

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo deste documento será disponibilizado somente a partir de 20/07/2028.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**INVESTIGAÇÃO MOLECULAR DE CORONAVÍRUS E
LEPTOSPIRA SPP. EM QUIRÓPTEROS DA REGIÃO
NOROESTE DO ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL**

RAQUEL CUBA GASPAR

Botucatu/SP
Julho - 2026

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**INVESTIGAÇÃO MOLECULAR DE CORONAVÍRUS E
LEPTOSPIRA SPP. EM QUIRÓPTEROS DA REGIÃO
NOROESTE DO ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL**

RAQUEL CUBA GASPAR

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, junto ao Programa de Pós-graduação em Animais Selvagens, para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Felipe Fornazari
Coorientador: Dr. Benedito Donizete Menozzi

Botucatu/SP
Julho - 2026

G249i Gaspar, Raquel Cuba
Investigação molecular de coronavírus e *Leptospira* spp. em
quirópteros da região noroeste do estado de São Paulo, Brasil / Raquel
Cuba Gaspar. -- , 2026
68 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP),
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu,
Orientador: Felipe Fornazari
Coorientador: Benedito Donizete Menozzi

1. Saúde animal. 2. Medicina veterinária. 3. Saúde única. 4.
Zoonoses. 5. Doenças infecciosas. I. Título.

MINI BIOGRAFIA DO AUTOR

Raquel Cuba Gaspar é médica veterinária graduada pela Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (FMVZ/UNESP), campus de Botucatu, com conclusão em 2019. Após a graduação, concluiu a Residência em Zoonoses e Saúde Pública (2022–2024) pela mesma instituição com financiamento do Ministério da Educação (MEC) e iniciou em 2024 o Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Animais Selvagens da UNESP, com bolsa CAPES.

Desde a graduação, demonstrou engajamento com a pesquisa e a extensão universitária. Participou da gestão do Grupo de Estudo em Animais Selvagens (GEAS) e do Grupo de Estudo em Zoonoses e Saúde Pública (GEZOSP); desenvolveu iniciação científica intitulada “Pesquisa de presença de líquido livre celomático em jabutis piranga (*Chelonoidis carbonaria*) hígidos por meio do exame ultrassonográfico”, como bolsista FAPESP; e integrou voluntariamente projetos de educação em saúde junto à comunidade, com foco em parasitoses e zoonoses diversas.

Sua produção científica concentra-se em zoonoses, epidemiologia, saúde única e biologia de quirópteros, com contribuições em diagnóstico sorológico e molecular. Conta com cinco artigos publicados em periódicos nacionais e internacionais indexados, 20 resumos publicados em anais de congresso no Brasil e exterior, dez apresentações em eventos científicos, e organização de sete eventos acadêmicos locais e regionais. Realizou um estágio de docência durante o mestrado, na disciplina de “Epidemiologia e Bioestatística”.

Atualmente, integra a Coordenação de Eventos da Associação Mulheres na Quiropterologia (MnQ). Por fim, possui participação em três artigos submetidos que estão aguardando aceite de publicação.

Nome da autora: **Raquel Cuba Gaspar**

TÍTULO: INVESTIGAÇÃO MOLECULAR DE CORONAVÍRUS E *LEPTOSPIRA* SPP. EM QUIRÓPTEROS DA REGIÃO NOROESTE DO ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL

COMISSÃO EXAMINADORA

Orientador

Prof. Ass. Dr. Felipe Fornazari

Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva

FMVZ – UNESP – Botucatu

Titular 1

Dr. Luiz Gustavo Bentim Góes

Laboratório de Eco-epidemiologia, Diversidade e Evolução de Vírus Emergentes

Institut Pasteur de São Paulo – USP – São Paulo

Titular 2

Dr^a. Jacqueline Kazue Kurissio

Instituto de Biotecnologia

UNESP – Botucatu

Suplente 1

Prof^a. Dr^a. Emanoelli Aparecida Rodrigues dos Santos

Departamento de Biociências

UFPR - Palotina

Suplente 2

Dr^a. Gismelli Cristiane Angeluci

Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva

FMVZ – UNESP – Botucatu

Data da Qualificação: 20 de julho de 2026.

AGRADECIMENTOS

À **Larissa Araujo**, minha noiva, que presenciou diariamente cada etapa dessa jornada. Sou eternamente grata pela paciência e pelo amor, que nos ajudaram a superar os muitos momentos de cansaço e ausência. Este trabalho tem um pouco de você em cada página.

À **Isabel Cuba**, minha irmã, pela cumplicidade desde o ventre, antecedendo tudo o que eu conquistei até hoje. As gargalhadas que você promoveu levantaram meu astral em situações muito oportunas. Obrigada pela presença constante, mesmo à distância.

Ao **Loui**, o filho idosinho de quatro patas que chegou na minha vida antes de eu decidir ser veterinária. Companheiro que me ajudou a colocar a cabeça no lugar muitas vezes e me fez valorizar mais ainda um simples passeio no fim da tarde.

À **Família Soares-Araújo** (Margarete, Ivo e Hellen), sem esquecer do **Spike**, pelo acolhimento que me fez sentir em casa quando eu precisava exatamente disso. Vocês me dão muito mais do que eu jamais conseguirei retribuir.

À **Victoria Braga, Jhulia Abreu, Gismelli Angeluci e Eduarda Brasilio**, pelos cafés que salvaram tardes impossíveis, e pelas risadas que, com muita frequência, foram o melhor motivador durante todo esse processo. Que sorte ter vocês por perto.

À **Nycolas Ribeiro, Kátia Jaggi e Anna Pizzaia**, pela companhia dentro e fora do laboratório. Compartilhar os dias com vocês tornou o processo menos solitário e, em vários sentidos, mais possível.

Ao **Paulo César Eliam** e à **Bruna Devidé**, pelos desabafos acolhidos e pelos ensinamentos práticos que me fizeram uma pessoa substancialmente menos aflita, mais confiante e otimista ao enfrentar todos os desafios de se trabalhar com RNA.

Ao **IBTEC**, por me permitir acompanhar a rotina de diagnóstico de vírus respiratórios. Em especial à **Larissa Baldo**, pela disponibilidade generosa para plantões de dúvidas. Contar com vocês nas etapas iniciais do projeto foi um privilégio real.

Ao **Luiz Gustavo Bentim Góes** e à **Gabrielle Rocha**, do **Institut Pasteur de São Paulo**, pelo suporte técnico na realização das análises. A colaboração de vocês foi essencial, e a dedicação com que foram conduzindo cada etapa ficará registrada com muito carinho.

Ao **Prof. Dr. Felipe Fornazari**, por ter aceitado o desafio dessa orientação. Orientar não é tarefa simples; orientar *esta* dissertação, com tudo que ela implicou, exigiu algo a mais. Obrigada pela confiança no projeto e em mim.

Ao **Dr. Benedito Menozzi**, por estar sempre com a porta e a mente abertas. Saber que havia um lugar para chegar quando as dúvidas ou as dificuldades batiam foi um amparo que não deve ser subestimado.

À **Prof^a. Dr^a. Márcia Marinho** do **Laboratório de Raiva** da FMVA/UNESP, por disponibilizar as amostras que possibilitou essa pesquisa, e ao **Serviço de Diagnóstico de Zoonoses** (FMVZ/UNESP), pela estrutura e pelos insumos para o processamento das amostras.

À **Comissão de Ética no Uso de Animais** (CEUA) da FMVZ/UNESP, pela aprovação do projeto, sem a qual nada aqui teria sido possível.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior** (CAPES), pela concessão da bolsa que viabilizou a realização desta pesquisa. Em um país que precisa defender a ciência todos os dias, o fomento público à pós-graduação é insubstituível.

Por fim, a todos alunos, estagiários, residentes, pós-graduandos, funcionários de serviços gerais, servidores e docentes que fizeram parte da minha rotina, seja por facilitarem a resolução de burocracias ou por ampliarem meus horizontes, constantemente me fazendo lembrar que existe um mundo inteiro e uma vida para além do currículo Lattes e do JCR.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Municípios de origem dos quirópteros encaminhados ao Laboratório de Raiva da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba (FMVA/UNESP), evidenciando as Regiões Geográficas Intermediárias e os biomas predominantes. 13

FIGURA 2. Resultado da nested PCR para coronavírus, demonstrado através de gel de agarose 1,5%. 14

FIGURA 3. Resultados da qPCR para *Leptospira* spp. A) Curva de amplificação das amostras de RF-001 a RF-050, com adição de controles positivo e negativo; B) Curva de amplificação das amostras de RF-051 a RF-098; C) Curva de dissociação do controle positivo evidenciada no primeiro lote de amostras; D) Curva de dissociação do controle positivo evidenciada no segundo lote de amostras. 15

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Distribuição e abundância de espécies de morcegos por município no Noroeste Paulista, 2019 a 2024.....	12
---	----

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1. Caracterização biológica e procedência das amostras de quirópteros encaminhados ao Laboratório de Raiva da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba (FMVA/UNESP), entre 2019 e 2024.	7
QUADRO 2. Sequência dos primers utilizados para detecção de Coronavírus.	9
QUADRO 3. Ciclagem empregada para a técnica de nested-PCR.	9
QUADRO 4. Sequência dos primers utilizados para detecção de <i>Leptospira</i> spp.	11
QUADRO 5. Ciclagem empregada na qPCR para os primers Lep1 e Lep2.	11

LISTA DE ABREVIATURAS

α-CoV	Alphacoronavirus
β-CoV	Betacoronavirus
δ-CoV	Deltacoronavirus
γ-CoV	Gammacoronavirus
μL	Microlitro
bp	Base pair (pares de base)
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CoV	Coronavírus
Covid-19	<i>Coronavirus Disease 2019</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
MERS-CoV	<i>Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus</i> (Coronavírus da Síndrome Respiratória do Oriente Médio)
n-PCR	Nested PCR
ONU	Organização das Nações Unidas
PCR	Polymerase chain reaction (Reação em cadeia da polimerase)
qPCR	Quantitative PCR/Quantitative real-time PCR (PCR em tempo real quantitativo)
RNA	Ácido ribonucleico
Rdrp	RNA- <i>dependent</i> RNA <i>polymerase</i> (RNA polimerase dependente de RNA)
SARS-CoV	<i>Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus</i> (Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave)
SARS-CoV-2	<i>Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2</i> (Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave 2)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	6
4.1. Aspectos éticos	6
4.2. Coleta de amostras	6
4.3. Detecção e caracterização de coronavírus	8
4.3.1. Extração de material genético	8
4.3.2. Reação de transcrição reversa (RT).....	9
4.3.3. Reação em cadeia da polimerase	9
4.3.4. Eletroforese.....	10
4.4. Detecção e caracterização de <i>Leptospira</i> spp.	10
4.4.1. Extração de material genético	10
4.4.2. Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR).....	10
4.5. Análise de dados	11
5. RESULTADOS	11
6. DISCUSSÃO	15
7. CONCLUSÃO.....	21
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22
9. TRABALHO CIENTÍFICO	29
10. ANEXO.....	52

RESUMO

A emergência de doenças zoonóticas destaca a necessidade de monitoramento constante da fauna silvestre, especialmente de quirópteros, reservatórios naturais de diversos patógenos. Este estudo objetivou investigar a presença de Coronavírus (CoV) em morcegos da região noroeste do Estado de São Paulo, encaminhados ao Laboratório de Raiva da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba (FMVA/UNESP) entre 2019 e 2024. Foram analisados 98 espécimes de 18 espécies distribuídas em três famílias (Molossidae, Phyllostomidae e Vespertilionidae), provenientes de oito municípios da Região Geográfica Intermediária de Araçatuba, com predomínio de Molossidae (85,7%), de machos (64,3%) e de adultos (96,9%). A detecção de CoV, por nested RT-PCR direcionada ao gene RdRp, não revelou amplificação em nenhuma das 97 amostras intestinais processadas. Adicionalmente, a investigação de *Leptospira* spp. em tecido renal, por qPCR direcionada ao gene 16S rRNA, também resultou negativa em todas as 94 amostras. Esses resultados não devem, contudo, ser interpretados como evidência de ausência de circulação desses agentes na quiropterofauna regional, uma vez que a concentração amostral no município de Araçatuba e a subamostragem de filostomídeos, família mais associada à circulação de CoV no país, limitam a representatividade da amostra. O projeto alinha-se aos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) 3 e 15 da Agenda 2030 da ONU, fortalecendo a capacidade de alerta precoce para riscos de saúde e promovendo a conservação da biodiversidade como barreira contra o *spillover*. A vigilância contínua de patógenos emergentes, aliada à ampliação do esforço amostral na região, é essencial para a segurança sanitária e a preservação do equilíbrio ecossistêmico.

Palavras-chave: ecologia de patógenos, vigilância, Saúde Única, zoonoses, ODS 3, ODS 15.

ABSTRACT

The emergence of zoonotic diseases highlights the need for constant monitoring of wildlife, especially bats, which are natural reservoirs of various pathogens. This study aimed to investigate the presence of coronaviruses (CoV) in bats from the northwestern region of the state of São Paulo, submitted to the Rabies Laboratory at the Araçatuba School of Veterinary Medicine (FMVA/UNESP) between 2019 and 2024. A total of 98 specimens from 18 species belonging to three families (Molossidae, Phyllostomidae, and Vespertilionidae) were analyzed. These specimens were collected from eight municipalities in the Araçatuba Intermediate Geographic Region, with a predominance of Molossidae (85.7%), males (64.3%), and adults (96.9%). Detection of CoV via nested RT-PCR targeting the RdRp gene revealed no amplification in any of the 97 processed intestinal samples. Additionally, testing for *Leptospira* spp. in renal tissue via qPCR targeting the 16S rRNA gene also yielded negative results in all 94 samples. These results should not, however, be interpreted as evidence of the absence of these agents in the regional chiropteroфаuna, since the sampling concentration in the municipality of Araçatuba and the under-sampling of Phyllostomidae, the family most closely associated with CoV circulation in the country, limit the representativeness of the sample. The project aligns with Sustainable Development Goals (SDGs) 3 and 15 of the UN 2030 Agenda, strengthening early warning capabilities for health risks and promoting biodiversity conservation as a barrier against spillover. Continuous surveillance of emerging pathogens, combined with expanded sampling efforts in the region, is essential for public health and the preservation of ecosystem balance.

Keywords: pathogen ecology, surveillance, One Health, zoonoses, ODS 3, ODS 15.

IMPACTO CIENTÍFICO GERADO

Este estudo insere-se em um campo de crescente relevância global: a vigilância de patógenos zoonóticos em fauna silvestre. A pesquisa propõe a padronização de protocolos diagnósticos para detecção de Coronavírus (CoV) e para um laboratório de referência e segue com o diagnóstico de *Leptospira* spp. em tecidos de morcegos. Embora os resultados tenham sido negativos para ambos os agentes, seu impacto científico, social e tecnológico é expressivo e multidimensional.

Do ponto de vista científico, a dissertação preenche uma lacuna geográfica relevante na literatura nacional. Os últimos dados publicados sobre CoV em morcegos na Região Geográfica Intermediária de Araçatuba datavam de mais de cinco anos, período em que novas espécies e linhagens foram descritas em diferentes biomas brasileiros. A negatividade das 98 amostras constitui dado epidemiológico robusto. Resultados negativos validados metodologicamente são fundamentais para identificar áreas de manutenção viral, orientar esforços amostrais futuros e aprimorar modelos de risco de spillover. Adicionalmente, o estudo registra 18 espécies de quirópteros em oito municípios, com predominância de Molossidae em ambiente urbano, contribuindo para o conhecimento da diversidade e ecologia da fauna local. A ausência de detecção de *Leptospira* spp. em tecido renal sugere baixa prevalência regional, dado relevante para a epidemiologia de uma zoonose frequentemente subestimada em populações de morcegos.

Ao monitorar a circulação de agentes como CoV e *Leptospira* spp. em populações silvestres urbanas, o estudo fortalece os sistemas de alerta precoce para emergências sanitárias, em consonância com a meta 3.d dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS 3 – Saúde e Bem-Estar) da Agenda 2030 da ONU. Ao mesmo tempo, demonstrando que morcegos urbanos convivem com populações humanas sem evidência atual de circulação dos patógenos investigados, a pesquisa contribui para desconstruir narrativas estigmatizantes sobre esses animais, promovendo sua conservação como componente essencial do equilíbrio ecossistêmico — alinhando-se ao ODS 15 (Vida Terrestre). Levando em consideração o papel ecológico dos morcegos em diversos nichos, promover sua proteção é, portanto, uma questão tanto ambiental quanto de segurança alimentar.

No plano tecnológico, a dissertação avança na padronização de protocolos moleculares para vírus de RNA em tecidos de quirópteros no contexto laboratorial da FMVZ/UNESP, identificando limitações técnicas e propondo caminhos de otimização — como a revisão de primers pan-CoV e a priorização de amostras intestinais. A validação cruzada com laboratório parceiro agrega camada de rigor metodológico incomum em estudos de vigilância de conveniência. Esse conjunto de protocolos testados e documentados representa infraestrutura técnica reproduzível para futuros estudos de vigilância de patógenos emergentes na região, com potencial de replicação em outros laboratórios de referência em raiva animal no Brasil.

1. INTRODUÇÃO

Os morcegos (Chiroptera, Mammalia) representam cerca de 20% da mastofauna global, com 1500 espécies registradas (SIMMONS; CIRRANELLO, 2025), e estão presentes em todos os continentes, com exceção da Antártida. No Brasil ocorrem 188 espécies distribuídas em 68 gêneros e nove famílias, sendo que o estado de São Paulo abriga aproximadamente 45% dessa diversidade (ABREU *et al.*, 2025).

Sua capacidade de voo verdadeiro, associada a um metabolismo elevado, alta taxa de replicação celular e temperatura corporal que ultrapassa 40°C durante o voo, cria condições fisiológicas únicas que podem ter favorecido a coevolução com uma diversidade ímpar de patógenos (BROOK; DOBSON, 2015). Além de vírus, morcegos podem hospedar também bactérias, fungos e protozoários (NUNES *et al.*, 2017; CASTELO-BRANCO *et al.*, 2023), muitos deles reconhecidos como causadores de doenças tropicais negligenciadas (DTNs), afetando desproporcionalmente populações em condições de vulnerabilidade socioeconômica (HOTEZ *et al.*, 2020).

A despeito de sua relevância ecológica, os quirópteros são reconhecidos como reservatórios naturais de uma ampla gama de patógenos com potencial zoonótico (LI *et al.*, 2005), dentre os quais os Coronavírus (CoV) da subfamília Orthocoronavirinae ocupam posição de destaque. Uma grande variedade de novos subtipos virais de CoV foram associados a este grupo animal, dentre os mais de 200 vírus detectados ou isolados (MORATELLI; CALISHER, 2015).

A subfamília *Orthocoronavirinae* (família *Coronaviridae*) divide-se em quatro gêneros: *Alphacoronavirus* (α -CoV), *Betacoronavirus* (β -CoV), *Deltacoronavirus* (δ -CoV) e *Gammacoronavirus* (γ -CoV) (WOO *et al.*, 2023).

Desmodus rotundus (*D. rotundus*) foi a primeira espécie de morcego relatada albergando CoV no Brasil, com registros iniciais no estado de São Paulo (BRANDÃO *et al.*, 2008). Na ocasião, identificou-se apenas a infecção pelo gênero β -CoV; contudo, anos depois, Asano *et al.* (2016) detectaram também α -CoV em *D. rotundus* na mesma região.

Devido aos recentes eventos de emergência em saúde pública envolvendo os CoV, pesquisas a respeito do papel dos morcegos na cadeia de transmissão viral

intensificaram-se no mundo todo (WEBER; DA SILVA, 2024). No Brasil, a prevalência de CoV em morcegos varia entre 0 e 17,2%, tendo sido identificada em pelo menos 29 espécies da quiropterofauna estudada, com predomínio dos relatos envolvendo o gênero α -CoV (VIOLET-LOZANO *et al.*, 2023; FIGUEIROA *et al.*, 2025; MOLINA *et al.*, 2025).

Quanto à metodologia de detecção, o diagnóstico de CoV em morcegos é comumente realizado por reação em cadeia da polimerase (PCR), com foco no gene da RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) (XIU *et al.*, 2020; COHEN *et al.*, 2023). Embora amostras intestinais, fecais ou retais apresentem maior efetividade na detecção do vírus (COHEN *et al.*, 2023), CoV também já foi isolado em tecidos pulmonares e hepáticos de morcegos (BITTAR *et al.*, 2020).

São poucos os estudos recentes que identificaram a infecção de morcegos por CoV no Brasil, especialmente no estado de São Paulo. A região noroeste do estado tem baixa representatividade considerando os municípios já amostrados. As últimas investigações na região ocorreram há mais de cinco anos (GÓES *et al.*, 2013; GÓES *et al.*, 2016; BITTAR *et al.*, 2020), e demonstraram prevalência crescente. Portanto, a continuidade das atividades de monitoramento é crucial para ampliar o conhecimento sobre a ecologia viral, entre outros patógenos, em morcegos na região. Esse trabalho tem o potencial de identificar novas cepas de CoV, bem como esclarecer a relação epidemiológica de quirópteros e agentes etiológicos de doenças negligenciadas, contribuindo significativamente para a vigilância e a prevenção de doenças emergentes.

A investigação da circulação de agentes zoonóticos em quirópteros alinha-se diretamente ao Objetivo de Desenvolvimento Sustentável 3 (Saúde e Bem-Estar) da Agenda 2030 da ONU, especificamente no que tange à meta 3.d. A padronização de protocolos diagnósticos para CoV e o monitoramento de infecção por *Leptospira* spp. em populações silvestres fornecem informações essenciais para a identificação de áreas de risco e pode ajudar a prever eventos de transbordamento (*spillover*). Ademais, ao promover o conhecimento sobre a fauna silvestre sem comprometer seu papel ecológico, a pesquisa corrobora o ODS 15 (Vida Terrestre), enfatizando que a conservação da biodiversidade e o equilíbrio dos ecossistemas são barreiras naturais cruciais contra a emergência de novas epidemias. Neste contexto, entende-se que não é possível alcançar o bem-estar sem garantir a proteção dos ecossistemas.

ZEPPELINI, 2025). Assim, mesmo diante de um resultado negativo, a presente pesquisa amplia a cobertura geográfica nacional ao fornecer dados inéditos sobre uma região do interior paulista até então não amostrada, contribuindo para o delineamento mais preciso da distribuição espacial da leptospirose em quirópteros brasileiros.

Diante do exposto, os achados deste estudo reforçam as recomendações propostas por Braga e Zeppelini (2025) quanto à necessidade de padronização metodológica nos estudos de *Leptospira* em morcegos brasileiros, incluindo a associação de técnicas moleculares e sorológicas, a utilização de múltiplos tecidos biológicos e o detalhamento do esforço amostral e da procedência dos animais. A ampliação futura da investigação para incluir soro sanguíneo, urina e genes-alvo adicionais, como lipL32 e secY, poderá contribuir para elucidar de forma mais robusta o real papel da quiropterofauna do interior paulista na epidemiologia da leptospirose.

Em síntese, a leitura conjunta dos achados regionais e nacionais indica que as limitações identificadas no presente estudo — concentração geográfica das amostras, subamostragem de Phyllostomidae, amostragem de conveniência sem repetição sistemática e emprego de um único tipo tecidual para triagem molecular de CoV — são compartilhadas por parte significativa da literatura brasileira sobre CoV e *Leptospira* spp. em morcegos, mas também podem ser mitigadas por ajustes metodológicos já validados por outros grupos de pesquisa, como o uso de swabs orais e retais, amostras fecais agrupadas, triagem de múltiplos tecidos por espécime e desenhos de captura ativa e longitudinal. A incorporação progressiva dessas estratégias nos próximos estudos, associada à ampliação do número de municípios amostrados na Região Geográfica Intermediária de Araçatuba, deverá fortalecer a capacidade do estudo de detectar e caracterizar a real circulação desses patógenos na quiropterofauna do noroeste paulista.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABREU, E. F. *et al.* **Lista de Mamíferos do Brasil (2025-1)**. 2025. Disponível em: <<https://doi.org/10.5281/zenodo.18378485>>. Acesso em: 28/01/2026.
2. AFELT, A. *et al.* **Bats, Bat-Borne Viruses, and Environmental Changes**. In: BATS. London: Intechopen, 2018. Cap. 8. p. 113-132.
3. ALVES, R. S. *et al.* Detection of coronavirus in vampire bats (*Desmodus rotundus*) in southern Brazil. **Transboundary and Emerging Diseases**, [S.l.], v. 69, n. 4, p. 2384-2389, 2021. DOI: 10.1111/tbed.14150.
4. ASANO, K. M. *et al.* *Alphacoronavirus* in urban Molossidae and Phyllostomidae bats, Brazil. **Virology Journal**, v. 13, n. 110, p. 1-5, jun. 2016. DOI: 10.1186/s12985-016-0569-4.
5. BANERJEE, A. *et al.* Bats and Coronaviruses. **Viruses**, v. 11, n. 41, p. 1-15, jan. 2019. DOI: 10.3390/v11010041.
6. BATISTA, J. M. N. *et al.* Serological and molecular investigation of *Leptospira* spp. in bats (Chiroptera, Mammalia) from Brazil. **Microbial Pathogenesis**, v. 198, p. 1-5, jan. 2025. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2024.107117>.
7. BERNARD, E. Species list of bats (Mammalia, Chiroptera) of Santarém area, Pará State, Brazil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 18, n. 2, p. 455-463, 2001.
8. BITTAR, C. *et al.* *Alphacoronavirus* Detection in Lungs, Liver, and Intestines of Bats from Brazil. **Microbiology Ecology**, v. 79, p. 203-212, mai. 2020. DOI: 10.1007/s00248-019-01391-x.

9. BOVENDORP, R. *et al.* Landscape Composition and Forest Structure Shape Phyllostomid Bat Assemblages in the Atlantic Forest Remnants. **Animals**, [S.L.], v. 15, n. 14, p. 2082, 15 jul. 2025. DOI: 10.3390/ani15142082.
10. BRAGA, C. S.; ZEPPELINI, C. G. *Leptospira* in Brazilian Bats (Mammalia: Chiroptera). **Veterinary Medicine and Science**, [s.l.], v. 11, n. 6, set. 2025.
11. BRANDÃO, P. E. *et al.* A coronavirus detected in the vampire bat *Desmodus rotundus*. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 12, n. 6, p. 466-468, dez. 2008. DOI: 10.1590/s1413-86702008000600003.
12. BRITO, J. E. C. *et al.* Bats (Mammalia: Chiroptera) in urban–rural interfaces: community structure associated with pathogen screening in São Paulo—the largest metropolitan region in Brazil. **Veterinary Research Communications**, [s. l.], v. 47, n. 3, p. 1575–1600, mai. 2023. DOI: 10.1007/s11259-023-10112-2
13. BRUSSEL, K.V.; HOLMES, E.C. Zoonotic disease and virome diversity in bats. **Current Opinion in Virology**, [S.L.], v. 52, p. 192-202, fev. 2022. DOI: 10.1016/j.coviro.2021.12.008.
14. BROOK, C.E.; DOBSON, A.P. Bats as ‘special’ reservoirs for emerging zoonotic pathogens. **Trends in Microbiology**, [s. l.], v. 23, n. 3, p. 172–180, mar, 2015. DOI: 10.1016/j.tim.2014.12.004.
15. BUENO, L. M. *et al.* High genetic diversity of alphacoronaviruses in bat species (Mammalia: Chiroptera) from the Atlantic Forest in Brazil. **Transboundary and Emerging Diseases**, [S.L.], v. 69, n. 5, p. 2863-2875, jul. 2022. DOI: 10.1111/tbed.14636.
16. CASTELO-BRANCO, D. S. C. M.; NOBRE, J. A.; SOUZA, P. R. H. *et al.* Role of Brazilian bats in the epidemiological cycle of potentially zoonotic pathogens. **Microbial Pathogenesis**, [S.L.], v. 177, p. 106032-106048, abr. 2023. DOI: 10.1016/j.micpath.2023.106032.
17. CHU, D. K. W. LEUNG, C. Y., GILBERT, M. *et al.* Avian coronavirus in wild aquatic birds. **Journal of virology**, v. 85, n. 23, p. 12815–12820. <https://doi.org/10.1128/JVI.05838-11>
18. COHEN, L. E. *et al.* Coronavirus sampling and surveillance in bats from 1996–2019: a systematic review and meta-analysis. **Nature Microbiology**, v. 8, p. 1176-1186, mai. 2023. DOI: 10.1038/s41564-023-01375-1.

19. COSENTINO, M. A. C. *et al.* Coronavirus Detection in Bats Captured on the Deforestation Arc of Mato Grosso, Brazil. **Zoonoses And Public Health**, [S.L.], p. 1-7, 16 fev. 2026. DOI: 10.1111/zph.70041.
20. DA SILVA JUNIOR, L. C. *et al.* Cross-Species Surveillance of Respiratory Viruses in Domestic and Wild Mammals of an Urban Atlantic Forest from Brazil. **Ecohealth**, [S.L.], v. 22, n. 1, p. 11-28, fev. 2025. DOI: 10.1007/s10393-024-01691-w.
21. DA PAZ, G. S. *et al.* Infection by *Histoplasma capsulatum*, *Cryptococcus* spp. and *Paracoccidioides brasiliensis* in bats collected in urban areas. **Transboundary and Emerging Diseases**, [s. l.], v.65, n. 6, p. 1797–1805, set. 2018. DOI: 10.1111/tbed.12955
22. DA SILVA JUNIOR, L. C. *et al.* Cross-Species Surveillance of Respiratory Viruses in Domestic and Wild Mammals of an Urban Atlantic Forest from Brazil. **Ecohealth**, [S.L.], v. 22, n. 1, p. 11-28, fev. 2025. DOI: 10.1007/s10393-024-01691-w
23. DE FRANÇA, D. A. *et al.* *Bartonella* spp., *Coxiella burnetii* and *Rickettsia rickettsii* in urban bats: molecular investigation of neglected zoonoses in brazil. **Brazilian Journal Of Microbiology**, [S.L.], v. 56, n. 2, p. 1371-1380, mar. 2025. DOI: 10.1007/s42770-025-01660-7.(a)
24. DE FRANÇA, D. A. *et al.* Rabies virus, *Bartonella koehlerae* and *Leishmania infantum* coinfection in a black *Myotis* (*Myotis nigricans*) from southeastern Brazil. **Veterinary Research Communications**, [S.L.], v. 49, n. 3, p. 1-7, 14 abr. 2025. DOI: 10.1007/s11259-025-10736-6.(b)
25. DI AZEVEDO, M. I. N. *et al.* Genetic Evidence for a Potentially New Pathogenic *Leptospira* sp. Circulating in Bats from Brazilian Amazon. **Transboundary and Emerging Diseases**, [S.l.], v. 2023, p. 9677047, 2023. DOI: 10.1155/2023/9677047.
26. DIAS, R. A. *et al.* Spatiotemporal distribution of a non-haematophagous bat community and rabies virus circulation: a proposal for urban rabies surveillance in Brazil. **Epidemiology and Infection**, [s. l.], v. 147, p. 1-17, 2019. DOI: 10.1017/S0950268818003229
27. DIETRICH, M. *et al.* *Leptospira* and paramyxovirus infection dynamics in a bat maternity enlightens pathogen maintenance in wildlife. **Environmental**

- Microbiology**, [S.L.], v. 17, n. 11, p. 4280-4289, fev. 2015. DOI: 10.1111/1462-2920.12766.(a)
28. DIETRICH, Muriel; MÜHLDOERFER, Kristin; TORTOSA, Pablo; MARKOTTER, Wanda. *Leptospira* and Bats: story of an emerging friendship. **Plos Pathogens**, [S.L.], v. 11, n. 11, p. 1005176, nov. 2015. DOI: 10.1371/journal.ppat.1005176.(b)
 29. ESTRADA-VILLEGAS, S. *et al.* Climate, habitat, and species interactions at different scales determine the structure of a Neotropical bat community. *Ecology*, [s.l.], v. 93, n. 5, p. 1183-1193, 2012. DOI: 10.2307/23213512
 30. FARIA, D. Phyllostomid bats of a fragmented landscape in the north-eastern Atlantic forest, Brazil. **Journal Of Tropical Ecology**, [S.L.], v. 22, n. 5, p. 531-542, jul. 2006. DOI: 10.1017/s0266467406003385.
 31. FERREIRA, A. C. R. *et al.* Cross-sectional study on *Brucella* spp., *Leptospira* spp. and *Salmonella* spp. in bats from Montes Claros, Minas Gerais, Brazil. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, [S.l.], v. 78, p. 101692, 2021. DOI: 10.1016/j.cimid.2021.101692.
 32. FIGUEIROA, T. *et al.* Alpha and Betacoronavirus Detection in Neotropical Bats from Northeast Brazil Suggests Wide Geographical Distribution and Persistence in Natural Populations. **Animals**, [S.L.], v. 15, n. 332, p. 1-18, jan. 2025. DOI: 10.3390/ani15030332.
 33. GÓES, L. G. B. *et al.* Novel bat coronaviruses, Brazil and Mexico. **Emerging Infectious Diseases**, v. 19, n. 10, p. 1711-1713, out. 2013. DOI: 10.3201/eid1910.130525.
 34. GÓES, L. G. B. *et al.* Genetic diversity of bats coronaviruses in the Atlantic Forest hotspot biome, Brazil. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 44, p. 510–513, out. 2016. DOI: 10.1016/j.meegid.2016.07.034.
 35. HOTEZ, P. J. *et al.* What constitutes a neglected tropical disease? **Plos Neglected Tropical Diseases**, [S.L.], v. 14, n. 1, p. 1-6, 30 jan. 2020. DOI: 10.1371/journal.pntd.0008001.
 36. JUNG, K.; THRELFALL, C.G. Trait-dependent tolerance of bats to urbanization: a global meta-analysis. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, [s. l.], v. 285, n. 1885, p. 1-9, ago. 2018. DOI: 10.1098/rspb.2018.1222.

37. KASSO, M.; BALAKRISHNAN, M. Ecological and Economic Importance of Bats (Order Chiroptera). **ISRN Biodiversity**, [s. l.], v. 2013, p. 1–9, nov. 2013. DOI: 10.1155/2013/187415.
38. KELM, D.H.; TOELCH, U.; JONES, M.M. Mixed-species groups in bats: non-random roost associations and roost selection in neotropical understory bats. **Frontiers in Zoology**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 1-12, out. 2021. DOI: 10.1186/s12983-021-00437-6
39. LI, W. *et al.* Bats Are Natural Reservoirs of SARS-Like Coronaviruses. **Science**, v. 310, n. 5748, p. 676-679, out. 2005. DOI: 10.1126/science.1118391.
40. LIMA, F. E. S. *et al.* 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, mar. 2013. DOI: 10.1007/s11262-013-0899-x.
41. LIU, D. X. *et al.* Human Coronavirus-229E, -OC43, -NL63, and -HKU1 (*Coronaviridae*). **Encyclopedia of Virology**, v. 2, p. 428-440, mar. 2021. DOI: 10.1016/B978-0-12-809633-8.21501-X.
42. LIU, B. *et al.* ZOVER 2.0: a virome-based platform for zoonotic and vector-borne viruses. **Nucleic Acids Research**, [S.L.], v. 54, n. 1, p. 925-931, nov. 2025. DOI: 10.1093/nar/gkaf1243.
43. MACHADO, D. M. R. *et al.* Serological and molecular investigations on *Toxoplasma gondii* and *Leptospira* spp. in bats captured in urban areas from Brazil. **Emerging Animal Species**, [S.l.], v. 9, p. 100033, 2023. DOI: 10.1016/j.eas.2023.100033.
44. MAGALHÃES, T. B. S. *et al.* First Detection of Alphacoronavirus in Bats from the World's Largest Wetland, the Pantanal, Brazil. **Pathogens**, [s.l.], v. 14, n. 1, p. 58-69, jan. 2025, DOI: 10.3390/pathogens14010058.
45. Mammal Diversity Database (MDD). (2026). Mammal Diversity Database (Version 2.4) [Data set]. Zenodo. DOI: 10.5281/zenodo.17033774
46. MAYER, F. Q. *et al.* Pathogenic *Leptospira* spp. in bats: Molecular investigation in Southern Brazil. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, [S.l.], v. 52, p. 14-18, 2017. DOI: 10.1016/j.cimid.2017.05.003.

47. MENOZZI, B. D. *et al.* Rabies virus and *Histoplasma suramericanum* coinfection in a bat from southeastern Brazil. *Zoonoses and Public Health*, [s. l.], v. 67, n. 2, p. 138–147, mar. 2020. DOI: 10.1111/zph.12663.
48. MÉRIEN, F. *et al.* Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 30, n. 9, p. 2219–2224, set. 1992. DOI: 10.1128/jcm.30.9.2219-2224.1992.
49. MOLINA, C. L. *et al.* Detection of an *Alphacoronavirus* in a Brazilian Bat (*Molossus* sp.). **Journal of Molecular Evolution**, v. 93, p. 257–266, fev. 2025. DOI: 10.1007/s00239-025-10236-w.
50. MORATELLI, R.; CALISHER, C. H. Bats and zoonotic viruses: can we confidently link with emerging deadly viruses? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 1, p. 1-22, fev. 2015. DOI: 10.1590/0074-02760150048.
51. NEUWEILER, G. **The Biology of Bats**. Oxford University Press. 2000.
52. NUNES, H. *et al.* Bats in urban areas of Brazil: roosts, food resources and parasites in disturbed environments. **Urban Ecosystems**, [s. l.], v. 20, n. 4, p. 953–969, 2017.
53. REIS, N. R. *et al.* Morcegos do Brasil. Londrina: Universidade Estadual de Londrina, 2007. 256p. REIS, N. R. *et al.* 2007
54. REIS, N. R. *et al.* **História natural dos morcegos brasileiros: chave de identificação de espécies**. Rio de Janeiro: Technical Books Editora, 2017.
55. RUSSO, D.; ANCILLOTTO, L. Sensitivity of bats to urbanization: a review. **Mammalian Biology**, [s. l.], v. 80, n. 3, p. 205–212, 2015.
56. SIMMONS, N. B.; CIRRANELLO, A. L. **Batnames.org Species List Version 1.9**. 2025. Disponível em: <<https://zenodo.org/records/16937886>>. Acessado em: 19/08/2025.
57. ULSENHEIMER, B. C. *et al.* *Leptospira interrogans* in bats in Rio Grande do Sul State, Brazil: epidemiologic aspects and phylogeny. **Brazilian Journal of Microbiology**, [S.l.], v. 53, n. 4, p. 2233-2240, 2022. DOI: 10.1007/s42770-022-00838-7.
58. VERDE, R. S. *et al.* Bat-Associated Pathogenic *Leptospira* spp. from Forest Fragments in Southwestern Brazilian Amazonia. **Transboundary and Emerging Diseases**, [S.l.], v. 2024, p. 6633866, 2024. DOI: 10.1155/2024/6633866.

59. VIOLET-LOZANO, L. *et al.* No molecular evidence for influenza A virus and coronavirus in bats belonging to the families *Phyllostomidae*, *Vespertilionidae*, and *Molossidae* in the state of São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 54, p. 523–529, nov. 2023. DOI: 10.1007/s42770-022-00878-z.
60. VOIGT, C. C. *et al.* Bats and Buildings: **The Conservation of Synanthropic Bats**. In: VOIGT, C.C.; KINGSTON, T. Bats in the anthropocene: conservation of bats in a changing world. Cham: Springer International Publishing, 2016. cap. 14, p. 427–462.
61. WEBER, M. N.; DA SILVA, M. S. Corona- and Paramyxoviruses in Bats from Brazil: A Matter of Concern? **Animals**, v. 14, n. 88, p. 1-13, dez. 2024. DOI: 10.3390/ani14010088.
62. WOO, P. C. Y. *et al.* ICTV Virus Taxonomy Profile: Coronaviridae 2023. **The Journal of general virology**, [s.l.], v. 104, n. 4, abr. 2025. DOI: 10.1099/jgv.0.001843
63. XIU, L. *et al.* A RT-PCR assay for the detection of coronaviruses from four genera. **Journal of Clinical Virology**, [s.l.], v. 128, p. 1-7, abr. 2020. DOI: 10.1016/j.jv.2020.104391