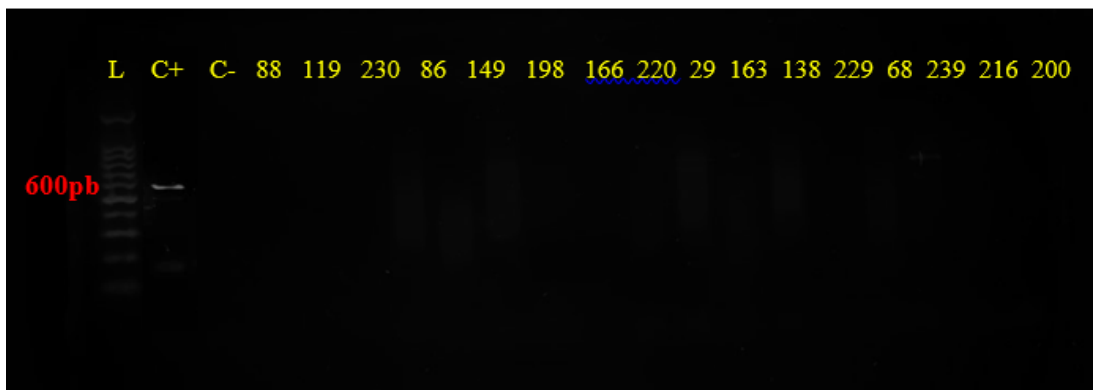


Figura 5. Eletroforese em gel de agarose da PCR para a detecção de coronavírus nas amostras de morcegos. C+: Controle positivo (600 pb), C-: controle negativo, L: Ladder 100pb.

6. DISCUSSÃO

Embora haja uma grande diversidade de espécies de morcegos no Brasil, não havia muitos de relatos sobre coronavírus em morcegos brasileiros. Um dos fatores seria o pouco interesse científico pontualmente localizado para os coronavírus nesses animais, e que sofreu uma mudança do direcionamento dos investimentos nas pesquisas, principalmente desde o anúncio da OMS de uma nova pandemia mundial, causada pelo SARS-CoV-2, e desde então, há uma boa variedade destas pesquisas em morcegos (BRANDÃO *et al.*, 2008; ASANO *et al.*, 2016; GOÉS *et al.*, 2016; PENGO *et al.*, 2016; BITTAR *et al.*, 2020; LOZANO *et al.*, 2021; BUENO *et al.*, 2022).

Nas últimas três décadas os quirópteros passaram a ser reconhecidos como protagonistas de extrema importância para a saúde pública mundial, uma vez que são reconhecidos como reservatórios naturais de diversos patógenos virais de potencial zoonótico (OLIVAL *et al.*, 2017). Fatores como sua ampla diversidade de espécies; extensa distribuição geográfica; longevidade; capacidade de adaptação a ecossistemas alterados; diversidade trófica; múltiplos habitats; habilidade de voo e interação entre espécies da mesma ordem e outros mamíferos, incluindo os seres humanos são cada vez mais amplamente aprofundados em pesquisas (DUPONT *et al.*, 2016; LOZANO *et al.*, 2021).

O município de Botucatu, está localizado na região centro sul do Estado de São Paulo, ocupando hoje uma área de 1.486,4 km². Se encontra a 235 km da capital do estado, a cidade de São Paulo, e localiza-se a 22° 53' 09'' de latitude sul e a 48° 26' 42'' de longitude oeste. Tem altitude relativamente elevada, que varia de 756m a 920m de altitude (metros acima do nível do mar), e seu clima é classificado como subtropical úmido, com temperatura média de 22° C.

A vigilância epidemiológica passiva da Raiva em quirópteros no município de Botucatu tem seu início no final dos anos 1990, com a criação de uma equipe na Prefeitura Municipal, ligada a Secretaria Municipal de Saúde voltada ao controle de zoonoses. Em 2003, com o diagnóstico do primeiro caso positivo de um quiróptero da espécie *A. lituratus* em área urbana da cidade (LANGONI *et al.*, 2005), houve aprimoramentos da sua vigilância. Um deles foi a especialização de uma equipe para o manejo de quirópteros em áreas urbanas, que estabelecia, principalmente, a coleta e envio de quirópteros encontrados em situações não usuais nos limites do território do município. Além dos já citados incrementos na Vigilância Epidemiológica passiva para quirópteros, a proximidade com o laboratório de diagnóstico e a parceria do município com a Universidade, é facilitador incontestável para o envio dessas amostras.

A utilização da rede de vigilância epidemiológica passiva, que coleta e envia as espécies de morcegos de variadas espécies e hábitos alimentares, recolhidos em vias públicas de áreas urbanas, dentro de residências com contato com humanos e animais domésticos, é uma facilidade que utilizamos neste trabalho, assim como Lozano *et al.* (2021), que utilizaram a mesma logística de animais enviados para o diagnóstico de raiva junto ao Instituto Pasteur, e também apresentaram resultados negativos para CoV. De outra forma, Bueno *et al.* (2022) utilizaram como amostragem animais saudáveis coletados à campo com o objetivo de detectar CoV em swabs fetais e orais de morcegos, com positividade de quase 10%. A metodologia de vigilância aplicada, seja passiva ou ativa, segundo Hattendorf *et al.* (2017), não apresenta variações importantes, sendo confiáveis ambos os métodos.

Apesar da alta prevalência de coronavírus em morcegos (BtCoV) com uma taxa de infecção estimada, de ao menos (1,38-CoV/amostra pesquisada), apresentadas em estudo global (ANTHONY *et al.* 2017), resultados negativos não são incomuns.

Quanto à comparação com estudos brasileiros, que utilizaram metodologias similares, realizada em Minas Gerais, por exemplo, que apresentou prevalência de 16,6% (3/18) de amostras positivas para HCoV, em amostras de rins, das espécies *Carollia perspicillata* e *Sturnira lilium* (PENGO *et al.*, 2016), com uma informação importante, as amostras se mostraram positivas no método qPCR e negativas quando submetidas ao nested-PCR convencional.

Enquanto em estudo de abrangência maior, Bittar *et al.* (2020) em amostras de intestinos, fígados e pulmões de morcegos, a prevalência foi de 17,2% (11/64) nas espécies *Molossus rufus*, *Phyllostomus discolor*, *Eptesicus sp*, *Glossophaga soricina*, *Molossus molossus* e *Artibeus literatus* da coleta realizada no município de São José do Rio Preto – SP e 2,6% (1/39) positivo na espécie *M. Molossus*, na cidade de Barreiras – BA, e utilizando a mesma metodologia de acesso aos morcegos, enviados para diagnóstico de raiva, Asano *et al.* (2016) chegaram a prevalência de 2,95% (9/305) de amostras provenientes do Estado de São Paulo, de cinco espécies distintas, *Cynomops abrasus*, *Cynomops planirostris*, *Desmodus rotundus*, *Glossophaga soricina* e *Platyrrhinus lineatus*. Porém, os resultados destes estudos têm algo em comum, foram obtidos pelo método nested-PCR com utilização de iniciadores mais genéricos (*primers* pan-CoV), como o utilizado na presente pesquisa.

É sabido que na biologia molecular aplicada nas pesquisas genéticas, a estrutura física, equipamentos, logística de armazenamento e treinamento do pessoal, são fatores que podem influenciar nos resultados obtidos, porém, uma vez padronizada a técnica, desde que se faça uso de todos os procedimentos de biossegurança e de controle de contaminantes, é possível

assegurar seus achados, positivos ou negativos, independentes dos métodos: qPCR ou PCR convencional.

Outros fatores podem influenciar nos achados, como por exemplo, o método de escolha amostral (DECLICH & CARTER, 1994).

Pesquisas com coletas em habitat natural, como as de bioma de Mata Atlântica, o segundo bioma com maior número de espécies de morcegos no Brasil, onde foram testadas 456 amostras de swabs (fecais e orais) com prevalência de 9,6% (44/456), relacionadas a sete espécies, entre elas espécies de primeiro relato com CoV, como, *Diphylla ecaudata* e *Sturnira lilium* (BUENO *et al.*, 2022) tendem a ser mais pontuais por abrangerem uma área menor, dando maior densidade ao (n) amostral (DECLICH & CARTER, 1994; HATTENDORF *et al.*, 2017). Ainda em avaliação mais localizada, no mesmo bioma, os autores refinaram a prevalência de coronavírus em morcegos de outros dois estados, com as taxas (9,7%) em Pernambuco e (8,3%) em Santa Catarina.

Mas, esse fator parece não ser o fator determinante para achados, já que, o primeiro relato de coronavírus em morcegos brasileiros foi de um entre sete espécimes testados, portanto, prevalência de 14,3% (1/7), em intestino de morcego hematófago *D. rotundus*, oriundos da rede de envio para diagnóstico e vigilância de raiva (BRANDÃO *et al.*, 2008).

Naquele que é considerado um dos estudos brasileiros de maior impacto, abrangência e relevância, mostrou resultados positivos em todas as possíveis variáveis pesquisadas: coleta por busca ativa e passiva, e os biomas: área urbana, floresta fragmentada e floresta preservada (GOÉS *et al.*, 2016). A amostra biológica de eleição foi o conteúdo intestinal total, e a metodologia molecular utilizada, foi a mais “popular”: iniciadores pan-CoV para nested-PCR, que totalizaram uma prevalência de 3,74% (15/401), que deu luz à sete espécies positivas: *Artibeus lituratus*, *Carollia perspicillata*, *Molossus rufus*, *Eumops glaucinus*, *Glossophaga soricina*, *Myotis nigricans*, *Myotis riparius* e *Sturnira lilium* (GOÉS *et al.*, 2016).

Portanto, parece crucial para qualquer investigação, e no caso da pesquisa de material genético de CoV em morcegos, ainda mais, seguir algumas diretrizes importantes de base descritas por Declich & Carter (1994) e ratificadas por Hattendorf *et al.* (2017): simplicidade, flexibilidade, aceitabilidade, sensibilidade e oportunidade.

Dados de sazonalidade amostral, parecem não ter influência direta nos resultados, por exemplo, nossas coletas abrangeram o período de janeiro a julho, enquanto Asano *et al.* (2016), com prevalência de 2,95% foi de março a julho, semelhança na sazonalidade, com resultados diferentes.

Quanto as espécies de morcegos avaliadas, é bem abrangente e se repetem na grande maioria das pesquisas brasileiras, e não parece haver uma relação com achados positivos/espécie, sendo as mais relatadas as do gênero *Glossophoga*, *Artibeus*, *Myotis*, *Desmodus*, *Molossus*, *Sturnira*, *Carollia* e *Eptesicus* (BRANDÃO *et al.*, 2008; ASANO *et al.*, 2016; GOÉS *et al.*, 2016; PENGO *et al.*, 2016; BITTAR *et al.* 2020; LOZANO *et al.* 2021; BUENO *et al.* 2022). Todas avaliadas no presente estudo.

Fatores biológicos podem influenciar na carga viral e coincidem com o aumento na circulação de vírus, além disso, o estresse reprodutivo e nutricional, infecções secundárias por fungos, por exemplo, a presença de grande número de indivíduos juvenis cuja imunidade materna encontra-se reduzida, podem influenciar na prevalência de coronavírus em morcegos. Estes tipos de fenômenos na biologia do hospedeiro estão correlacionados positivamente com um aumento na incidência de eventos de *spillover* de vírus para humanos (OLIVAL *et al.*, 2017; PANDIT *et al.*, 2022).

Assim, diante do exposto acima, considerando todas as dificuldades encontradas ao longo da pesquisa, conseguimos um razoável número de amostras analisadas; os resultados são dados importantes e que serão divulgados a comunidade científica, e alcançamos um dos principais objetivos: o desenvolvimento do protocolo para diagnóstico de coronavírus no laboratório de Biologia Molecular aplicada às Zoonoses do Serviço de Diagnóstico de Zoonoses – FMVZ, a priori, utilizando os morcegos enviados ao diagnóstico de raiva, porém com potencial de extensão para novas pesquisas com o objetivo de identificar CoV em espécies animais diferentes.

7. CONCLUSÃO

A compreensão da circulação de coronavírus em morcegos tem sido desafiante, isso porque os estudos ainda são escassos no Brasil, limitando dados e informações, além da já conhecida baixa prevalência em morcegos;

No período de janeiro a julho de 2023, não houve detecção de CoV em conteúdo intestinal de morcegos oriundos do município de Botucatu – SP;

Protocolar a técnica de PCR de coronavírus no LDZ-UNESP-Botucatu, SP favorece o desenvolvimento do diagnóstico para detecção de CoV em morcegos concomitantes com o diagnóstico de raiva, o que é de extrema importância, tanto para a rotina laboratorial, quanto para o desenvolvimento de novas pesquisas na área.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA, A. L., XAVIER, F., CHAVES, L. S. M., SABINO, E. C., SARAIVA, A. M., & SALLUM, M. A. M.. **Interfaces à transmissão e spillover do coronavírus entre florestas e cidades**. Estudos Avançados, v. 34, p. 191-208, 2020. <https://doi.org/10.1590/s0103-4014.2020.3499.012>

ALLEN, T., MURRAY, K.A., ZAMBRANA-TORRELIO, C. *et al.* **Global hotspots and correlates of emerging zoonotic diseases**. Nat Commun 8, 1124 (2017). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00923-8>

ANTHONY, SJ; JOHNSON, CK; GREIG, DJ; KRAMER, S *et al.* **Global patterns in coronavirus diversity**. Virus Evolution, Volume 3, Issue 1. 2017.

ASANO, K., HORA, A., SCHEFFER, K. *et al.* **Alphacoronavirus in urban Molossidae and Phyllostomidae bats**. Brazil. Virol J 13, 110 (2016). <https://doi.org/10.1186/s12985-016-0569-4>

BARBOSA, C., DURIGON, E.. **Coronavirus em aves silvestres e domésticas provenientes de diferentes regiões do Brasil**. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo. 2015.

BARROS, I.. **Um enfoque multigênico para a genealogia comparada de Betacoronavirus em bovinos e equinos**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2011.

BIANCOLELLA, M., COLONA, V.L., MEHRIAN-SHAI, R., WATT, J., LUZZATTO, L., NOVELLI, G., REICHARDT, J.. **COVID-19 2022 update: transition of the pandemic to the endemic phase**. Hum Genomics 16, 19. 2022. <https://doi.org/10.1186/s40246-022-00392-1>

BITTAR, C., MACHADO, R., COMELIS, M., *et al.* **Alphacoronavirus Detection in Lungs, Liver, and Intestines of Bats from Brazil**. Microbial ecology, v. 79, p. 203-212, 2020. <https://doi.org/10.1007/s00248-019-01391-x>

BOLLES M., DONALDSON E., BARIC R. **SARS-CoV and emergent coronaviruses: viral determinants of interspecies transmission Curr. Opin. Virol.**, 1, pp. 624-634. 2011.

BONFIM, D., AGUIAR R., SOUZA, R.. **Vigilância genômica do SARS-CoV-2 em Betim, Minas Gerais**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais. 2021.

BRANDÃO, P. **Coronavírus bovino (BCoV): ocorrência, diversidade molecular e padronização de PCR para diagnóstico a partir de amostras fecais de bezerros com e sem diarreia criados em municípios dos Estados de São Paulo e Minas Gerais, Brasil**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2004.

BRANDÃO, P.. **Bovine coronavirus detection in adult cows in Brazil**. Arq. Inst. Biol, v. 69, n. 2, p. 103-4. 2002.

BRANDÃO, P.. **Molecular analysis of Brazilian strains of bovine coronavirus (BCoV) reveals a deletion within the hypervariable region of the S1 subunit of the spike glycoprotein also found in human coronavirus OC43**. Archives of virology, v. 151, p. 1735-1748. 2006.

BRANDÃO, P.; SCHEFFER, K.; VILLARREAL, L.; ACHKAR, S.; OLIVEIRA, R.; FAHL, W.; CASTILHO, J.; KOTAIT, I.; RICHTZENHAIN, L.. **A coronavirus detected in the vampire bat *Desmodus rotundus***. The Brazilian Journal of Infectious Diseases, v. 12, p. 466-468. 2008.

BRITO, S., *et al.* **Pandemia da COVID-19: o maior desafio do século XXI**. Vigilância sanitária em debate, v. 8, n. 2, p. 54-63. 2020.

BRUNET-ROSSINNI, A.; AUSTAD, S.. **Ageing Studies on Bats: a review**. Biogerontology, v. 5, n. 4, p. 211-222. 2004.

BRUSSEL, KV; HOLMES, E.C. **Zoonotic disease and virome diversity in bats**. Curr. Opin. Virol., 52. 2022.

BUENO, L. *et al.* **High genetic diversity of alphacoronaviruses in bat species (Mammalia: Chiroptera) from the Atlantic Forest in Brazil**. Transboundary and Emerging Diseases, v.

69, n. 5, p. e2863-e2875. 2022.

BURROWS, M. T. *et al.* **Geographical limits to species-range shifts are suggested by climate velocity.** *Nature*, v. 507, n. 7493, p. 492–495. 2014.

CALISHER, C.; CHILDS, J.; FIELD, H.; HOLMES, K.; SCHOUNTZ, T.. **Bats: important reservoir hosts of emerging viruses.** *Clinical Microbiology Reviews*, v. 19, n. 3, p. 531-545. 2006.

CANUTI, M.; EIS-HUEBINGER, A.; DEIJS, M.; VRIES, M.; DREXLER, J.; OPPONG, S.; MÜLLER, M.; KLOSE, S.; WELLINGHAUSEN, N.; COTTONTAIL, V.. **Two Novel Parvoviruses in Frugivorous New and Old World Bats.** *Plos One*, v. 6, n. 12, p. 1-9. 2011.

CARLSON, C., ALBERY, G., MEROW, C. TRISOS C., ZIPFEL C., ESKEW, E., OLIVAL, K., ROSS, N., BANSAL, S.. **Climate change increases cross-species viral transmission risk.** *Nature* 607, 555–562 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04788-w>

CARNEIRO, N. F. D. F., CALDEIRA, A. P., ANTUNES, L. A., CARNEIRO, V. F., & CARNEIRO, G. F. **Rabies in *Artibeus lituratus* bats in Montes Claros, State of Minas Gerais.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 42, n. 4, p. 449-451. 2009.

CASCIO, A.; BOSILKOVSKI, M.; RODRIGUEZ-MORALES, A.J.; PAPPAS, G.. **The socio-ecology of zoonotic infections.** *Clinical Microbiology And Infection*, v. 17, n. 3, p. 336-342. 2011.

CHAN J., LAU S., TO K., CHENG V., WOO P., YUEN K.. **Middle East respiratory syndrome coronavirus: another zoonotic betacoronavirus causing SARS-like disease.** *Clin. Microbiol. Rev.*, 28, pp. 465-522. 2015.

CHU D.; LEUNG C.; GILBERT M.; JOYNER P.; NG E.; TSE T.; GUAN Y.; PEIRIS J.; POON LL. **Avian coronavirus in wild aquatic birds.** *J Virol* 85:12815–12820. 2011.

CORMAN, V., *et al.* **Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-**

PCR. Eurosurveillance, v. 25, n. 3, p. 2000045. 2020.

CORMAN, V.; RASCHE, A.; DIALLO, T.; COTTONTAIL, V.; STÖCKER, A.; SOUZA, B.; CORRÊA, J.; CARNEIRO, A.; FRANKE, C.; NAGY, M.. **Highly diversified coronaviruses in neotropical bats.** Journal Of General Virology, v. 94, n. 9, p. 1984-1994. 2013.

CUI, J.; LI, F.; SHI, Z.. **Origin and evolution of pathogenic coronaviruses.** Nature reviews microbiology, v. 17, n. 3, p. 181-192. 2019.

CUNHA, E. M. S. et al. **Raiva em morcegos na região norte-noroeste do Estado de São Paulo: 1997-2002.** Revista de Saúde Pública, v. 40, n. 6, p. 1082-1086. 2006.

DAVIS, E.. **Enterocolite neonatal associada à infecção por coronavírus em potro: relato de caso.** Revista de Investigação Diagnóstica Veterinária, v. 2, pág. 153-156. 2000.

DECLICH, S.; CARTER, A.. **Public health surveillance: historical origins, methods and evaluation.** Bulletin of the World Health Organization, v. 72, n. 2, p. 285. 1994.

DOMINGUEZ, Samuel R. *et al.* **Detection of group 1 coronaviruses in bats in North America.** Emerging infectious diseases, v. 13, n. 9, p. 1295. 2007.

DUARTE, P.. **COVID-19: Origem do novo coronavírus.** Brazilian Journal of Health Review, v. 3, n. 2, p. 3585-3590. 2020.

DUPONT, P. **Detecção e caracterização de vírus em morcegos do Rio Grande do Sul, Brasil.** Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2016.

ESTEVES, Pedro José. **Coronavírus.** Revista de Ciência Elementar, v. 8, n. 3. 2020.

FISCHER, K. *et al.* **Insectivorous bats carry host specific astroviruses and coronaviruses across different regions in Germany.** Infection, Genetics and Evolution, v. 37, p. 108-116. 2016.

FLORES, E. (org.). **Virologia veterinária.** Santa Maria: UFSM, 2007.

GALHANO, C.. **SARS-CoV-2: as evidências genéticas da sua origem**. Dissertação de Mestrado. Universidade de Lisboa. 2021.

GARBINO, G.; LIM, B.; TAVARES, V.. **Systematics of big-eyed bats, genus *Chiroderma* Peters, 1860 (Chiroptera: Phyllostomidae)**. Zootaxa, v. 4846, n. 1, p. 1–93-1–93. 2020.

GLOZA-RAUSCH F., IPSEN A., SEEBENS A., GOTTSCHHE M., PANNING M., DREXLER J., PETERSEN N., ANNAN A., GRYWNA K., MULLER M., PFEFFERLE S., DROSTEN C. **Detection and prevalence patterns of group I coronaviruses in bats, northern Germany**. Emerg Infect Dis 14:626-631. 2008.

GOÉS L., CAMPOS A., CARVALHO C., AMBAR G., QUEIROZ L., CRUZ-NETO A., MUNIR M., DURIGON E.. **Genetic diversity of bats coronaviruses in the Atlantic Forest hotspot biome, Brazil**. Infect Genet Evol 44:510–513. 2016.

GÓES, L., RUVALCABA, S., CAMPOS, A., QUEIROZ, L. H., CARVALHO, C., JEREZ, J., DURIGON, E., DÁVALOS, L., & DOMINGUEZ, S.. **Novel bat coronaviruses, Brazil and Mexico**. Emerging infectious diseases vol. 19,10: 1711-3. 2013.

GRENDENE, C. *et al.* **Coronavírus (covid-19): história, conhecimento atual e sequelas de longo prazo**. Revista Corpus Hippocraticum, v. 1, n. 1. 2021.

GUO, T. *et al.* **Cardiovascular implications of fatal outcomes of patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19)**. JAMA cardiology, v. 5, n. 7, p. 811-818. 2020.

HAAKE, C.; COOK, S.; PUSTERLA, N.; MURPHY, B.. **Coronavirus Infections in Companion Animals: Virology, Epidemiology, Clinical and Pathologic Features**. Viruses, v. 12 n.1023, p. 1-22. 2020.

HAN, Hui-Ju; WEN, Hong-Ling; ZHOU, Chuan-Min; CHEN, Fang-Fang; LUO, Li-Mei; LIU, Jian-Wei; YU, Xue-Jie. **Bats as reservoirs of severe emerging infectious diseases**. Virus Research, v. 205, p. 1-6. 2015.

HARTENIAN, E. *et al.* **The molecular virology of coronaviruses.** Journal of Biological Chemistry, v. 295, n. 37, p. 12910-12934. 2020.

HASÖKSÜZ, M.; KILIC, S.; SARAÇ, F.. **Coronavírus e Sars-cov-2.** Revista Turca de Ciências Médicas, v. 9, pág. 549-556. 2020.

HATTENDORF, J., BARDOSH, K. L., & ZINSSTAG, J. **One Health and its practical implications for surveillance of endemic zoonotic diseases in resource limited settings.** Acta Tropica, 165, 268–273. 2017.

HAYMAN, D.; BOWEN, R.; CRYAN, P.; MCCRACKEN, G.; O'SHEA, T.; PEEL, A.; GILBERT, A.; WEBB, C.; WOOD, J.. **Ecology of Zoonotic Infectious Diseases in Bats: current knowledge and future directions.** Zoonoses And Public Health, v. 60, n. 1, p. 2-21. 2012.

HELMY, Y.; FAWZY, M.; ELASWAD, A.; SOBIEH, A.; KENNEY, S.; SHEHATA, A. **The COVID-19 Pandemic: a comprehensive review of taxonomy, genetics, epidemiology, diagnosis, treatment, and control.** Journal Of Clinical Medicine, v. 9, n. 4, p. 1-29. 2020.

HU, B.; GE, X.; WANG, L.; SHI, Z. **Bat origin of human coronaviruses.** Virology Journal, v. 221, n. 12, p. 1-10. 2015.

HU, B.; ZENG, L.; YANG, X.; GE, X.; ZHANG, W.; LI, B.; XIE, J.; SHEN, X.; ZHANG, Y.; WANG, N.. **Discovery of a rich gene pool of bat SARS-related coronaviruses provides new insights into the origin of SARS coronavirus.** Plos Pathogens, v. 13, n. 11, p. 1-27. 2017.

HUYNH J., LI S., YOUNT B., SMITH A., STURGES L., OLSEN J., NAGEL J., JOHNSON J., AGNIHOTHRAM S., GATES J., FRIEMAN M., BARIC R., DONALDSON E. **Evidence supporting a zoonotic origin of human coronavirus strain NL63.** J. Virol., 86, pp. 12816-12825. 2012.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES (ICTV). ICTV KALLIO-KOKKO *et al.*, **Viral Zoonoses in Europe.** FEMS microbiology reviews, v. 29, n. 5, p. 1051-1077. 2005.

KUMAR, A.; NAYAR, K.. **COVID 19 and its mental health consequences**. Journal of Mental Health, v. 30, n. 1, p. 1-2. 2021.

LAM, T.; JIA, N.; ZHANG, Y.; SHUM, M.; JIANG, J.; ZHU, H.; TONG, Y.; SHI, Y.; NI, X.; LIAO, Y.. **Identifying SARS-CoV-2-related coronaviruses in Malayan pangolins**. Nature, v. 583, n. 7815, p. 282-285. 2020.

LANGONI, H.; CRISTINA, K.; MENOZZI, B.; SILVA, R.. **Rabies in the big fruit eating bat *Artibeus lituratus* from Botucatu, Southeastern Brazil**. Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases (Online), Botucatu, SP, v. 11, n.1, p. 84-87. 2005.

LAU, S. K. P. et al. **Discovery of a novel coronavirus, China Rattus coronavirus HKU24, from Norway rats supports murine origin of Betacoronavirus 1 with implications on the ancestor of Betacoronavirus lineage A**. Journal of virology, p. JVI. 02420-14. 2014.

LELLI, D. *et al.* **Detecção de coronavírus em morcegos de diversas espécies na Itália**. Vírus, v. 5, n. 11, pág. 2679-2689. 2013.

LIMA, C. R. M. D., SÁNCHEZ-TARRAGÓ, N., MORAES, D., GRINGS, L., MAIA, M. R. (2020). **Emergência de saúde pública global por pandemia de COVID-19: desinformação, assimetria de informações e validação discursiva**. Folha de Rostto: Revista de Biblioteconomia e Ciência da Informação, p.1-28. 2020.

LIMA, F.; CAMPOS, F.; KUNERT FILHO, H.; BATISTA, H.; CARNIELLI JÚNIOR, P.; CIBULSKI, S.; SPILKI, F.; ROEHE, P.; FRANCO, A.. **Detection of Alphacoronavirus in velvety free-tailed bats (*Molossus molossus*) and Brazilian free tailed bats (*Tadarida brasiliensis*) from urban area of Southern Brazil**. Virus Genes, v. 47, n. 1, p. 164-167. 2013.

LIU, P. *et al.* **Are pangolins the intermediate host of the 2019 novel coronavirus?** Cold Spring Harbor Laboratory. 2020.

LOZANO, L.. **Detecção molecular de alfa influenzavírus e coronavírus em morcegos não Hematófagos coletados no Estado de São Paulo, Brasil**. Dissertação de Mestrado.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2021.

LUIS ANGELA D., HAYMAN DAVID T. S., O'SHEA THOMAS J., CRYAN PAUL M., GILBERT AMY T., PULLIAM JULIET R. C., MILLS JAMES N., TIMONIN MARY E., WILLIS CRAIG K. R., CUNNINGHAM ANDREW A., FOOKS ANTHONY R., RUPPRECHT CHARLES E., WOOD JAMES L. N. AND WEBB COLLEEN T. **A comparison of bats and rodents as reservoirs of zoonotic viruses: are bats special.** Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences , v. 1756, pág. 20122753. 2013.

MACKAY, I.; ARDEN, K.. **MERS coronavirus: diagnostics, epidemiology and transmission.** Virology journal, v. 12, n. 1, p. 1-21. 2015.

MAGLE, Seth B. *et al.* **Urban wildlife research: past, present, and future.** Biological conservation, v. 155, p. 23-32. 2012.

MAHDY MAA, YOUNIS W AND EWAIDA Z. **An Overview of SARS-CoV-2 and Animal Infection.** Front. Vet. Sci. 7:596391. 2020.

MANTOVAN, K., LANGONI, H.. **Pesquisa de Zoonoses virais emergentes em morcegos hematófagos *Desmodus rotundus*: Uma abordagem de saúde única.** Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. 2023.

MANZINI S., RODRIGUES N., BERTOZZO T., AIRES I., LUCHEIS S.. **SARS-COV-2: Sua relação com os animais e potencial doença zoonótica.** Vet. e Zootec; v28: 001-013. 2021.

MAXMEN, A. *et al.* **The COVID lab-leak hypothesis: what scientists do and don't know.** Nature, v. 594, n. 7863, p. 313-315. 2021.

MCINTOSH, K., **Coronaviruses: A Comparative Review. Current Topics in Microbiology and Immunology.** Ergebnisse der Mikrobiologie und Immunitätsforschung Springer Verlag Berlin, Heidelberg, 63, 85-129. 1974.

MEIRELLES, M.. **Enterite associada à infecção por coronavírus em potros puro sangue inglês em um haras no Rio Grande do Sul.** Arquivos do Instituto Biológico, v. 78, p. 605-

608. 2020.

MENOZZI, B.; PAZ, G.; PAIZ, L.; GARCES, H.; ADORNO, B.; ALMEIDA-SILVA, F.; OLIVEIRA, R.; RICHINI-PEREIRA, V.; CHECHI, J.; BAGAGLI, E.. **Rabies virus and Histoplasma suramericanum coinfection in a bat from southeastern Brazil.** Zoonoses And Public Health, v. 67, n. 2, p. 138-147. 2019.

MOUTINHO, F. F. B. *et al.* **Raiva em morcego não hematófago em área urbana do Município de Niterói-RJ.** Revista Brasileira de Ciência Veterinária, v. 22, n. 2, p. 99-102. 2015.

NOCKER, S.; LUDWING, P. **The WD-repeat protein superfamily in Arabidopsis: conservation and divergence in structure and function.** BMC Genomics, v.4, p. 50. 2003.

OLIVAL, K., HOSSEINI, P., ZAMBRANA-TORRELIO, C., ROSS, N., Bogich, T., Daszak, P.. **Host and viral traits predict zoonotic spillover from mammals.** Nature 546, 646–650. 2017. <https://doi.org/10.1038/nature22975>

PANDA, A.; THAKUR, S.; KATOCH, R.. **Rabies: control strategies for Himalayan states of the Indian subcontinent.** Journal of Communicable Diseases, v.40, p.169-175. 2008.

PANDIT, P. *et al.* **Predicting the potential for zoonotic transmission and host associations for novel viruses.** Communications biology, v. 5, n. 1, p. 844. 2022.

PAZ, G.; ADORNO, B.; RICHINI-PEREIRA, V.; BOSCO, S.; LANGONI, H.. **Infection by Histoplasma capsulatum, Cryptococcus spp. And Paracoccidioides brasiliensis in bats collected in urban areas.** Transboundary And Emerging Diseases, v. 65, n. 6, p. 1797-1805. 2018.

PEDERSEN, N. ALLEN, Claire E.; LYONS, Leslie A. **Pathogenesis of feline enteric coronavirus infection.** Journal of Feline Medicine and Surgery, v. 10, n. 6, p. 529-541. 2008.

PENGO, L., DRUMOND, B., TRINDADE, G.. **Prospecção de Coronavirus humano e vírus da raiva em pequenos mamíferos silvestres, no Estado de Minas Gerais, Brasil.** Dissertação

do Mestrado. Universidade Federal do Juiz de Fora. 2016.

PIMENTEL R., *et al.* **The dissemination of COVID-19: an expectant and preventive role in global health.** J Hum Growth Dev; 30(1): 135-140. 2020.

PLOWRIGHT, R., PARRISH, C., MCCALLUM, H., HUDSON, P., KO, A., GRAHAM, A., LLOYD-SMITH, J. **Pathways to zoonotic spillover.** Nat Rev Microbiol 15, 502–510. 2017. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.45>

POON, L.; CHU, D.; CHAN, K.; WONG, O.; ELLIS, T.; LEUNG, Y.; LAU, S.; WOO, P.; SUEN, K.; YUEN, K.. **Identification of a Novel Coronavirus in Bats.** Journal Of Virology, v. 79, n. 4, p. 2001-2009. 2005.

QUAN P., FIRTH C., STREET C., HENRIQUEZ J., PETROSOV A., TASHMUKHAMEDOVA A., HUTCHISON S., EGHOLM M., OSINUBI M., NIEZGODA M., OGUNKOYA A., BRIESE T., RUPPRECHT C., LIPKIN W. **Identification of a severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in a leaf-nosed bat in Nigeria.** mBio 1. 2010.

QUEIROZ, L. H. *et al.* **Perfil epidemiológico da raiva na região Noroeste do Estado de São Paulo no período de 1993 a 2007.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 42, n. 1, p. 9-14. 2009.

REIS, N., *et al.* **Morcegos do brasil.** Universidade de Santa Cruz do Sul (UNISC). 2007.

RABAAN, A., AL-AHMED, S., HAQUE, S., SAH, R., TIWARI, R., MALIK, Y., DHAMA, K., YATOO, M., BONILLA-ALDANA, D., RODRIGUEZ-MORALES, A. **SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-CoV: a comparative overview.** Le Infezioni in Medicina, n. 2, p. 174-184. 2020.

SATIJA, N.; LAL, S.. **The molecular biology of SARS coronavirus.** Annals of the New York Academy of Sciences, v. 1102, n. 1, p. 26-38. 2007.

SCHALK, A. F.; HAWN, M. C.; DAK, F. N. **An apparently new respiratory disease of baby**

chicks. Journal of the American Veterinary Medicine Association, v. 78, p. 413-423. 1931.

SCHOUNTZ, Tony. **Immunology of Bats and Their Viruses: challenges and opportunities.** Viruses, v. 6, n. 12, p. 4880-4901. 2014.

SINGH, D., YI, S.V. **On the origin and evolution of SARS-CoV-2.** Exp Mol Med 53, 537–547. 2021. <https://doi.org/10.1038/s12276-021-00604-z>

SHI, J.; WEN, Z.; ZHONG, G.; YANG, H.; WANG, C.; HUANG, B.; LIU, R.; HE, X.; SHUAI, L.; SUN, Z.. **Susceptibility of ferrets, cats, dogs, and other domesticated animals to SARS–coronavirus 2.** Science, v. 368, n. 6494, p. 1016-1020. 2020.

SHIRATO, Kazuya *et al.* **Possible involvement of infection with human coronavirus 229E, but not NL63, in Kawasaki disease.** Journal of Medical Virology, v. 86, n. 12, p. 2146-2153. 2014.

SIMMONS, N.; SEYMOUR, K.; HABERSETZER, J.; GUNNELL, G.. **Primitive Early Eocene bat from Wyoming and the evolution of flight and echolocation.** Nature, v. 451, n. 7180, p. 818-821. 2008.

SODRÉ, M.; GAMA, A.; ALMEIRA, M.. **Updated list of bat species positive for Rabies in Brazil.** Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, v. 52, n 2, p. 75-81. 2010.

SOKOLOW SUSANNE H., NOVA NICOLE, PEPIN KIM M., PEEL ALISON J., PULLIAM JULIET R. C., MANLOVE KEZIA, CROSS PAUL C., BECKER DANIEL J., PLOWRIGHT RAINA K., MCCALLUM HAMISH AND DE LEO GIULIO A. **Ecological interventions to prevent and manage zoonotic pathogen spillover.** Phil. Trans. R. Soc. B3742018034220180342. 2019.

SU, S.; WONG, G.; SHI, W.; LIU, J.; LAI, A.; ZHOU, J.; LIU, W.; BI, Y.; GAO, G.. **Epidemiology, Genetic Recombination, and Pathogenesis of Coronaviruses.** Trends In Microbiology, v. 24, n. 6, p. 490-502, 2016.

TANG X., ZHANG J., ZHANG S., WANG P., FAN X., LI L., LI G., DONG B., LIU W.,

CHEUNG C., XU K., SONG W., VIJAYKRISHNA D., POON L., PEIRIS J., SMITH G., CHEN H., GUAN Y. **Prevalence and genetic diversity of coronaviruses in bats from China..** J Virol 80:7481–7490. 2006.

TIWARI, R., *et al.* **COVID-19: animals, veterinary and zoonotic links.** Veterinary Quarterly, v. 40, n. 1, p. 169-182. 2020.

UNITED STATES AGENCY FOR INTERNATIONAL DEVELOPMENT. **USAID launches Emerging Pandemic Threats program.** Washington. 2009. Disponível em: http://www.usaid.gov/press/releases/2009/pr091021_1.html >.

VIJGEN, L. *et al.* **A pancoronavirus RT-PCR assay for detection of all known coronaviruses.** SARS-and Other Coronaviruses: Laboratory Protocols, v. 454, p. 3-12. 2008.

VIZOTTO, L. D.; TADDEI, VALDIR A. **Chave para determinação de quirópteros brasileiros.** 1973.

XIU, L. *et al.* **A RT-PCR assay for the detection of coronaviruses from four genera.** Journal of Clinical Virology, v. 128, p. 104391. 2020.

WYNNE JW, WANG L-F. **Bats and Viruses: Friend or Foe?.** PLoS Pathog 9 (10): e1003651. 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003651>

WOO P., LAU S., LAM C., LAU C., TSANG A., LAU J., *et al.* **Discovery of seven novel Mammalian and avian coronaviruses in the genus deltacoronavirus supports bat coronaviruses as the gene source of alphacoronavirus and betacoronavirus and avian coronaviruses as the gene source of gammacoronavirus and deltacoronavirus.** Journal of virology, v. 86, n. 7, p. 3995-4008. 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **COVID-19 Epidemiological Update - 27 October 2023.** 2023. Disponível em: <https://www.who.int/publications/m/item/covid-19-epidemiological-update---27october-2023>

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Severe acute respiratory syndrome (SARS)**. 2020. Disponível em: <https://www.who.int/csr/sars/en/>

WU, Y. *et al.* **Nervous system involvement after infection with COVID-19 and other coronaviruses**. *Brain, behavior, and immunity*, v. 87, p. 18-22. 2020.

ZANELLA, J.. "**Zonoses emergentes e reemergentes e sua importância para saúde e produção animal.**" *Pesquisa agropecuária brasileira* 51; 510-519. 2016.

ZUBAID, A. (ed.). **Functional and Evolutionary Ecology of Bats**. Nova Iorque: Oxford University Press, 360haymhay. 2005.

ZHOU, H. *et al.* **A review of SARS-CoV2: compared with SARS-CoV and MERS-CoV**. *Frontiers in medicine*, v. 8, p. 628370. 2021.

9. ANEXOS

Anexo 1. Certificado de autorização para atividades com finalidade científica pelo Sistema de Autorização e Informação em biodiversidade (SISBIO).



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: 85973-1	Data da Emissão: 23/01/2023 10:02:57	Data da Revalidação*: 23/01/2024
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: DANILO ALVES DE FRANCA	CPF: 445.701.458-33
Título do Projeto: Importância dos quirópteros na transmissão de agentes infecciosos: uma abordagem de Saúde Única	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO	CNPJ: 46.031.918/0020-97

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta de material	01/2023	01/2026

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Nacionalidade
1	Helio Langoni	Orientador	409.015.308-59	Brasileira
2	Benedito Donizete Menozzi	Orientador	171.687.188-35	Brasileira
3	KETRIN RIBEIRO FAVARO	Mestranda	413.380.358-27	Brasileira

Observações e ressalvas

1	Deve-se observar as as recomendações de prevenção contra a COVID-19 das autoridades sanitárias locais e das Unidades de Conservação a serem acessadas.
2	Esta autorização NÃO libera o uso de substância com potencial agrotóxico ou inseticida e NÃO se me o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de atender às exigências e obter as autorizações previstas em outros instrumentos legais relativos ao registro de agrotóxicos (Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002, entre outros).
3	Esta autorização NÃO libera o uso de substância com potencial agrotóxico ou inseticida e NÃO se me o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de atender às exigências e obter as autorizações previstas em outros instrumentos legais relativos ao registro de agrotóxicos (Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002, entre outros).
4	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
5	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, presentes e passadas, 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.
6	Este documento somente poderá ser utilizado para as fins previstas na Portaria ICMBio nº 748/2022, na 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.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/gen .
8	O titular de licença ou autorização e os membros de 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 <i>in situ</i> .

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº Portaria ICMBio nº 748/2022. 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: 0859730120230123

Página 1/4



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: 85973-1	Data da Emissão: 23/01/2023 10:02:57	Data da Revalidação*: 23/01/2024
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: DANILO ALVES DE FRANCA	CPF: 445.701.458-33
Título do Projeto: Importância dos quirópteros na transmissão de agentes infecciosos: uma abordagem de Saúde Única	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO	CNPJ: 48.031.918/0020-97

Observações e ressalvas

9	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.
10	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 infraestrutura da unidade.

Outras ressalvas

1	CENAP Atibaia-SP
---	------------------

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Descrição do local	Município-UF	Bioma	Caverna?	Tipo
1	Município	Avaré-SP	Mata Atlântica	Não	Dentro de UC Municipal
2	Município	Pardinho-SP	Mata Atlântica	Não	Dentro de UC Municipal
3	Município	Lençóis Paulista-SP	Mata Atlântica	Não	Dentro de UC Municipal
4	Município	Bauru-SP	Mata Atlântica	Não	Dentro de UC Municipal
5	Município	Botucatu-SP	Mata Atlântica	Não	Dentro de UC Municipal
6	Município	São Manuel-SP	Mata Atlântica	Não	Dentro de UC Municipal
7	Município	Cerqueira César-SP	Mata Atlântica	Não	Dentro de UC Municipal
8	Município	Dois Córregos-SP	Mata Atlântica	Não	Dentro de UC Municipal
9	Município	Itatinga-SP	Mata Atlântica	Não	Dentro de UC Municipal

Atividades

#	Atividade	Grupo de Atividade
1	Captura de animais silvestres in situ	Fora de UC Federal
2	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Atividades ex-situ (fora da natureza)
3	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Fora de UC Federal

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº Portaria ICMBio nº 748/2022. 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: 0859730120230123

Página 2/4



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: 85973-1	Data da Emissão: 23/01/2023 10:02:57	Data da Revalidação*: 23/01/2024
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: DANILO ALVES DE FRANCA	CPF: 445.701.458-33
Título do Projeto: Importância dos quirópteros na transmissão de agentes infecciosos: uma abordagem de Saúde Única	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO	CNPJ: 48.031.918/0020-97

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxon	Qtde.
1	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Chiroptera	300
2	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Chiroptera	-
3	Captura de animais silvestres in situ	Chiroptera	-

A quantidade prevista só é obrigatória para atividades do tipo "Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ". Essa quantidade abrange uma porção territorial mínima, que pode ser uma Unidade de Conservação Federal ou um Município.

A quantidade significa: por espécie X localidade X ano.

Materiais e Métodos

#	Tipo de Método (Grupo taxonômico)	Materiais
1	Amostras biológicas (Outros mamíferos)	Animal encontrado morto ou partes (carcaça)/osso/pele, Ectoparasita, Fezes, Fragmento de tecido/órgão, Pêlo, Sangue, Secreção
2	Método de captura/coleta (Outros mamíferos)	Captura manual

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo destino
1	UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO	Laboratório

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº Portaria ICMBio nº 748/2022. 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: 0859730120230123

Página 3/4

Anexo 2. Ofício de parecer ético de subprojeto.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



Botucatu, 31 de outubro de 2023.

Ao

Conselho do Programa de Pós-graduação em Doenças Tropicais
Faculdade de Medicina de Botucatu - Unesp

Prezados Senhores,

Declaramos que a (X) dissertação de mestrado / () tese de doutorado intitulada
**"INVESTIGAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE CORONAVÍRUS
EM QUIRÓPTEROS DO ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL."** de autoria do(a)
discente Ketrin Ribeiro Fávoro é subprojeto do projeto intitulado **"PESQUISA DE
AGENTES INFECCIOSOS DE CARÁTER ZONÓTICO EM QUIRÓPTEROS."** que
foi submetido e aprovado pelo () CEP / (X) CEUA, conforme parecer anexo.

Declaramos que no subprojeto não houve alterações de procedimentos operacionais
ou metodológicos daqueles constantes no projeto original e que o(a) discente integra a
equipe do projeto.

Atenciosamente,

DANILO ALVES DE FRANÇA

BENEDITO DONIZETE MENOZZI

KETRIN RIBEIRO FÁVARO

Faculdade de Medicina de Botucatu – Seção Técnica de Pós-graduação
Av. Professor Mário Rubens Guimarães Montenegro, s/n CEP 18618-687 Botucatu São Paulo Brasil
posgraduacao.fmb@unesp.br

Anexo 3. Atestado de aprovação da pesquisa pela Comissão de Ética CEP da Faculdade de Medicina– FMB – UNESP.



ATESTADO

Atesto que o Projeto "Pesquisa de agentes infecciosos de caráter zoonótico em quirópteros" **Protocolo CEUA 0259/2022**, a ser conduzido por Danilo Alves de França, responsável/orientador Helio Langoni, para fins de pesquisa científica/ensino - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA.

Finalidade	PESQUISA CIENTÍFICA
Vigência do projeto	01/01/2023 a 31/12/2024
Nome Comum / Espécie / Linhagem	QUIROPTERO / MYOTIS BOCAGII /
Raça	
Nº de animais machos	0
Nº de animais fêmeas	0
Nº de animais sexo indefinido	300
Peso médio de animais machos	0
Peso médio de animais fêmeas	0
Peso médio de animais sexo indefinido	50g
Idade	1 ano(s) e 1 mes(es) e 1 dia(s).
Procedência	Vigilância

Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEUA em 07/11/2022

JULIANY GOMES QUITZAN

Presidente da CEUA da FMVZ, UNESP - Campus de Botucatu

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Seção Técnica Acadêmica
Rua Prof. Dr. Walter Maurício Corrêa, s/n
UNESP - Campus de Botucatu/SP - Cep 18618-681
(14) 3880-2176 - patrizia@fmvz.unesp.br - www.fmvz.unesp.br

Anexo 4. Planilha de dados dos quirópteros coletados em Botucatu levados ao LDZ-UNESP-Botucatu, SP.

Amostra	Registro	Data	Procedência	Espécie
1	01/23	02/01	Botucatu	<i>Molossus molosssus</i>
2	02/23	02/01	Botucatu	<i>Molossus molosssus</i>
3	03/23	03/01	Botucatu	<i>Molossus rufus</i>
4	04/23	03/01	Botucatu	<i>Molossus molosssus</i>
5	12/23	04/01	Botucatu	<i>Eptesicus brasiliensis</i>
6	13/23	06/01	Botucatu	<i>Molossus rufus</i>
7	16/23	06/01	Botucatu	<i>Molossus molosssus</i>
8	18/23	09/01	Botucatu	<i>Molossus rufus</i>
9	19/23	09/01	Botucatu	<i>Molossus molosssus</i>
10	25/23	10/01	Botucatu	<i>Molossus rufus</i>
11	28/23	11/01	Botucatu	<i>Molossus molosssus</i>
12	29/23	11/01	Botucatu	<i>Molossus molosssus</i>
13	30/23	11/01	Botucatu	<i>Molossus molosssus</i>
14	34/23	12/01	Botucatu	<i>Molossus molosssus</i>
15	35/23	13/01	Botucatu	<i>Molossus molosssus</i>
16	36/23	13/01	Botucatu	<i>Molossus molosssus</i>
17	37/23	14/01	Botucatu	<i>Molossus molosssus</i>
18	38/23	14/01	Botucatu	<i>Molossus molosssus</i>
19	39/23	15/01	Botucatu	<i>Molossus molosssus</i>
20	40/23	15/01	Botucatu	<i>Molossus molosssus</i>
21	41/23	16/01	Botucatu	<i>Molossus molosssus</i>
22	43/23	16/01	Botucatu	<i>Molossus molosssus</i>
23	44/23	16/01	Botucatu	<i>Molossus rufus</i>
24	49/23	18/01	Botucatu	<i>Molossus molosssus</i>
25	50/23	18/01	Botucatu	<i>Molossus molosssus</i>
26	52/23	19/01	Botucatu	<i>Eumops glaucinus</i>
27	54/23	20/01	Botucatu	<i>Eumops perotis</i>
28	55/23	20/01	Botucatu	<i>Molossus molosssus</i>
29	56/23	20/01	Botucatu	<i>Molossus molosssus</i>
30	58/23	22/01	Botucatu	<i>Molossus molosssus</i>
31	59/23	22/01	Botucatu	<i>Eumops glaucinus</i>
32	68/23	25/01	Botucatu	<i>Molossus molosssus</i>
33	73/23	26/01	Botucatu	<i>Molossus molosssus</i>
34	74/23	27/01	Botucatu	<i>Molossus molosssus</i>
35	76/23	29/01	Botucatu	<i>Eumops glaucinus</i>
36	77/23	29/01	Botucatu	<i>Molossus molosssus</i>
37	78/23	31/01	Botucatu	<i>Molossus rufus</i>
38	80/23-A	01/02	Botucatu	<i>Eumops perotis</i>
39	83/23	03/02	Botucatu	<i>Eumops perotis</i>
40	84/23	03/02	Botucatu	<i>Molossus molosssus</i>
41	85/23	03/02	Botucatu	<i>Molossus molosssus</i>
42	86/23	03/02	Botucatu	<i>Molossus molosssus</i>
43	88/23	06/02	Botucatu	<i>Eumops sp.</i>

44	89/23	06/02	Botucatu	<i>Myotis nigricans</i>
45	95/23	09/02	Botucatu	<i>Anoura sp.</i>
46	96/23	09/02	Botucatu	<i>Myotis nigricans</i>
47	97/23	11/02	Botucatu	<i>Histiotus nigricans</i>
48	98/23	11/02	Botucatu	<i>Molossus molosssus</i>
49	100/23	14/02	Botucatu	<i>Eptesicus brasiliensis</i>
50	102/23	18/02	Botucatu	<i>Lasiurus blossevillii</i>
51	103/23	19/02	Botucatu	<i>Molossus molosssus</i>
52	107/23	25/02	Botucatu	<i>Molossus sp.</i>
53	115/23	10/03	Botucatu	<i>Molossus molosssus</i>
54	116/23	11/03	Botucatu	<i>Molossus molosssus</i>
55	117/23	13/03	Botucatu	<i>Eumops glaucinus</i>
56	119/23	14/03	Botucatu	<i>Molossus molosssus</i>
57	125/23	16/03	Botucatu	<i>Lasiurus blossevillii</i>
58	127/23	19/03	Botucatu	<i>Molossus molosssus</i>
59	129/23	23/03	Botucatu	<i>Eumops glaucinus</i>
60	135/23	28/03	Botucatu	<i>Eumops perotis</i>
61	136/23	29/03	Botucatu	<i>Molossus molosssus</i>
62	138/23	03/04	Botucatu	<i>Molossus molosssus</i>
63	140/23	06/04	Botucatu	<i>Eumops glaucinus</i>
64	153/23	17/04	Botucatu	<i>Eumops glaucinus</i>
65	154/23	19/04	Botucatu	<i>Molossus rufus</i>
66	155/23	24/04	Botucatu	<i>Molossus molosssus</i>
67	163/23	27/04	Botucatu	<i>Glossophaga soricina</i>
68	165/23	02/05	Botucatu	<i>Tarida brasiliensis</i>
69	166/23	02/05	Botucatu	<i>Molossus molosssus</i>
70	167/23	04/05	Botucatu	<i>Molossus molosssus</i>
71	177/23	15/05	Botucatu	<i>Sturnira lilium</i>
72	188/23	29/05	Botucatu	<i>Platyrrhinus lineatus</i>
73	189/23	29/05	Botucatu	<i>Glossophaga soricina</i>
74	192/23	31/05	Botucatu	<i>Myotis nigricans</i>
75	194/23	02/06	Botucatu	<i>Glossophaga soricina</i>
76	198/23	11/06	Botucatu	<i>Eumops sp.</i>
77	200/23	12/06	Botucatu	<i>Artibeus lituratus</i>
78	206/23	15/06	Botucatu	<i>Molossus rufus</i>
79	209/23	17/06	Botucatu	<i>Anoura geoffroyi</i>
80	211/23	21/06	Botucatu	<i>Artibeus lituratus</i>
81	212/23	21/06	Botucatu	<i>Glossophaga soricina</i>
82	216/23	27/06	Botucatu	<i>Molossus molosssus</i>
83	217/23	27/06	Botucatu	<i>Eumops auripendulus</i>
84	219/23	28/06	Botucatu	<i>Molossus rufus</i>
85	220/23	28/06	Botucatu	<i>Eumops perotis</i>
86	225/23	03/07	Botucatu	<i>Eumops auripendulus</i>
87	228/23	05/07	Botucatu	<i>Molossus rufus</i>
88	229/23	06/07	Botucatu	<i>Molossus molosssus</i>
89	230/23	06/07	Botucatu	<i>Molossus molosssus</i>
90	234/23	10/07	Botucatu	<i>Molossus molosssus</i>
91	235/23	10/07	Botucatu	<i>Molossus molosssus</i>

92	239/23	12/07	Botucatu	<i>Molossus molosssus</i>
93	240/23	13/07	Botucatu	<i>Molossus molosssus</i>
94	241/23	13/07	Botucatu	<i>Molossus molosssus</i>
95	248/23	13/07	Botucatu	<i>Molossus molosssus</i>
96	249/23	13/07	Botucatu	<i>Molossus molosssus</i>
97	251/23	13/07	Botucatu	<i>Eumops glaucinus</i>
98	252/23	13/07	Botucatu	<i>Lasiurus blossevillii</i>
99	253/23	13/07	Botucatu	<i>Molossus molosssus</i>
100	255/23	13/07	Botucatu	<i>Molossus molosssus</i>