

AMANDA DE OLIVEIRA VIANA

**Monitoramento de ectoparasitas e vírus em
resíduo urbano de mata atlântica**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

São Paulo

2020

AMANDA DE OLIVEIRA VIANA

**Monitoramento de Ectoparasitas e Vírus em
Resíduo Urbano de Mata Atlântica**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Edison Luiz Durigon

Coorientadora: Dra. Elizabete Captivo Lourenço

Versão corrigida. A versão original eletrônica, encontra-se disponível tanto na Biblioteca no ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo

2020

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

de Oliveira Viana, Amanda
Monitoramento de Ectoparasitas e Vírus em Resíduo Urbano de Mata Atlântica / Amanda de Oliveira Viana; orientador Edison Luiz Durigon; coorientadora Elizabete Captivo Lourenço. -- São Paulo, 2020.
60 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Vírus. 2. Coronavírus. 3. Herpesvírus. 4. Morcegos. 5. ectoparasitos. I. Luiz Durigon, Edison, orientador. II. Captivo Lourenço, Elizabete, coorientador. III. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Amanda de Oliveira Viana

Título da Dissertação: Monitoramento de Ectoparasitas e Virus em Resíduo Urbano de Mata Atlântica

Orientador: Professor Dr. Edison Luiz Durigon

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada a 28/09/2020, considerou o(a) candidato(a):

Aprovado(a) () Reprovado(a)

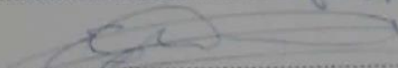
Examinador(a):

Assinatura: 

Nome: Maria Fúlgia Barbosa

Instituição: Instituto Butantan

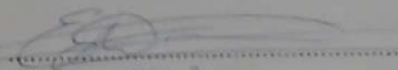
Examinador(a):

Assinatura: 

Nome: Paula Eduarda Branco

Instituição: Universidade de São Paulo

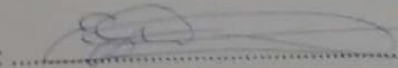
Examinador(a):

Assinatura: 

Nome: Flávia Balança Gondim de Freitas

Instituição: Universidade de São Paulo, Jiruan

Presidente:

Assinatura: 

Nome: Edison Luiz Durigon

Instituição: Universidade de São Paulo

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Monitoramento de Ectoparasitas e Vírus em Resíduo Urbano de Mata Atlântica", protocolada sob o CEUA nº 9447240918, sob a responsabilidade de **Edison Luiz Durigon e equipe; Amanda de Oliveira Viana** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo) (CEUA-ICB/USP) na reunião de 11/02/2019.

We certify that the proposal "Monitoring of ectoparasites and viruses in urban residue of Mata Atlântica", utilizing 320 Chiropter (320 females), protocol number CEUA 9447240918, under the responsibility of **Edison Luiz Durigon and team; Amanda de Oliveira Viana** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Biomedical Sciences Institute (University of São Paulo) (CEUA-ICB/USP) in the meeting of 02/11/2019.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: **36 meses**

Depto/Setor: **Microbiologia**

Origem: **Animais provenientes da natureza**

Espécie: **Quiroptero**

sexo: **Fêmeas**

Idade ou peso: **8 a 100 g**

Linhagem: **Não se aplica**

N amostral: 320

São Paulo, 11 de fevereiro de 2019



Profa. Dra. Luciane Valéria Sita
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)



Dr. Alexandre Ceroni
Vice-Cordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)

AGRADECIMENTOS

Agradeço à toda equipe do Laboratório de Virologia Clínica e Molecular pelo apoio na coleta, meu treinamento no uso do NB2, dentre tantos outros procedimentos necessários à construção dessa dissertação. Meu agradecimento especial à Carla Meneguim Barbosa, Erick Gustavo Dorlass, Luciano Matsumiya Thomazelli e Thaís Gamon por me ajudarem em momentos fundamentais. Agradeço ao meu orientador Edison Luiz Durigon por todo o apoio, orientação e por ter paciência comigo no acesso a esse campo novo que a virologia representa para mim. À minha coorientadora, Elizabete Captivo Lourenço sou grata por todas as correções e conselhos. Quando cheguei em São Paulo e estava procurando estágio e novas oportunidades, tive a sorte de encontrar como orientadora a Erika Hingst-Zaher. Ela foi uma grande incentivadora e alvez sem ela eu não tivesse entrado na virologia. Sou grata a todos vocês!

Finalmente, agradeço a Universidade do Estado de São Paulo e ao Programa de Pós Graduação Interunidades em Biotecnologia pela oportunidade de obter o título de Mestre em Biotecnologia, assim como à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**FAPESP/CAPES – Processo nº 2017/25123-9**) pela bolsa de mestrado concedida.

RESUMO

Viana, A.O. Monitoramento de Ectoparasitas e Vírus em Resíduo Urbano de Mata Atlântica. 2020. 61 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Morcegos são conhecidos como importantes reservatórios de diversos vírus com potencial emergente. Características ecológicas, hábitos gregários e mecanismos evolutivos constituem características que formam condições ideais para manutenção e transmissão do vírus para outras espécies. O objetivo do presente trabalho foi verificar a presença de herpesvírus e coronavírus em ectoparasitos e amostras de swab oral e retal de morcegos. As capturas ocorreram no Parque do Instituto Butantan entre 2017 e 2018. Quando coletadas, as amostras foram conservadas em VTM e armazenadas em ultrafreezer -70°C. Para a detecção molecular do vírus foram realizadas etapas de extração do material genético, RT PCR – no caso de vírus de RNA, PCR, NESTED-PCR, eletroforese em gel de agarose, purificação dos fragmentos amplificados, sequenciamento e análise das sequências obtidas. Obtivemos nove espécies de morcegos pertencentes a três guildas, todas as espécies já foram registradas para o Estado de São Paulo. Foram registradas cerca de 10 espécies de ectoparasitos, sendo *P. euthystrum* e *Chirnyssoides* sp. os primeiros registros para o Estado de São Paulo. Encontramos sete amostras de swab oral e retal, provenientes de 10 morcegos, positivas para herpesvírus. Os Herpesvírus, pertencentes à subfamília Alphaherpesvirinae, apresentaram prevalência de 12,5%. Embora Herpesvírus de morcegos não possuam importância emergente, estudos de herpes em morcegos são escassos. Com relação aos coronavírus, obtivemos sequências de 10 amostras, provenientes de sete quirópteros. Dentre essas amostras, nove foram de swab e um de ácaro ectoparasito de morcego. A sequência encontrada no ácaro foi semelhante à sequência encontrada no swab retal do seu hospedeiro. Observamos que geralmente o coronavírus encontrado em um morcego de determinada espécie é semelhante ao coronavírus encontrados na mesma espécie ou pertencente à mesma guilda. Levando em consideração, que o trabalho foi desenvolvido em uma região de grande concentração e circulação de pessoas, assim como a notabilidade de alguns resultados, salientamos a necessidade de um monitoramento a longo prazo dos morcegos nessa região.

PALAVRAS-CHAVE: Herpesvírus. Coronavírus. Morcegos. Ectoparasitos.

ABSTRACT

Viana, A.O. Monitoring of ectoparasites and viroses in na urban fragment of Atlantic forest. 2020. 61 f. Masters thesis (Biotecnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Bats are known as important reservoirs of several viruses with emerging potential. Ecological characteristics, gregarious habits and evolutionary mechanisms are characteristics that form ideal conditions for maintenance and transmission of the virus to other species. The aim of the present study was to verify the presence of Herpesvirus and Coronavirus in samples of oral and rectal swab bats and ectoparasite samples. The catches took place at the Instituto Butantan Park between 2017 and 2018. When collected, the samples were conserved in VTM and stored in ultra-freezer -70°C . For the molecular detection of the virus, steps were taken to extract the genetic material, RT PCR - in each RNA, PCR, NESTED-PCR virus, agarose gel electrophoresis, purification of the amplified fragments, sequencing and analysis of the obtained sequences. We obtained 9 species of bats belonging to 3 guilds, all species have already been registered for the State of São Paulo. About 10 species of ectoparasites were recorded, being *P. euthystrum* and *Chirnyssoides* sp. the first record for the state of São Paulo. We found 7 samples of oral and rectal swab, from 10 bats, positive for herpesvirus. Herpesviruses, belonging to the subfamily Alphaherpesvirinae, had a prevalence of 12.5%. Although bat herpesvirus is not of emerging importance, studies of herpes in bats are scarce. In addition, cytopathic effects have been demonstrated in Vero cells and can replicate in some human cell lines. About coronaviruses, we obtained sequences of 10 samples, from 7 chiropterans. Among these samples, 9 were from swab and 1 from ectoparasite bat mite. The sequence found in the mite was similar to the sequence found in the rectal swab of its host. We observed that usually the coronavirus found in a bat of a certain species is similar to coronas found in the same species or belonging to the same guild. Considering that the work was developed in a region of great concentration and circulation of people, as well as the remarkable results, we emphasize the need for long-term monitoring of bats in this region.

KEYWORDS: Herpesvirus. Coronavirus. Bats. Ectoparasites.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura do Herpesvírus.....	15
Figura 2: Esquema de replicação do Vírus Herpes simplex 1	17
Figura 3: Esquema geral do genoma dos Herpesvírus. a. Genoma de Herpesvírus tipo A. b. Genoma de Herpesvírus tipo B. c. Genoma de Herpesvírus tipo C. d. Genoma de Herpesvírus tipo D. e. Genoma de Herpesvírus tipo E.....	18
Figura 4: Modelo de evolução de Coronavírus.....	20
Figura 5: Organização do genoma de diferentes Coronavírus.....	21
Figura 6: a. Micrografia eletrônica de um Coronavírus humano. b. Esquema da estrutura do Coronavírus.....	22
Figura 7: Ciclo celular dos Coronavírus causadores da SARS e MERS.....	23
Figura 8: Parque do Instituto Butantan.....	28
Figura 9: Rede de neblina sendo armada e uso de Equipamento de Proteção Individual (EPI).....	30
Figura 10: Morcego sendo retirado da rede.....	30
Figura 11: a. Morcego do gênero <i>Artibeus</i> . b. Coleta de swab oral em <i>Sturnira</i> . c. Coleta de swab retal em um <i>Artibeus</i>	31
Figura 12: Mosca ectoparasita na orelha de um morcego da família Phyllostomidae...32	
Figura 13: Observação e identificação dos ectoparasitos.....	32
Figura 14: a. <i>Artibeus lituratus</i> . b. Morcego do gênero <i>Sturnira</i>	38
Figura 15: a. Ácaro da família Macronyssidae, <i>P. euthystrum</i> . b. Ácaro da família Spinturnicidae <i>P. iheringi</i>	39
Figura 16: a. Mosca <i>Megistopoda</i> sp. b. <i>Paratrichobius longichrus</i>	38
Figura 17: Eletroforese em gel de agarose referentes às amostras de swab de morcegos testados para Herpesvírus.....	43
Figura 18: Eletroforese em gel de agarose referente às amostras de swab testadas para Coronavírus.....	44
Figura 19: Eletroforese em gel de agarose referente às amostras de ectoparasitos de morcegos testados para Coronavírus.....	44
Figura 20: Árvore filogenética das sequências de coronavírus encontradas nas amostras de swab e ectoparasito de morcego.....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Primers utilizados no protocolo para detecção de Coronavírus	34
Tabela 2: Primers utilizados no protocolo P32 de Herpesvírus.....	35
Tabela 3: Primers utilizados no protocolo P33 de Herpesvírus.....	36
Tabela 4: Relação dos ectoparasitos encontrados e seus respectivos hospedeiros.....	40
Tabela 5: Relação de co-ocorrência de ectoparasitos em determinados hospedeiros.....	42
Tabela 6: Relação das sequências obtidas no algoritmo “BlastN”	45

Sumário

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	14
2.1. Vírus e morcegos	14
2.2. Herpesvírus	15
2.3. Coronavírus	19
2.4. Vírus e ectoparasitos de morcegos	24
3. OBJETIVO.....	27
4. MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1. Captura e identificação dos morcegos e coleta de swab oral e retal	29
4.2. Coleta, triagem e identificação de ectoparasitas	31
4.2.1. Ácaros	32
4.2.2. Moscas	33
4.3. Triagem e Detecção molecular de vírus	33
4.3.1. Extração do material genético	33
4.3.2. Reação de Transcrição reversa (RT)	33
4.3.3. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Nested-PCR	34
4.3.3.1 Coronavírus	34
4.3.3.2 Herpesvírus	34
4.3.4. Eletroforese em gel de agarose	36
4.3.5. Purificação dos fragmentos amplificados para reação de Sequenciamento	37
4.3.6. Reação de Sequenciamento	37
4.3.7. Análise das sequências	37
5. RESULTADOS	38
5.1. Morcegos	38
5.2. Ectoparasitos	38
5.3. Detecção de Herpesvírus e Coronavirus por PCR e RT-PCR	42
5.4. Sequenciamento das amostras positivas de Herpesvírus e Coronavirus	45
6. DISCUSSÃO.....	47
7. CONCLUSÃO	50
8. REFERÊNCIAS	51

MONITORAMENTO DE ECTOPARASITAS E VÍRUS EM RESÍDUO URBANO DE MATA ATLÂNTICA

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, existem cerca de 181 espécies de morcegos, distribuídas em nove famílias e 68 gêneros (Garbino et al., 2020) e, no mundo, mais de 1300 espécies (FENTON; SIMMONS, 2015). Alguns morcegos, quando adultos, podem pesar cerca de 4 gramas, enquanto outros podem chegar a 1,5 Kg e atingir 1,7 m de envergadura (REIS et al., 2007). Únicos e diversos, os morcegos podem se alimentar de frutos, partes florais, néctar, pequenos invertebrados e vertebrados como anfíbios, aves, peixes e até outros morcegos (BORDIGNON et al., 2017). Ainda assim, esses não são canibais, uma vez que uma espécie se alimenta de morcegos de outra espécie (FENTON, 1992). Devido a essa diversidade de hábitos alimentares, esses pequenos mamíferos, podem realizar importantes papéis ecológicos (REIS et al., 2007; PERACCHI et al., 2011). Os insetívoros, por exemplo, controlam populações de insetos que podem ser praga agrícola ou transmitir doenças como a dengue (GRIFFIN et al., 1960; YALDEN; MORRIS, 1975 [APUD REIS et al., 2007]). Já os morcegos frugívoros possuem um importante papel na regeneração e manutenção das florestas, especialmente os morcegos pertencentes à família Phyllostomidae, pois além de percorrerem longas distâncias ao forragear – processo de busca por alimento – são responsáveis pela dispersão de cerca de 25% das espécies botânicas das florestas tropicais (JONES; CARTER, 1976; HUMPHREY; BONACCORSO, 1979; BREDET et al., 1996; GALINDO-GONZÁLES, 1998).

Embora importantes para a saúde ambiental, no ambiente urbano, esses pequenos mamíferos são frequentemente considerados indesejáveis devido à falta de informação e alguns transtornos que podem causar, como a presença nos forros das residências, gerando barulho e odor forte no verão (REIS et al., 2007). A degradação do habitat natural levou algumas espécies – mais resistentes às perturbações ambientais – a ocupar com maior intensidade as construções humanas, aumentando a probabilidade de contato com as pessoas e, portanto, o risco de contágio de doenças à animais domésticos e humanos (LIMA, 2008).

Os morcegos podem propiciar a manutenção de uma série de patógenos, mas podem ser reservatórios especiais quando se trata de vírus. O que favorece a manutenção e disseminação de vírus nesses animais são algumas de suas características ecológicas, tais como a sua abundância – representando cerca de ¼ de todas as espécies de mamíferos

- distribuição mundial, habilidade de voar e migrar por longas distâncias e hábitos gregários (BROOK; DONSON, 2015; TURMELLE; OLIVAL, 2009; ZHENGLI, 2013; CALISHER et al., 2006). Zhengli (2013) relatou a identificação de mais de 80 vírus diferentes em amostras provenientes de morcegos.

O primeiro morcego encontrado com vírus, foi um hematófago assintomático diagnosticado com *Lyssavirus* (CARINI, 1911) e desde então a literatura científica foi inundada com essa relação entre quirópteros e o vírus da raiva (BROOK E DOBSON, 2015). Porém, na história recente tem sido descrito como fonte de múltiplas viroses patogênicas, como coronaviruses (LI et al., 2005; DOMINGUEZ et al., 2007; GÓES et al., 2013), filoviruses (LEROY et al., 2005; SWANEPOEL et al., 2007), henipaviruses e paramyxovirus (HALPIN et al., 2000; DREXLER et al., 2009) para animais domésticos e humanos (CALISHER et al., 2006; TURMELLE; OLIVAL, 2009, ZHENGLI et al., 2013).

Sabemos que algumas viroses podem ser transmitidas para morcegos via artrópodes (CALISHER et al., 2006). Em suas moscas ectoparasitas, já foram detectados alguns patógenos, como bactérias do gênero *Bartonella* e *Orthobunyavirus* (VAN VUREN et al., 2017; AMARAL et al., 2018). Embora para ectoparasitos de morcegos não se tenha ainda constatado a sua funcionalidade como vetor, essas detecções são um primeiro passo importante para a compreensão da manutenção e dispersão de patógenos por morcegos.

Quirópteros podem ser parasitados por uma variedade de insetos e ácaros, pertencentes às ordens Diptera, Hemiptera, Siphonaptera, Astigmata, Mesostigmata, Trombidiformes e Ixodida (MARSHAL 1982; WHITAKER, 1988; DICK et al., 2003; BERTOLA et al. 2005; DICK et al. 2007). Esses organismos vivem sobre o hospedeiro durante toda a vida ou parte dela, se alimentando do sangue e de secreções epiteliais (RADOVSKY, 1967; MARSHAL, 1982). O parasitismo pode ser um fator importante de controle de populações, pois em determinados níveis eles podem afetar a capacidade competitiva, a longevidade e o comportamento dos seus hospedeiros (LUCAN 2006; ALMEIDA et al., 2010).

Estudar as relações que se estabelecem entre morcegos, ectoparasitos, os diversos patógenos e humanos são fundamentais para traçar estratégias eficazes de vigilância e monitoramento de surtos de doenças, especialmente onde morcegos e humanos possuem um contato estreito (KOTAIT et al., 2007; ALLOCATI et al., 2016). Embora não possamos ignorar que os morcegos podem representar alguns riscos à nossa saúde, não

devemos esquecer a sua importância para a saúde ambiental e para a manutenção de uma rede ecológica saudável.

Podemos notar, que embora existe um número grande de viroses que podem acometer os morcegos e, possivelmente, os ectoparasitos, optamos no presente projeto estudar os Herpesvírus e Coronavírus por possuírem um potencial de se tornarem emergentes com importância, não só em saúde humana e saúde animal, mas principalmente pela relevância em saúde única (One Health). Sabemos que as herpesvíroses podem ser transmitidas entre animais de espécies diferentes. Além do mais, elas podem ser assintomáticas ou leves no hospedeiro de origem, mas causar graves doenças no novo hospedeiros (WOZNIAKOWSKI; SAMOREK-SALAMONOWICZ, 2015). Em morcegos, poucos são os estudos, e alguns Herpesvírus ainda não identificados foram encontrados, necessitando mais estudos (ZHENG et al., 2016). No caso do Coronavírus, eles podem causar por exemplo, a síndrome da diarreia aguda em suínos (SADS) (ZHOU et al., 2018), a síndrome respiratória do oriente médios (MERS) (ZAKI et al., 2012) e atualmente estamos vivendo a pandemia de COVID-19, uma doença respiratória aguda grave também causada por um coronavírus cuja origem também está relacionada a morcegos (ZHOU et al., 2020) Nosso objetivo foi testar as amostras de swab oral e retal de morcegos, bem como amostras de seus ectoparasitos para Herpesvírus e Coronavírus.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Vírus e morcegos

Morcegos são conhecidos como importantes reservatórios de vários vírus com potencial emergente. Alguns autores investigaram aspectos ecológicos e fisiológico dos morcegos, tentando encontrar explicações para essa alta capacidade de controle de infecções virais (CALISHER ET AL., 2006; O'SHEA et al., 2014; BROOK; DOBSON, 2015). Inicialmente envolvidas com a regulação do estresse oxidativo, a importância da mitocôndria tem sido evidenciada nos processos de sinalização celular e resposta imunológica (BROOK; DOBSON, 2015). Brook e Dobson (2015) sugerem que o controle de patógenos intracelulares se dá por autofagia e apoptose celular, sendo um mecanismo importante para patógenos intracelulares, mas em contrapartida deixando os morcegos suscetíveis a patógenos extracelulares. Além do mais, Plowright e colaboradores (2008) estudaram Hendra vírus em raposas voadoras e observaram que as fêmeas gestantes e lactantes apresentavam soro prevalência mais elevada, assim como os machos em situação de privação nutricional. Sugere-se que a ocorrência de *spillover* pode estar relacionado ao período reprodutivo (PLOWRIGHT et al., 2008; BROOK; DOBSON, 2015).

O'shea e colaboradores (2014) também sugerem que morcegos e vírus teriam coevoluído, o que explicaria a alta tolerância dos morcegos às infecções virais. Durante o voo, o organismo do morcego pode alcançar temperatura de até 40°C. Altas temperaturas e taxas metabólicas estimulam respostas imunológicas e explicariam a alta patogenicidade dos vírus que foram selecionados de modo a suportar essas condições, facilitando sua transmissão para outras espécies de mamíferos (O'SHEA et al., 2014). Além do mais, vírus relacionados a morcegos podem usar, para a replicação celular, as vias metabólicas que foram conservados em mamíferos, o que também pode facilitar o *spillover*, incluindo humanos (CALISHER et al., 2006). Outro indício de coevolução é que esses animais já tinham sua presença registrada há 50 milhões de anos (TEELING et al., 2005) e a sua origem coincide com o surgimento de algumas viroses mantidas em morcegos. Chiroptera é o táxon mais antigo conhecido para paramyxovírus, coronavírus, dentre outros (CALISHER et al., 2006; CUI, et al., 2007; DREXLER et al., 2009).

Por fim, características ecológicas e hábitos gregários, somados a fatores como mecanismos evolutivos relacionados ao voo, período reprodutivo da fêmea ou de estresse

nutricional para ambos os sexos, as altas temperaturas durante o voo e vias metabólicas conservadas em mamíferos, formam juntas as características ideais de manutenção, transmissão intra e interespecífica e possível transmissão dos vírus de morcegos para outras espécies de mamíferos, incluindo o homem (HOCK, 1951; KLUGER, 1998; CALISHER et al., 2006; O'SHEA et al., 2014; BROOK; DOBSON, 2015).

2.2. Herpesvírus

Os herpesvírus (HVs) pertencem à família Herpesviridae, que historicamente é definida com base na estrutura do vírion. Este grupo apresenta, como podemos observar na figura 1, um genoma formado por DNA de fita dupla, envolto por um capsídeo icosaédrico, uma camada de tegumento e por fim o envelope com glicoproteínas na superfície (ICTV, 2017). A maioria dos genes de Herpesvírus codifica para proteínas encontradas do envelope, do capsídeo ou do tegumento, que além das proteínas, contém RNAs virais e componentes celulares (FLINT et al., 2015).

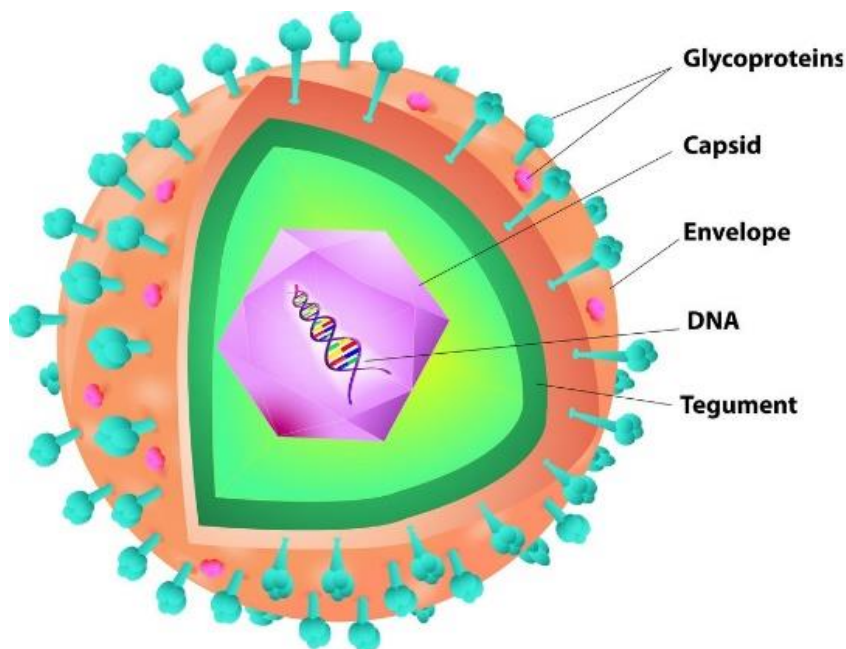


Figura 1: Estrutura do Herpesvírus. A figura mostra o material genético, envolto pelo capsídeo, com estrutura helicoidal. O capsídeo, por sua vez, envolto pelo tegumento. Finalmente, podemos observar o envelope com suas glicoproteínas. (**Fonte:** <<https://www.vectorstock.com/royalty-free-vector/structure-of-herpes-virus-vector-1043059>>.)

A família Herpesviridae está dividida em três subfamílias com base em características biológicas: *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* e

Gammapesvirinae (FLINT et al., 2015). *Alphaherpesvirinae* pode infectar aves e mamíferos, possui ciclo relativamente curto, espalha-se rapidamente em cultura, é eficiente na multiplicação das células infectadas e possui capacidade de manter infecção latente em gânglios sensoriais. Este grupo pode infectar aves e mamíferos (McGEOCH et al., 2005; PELLET; ROIZMAN, 2013); *Betaherpesvirinae* possui ciclo reprodutivo de cerca de 7 dias, seu processo de infecção é lento e as células infectadas sofrem citomegalia. Podem estabelecer latência em glândulas secretoras, células linfocitárias e outros tecidos. Os vírus da subfamília *Gammapesvirinae* são geralmente específicos de Linfócito T e B, onde geralmente estabelecem latência. No entanto podem infectar também algumas células epiteliais e fibroblásticas. Podem infectar humanos, outros primatas e carnívoros (PELLET; ROIZMAN, 2013).

Estes vírus podem manter latência celular por um período e se tornar ativos quando o sistema imune estiver comprometido. As proteínas do envelope viral entram em contato com os receptores celulares dando início ao processo de fusão do envelope com a membrana da célula hospedeira (Figura 2). O capsídeo e as proteínas do tegumento são liberados no citoplasma e transportados até o núcleo, onde as proteínas e o material genético (DNA) serão liberados. A proteína de desligamento VHS (Virion Host Shut-off) vai degradar o mRNA do hospedeiro e o DNA, ao entrar no núcleo, circulariza-se. A transcrição vai ocorrer com a ajuda da RNA polimerase II do hospedeiro e ocorre basicamente três momentos: a formação do mRNA α (alfa) ou precoces imediatos; a formação do β mRNA ou precoces tardios; e a formação do γ (gama) mRNA ou tardios. Nesse primeiro momento, a proteína VP16 vai estimular a transcrição de uma determinada região do DNA pela RNA polimerase II, dando origem ao α mRNA, que será traduzido em α proteínas. Estas proteínas, por sua vez, irão regular a expressão gênica ativando a transcrição da região β do gene, dando origem ao β mRNA e às β proteínas. Finalmente, as β proteínas estão relacionadas com a replicação do DNA viral, que ocorre por círculo rolante. Por sua vez, a síntese do DNA estimula a expressão do gene γ . As proteínas deste gene são responsáveis pela montagem do capsídeo e a modificação das membranas da célula, para a formação do vírion. Ainda no núcleo, o DNA replicado é empacotado no capsídeo e ao passar pela membrana adquire o envelope, ganhando infectividade. O vírion maduro pode ser liberado para fora da célula com ajuda do retículo endoplasmático.

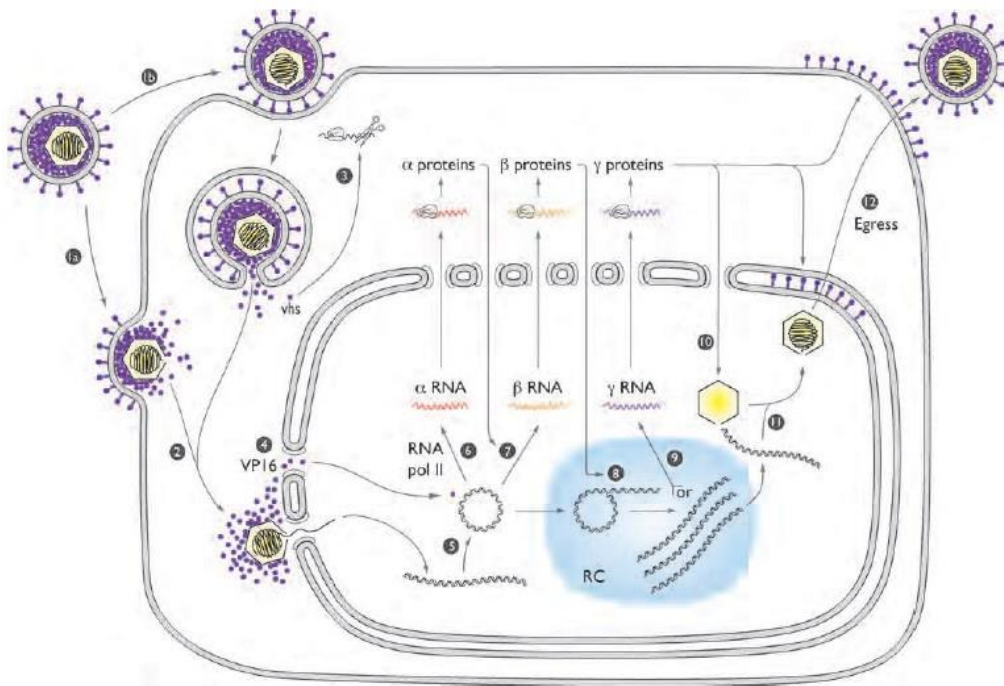


Figura 2: Esquema de replicação do vírus Herpes simplex 1 (Fonte: FIELDS et al., 2013). O Vírus entra em contato com a célula hospedeira. O tegumento e o capsídeo entram em contato com o poro da célula, liberando o DNA. O DNA viral chega, então, ao núcleo celular, onde será transcrito. Nesse processo, temos a formação de cinco grupos de produtos gênicos: α , β_1 , β_2 , γ_1 e γ_2 . Após a replicação do DNA, temos a montagem dos vírions, que adquirem infectividade quando passam pela membrana celular, finalizando sua estrutura.

O vírion maduro varia entre 120 a 260 nm de tamanho e o material genético, entre 124 a 295kb. Uma característica interessante dos herpesvírus é o arranjo da sequência do seu material genético. Os genomas possuem sequências terminais e internas repetitivas, alternando regiões longas (Unique Long regions- UL) e regiões curtas (Unique short-US) que permitem rearranjos em algumas espécies. De acordo com o tipo de genoma, os Herpesvírus podem ser divididos em tipos A, B, C e D: Os genomas de tipo A (ex. EHV-2) consistem em uma única região U seguida de uma região de repetição terminal (TR). A estrutura do tipo B (ex. Herpesvírus causador do Sarcoma de Kaposi) também é constituída de uma região U seguida de diversas regiões TRs (PELLET; ROIZMAN, 2013; YOU et al., 2017).

O tipo C (ex: vírus de Epstein-Barr), por sua vez, possui número variável de sequências de terminais (TR) e uma repetição direta interna que não está relacionada à TR que divide a região U em duas regiões únicas (UL e US). Já os genomas do tipo D (ex. PRV) e E (ex. HSV-1) contêm regiões UL e US que são seguidas por repetições invertidas terminais e internas (TRL / IRL e IRS / TRS). As regiões TRL / IRL são muito

curtas em alguns genomas do tipo D (por exemplo, no caso do VZV), sendo mais longas em vírus com genomas de classe E. Ainda na estrutura do tipo E, há também uma repetição terminal de centenas de pares de bases que é conhecida como sequência “a”. Além disso, uma cópia invertida, conhecida como sequência “a’”, está presente internamente (YOU et al., 2017).

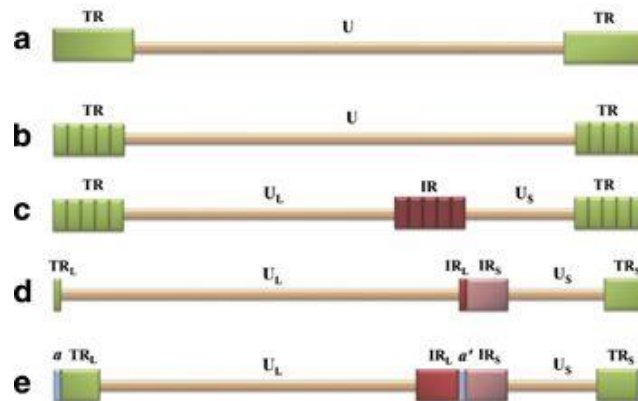


Figura 3: Esquema geral do genoma dos Herpesvírus. **a.** Genoma de Herpesvirus do tipo A contendo duas seqüências de repetição terminal (TRs) e uma seqüência única (U). **b.** Genoma de Herpesvirus do tipo B com uma seqüência única (U) e diversas repetições de TRs. **c.** Genoma de Herpesvirus do tipo C mostra número variável de seqüências de TRs e uma repetição direta interna que divide a região U em duas regiões únicas (UL e Us). **d.** Genoma de Herpesvirus do tipo D contém regiões UL e US seguidas por repetições invertidas terminais e internas (TRL / IRL e IRS / TRS). **e.** Genoma de Herpesvirus do tipo E contém regiões UL e US seguidas por repetições invertidas terminais e internas (TRL / IRL e IRS / TRS) contendo as seqüências “a” e “a’” (Fonte: YOU et al., 2017).

Todos os genomas de Herpesvírus contém em seus terminais sinais de ação cis relacionados à clivagem do genoma concateméricos. A composição de nucleotídeos é bastante variável e há baixíssima homologia entre diferentes subgrupos. O genoma codifica, em média, 100 diferentes proteínas das quais 35 estão envolvidas na estrutura do vírion, 41 são relativas à replicação – tais como a DNA polimerase e a terminasse – e genes para o complexo helicase/primase. Os herpesvírus codificam ainda proteínas envolvidas no metabolismo de nucleotídeos e reparo de DNA (PAYNE, 2017).

Os herpesvírus podem causar infecções na pele, mucosas, sistema linfático e nervoso em vários animais (EHLERS, 2004). Embora todas as subfamílias possam ser encontradas em uma variedade de hospedeiros – incluindo mamíferos, aves e répteis – *Alphaherpesvirinae* pode se estabelecer em uma variedade de hospedeiros, enquanto as

outras subfamílias ficam restritas a um grupo ou até mesmo a família ou ordem do hospedeiro natural (DAVISON et al., 2009; PELLET; ROIZMAN, 2013).

Em morcegos, a primeira referência de Herpesvírus foi em 1996 (TANDLER, 1996). Mas foi em 2007 que o primeiro Herpesvírus foi confirmado em morcegos, com a detecção molecular de sete *Gammaherpesvírus* e um *Betaherpesvírus* em sete diferentes espécies de hospedeiros (WIBBELT et al., 2007). Em 2009, houve o primeiro indício de *Alphaherpesvírus*, com uma caracterização parcial nesses hospedeiros (RAZAFINDRATSIMANDRESY et al., 2009). Em 2014, Sasaki e colaboradores isolaram e caracterizaram um novo *Alphaherpesvírus* em morcegos da família Pteropodidae. Hoje, sabemos que morcegos de diversas espécies, famílias, distribuição geográfica e hábitos alimentares podem ser hospedeiros de herpesvírus, muitas delas ainda não identificadas (POZO et al., 2016; ZHENG et al., 2016; WADA et al., 2018).

2.3. Coronavírus

Os Coronavírus pertencem a subfamília *Coronavirinae*, que foi subdividida em quatro gêneros: *Alphacoronavírus*, *Betacoronavírus*, *Gammacoronavírus* e *Deltacoronavírus* (ICTV, 2019). *Gammacoronavírus* e *Deltacoronavírus* surgiram em aves, enquanto Alpha e *Betacoronavírus* surgiram em morcegos (DROSTEN et al., 2003; ZAKI et al., 2012) (Figura 4) Esses vírus possuem genoma de RNA (Figura 5), fita simples, sentido positivo e possuem envelope cuja estrutura lembra uma coroa ou halo – o que deu origem ao seu nome (ICTV, 2017).

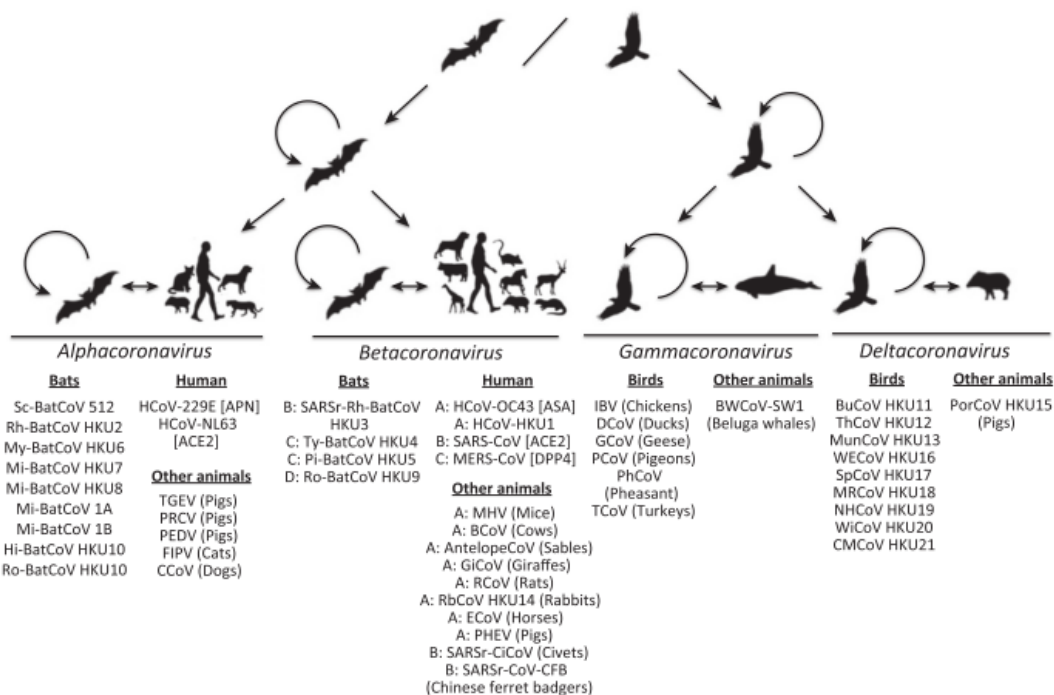


Figura 4: Modelo de evolução de Coronavírus. Podemos notar que os morcegos são a fonte de genes de Alphacoronavírus e Betacoronavírus (**Fonte:** CHAN, 2013).

Com um tamanho que varia entre 26 e 32kb, é o maior genoma conhecido para vírus de RNA. Cerca de dois terços dos genes codificam para proteínas estruturais e um terço para proteínas acessórias. O genoma de Coronavírus é organizado de modo que as regiões que codificam para as proteínas estruturais seguem a seguinte ordem: região de codificação para a proteína S, E, M e N (Figura 5). Essa ordem não se modifica entre os diversos Coronavírus (FEHR; PERLMAN, 2015).

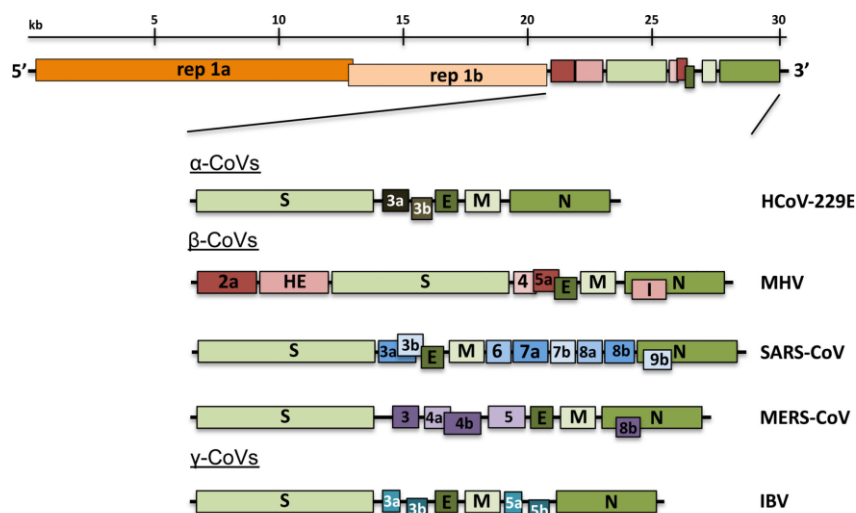


Figura 5: Organização do genoma de diferentes Coronavírus. As regiões do gene que codificam para as proteínas estruturais, seguem uma ordem: primeiro vem a região codificante para a proteína S, depois M, E e N.

As proteínas S, M e E compõem a estrutura do envelope, enquanto a Proteína N está presente no nucleocapsídeo (MASTERS; PERLMAN, 2013; ICTV, 2017). A proteína S é responsável pelas diversas morfologias da superfície do envelope viral. Uma dessas morfologias podemos observar na figura 6. A proteína S exerce importante função no momento de se ligar a receptores celulares e iniciar o processo de infecção (BENIAC et al., 2006; MASTERS; PERLMAN, 2013). A proteína estrutural mais abundante é a proteína M, que é responsável pela forma do envelope de coronavírus. Ela é relativamente bem conservada dentro de cada gênero, mas difere profundamente entre os gêneros de *Coronavirinae*. A proteína E está presente em menor quantidade no envelope e tem papel na infectividade do vírus (MASTERS; PERLMAN, 2013). Por fim, a Proteína N é a única proteína constituinte do nucleocapsídeo helicoidal e, embora se ligue ao RNA viral, oferece pouca ou nenhuma proteção à ação das ribonucleases (HOGUE et al., 2008; MASTERS; PERLMAN, 2013). Uma quinta proteína estrutural, uma hemaglutinina histerase (HE), só é encontrada em *Betacoronavírus* (MASTERS; PERLMAN, 2013).

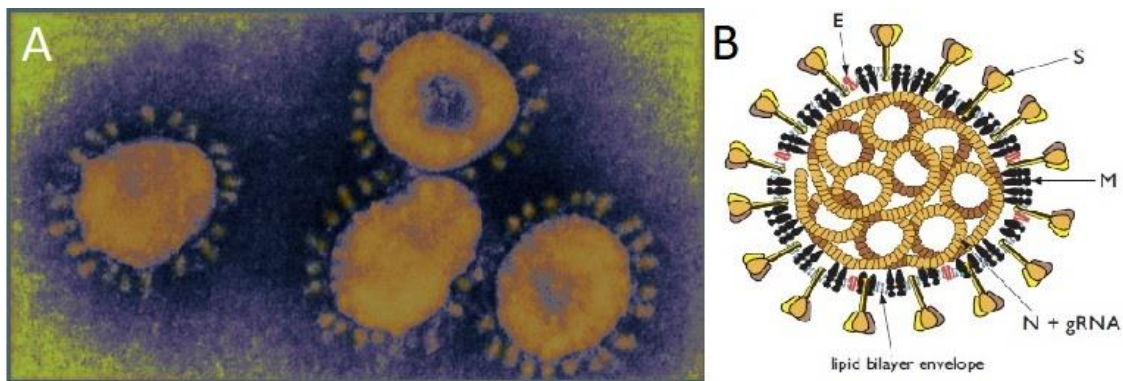


Figura 6: a.: Micrografia eletrônica colorida de um Coronavírus Humano (Fonte: Micrografia de F. A. Murphy, University of Texas Medical Branch, Galveston, Texas). b.: Esquema da estrutura do Coronavírus, mostrando as proteínas S, M, E e N (Fonte: FIELDS ET AL., 2013).

A região da proteína S que vai interagir com os receptores da célula hospedeira vai variar de acordo com o coronavírus. Em alguns vírus essa interação vai ocorrer na membrana plasmática ou na membrana do endossomo. A região da proteína S que vai interagir com esse receptor vai variar de acordo com o Coronavírus. Realizada a ligação, ocorre a clivagem e fusão das membranas e material genético é liberado no citosol (CHENG et al., 2004; HEALD-SARGENT; GALLAGHER, 2012; FLINT et al., 2015; KUO et al., 2016).

O genoma do coronavírus funciona como um mRNA e a região ORF 1a e 1b será traduzida nas poliproteínas pp1a e pp1b. Essas proteínas são traduzidas através de um processo chamado *frameshifting*. Enquanto o ribossomo está traduzindo a proteína, pode ocorrer uma mudança no frame de leitura, de modo que uma única região pode dar origem a diversas proteínas. Sendo assim, uma região 5'---UUAUAGGGG---3' que era lida como códons UUA UAG GGG passa a ser lida U UAU AGG GG, por exemplo. Desse modo, a partir de uma única região, duas proteínas podem ser traduzidas (SAJITA et al., 2007; PLANT; DINMAN, 2008; FLINT et al., 2015). A ação proteolítica realizada por proteases virais resulta na clivagem dessas poliproteínas e na formação de cerca de 16 proteínas não estruturais fundamentais nos processos de replicação e transcrição. Uma dessas proteínas será responsável pela alteração das membranas celulares formando uma estrutura de vesículas de dupla membrana onde acontecerá a síntese do RNA viral (DE GROOT et al., 2013; FLINT et al., 2015).

Tanto a replicação do RNA viral quanto a síntese de mRNA vai ocorrer via intermediários de cadeia negativa (FLINT et al., 2015; FEHR; PERLMAN, 2015). O RNA de cadeia negativa vai servir como molde para a formação do mRNA que vai dar

origem às proteínas estruturais e acessórias. As proteínas estruturais M, S e E são inseridas no retículo endoplasmático e em seguida levadas até o local da montagem do vírion: um compartimento intermediário formado pelo retículo endoplasmático e o complexo de Golgi. Depois do RNA viral estar sintetizado, ele vai ser encapsulado pela proteína N, formando o nucleocapsídeo. Ao passar pela membrana do compartimento intermediário, vai adquirir a membrana com as respectivas proteínas. Os vírions são, então, transportados para a superfície celular em vesículas e liberados por exocitose (FLINT et al., 2015; FEHR; PERLMAN, 2015). Podemos observar o ciclo do Coronavírus na figura 7, a seguir:

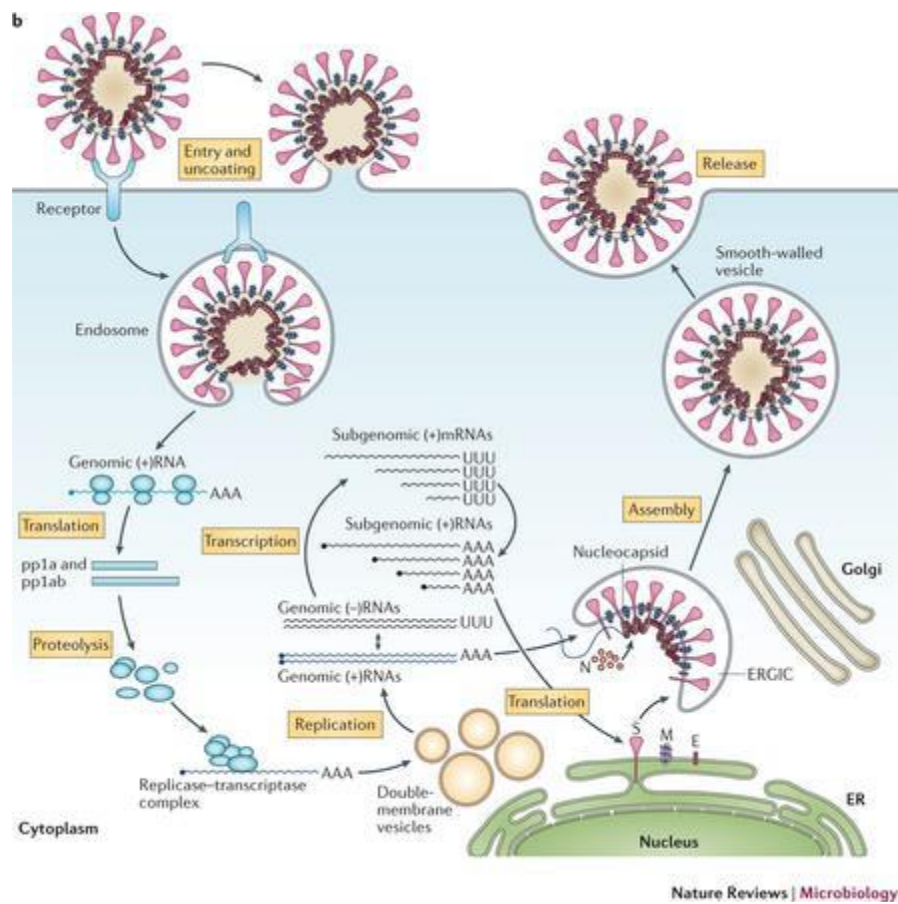


Figura 7: Ciclo celular dos Coronavírus causadores da SARS e da MERS (Fonte: FEHR; PERLMAN, 2015). Ocorre a ligação do vírion na célula. Pós a clivagem e fusão das membranas, o material genético passa ao citosol, onde há a replicação do gene da replicase. A tradução das poliproteínas pp1a e pp1b dão origem à proteínas não estruturais. Essas proteínas se arranjam em vesículas de dupla membrana, onde a síntese do RNA viral ocorre. A produção de RNAs genômicos e subgenômicos se dá por via de intermediários de cadeia negativa. Após a replicação e síntese do material genético, as proteínas estruturais são produzidas, inseridas no retículo endoplasmático e os vírions são montados e transportados para a superfície celular.

Os coronavírus são conhecidos por causar doenças respiratórias e gastrointestinais em animais domésticos e humanos. Sendo o táxon mais antigo conhecido para a família Coronaviridae, os morcegos são a origem de diversas dessas coronaviroses emergentes (CALISHER et al., 2006; CUI et al., 2007; ALLOCATI et al., 2016; BANERJEE et al., 2019).

Na década de 60, foi detectado o HCoV-229E em humanos, responsável pelo resfriado comum (HAMRE; PROCKNOW, 1966). Um Coronavírus intimamente relacionado com o HCoV-229E foi encontrado em morcegos, gerando evidências de que eles sejam o hospedeiro de origem dessa virose (CORMAN et al., 2015). Depois disso, outras coronaviroses de humanos tiveram sua origem relacionadas a morcegos. Em 2002, o HCoV-SARS foi detectado durante a epidemia de uma síndrome respiratória aguda grave, uma doença emergente e sua origem em morcegos foi posteriormente confirmada (DROSTEN et al., 2003; MAHONY; RICHARDSON, 2005; CALISHER et al., 2016). Em 2004, foi detectado o HCoV-NL63, responsável também pelo resfriado comum, e sua origem zoonótica também foi verificada (VAN DER HOEK et al., 2006; HUYNH et al., 2012). Em 2012 foi identificado o MERS-CoV, causador de uma doença denominada síndrome respiratória do oriente médio, que, embora tenha o camelo como hospedeiro intermediário, tem no morcego a sua origem (DROSTEN et al., 2003; ZAKI et al., 2012; WANG et al., 2014). Atualmente estamos vivenciando o decorrer de uma pandemia causada pelo SARS-CoV-2, cuja origem provavelmente é também em morcegos, pois são muito similares a um tipo de SARS-CoV encontrados em morcegos (REHMAN et al., 2020; WU et al., 2020).

Coronaviroses com origem em morcegos também são observadas em animais domésticos e de criação. É o caso do SADS-CoV, detectado em 2018, durante a emergência da diarreia aguda suína que causou a morte em larga escala e prejuízos a criações de porcos na China (ZHOU et al., 2018; FAN et al., 2019). Dessa forma, compreendemos que os morcegos possuem um importante papel na origem e diversificação dos Coronavírus e que estudar a diversidade desse vírus em morcegos é importante para compreender a circulação das coronaviroses em diversas populações, sejam de animais silvestres, domésticos ou humanos.

2.4. Vírus e ectoparasitos de morcegos

Os morcegos possuem uma grande diversidade de artrópodes ectoparasitos pertencentes às ordens Diptera, Hemiptera, Siphonaptera, Astigmata, Mesostigmata,

Trombidiformes e Ixodida (FRANK et al., 2014). Esses ectoparasitos podem se alimentar de sangue e outros fluidos corporais e ocorrem em diferentes graus de especificidade, podendo ocorrer sobre o corpo do hospedeiro durante todo o ciclo de vida ou em apenas uma parte dele (BERTOLA et al., 2005; ALMEIDA et al., 2011; ALMEIDA et al., 2015; LOURENÇO et al., 2016). As moscas das famílias Streblidae e Nycteribiidae, por exemplo, são exclusivas de morcegos e normalmente apresentam alta especificidade com relação à espécie do hospedeiro (WENZEL 1970; DICK; PATTERSON, 2006). Já os carrapatos, da família Ixodidae e Argasidae podem parasitar uma grande diversidade de animais silvestres e domésticos, além dos seres humanos (ARAGÃO, 1936 [apud Reis et al., 2008]; WITAKER et al., 2009). Um dado interessante é que um argásídeo da espécie *Ornithodoros minom* foi encontrado parasitando humanos e em um carrapato do mesmo gênero já foi detectado sangue humano (GILL et al., 2004; LABRUNA et al 2014). Se os ectoparasitos de morcegos tiverem papel de vetor de vírus em morcegos, isso pode significar que infestações – mesmo que acidentais – podem representar um risco aos seres humanos. Além do mais, um único hospedeiro pode abrigar diversos ectoparasitos, de diferentes grupos (LOURENÇO et al., 2020). Isso pode levar à troca de vírus e outros parasitas entre as populações de ectoparasitos.

Sabemos que artrópodes ectoparasitas podem ser responsáveis pela transmissão de alguns patógenos, incluindo vírus. Os orthobuniavírus, por exemplo, podem ser transmitidos por mosquitos (DIAS; CHANCLER, 1949). Outros vírus foram relatados em artrópodes ectoparasitas, sendo em alguns casos primeiro registro, mas não foi verificada a sua eficiência vetorial (HOUCK et al, 2001; AZNAR-LOPES et al., 2013; GOLDBERG et al., 2017; VAN VUREN et al., 2017). Com relação a vírus e ectoparasitos de morcegos, não foram encontrados muitos trabalhos.

No Brasil, o único trabalho encontrado foi o de Favoretto e colaboradores (2013) em que os autores realizaram um experimento. Eles inocularam duas espécies de carrapatos da família Argasidae com vírus da raiva e observaram que após 30 minutos eles ficaram negativos para o vírus. Os autores chegaram à conclusão de que talvez essa família e as espécies utilizadas não sejam importantes para o ciclo da raiva. No mesmo ano, Aznar-Lopes e colaboradores (2013) detectaram um rhabdovírus em moscas da família Nycteribiidae em morcegos na Espanha. Embora este estudo não trate de eficiência vetorial, esse primeiro registro é importante, sinal de que o vírus pode se manter nesses artrópodes. Em 2001 havia sido relatada a presença de hantavírus em ectoparasitos de roedores no Texas (EUA) (HOUCK et al., 2001). Devido à presença de hantavírus em

ectoparasitos cujos hospedeiros foram negativos para hantavírus, os autores inferem que esse ectoparasito provavelmente não se contaminou nesse hospedeiro, defendendo a ideia de que esses ectoparasitos são potenciais vetores de vírus.

Em 2017 houve um novo rhabdovírus, nomeado Kanywara vírus, encontrado em moscas das famílias Streblidae e Nicterybiidae em morcegos da família Pteropodidae na Uganda (África do Sul) e um novo orthobunyavírus em Streblidae na região do Egito (GOLDBERG et al., 2017; VAN VUREN et al., 2017). Embora esses autores não investiguem a questão da competência vetorial, os vírus novos encontrados nesses ectoparasitos nos levam a crer que os ectoparasitos podem sim ter um papel importante na manutenção e transmissão dos vírus de morcegos.

Nós sabemos também que alguns vírus, como influenza e coronavírus costumam ter sua diversidade relacionada com a diversidade de morcegos. Não só que a diversidade viral tende a crescer com a diversidade de morcegos, mas principalmente que as espécies virais tendem a ser específicas de acordo com o grupo de morcegos (família, gênero...). Os ectoparasitos de morcegos também costumam ser específicos de acordo com a família, gênero ou espécie de morcego, dependendo do caso. Sendo assim, seria plausível que os ectoparasitos servissem de vetores, isso poderia explicar tanto essa relação entre diversidade viral e diversidade de morcegos.

3. OBJETIVO

Levando em consideração o potencial zoonótico e emergente, a origem dos Coronavírus, a existência de Herpesvírus não identificados encontrados em morcegos, bem como a necessidade de intensificar o esforço amostral, o objetivo do presente trabalho foi verificar a presença de Herpesvirus e Coronavírus em morcegos e em seus ectoparasitos em fragmento florestal urbano no Parque do Instituto Butantan.

Os objetivos específicos foram:

- Realizar a identificação de morcegos e ectoparasitos.
- Verificar a presença de vírus em amostras coletadas via swab oral e retal de morcegos.
- Verificar a presença de vírus nos ectoparasitos dos morcegos.
- Verificar se os vírus encontrados nos ectoparasitos são os mesmos ou possuem alguma relação com os vírus encontrados nos morcegos.
- Realizar a detecção molecular dos vírus/famílias virais zoonóticos e/ou com potencial de emergência: Coronavírus e Herpesvírus.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Os morcegos para a prospecção das amostras foram capturados no Instituto Butantan. O Instituto Butantan está localizado no bairro do Butantã, Zona Oeste da Cidade de São Paulo (Figura 8). O Parque do Instituto Butantan possui cerca de 80 hectares e 62% desta área é coberta por vegetação nativa e exótica (<https://www.institutobutanta.com.br/parque/>, recuperado em 01, dezembro, 2017). O Parque possui palmeiras e árvores com ocos que podem ser utilizadas como refúgio para algumas espécies de morcegos. Os forros quentes e isolados de alguns prédios antigos também são propícios como abrigo (GREENHAAL & PARADISO, 1968; REIS, 1982), como é o caso do antigo prédio da BCG, localizado atrás da biblioteca do Instituto, onde há uma colônia de *Glossophaga soricina*. O Instituto Butantan está localizado em uma região densamente povoada. Dados da Subprefeitura do Butantã mostram que a região do Butantã apresentava 428.217 habitantes até 2010. O Parque do Instituto recebe anualmente mais de 150 mil habitantes, podendo chegar a 200 mil por ano, sendo um dos principais pontos turísticos de São Paulo (SÃO PAULO, 2017).



Figura 8: Parque do Instituto Butantan. Ao entorno podemos observar área densamente urbanizada (Fonte: produzido no Google Earth Pro).

4.1. Captura e identificação dos morcegos e coleta de swab oral e retal

Os animais foram capturados (licença SISBIO N° 59547-2) obedecendo as normas do Comitê de ética em pesquisas com animais causando o mínimo de dor e desconforto possível (CEUA N° 9447240918). Foram realizadas 11 noites de captura, com duração de cerca de seis horas de coleta. De 4 a 7 redes de neblina foram armadas em trilhas, junto a árvores em frutificação ou sobre corpo d'água (ESBÉRARD, 2009) (Figura 9 e 10) e foram vistoriadas a cada 20 minutos. Para tentar atingir a maior diversidade possível de morcegos, intensificamos as buscas por possíveis refúgios (ESBÉRARD; BERGALLO,

2008) e buscamos realizar as capturas em todas as fases do ciclo lunar (ESBÉRARD, 2007).



Figura 9: Da esquerda para a direita: Rede de neblina sendo armada e uso de Equipamento de Proteção Individual (EPI) (Créditos: Cairo Monteiro). **Figura 10:** Morcego sendo retirado da rede (Créditos: Cairo Monteiro).

Os morcegos capturados foram identificados em campo usando principalmente uma chave de identificação atualizada (REIS et al., 2017) e um guia de campo (REIS et al., 2013). Eles foram mensurados e marcados com anilha de metal (Figura 11A) ou coleiras plásticas contendo cilindros coloridos (ESBÉRARD; DAEMON, 1999), dependendo da disponibilidade. As amostras de swab oral (Figura 11B) e retal (Figura 11 C) foram acondicionadas em criotubo contendo 500 μL de meio VTM (2.000 U de penicilina G, 2,5 μg de estreptomicina, 6 μg de gentamicina, 25 μg de anfotericina B, 1,0% de albumina bovina e 20% de glicerina), depositadas imediatamente em Dry Shipper e, ao chegar no laboratório, foram armazenadas em ultra-freezer (- 80 °C). As amostras foram identificadas segundo o registro do animal (1, 2, 3...) seguido pelo tipo de amostra: SO para swab oral, SR para swab retal, AC para ácaro e M para mosca. Exemplo: 1SO.



Figura 11: a.: Um morcego do gênero *Artibeus*, capturado no Instituto Butantan, portando anilha de metal no antebraço (Créditos: Cairo Monteiro). b.: Coleta de swab oral em uma *Sturnira* (Créditos: Amanda Viana). c.: Coleta de swab retal em um *Artibeus* (Créditos: Amanda Viana).

4.2. Coleta, triagem e identificação de ectoparasitas

Os ectoparasitas foram coletados sobre o corpo do hospedeiro, realizando-se buscas entre os pelos, nas membranas, nariz e orelhas (Figura 12). As moscas e os ácaros foram removidos utilizando pinça de ponta fina ou pincel umedecido em água. Normalmente utilizamos pincel embebido em álcool, mas com receio de que pudesse interferir nas análises moleculares, optamos por utilizar apenas água.

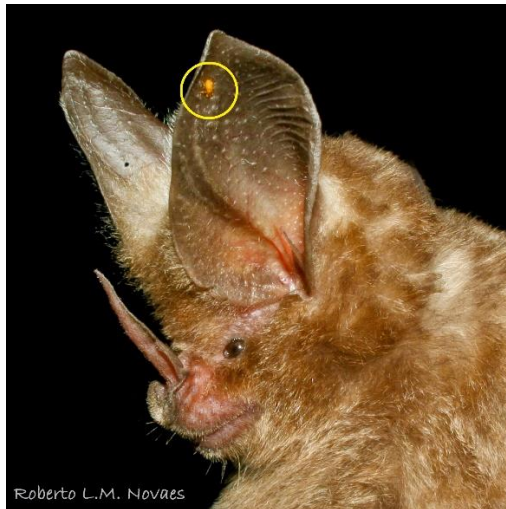


Figura 12: Mosca ectoparasita na orelha de um morcego da família Phyllostomidae. (Fonte: Blog Morcegos do Brasil. Disponível em: <<https://morcegodobrasil.blogspot.com/search/label/Mimon%20bennettii>>).

4.2.1. Ácaros

Os ácaros encontrados em um mesmo hospedeiro foram divididos em dois grupos: uma parte dos ácaros foram colocados em criotubos com meio VTM, acondicionados em nitrogênio e armazenadas em ultra freezer (-80°C). Outra parte, foi depositada em tubos plásticos de 2 ml contendo etanol 70%. No laboratório, esses ácaros foram diafanizados e montados em lâmina para posterior identificação (Figura 13). As chaves utilizadas foram principalmente Radovsky (1967, 2011), Henrri e Tipton (1975).



Figura 13: Observação e identificação dos ectoparasitos em microscópio estereoscópico realizada no Laboratório de Ácaros Parasitas (LAPAR – UFRRJ).

4.2.2. Moscas

As moscas coletadas foram acondicionadas em tubo falcon. Na manhã seguinte à coleta, as moscas foram identificadas em microscópio estereoscópio utilizando principalmente as chaves de Guerrero (1994, 1995). Após a identificação, uma mosca de cada hospedeiro foi colocada em etanol 70% para material testemunho. As moscas que eram encaminhas para as análises da virologia, tiveram o abdome retirado, foram depositadas em nitrogênios e armazenadas em ultra freezer (-80°C).

4.3. Triagem e Detecção molecular de vírus

4.3.1. Extração do material genético

A extração de material genético total das amostras selecionadas foi realizada no Laboratório de Biossegurança nível 2+ do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (USP), utilizando o equipamento de extração de RNA total automatizado “MagMAX™ Express” (Applied Biosystems®) usando o “*MagMAX™ - 96 Total RNA Isolation Kit*”. A cada poço da placa de extração, foram adicionados 100 µL de amostras, 10 µL de RNA Binding Beads, 10µL de RNA Lysis/Binding Enhancer e 130 µL de Lysis/Binding Solution, com posterior homogeneização. Em seguida, foram realizadas duas lavagens, sob agitação (900 g por 2 minutos, à temperatura ambiente), utilizando 150 µL do reagente Wash Solution 1 em cada poço. Em todas as etapas de lavagem, o robô utiliza uma placa magnética sob a microplaca por 1 minuto, para que as esferas metálicas (*beads*) ligadas ao RNA, não sejam removidas durante as lavagens. Outras duas lavagens sob agitação (900 g por 2 minutos, à temperatura ambiente) foram efetuadas, com 150 µL do reagente Wash Solution 2 em cada poço. Em seguida, 75 µL do tampão de eluição (Elution Buffer) foi adicionado em cada poço e novamente agitado a 900 g por 3 minutos, visando separar o RNA que estaria aderido às *beads* metálicas. O material extraído foi transferido para microtubos nuclease-free e armazenados em freezer (- 80 °C) até seu processamento.

4.3.2. Reação de Transcrição reversa (RT)

Uma vez extraído, o RNA obtido foi submetido à reação de Transcrição Reversa, a fim de se obter o DNA complementar (cDNA). Para cada reação, 10 µL do RNA extraído de cada amostra foi utilizado. Foram adicionados de 2 µL de RT Buffer 10X, 2 µL de Randon Primers (50 ng/µL), 4,2 µL de água DEPC e 50 U de enzima MultiScribe™ Reverse Transcriptase. Essa reação foi então colocada no termociclador a 25 °C por 10

minutos, 37 °C por 120 minutos, 85 °C por 5 minutos e resfriadas a 4 °C até serem retiradas.

4.3.3. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Nested-PCR.

4.3.3.1 Coronavírus

Utilizando o protocolo de detecção de Coronavírus desenvolvido por POON et al. (2005), que utiliza como alvo o gene da RpRd presente no ORF 1 do genoma viral, foi realizada uma Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) seguida de uma Nested-PCR originando um fragmento de 440 pares bases (pb). Os primers utilizados estão na tabela 1.

Tabela 1: Primers utilizados no protocolo para detecção de Coronavírus.

Primer	Sequência (5'-3')	Reação
Foward	GGKTGGGAYTAYCCKAARTG	PCR
Reverse	TGYTGTSWRCARAAATCARTG	PCR
Foward	GGTTGGGACTATCCTAAGTGTGA	Nested-PCR
Reverse	CCATCATCAGATAGAATCATCAT	Nested-PCR

Para realizar o PCR, foram transferidos 3,0 µL do cDNA de cada amostra aos poços de uma nova placa de PCR (96 orifícios), 2,5 µL de Buffer 10X, 1,25 µL de MgCl₂ (50 mM), 0,5 µL de dNTP (10 µM), 2,5 µL de PCR Primer Foward (10 pMol/µL), 2,5 µL de PCR Primer Reverse (10 pMol/µL), 0,125 µL da enzima TaqTM DNA Polymerasee 12,625 µL de água DEPC. A reação foi então colocada no termociclador a 94 °C por 2 minutos e 40 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 48 °C por 30 segundos, 72 °C por 40 segundos, 72 °C por 7 minutos e mantido a 4 °C após o final dos ciclos. Já para a Nested PCR, em uma nova placa, foram colocados 2,0 µL do produto de PCR, 2,5 µL de Buffer 10X, 1,25 µL de MgCl₂ (50 mM), 0,5 µL de dNTP (10 mM), 1,25 µL de Nested PCR Primer Foward (10 pMol/µL), 1,25 µL de Nested PCR Primer Reverse (10 pMol/µL), 0,125 µL da enzima TaqTM DNA Polymerasee 16,125 µL de água DEPC, submetidos às mesmas condições de tempo e temperatura descritas para a reação de PCR.

4.3.3.2 Herpervírus

Utilizamos dois protocolos de Herpesvírus, um desenvolvido por Chmielewicz e colaboradores (2001) – o protocolo P32 – e outro desenvolvido por VanDervanter e colaboradores (1996) – o protocolo P33.

O protocolo P32 tem como alvo o gene que codifica para a DNA polimerase. Foi realizada uma Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) seguida por uma Nested-PCR, gerando um fragmento de 215 a 315 pares de base (pb). Na PCR utilizamos dois Primers Fowards – o DFK e o ILK – e um Reverse – o KG1 (tabela 2). Na Nested-PCR utilizamos o Primer Foward TGV e o Primer Reverse IYG (tabela2).

Tabela 2: Primers utilizados no protocolo P32 para detecção de Herpesvírus.

Primer	Sequência (5'-3')	Reação
DFA Foward	GAYTTYGCNAGYYTNTAYCC	PCR
ILK Foward	TCCTGGACAAGCAGCARNYSGCNMTNAA	PCR
KG1 Reverse	GTCTTGCTCACCAGNTCNACNCCYTT	PCR
TGV Foward	TGTAACTCGGTGTAYGGNTTYACNGGNGT	Nested-PCR
IYG Reverse	CACAGAGTCCGTRTCNCCRTADAT	Nested-PCR

Para realizar o PCR, foram transferidos 5,0 µL do DNA de cada amostra aos poços de uma nova placa de PCR (96 orifícios), 2,5 µL de Buffer 10X, 1,0 µL de MgCl₂ (50 mM), 1,0 µL de dNTP (10 µM), 1,0 µL de PCR dos dois Primers Foward (10 pMol/µL), 1,0 µL de PCR Primer Reverse (10 pMol/µL), 0,3 µL da enzima TaqTM DNA Polymerasee 12,2 µL de água DEPC. A reação foi então colocada no termociclador a 95 °C por 2 minutos, 45 ciclos de 96 °C por 5 segundos, 46 °C por 8 segundos, 68 °C por 12 segundos, 72 °C por 2 minutos e mantido a 4 °C após o final dos ciclos. Já para a Nested PCR, em uma nova placa, foram colocados 5 µL do produto de PCR, 2,5 µL de Buffer 10X, 1,0 µL de MgCl₂ (50 mM), 1,0 µL de dNTP (10 mM), 1,0 µL de Nested PCR Primer Foward (10 pMol/µL), 1,0 µL de Nested PCR Primer Reverse (10 pMol/µL), 0,3 µL da enzima TaqTM DNA Polymerasee 16,125 µL de água DEPC, submetidos às mesmas condições de tempo e temperatura descritas para a reação de PCR.

O protocolo P33 tem como alvo o gene que codifica para Terminase. Foi realizada uma Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) seguida por uma Nested-PCR, gerando um fragmento de 519 pb na PCR e 419 pb na Nested-PCR. Na PCR utilizamos o Primers Fowards TS-TERM_707s e o Primer Reverse TS-TERM_707as. Na Nested-PCR utilizamos o Primer Foward TS-TERM_708s e o Primer Reverse TS-TERM_708as (Tabela 3).

Tabela 3: Primers utilizados no protocolo P33 de Herpesvírus.

Primer	Sequência (5'-3')	Reação
TS-TERM_707S	TTGTGGACGAGRSIMAYTTYAT	PCR
TS-TERM_707	ACAGCCACGCCNGTICCGAIGC	PCR
TS-TERM_708S	GCAAGATCATNTTYRTITCITC	Nested-PCR
TS-TERM_708	TGTTGGTCGTRWAIGCIGGRT	Nested-PCR

O protocolo P33 também implicou uma Reação em Cadeia da Polimerase seguida por uma Nested-PCR, gerando um fragmento de 419 a 519 pares de base (pb). Para realizar o PCR, foram transferidos 5,0 µL do DNA de cada amostra aos poços de uma nova placa de PCR (96 orifícios), 2,5 µL de Buffer 10X, 1,0 µL de MgCl₂ (50 mM), 1,0 µL de dNTP (10 µM), 1,0 µL de PCR Primer Forward (10 pMol/µL), 1,0 µL de PCR Primer Reverse (10 pMol/µL), 0,3 µL da enzima Taq™ DNA Polymerasee 12,2 µL de água DEPC. A reação foi então colocada no termociclador a 95 °C por 5 minutos, 45 ciclos de 96 °C por 5 segundos, 46 °C por 8 segundos, 68 °C por 12 segundos, 72 °C por 2 minutos e mantido a 4 °C após o final dos ciclos. Já para a Nested PCR, em uma nova placa, foram colocados 5 µL do produto de PCR, 2,5 µL de Buffer 10X, 1,0 µL de MgCl₂ (50 mM), 1,0 µL de dNTP (10 mM), 1,0 µL de Nested PCR Primer Forward (10 pMol/µL), 1,0 µL de Nested PCR Primer Reverse (10 pMol/µL), 0,3 µL da enzima Taq™ DNA Polymerasee 13,20 µL de água DEPC, submetidos às mesmas condições de tempo e temperatura descritas para a reação de PCR.

4.3.4. Eletroforese em gel de agarose

Foram confeccionados géis de agarose na concentração 2%, adicionados de 2,5 µL de brometo de etídio. No primeiro poço de cada linha do gel, foram aplicados 2 µL de marcador de peso molecular (DNA ladder, 0,25 µg/µL) e, nos demais poços, 15 µL de amostra com 3 µL de Blue Juice 10X. Como controle positivo para Coronavírus foi utilizado cepa vacinal Massachusetts. Para Herpesvírus, o controle utilizado foi proveniente de amostras clínicas positivas para Herpes Simplex 1 (HSV1) e Herpes Simplex 2 (HSV2).

Os géis foram então submetidos à eletroforese a 100 mA por 50 minutos. Foram consideradas amostras positivas para herpesvírus aquelas que apresentaram banda na

altura referente a 440 pb esperadas na reação de Nested. Para coronavírus, foram consideradas positivas as amostras que apresentaram banda referente a 419 pares de base.

4.3.5. Purificação dos fragmentos amplificados para reação de Sequenciamento

Para a purificação dos produtos da PCR e Nested nas amostras que não apresentaram bandas inespecíficas foi utilizado protocolo do Kit ExoSap-IT® (Affymetrix), de acordo com as instruções do fabricante. No caso de amostras que apresentaram bandas inespecíficas na eletroforese em gel de agarose, utilizamos o GeneJET™ Gel Extraction Kit (ThermoScientific), de acordo com as instruções dos fabricantes.

4.3.6. Reação de Sequenciamento

As reações de sequenciamento foram feitas utilizando o BigDye® Terminator v3.1 CycleSequencing Kit (AppliedBiosystems) e colocadas no termociclador GeneAmp PCR System 9700, de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida, as amostras foram purificadas usando o BigDye X Terminator® Purification kit (Applied Biosystems) e aplicadas no sequenciador automatizado ABI PRISM 3130XL DNA Sequencer (Applied Biosystems).

4.3.7. Análise das sequências

Os cromatogramas gerados contendo as sequências nucleotídicas foram analisados através do programa Bioedit v.7.2.5 e aquelas em sentido antisenso foram transformadas para seu reverso complementar. Foi verificada a similaridade com sequências existentes através do serviço Blast-n do GenBank da página do NCBI (National Center for Biotechnology Information) no endereço eletrônico: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> de onde também foram importadas diversas sequências já descritas da região alvo amplificada que foram editadas e alinhadas através do software Clustaw W2.1. As árvores filogenéticas foram geradas a partir das sequências nucleotídicas a partir do método de “neighbor-joining” para realização da inferência filogenética foram importadas sequências do GenBank dos diversos grupos de Coronavírus.

5. RESULTADOS

5.1. Morcegos

Registramos espécies distribuídas em duas famílias, quatro subfamílias e pertencentes a três guildas. O total foi de 134 indivíduos, de 9 espécies, sendo 26 *Artibeus fimbriatus*, 14 *Artibeus lituratus* (Figura 14A), 1 *Carollia perspicillata*; 24 *Glossophaga soricina* (Figura 8), 1 *Histiotus velatus*, 1 *Myotis riparius*; 11 *Platyrrhinus lineatus*, 32 *Sturnira lilium* e 23 *Sturnira tildae* (Figura 14 B). A guilda dos frugívoros foi a mais abundante, tendo *S. tildae* e *A. fimbriatus* como as espécies predominantes.

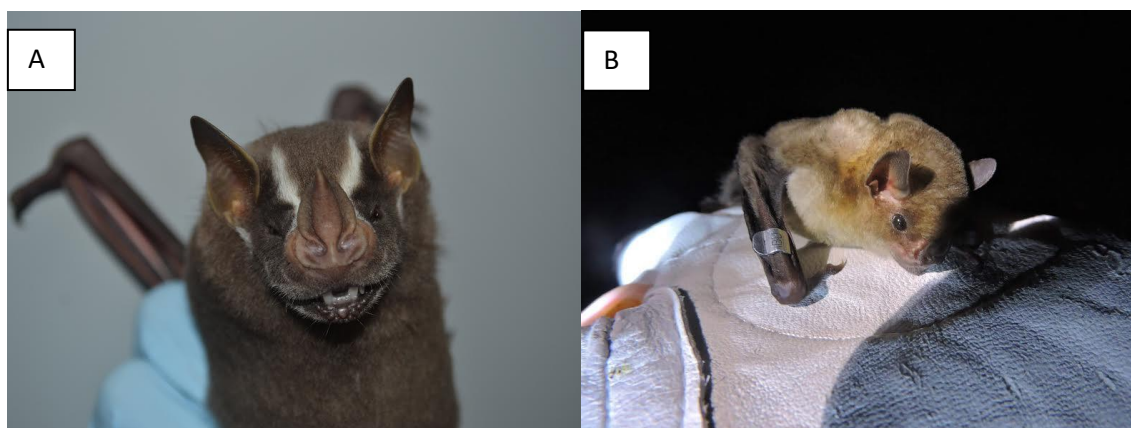


Figura 14: a.: *Artibeus lituratus* capturado em setembro de 2017 (Créditos: Vanessa B. Teixeira). b.: Morcego do gênero *Sturnira* capturado em setembro de 2017 (Créditos: Vanessa B. Teixeira).

5.2. Ectoparasitos

Identificamos cerca de 150 ectoparasitos dentre ácaros e moscas pertencentes a pelo menos 10 espécies, 7 gêneros e 5 famílias. A classificação pode ser observada melhor na tabela 4, bem como a relação parasito-hospedeiro dos espécimes encontrados.

Encontramos três espécies de ácaros Mesostigmata distribuídos nas famílias Macronyssidae e Spinturnicidae. *Parichoronyssus euthysternum* (Figura 15 A) foi encontrado parasitando *S. lilium* e *S. tildae*; *Periglischrus iheringi* (Figura 15 B) foi encontrado parasitando *A. lituratus*, *A. fimbriatus*, *S. lilium* e *S. tildae*; *Periglischrus ojasti* foi encontrado parasitando quase as mesmas espécies que *P. iheringi*, excetuando-se *A. fimbriatus*. Além de spinturnicídeos e macronissídeos adultos, encontramos protoninfas de Macronyssidae, Spinturnicidae e de *Parichoronyssus*. Ainda dentro da classe dos ácaros, porém pertencentes à ordem Sarcoptiformes, encontramos dois espécimes, cada um de uma família: Sarcoptidae e Psoroptidae. O psoroptídeo foi

classificado até o taxón família e sarcoptídeo foi classificado gênero: *Chirnyssoides sp.* Foi o primeiro registro de *P. euthy sternum* e *Chirnyssoides sp* para o estado de São Paulo e o primeiro registro de uma protoninfa de *Parichoronyssus*.

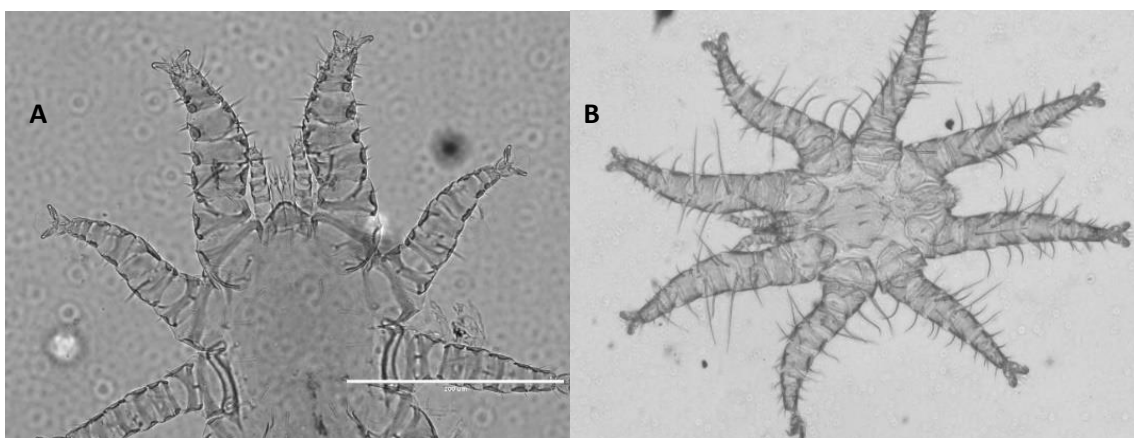


Figura 15 : a.: Ácaro da família Macronyssidae, *P. euthy sternum* (Créditos: Amanda Viana). b.: Ácaro da família Spinturnicidae *P. iheringi* (Créditos: Amanda Viana).

Dípteros da família Streblidae apresentaram o maior número de espécies. *Aspidoptera sp.* foi encontrada parasitando *S. tildae* e *S. lilium*. *Megistopoda aranea* foi encontrada sobre *A. fimbriatus* e *S. lilium*. *Megistopoda proxima* foi encontrada em *S. lilium* e *S. tildae*. Um espécime *Megistopoda sp.* (Figura 16A) foi encontrado sobre *S. tildae*. *Paratrichobius longicrus* (Figura 16B) foi encontrado sobre *A. fimbriatus*, *A. lituratus*, *P. lineatus* e *S. lilium*. Finalmente, *Trichobius longipes* foi encontrado parasitando *G. Soricina*.



Figura 16: A) Mosca *Megistopoda proxima*. Nota-se o terceiro par de patas, que é mais longo que os outros, e o par de asas reduzido (Créditos: Elizabete C. Lourenço). B) *Paratrichobius longicrus*. A asa ultrapassa o comprimento do corpo e é possível observar uma fileira de cerdas, do tipo espiniformes, transversal à coxa do primeiro par de patas (Créditos: Elizabete C. Lourenço).

Tabela 4: Relação de ectoparasitos encontrados e seus respectivos hospedeiros.

Família	Espécie	Fase	Hospedeiro
Acari			
Macronyssidae	-	Protoninfa	<i>A. lituratus</i> <i>S. liliium</i>
	<i>Parichoronyssus euthystrum</i>	Adulto	<i>S. liliium</i> <i>S. tildae</i>
	<i>Parichoronyssus</i> sp.	Protoninfa	<i>S. tildae</i>
Spiruridae			
	-	Protoninfa	<i>S. tildae</i>
	<i>Periglischrus iheringi</i>	Adulto	<i>A. fimbriatus</i> <i>A. lituratus</i> <i>S. tildae</i> <i>S. liliium</i>
	<i>Periglischrus ojasti</i>	Adulto	<i>A. Lituratus</i> <i>S. tildae</i> <i>S. liliium</i>
Sarcopt			

t i d a e	<i>Chirnyssoides</i> sp.	Adulto e ovos	<i>S. lilium</i>
P s o r o p t i d a e	-		<i>S. lilium</i>
I n s e c t a			
S t r e b l i d a e	<i>Aspidoptera</i> sp.	Adulto	<i>S. lilium</i> <i>S. tilda</i>
	<i>Megistopoda aranea</i>	Adulto	<i>A. fimbriatus</i> <i>S. lilium</i>
	<i>Megistopoda proxima</i>	Adulto	<i>S. lilium</i> <i>S. tilda</i>
	<i>Megistopoda</i> sp.	Adulto	<i>S. tilda</i>
	<i>Paratrachobius longicrus</i>	Adulto	<i>A. fimbriatus</i> <i>A. lituratus</i> <i>P. lineatus</i> <i>S. lilium</i>
	<i>Trichobius longipes</i>	Adulto	<i>G. soricina</i>

O hospedeiro com maior diversidade de ectoparasitos foi *S. lilium*, seguida por *S. tilda*. Em *P. lineatus* e *G. soricina* foram encontrados apenas uma espécie de ectoparasito. Encontramos algumas co-ocorrências entre Spinturnicidae, Macronyssidae, Psoroptidae, Sarcoptidae e Streblidae. Na tabela 5 podemos observar essas co-ocorrências mais detalhadamente. Os estreblídeos *M. proxima*, *P. longicrus* e *Trichobius longipes* não foram encontrados em co-ocorrência.

Tabela 5: Relação de Co-ocorrência de ectoparasitos em determinados hospedeiros.

Táxon	Hospedeiro
Macronyssidae + Spinturnicidae <i>Parichoronyssus euthystrum + Periglischrus ojasti</i>	<i>Artibeus lituratus</i>
Macronyssidae + Streblidae <i>Parichoronyssus euthystrum + Streblidae</i>	<i>Sturnira lilium</i>
Spinturnicidae + Streblidae <i>Periglischrus ojasti + Megistopoda aranea</i>	<i>Sturnira lilium</i>
<i>Periglischrus iheringi + Periglischrus ojasti + Streblidae</i>	<i>Artibeus lituratus</i>
Sarcoptidae + Streblidae <i>Chirnyssoides sp. + Streblidae</i>	<i>Sturnira lilium</i>
Streblidae + Streblidae <i>Aspidoptera sp. + Megistopoda sp.</i>	<i>Sturnira tildae</i>
Macronyssidae + Psoroptidae + Streblidae <i>Parichoronyssus euthystrum + Psoroptidae + Streblidae</i>	<i>Sturnira tildae</i>
Macronyssidae + Spinturnicidae + Streblidae <i>Parichoronyssus euthystrum + Periglischrus iheringi + Streblidae</i>	<i>Sturnira tildae</i>

5.3. Detecção de Herpesvírus e Coronavírus por PCR e RT-PCR

Foram testadas para Herpesvírus e Coronavírus um total de 221 amostras, provenientes de 134 morcegos capturados no Parque do Instituto Butantan, entre swab oral, retal e ectoparasitos.

O resultado da eletroforese em gel de agarose para Herpesvírus nas amostras de ectoparasitos, apresentaram positividade em 14, apenas no protocolo 33 (P33), enquanto as amostras de swab oral e retal dos morcegos apresentaram positividade em 19 amostras apenas no protocolo 32 (P32). Embora o gel tenha apresentado 14 bandas, não conseguimos sequências de herpes em nenhuma amostra de ectoparasito.

Na eletroforese em gel de agarose para as amostras provenientes dos swabs, encontramos 19 amostras suspeitas de positivas no protocolo P32 (Figura 17).

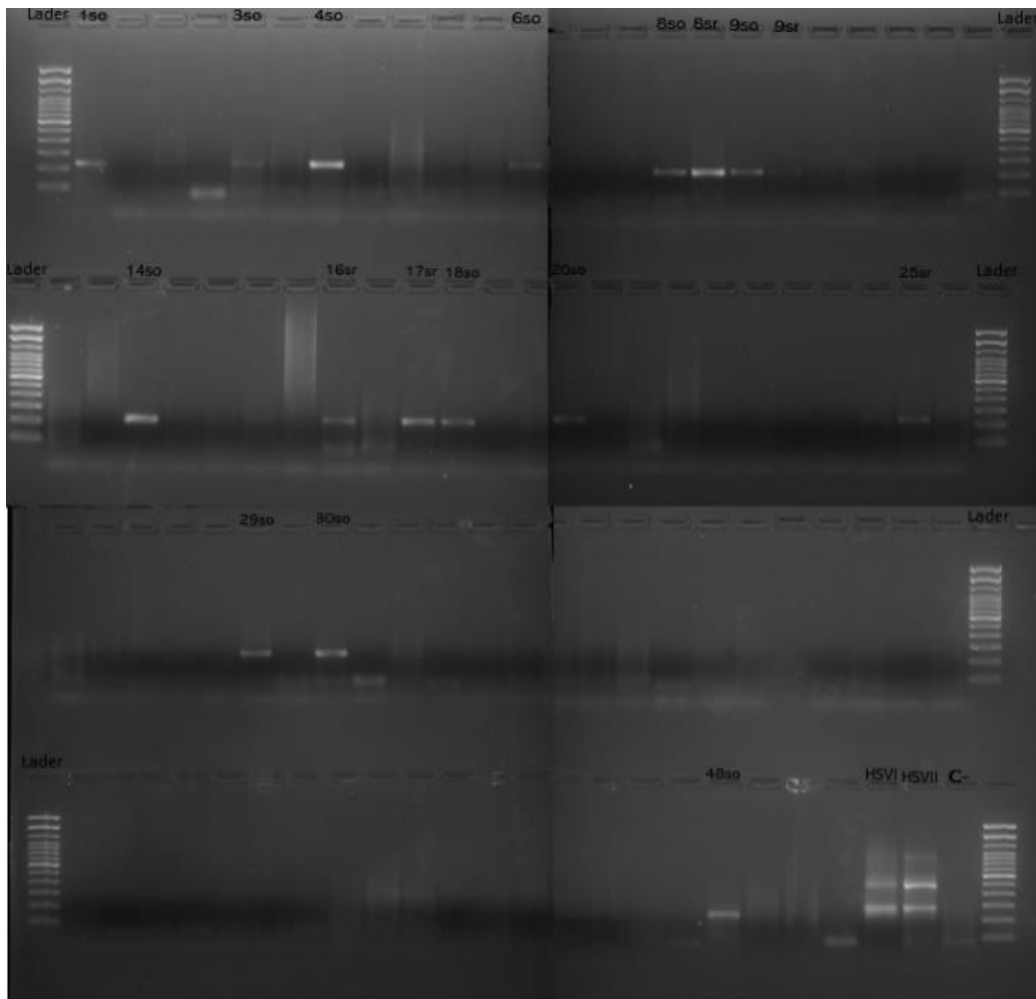


Figura 17: Eletroforese em gel de agarose referentes às amostras de swab de morcegos testados para Herpesvírus. Podemos ver as amostras suspeitas de positivo, a peso molecular disposto lateralmente e os controles usados: HSVI e HSVII.

As amostras de swab e ectoparasitos foram testadas para Coronavírus e na eletroforese em gel de agarose observamos algumas amostras que levantaram banda na altura do fragmento gerado na PCR e também na altura dos controles. Tanto as amostras de swab quanto as de ectoparasito apresentaram bandas. Na eletroforese em gel de agarose das amostras de swab, observamos nove bandas (Figura 18). As amostras suspeitas são oriundas de seis das nove espécies encontradas (Tabela 5). Apenas *Histiotus velatus* não teve amostra suspeita, no entanto, é importante lembrar que temos apenas um indivíduo capturado dessa espécie.

Em relação às amostras de ectoparasitos, encontramos uma banda na altura do fragmento esperado, de 419 pb (Figura 19). Essa amostra é de um ácaro coletado de um *Artibeus fimbriatus*.

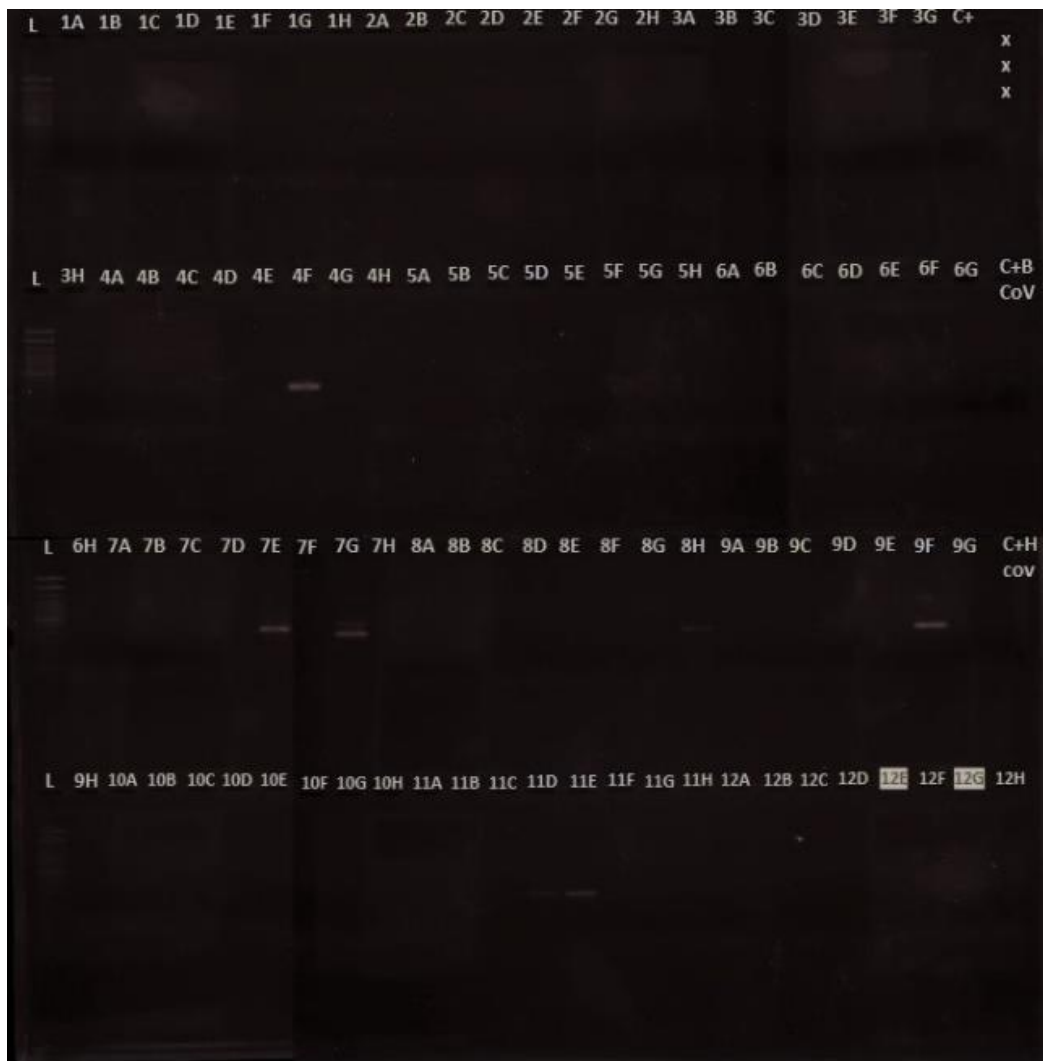


Figura 18: Eletroforese em gel de agarose referentes às amostras de swab testadas para Coronavírus. Gel referente às amostras de swab de morcegos testados para Coronavírus.

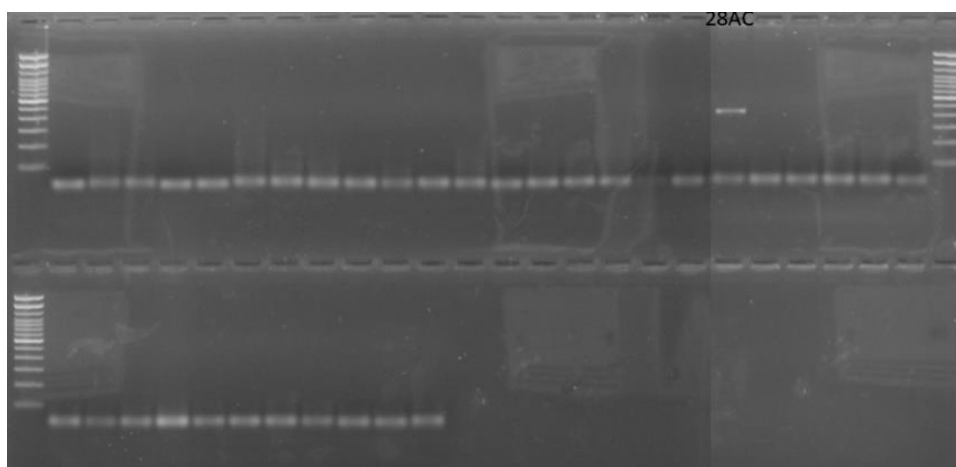


Figura 19: Eletroforese em gel de agarose referente às amostras de ectoparasitos de morcegos testados para Coronavírus.

5.4. Sequenciamento das amostras positivas de Herpesvírus e Coronavirus

Para herpesvírus, testamos 129 amostras, no entanto, obtemos sequências de sete amostras, sendo 6 amostras de swab oral e 1 de swab retal (Tabela 6). Foram 6 morcegos positivos: 1 *A. fimbriatus*, 2 *G. soricina*, 2 *S. tildae* e 1 *S. lilium*. A prevalência foi de 12,2%, pois foram sete morcegos positivos para 49 testados. Em ambas as amostras 8SO e 8SR, oriundas do mesmo morcego, encontramos sequências semelhantes. De acordo com o blast, nossas sequências se aproximaram de 4 *Gammaherpesvírus*, sendo 1 Rhadinovírus, 1 Betaherpesvírus e 1 não classificado.

Tabela 6: Relação das amostras com maior cobertura pelo BlastN sequências obtidas no algoritmo “BlastN”.

Amostra	Blast	e-Value	Identidade	Local	Ano	Hospedeiro	Descrição
1SO <i>A. fimbriatus</i>	JN692429	2.00E-21	75.95%	China	2011	Chiroptera <i>Myotis ricketti</i>	<i>Gammaherpesvírus</i>
4SO <i>G. soricina</i>	KX434628	2.00E-18	80.91%	China	2008	Cetáceo	<i>Gammaherpesvírus</i>
5SO <i>S. tildae</i>	KR261896	2.00E-07	79.01%	China	2014	Chiroptera <i>Cynopterus sphinx</i>	Não classificado
8SO/8SR <i>S. lilium</i>	MN850458	1.00E-12	80.00%	Martinica	2014	Chiroptera <i>Sturnira angeli</i>	<i>Gammaherpesvírus</i>
9SR <i>S. tildae</i>	MN850445	3.00E-27	87.27%	Guiana Francesa	2014	Chiroptera <i>Sturnira tildae</i>	<i>Betaherpesvírus</i>
14SO <i>G. soricina</i>	AY949828	6.00E-14	73.83%	EUA	2001	Cetaceo	<i>Gammaherpesvírus</i> <i>Rhadinovírus</i> não classificado

Quanto a Coronavirus, testamos 222 amostras, referentes a 99 morcegos. Encontramos sequências referentes a 10 amostras, sendo 5 swab retal, 4 swab oral e 1 ácaro ectoparasito de morcego. Foram 7 morcegos positivos: 3 *G. soricina*, 2 *A. lituratus* e 2 *A. fimbriatus*. A prevalência foi de 6%. Na amostra 28AC, a amostra de ácaro, foi encontrado um coronavírus que se assemelha com o fragmento do coronavírus encontrado na amostra 28SR, a amostra de swab retal do hospedeiro (*A. fimbriatus*) do ácaro. Encontramos 5 Alphacoronavírus e 4 Coronavírus não classificados. Encontramos coronavírus tanto em swab oral e retal de dois morcegos da espécie *G. soricina*, referentes às amostras 5 e 45 (Figura 20). Para a árvore filogenética, não utilizamos a amostra 12SO (Swab oral de *A. lituratus*) devido à baixa qualidade do fragmento sequenciado.

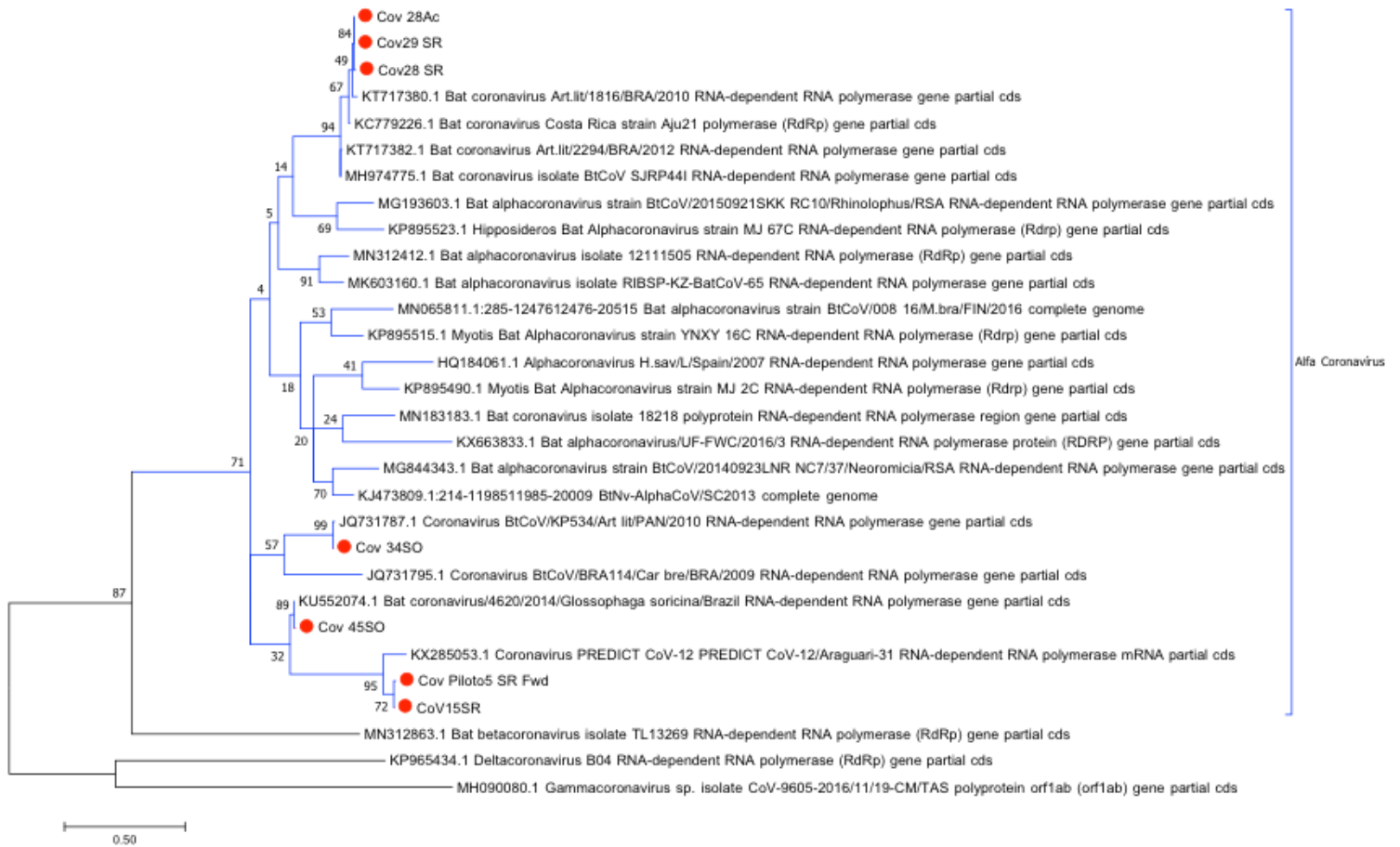


Figura 20: Árvore filogenética das sequências de Coronavírus encontradas nas amostras de swab e ectoparasito de morcego. CoV28AC: Sequência encontrada em ácaro ectoparasito de morcego de registro 28, um *A. fimbriatus*. CoV28SR: Swab retal do morcego 28. CoV29SR: Swab retal de um *A. fimbriatus*. CoV34SO: Swab oral de *A. lituratus*. CoV45SO: Contig das sequências encontradas em swab oral e retal de *Glossophaga soricina*. Piloto 5SR: Contig das sequências de swab oral e retal de *Glossophaga soricina*. 15SR: Swab retal de *Glossophaga soricina*.

6. DISCUSSÃO

No Parque do Instituto Butantan encontramos morcegos frugívoros, nectarívoros e insetívoros, com predominância da guilda de morcegos frugívoros, pertencentes à família Phyllostomidae. O resultado encontrado está de acordo com o esperado para áreas urbanas, onde somente espécies com grande tolerância às perturbações ambientais poderiam ser encontradas no Parque do Instituto Butantan (BREDT et al., 1996; ESBÉRARD et al., 2014).

As relações parasito-hospedeiro encontradas para os ácaros já haviam sido relatadas em outros estudos (LOURENÇO et al., 2020). *P. ojasti* está intimamente associada ao gênero *Sturnira*, mas já foi também registrado em outros filostomídeos, como *A. lituratus* (HENRRIN; TIPTON, 1975). *P. iheringi* apresenta uma forte relação com *Artibeus lituratus* (HENRRIN; TIPTON, 1975; LOURENÇO et al., 2020), mas também já foi relatado em *A. fimbriatus* (LOURENÇO et al., 2020), *S. lilium* (HENRRIN; TIPTON, 1975) e *S. tildae* (CONFALONIERI, 1976).

A espécie *P. euthy sternum* tem um padrão de distribuição neotropical e pode ser encontrado em morcegos filostomídeos (MORALES-MALACARA; GUERRERO, 2007). No Brasil, já foi registrado em *S. lilium*, no estado do Rio de Janeiro (ALMEIDA et al., 2011). Existe uma grande lacuna de conhecimento sobre ectoparasitas de morcegos, especialmente ácaros. O presente estudo contribui para o conhecimento sobre os ácaros para o estado de São Paulo, acrescentando o registro de *P. euthy sternum* e *Chyrnissoides* sp.

Quanto aos dípteros encontrados em seus respectivos hospedeiros, sabe-se que *M. aranea* e *M. proxima* parasitam morcegos da subfamília Stenodermatinae, cujos quirópteros do gênero *Artibeus* e *Sturnira* são representantes dessa subfamília. Suspeita-se que *M. aranea* seja parasita preferencial de *A. fimbriatus* e sabe-se que *M. proxima* é parasita primário de morcegos do gênero *Sturnira*. Os dados obtidos neste estudo corroboram com essa informação. *Paratrichobius longicrus* é considerado hospedeiro primário de *A. lituratus*, mas já foi encontrado em outros hospedeiros, inclusive *S. lilium*. (GRACIOLLI; CARVALHO, 2001).

Em relação aos herpesvírus, podemos notar que as sequências encontradas no presente trabalho se assimilaram – quando realizada a busca no BLAST – a quirópteros e cetáceos da América do Norte (Martinica e EUA), América do Sul (Guiana Francesa) e Ásia (China). Tratando-se de Chiroptera, podemos notar que as sequências encontradas por nós em morcegos do gênero *Sturnira* (8SO, 8SR, 9SR) apresentaram uma identidade

de cerca de 80% com herpes encontrados também em *Sturnira* da América do Sul. No caso da amostra 5SO, proveniente de *S. tildae*, compartilha 70% de identidade com herpes encontrado em morcego da espécie *C. sphinx* que – embora de outra família – pertence à mesma guilda, a dos frugívoros. O resultado mais destoante dentre os morcegos, foi da amostra 1SO, pois se trata de uma sequência encontrada em *A. fimbriatus* que compartilha uma identidade de 75,95% com uma sequência encontrada em *M. ricketti*. Esses mosceros são pertencentes, respectivamente, à guilda dos frugívoros e insetívoros.

Das seis sequências de herpesvírus encontradas, 4 foram de *Gammaherpesvírus*. A subfamília *Gammaherpesviridae* possui vírus que causam importantes doenças em humanos. Sequências de vírus dessa família tem sido muito encontrada em morcegos (ZHENG et al., 2016; WADA et al., 2018). Além do mais, foi demonstrado que eles podem causar efeitos citopáticos em células Vero e que podem se replicar em algumas linhagens de células humanas (HOST; DAMANIA, 2016; SHABMAN et al., 2016). Recentemente Wada e colaboradores (2018) encontraram uma alta frequência de um novo *Gammaherpesvírus* em morcegos frugívoros na Indonésia. Embora os herpesvírus encontrados em morcegos até o momento não tenha importância zoonótica ou emergente, acreditamos o conhecimento acerca da relação herpesvírus – morcego possam nos trazer dados importantes para compreender a relação mais ampla entre morcegos e vírus, ainda mais em um país como o Brasil, onde a quiropterofauna é extremamente diversa.

Com relação aos Coronavírus detectados em amostras de Swab oral, retal e em uma amostra de ácaro, análises filogenéticas apontam a circulação de alphacoronavírus nos morcegos capturados. Encontramos sequências de coronavírus em três espécies de morcegos pertencentes a duas guildas, frugívoros e nectarívoros. Além disso, pudemos notar que sequências encontradas em determinadas espécies eram semelhantes a sequências encontradas na mesma espécie ou em espécies da mesma guilda, isso quando o hospedeiro havia sido identificado, segundo as informações disponíveis no Blast. Uma sequência encontrada em um *A. lituratus* foi similar a uma sequência de *A. lituratus* capturado no Panamá, com 98% de similaridade (CORMAN et al., 2013). Esses dados, de coronavírus associados ao mesmo táxon de morcegos de regiões distintas, foi encontrado por Goés e colaboradores (2016) em um estudo realizado na Mata Atlântica. Nossos dados reforçam indícios de que a diversidade de Coronavírus possa estar relacionada com o táxon de morcego (CUI et al., 2007; ANTHONY et al., 2017). Por fim, podemos notar que o coronavírus encontrado no ácaro ectoparasito do morcego se encontra no mesmo cladro do coronavírus encontrado em seu hospedeiro, ambas as amostras de número 28.

O que demonstra que essas sequências encontradas são similares. É possível que o ácaro funcione ao menos como vetor mecânico, transmitindo o vírus sem que esse se multiplique nele.

A identificação de diferentes coronavírus, em diferentes espécies de morcegos em um parque que, além de estar localizado em uma região densamente povoada, pode chegar a receber até 200 mil visitantes anualmente, reforça a importância de trabalhos de monitorarmos principalmente os coronavírus, que possuem grande potencial emergente (WOŹNIAKOWSKI; SAMOREK-SALAMONOWICZ, 2015).

7. CONCLUSÃO

Este trabalho contribuiu com os seguintes conhecimentos acerca de ectoparasitos e vírus em morcegos para o estado de São Paulo:

- Identificamos 9 espécies de morcegos e 10 espécies de ectoparasitos;
- Fizemos o primeiro registro de *P. euthystrum* e *Chyrnissoides* sp para o Estado de São Paulo;
- Coletamos pela primeira vez uma protoninfa de *P. euthystrum*;
- Constatamos a presença vírus pertencentes às famílias *Herpesviridae* e *Coronaviridae* em Swabs orais e retais de morcegos;
- Detectamos um coronavírus ainda não caracterizado em ácaro ectoparasito de morcego. O mesmo coronavírus foi detectado no hospedeiro deste ácaro.

8. REFERÊNCIAS

ALLOCATI, N., PETRUCCI, A. G., DI GIOVANNI, P., MASULLI, M., DI ILIO, C.; DE LAURENZI, V. Bat–man disease transmission: zoonotic pathogens from wildlife reservoirs to human populations. **Cell Death Discovery**, v.2, p. 16048, 2016.

ALMEIDA, J.C., SILVA, S.S., SERRA-FREIRE, N.M., & VALIM, M.P. Ectoparasites (Insecta and Acari) associated with bats in Southeastern Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 48, n. 4, p. 753-757, 2011.

ALMEIDA, J.; SERRA-FREIRE, N.; PERACCHI, A. Anatomical location of *Periglischrus iheringi* (Acari: Spinturnicidae) associated with the great fruit-eating bat (Chiroptera: Phyllostomidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria**, v. 24, n. 3, p. 361-364, 2015.

ALMEIDA, J.; SILVA, S.; SERRA-FREIRE, N.; PERACCHI, A. Diversidade ectoparasitológica em morcegos na Fazenda Marambaia, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. **Chiroptera Neotropical**, v. 16, n. 1, 2010.

AMARAL, R. B.; LOURENÇO, E. C.; FAMADAS, K. M.; GARCIA, A. B.; MACHADO, R. Z.; ANDRE, M. R. Molecular detection of *Bartonella* spp. and *Rickettsia* spp. in bat ectoparasites in Brazil. **PLoS One**, v. 13, n. 6, p. 1-22, 2018.

ANTHONY, S. J.; JOHNSON, C. K.; GREIG, D. J.; KRAMER, S.; CHE, X.; WELLS, H.; ... KARESH, W. Global patterns in coronavirus diversity. **Virus evolution**, v. 3, n. 1, 2017.

AZNAR-LOPEZ, C.; VAZQUEZ-MORON, S.; MARSTON, D. A.; JUSTE, J.; IBANEZ, C.; BERCIANO, J. M.; ... FOOKS, A. R. Detection of rhabdovirus viral RNA in oropharyngeal swabs and ectoparasites of Spanish bats. **Journal of General Virology**, v. 94, n. 1, p. 69-75, 2013.

BANERJEE, A.; KULCSAR, K.; MISRA, V.; FRIEMAN, M.; MOSSMAN, K. Bats and coronaviruses. **Viruses**, v. 11, n. 1, 2019.

BENIAC, D.R., ANDONOV, A., GRUDESKI, E., & BOOTH, T.F. Architecture of the SARS coronavirus prefusion spike. *Nature Structural and Molecular Biology*, v. 13, n. 8, p. 751, 2006.

BERTOLA, P.B.; AIRES, C.C.; FAVORITO, S.E.; GRACIOLLI, G.; AMAKU, M.; PINTO-DA-ROCHA, R. Bat flies (Diptera: Streblidae, Nycteribiidae) parasitic on bats (Mammalia: Chiroptera) at Parque Estadual da Cantareira, São Paulo, Brazil: parasitism rates and host-parasite associations. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 1, p. 25-32, 2005.

BREDT, A.; ARAÚJO, F.A.A.; CAETANO-JÚNIOR, J. RODRIGUES, M.G.R.; YOSHIZAWA, M.; SILVA, M.M.S.; MASSUNAGA, P.N.T.; BÜRER, S.P.; POTRO, V.A.R.; UIEDA, W. Morcegos em áreas urbanas e rurais: manual de manejo e controle. **Ministério da Saúde**, p. 117, 1996.

BROOK, C.E.; DOBSON, A.P. Bats as 'special' reservoirs for emerging zoonotic pathogens. **Cell Press: Trends in Microbiology**, v. 23, n. 3, p. 172-180, 2015.

BORDIGNON, O.M.; REIS, N.R.; PERACCHI, A.L.; BATISTA, C.B. Sobre os morcegos brasileiros. *In*: REIS, N.R.; PERACCHI, A.L.; BATISTA, C.B.; LIMA, I.P.; PEREIRA, A.D. (Orgs.). História Natural dos Morcegos Brasileiros. **Technical Books Editora**, p. 17-20, 2017

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

CARINI, A. Sur une grande épizootie de rage. **Ann Inst Pasteur**, v. 25, p. 843-846, 1911.

CHAN, J. F. W.; TO, K. K. W.; TSE, H., JIN, D. Y.; YUEN, K. Y. Interspecies transmission and emergence of novel viruses: lessons from bats and birds. **Trends in microbiology**, v. 21, n. 10, p. 544-555, 2013.

CHENG, P.K., WONG, D.A., TONG, L.K., IP, S.M., LO, A.C., LAU, C.S., ... & LIM, W.W. Viral shedding patterns of coronavirus in patients with probable severe acute respiratory syndrome. **The Lancet**, v. 363, n. 9422, p. 1699-1700, 2004.

CHMIELEWICZ, B; GOLTZ, M; EHLERS, B. Detection and multigenic characterization of a novel *Gammaherpesvirus* in goats. **Virus research**, v. 75, n. 1, p. 87-94, 2001.

CONFALONIERI, U.E.C. Sobre a família Spinturnicidae Oudemans, 1902 e seus hospedeiros no Brasil, com um estudo biométrico de *Periglischrus iheringi* Oudemans, 1902 e *Periclischrus ojastii* Machado-Allison, 1964 (Arthropoda: Acari: Mesostigmata). **Tese**, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1976.

CORMAN, V. M.; BALDWIN, H. J.; TATENO, A. F.; ZERBINATI, R. M.; ANNAN, A.; OWUSU, M.; ... VALLO, P. Evidence for an ancestral association of human coronavirus 229E with bats. **Journal of virology**, v. 89, n. 23, p. 11858-11870, 2015.

CUI, J., HAN, N., STREICKER, D., LI, G., TANG, X., SHI, Z., ... & WANG, L. Evolutionary relationships between bat coronaviruses and their hosts. **Emerging infectious diseases**, v. 13, n. 10, p. 1526, 2007.

DAVISON, A.J.; EBERLE, R.; EHRLS, B. The order herpesvirales. **Arch Virol**, v. 154, p. 171-177, 2009.

DE GROOT, R. J.; BAKER, S. C.; BARIC, R. S.; BROWN, C. S.; DROSTEN, C.; ENJUANES, L.; FOUCHIER, R. a M.; GALIANO, M.; GORBALENYA, A. E.; MEMISH, Z.; PERLMAN, S.; POON, L. L. M.; SNIJDER, E. J.; STEPHENS, G. M.; WOO, P. C. Y.; ZAKI, A. M.; ZAMBON, M.; ZIEBUHR, J. Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV); Announcement of the Coronavirus Study Group. **Journal of virology**, v. 5, n. May, p. 13-15, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23678167>>.

- DIAS, E.; CHANDLER, A.C. Human Diseases transmitted by Parasitic Bugs. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 47, p. 423-441, 1949.
- DICK, C.W.; GANNON, M.R.; LITTLE, W.E.; PATRICK, M.J. Ectoparasite associations of bats from central Pennsylvania. **Journal of Medical Entomology**, v. 40, n. 6, p. 813-819, 2003.
- DICK, C.W.; GETTINGER, D.; GARDNER, S.L. Bolivian ectoparasites: A survey of bats (Mammalia Chiroptera). **Comparative Parasitology**, v. 74, n. 2, p. 372-378, 2007.
- DICK, C.W.; PATTERSON, B.D. Bat flies: obligate ectoparasites of bats. In *Micromammals and macroparasites*. **Springer**, 2006.
- DOMINGUEZ, S.R.; O'SHEA, T.J.; OKO, L.M.; HOLMES, K.V. Detection of group 1 coronaviruses in bats in North America. **Emerging infectious diseases**, v. 13, n. 9, p. 1295, 2007.
- DREXLER, J.F.; CORMAN, V.M.; GLOZA-RAUSCH, F.; SEEBENS, A.; IPSEN, A.; KRUPPA, T.; MÜLLER, M.A.; KALKO, E.K.; ADU-SARKODIE, Y.; OPPONG, S.; DROSTEN, C. Henipavirus RNA in african bats. **PLoS One**, v.4, n. 7, 2009.
- DROSTEN, C.; GÜNTHER, S.; PREISER, W.; VAN DER WERF, S.; BRODT, H. R.; BECKER, S.; ... BERGER, A. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. **New England journal of medicine**, v. 348, n. 20, p. 1967-1976, 2003.
- EHLERS, B.; LOWDEN, S. Novel herpesviruses of Suidae: indicators for a second genogroup of artiodactyl *Gammaherpesviruses*. **Journal of general virology**, v. 85, n. 4, p. 857-862, 2004.
- ESBÉRARD, C.E.; BERGALLO, H.G. Influência do esforço amostral na riqueza de espécies de morcegos no sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 25, n. 1, p. 67-73, 2008.
- Esbérard, C.; Daemon, C. Um novo método para marcação de morcegos. **Chiroptera neotropical**, p. 116-117, 1999.
- ESBÉRARD, C. E. Diversidade de morcegos em área de Mata Atlântica regenerada no sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Zoociências**, v. 5, n. 2, 2009.
- ESBÉRARD, C.E. Influência do ciclo lunar na captura de morcegos **Phyllostomidae**. **Iheringia, série zoologia**, v. 97, n. 1, p. 81-85, 2007.
- ESBÉRARD, C.E., LUZ, J.L., COSTA, L.M., & BERGALLO, H.G. Bats (Mammalia, Chiroptera) of an urban park in the metropolitan area of Rio de Janeiro, southeastern Brazil. **Iheringia. Série Zoologia**, v. 104, n. 1, p. 59-69, 2014.
- FAN, Y.; ZHAO, K.; SHI, Z.; ZHOU, P. Bat coronaviruses in China. **Viruses**, v. 11, 2019.

FAVORETTO, S. R.; ALMEIDA, M. F. D.; MARTORELLI, L. F. A.; AIRES, C. C., Labruna, M. B.; KATAOKA, A. P. A. G.; ... KOPROWSKI, H. Experimental infection of the bat tick *Carios fonsecai* (Acari: Ixodidae) with the rabies virus. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 6, p. 788-790, 2013.

FEHR, A. R.; PERLMAN, S. Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. In *Coronaviruses* (pp. 1-23). **Humana Press**, 2015.

FENTON, M.B. Bats. **New York: Facts on File**, p. 207, 1992.

FENTON, M.B.; SIMONS, N.B. Bats: a word of science and mystery. **University of Chicago Press**, 2015.

FLINT, J., RACANIELLO, V.R., RALL, G.F., & SKALKA, A.M. Principles of virology, Volume I: molecular biology (Ed. 4), 2015.

FRANK, R.; MÜNSTER J.; SCHULZE, J.; LISTON, A.; KLIMPEL, S. Macroparasites of Microchiroptera: bat ectoparasites of Central and South America. In *Bats (Chiroptera) as vectors of diseases and parasites*. **Springer**, P. 87-130, 2014.

GALINDO-GONZÁLES, J. Dispersión de semillas por murciélagos: su importancia em la conservación y regeneración del bosque tropical. **Acta Zoológica Mexicana, Nueva Serie**, v. 73, p. 57-74, 1998.

GARBINO, G.S.T.; GREGORIN, R.; LIMA, I.P.; LOUREIRO, L.; MORAS, L.M.; MORATELLI, R.; NOGUEIRA, M.R.; PAVAN, A.C.; TAVARES, V.C.; PERACHI, A.L. **Updated checklist of Brazilian bats**: versão 2020. Comitê da Lista de Morcegos do Brasil/Sociedade Brasileira para o Estudo de Quirópteros. Disponível em: <https://www.sbeq.net/lista-de-especies>. Acesso em: 16 novembro 2020.

GILL, J.S.; ROWLEY, W.A.; BUSH, P.J.; VINER, J. P.; GILCHRIST, M.J.R. Detection of human blood in the bat tick *Carios (Ornithodoros) kelleyi* (Acari: Argasidae) in Iowa. **Journal of medical entomology**, v. 41, n. 6, p. 1179-1181, 2004.

GÓES, L.G.B.; RUVACABA, S.G.; CAMPOS, A.A.; QUEIROZ, L.H.; CARVALHO, C.; JEREZ, J.A.; DURIGON, E.L.; DÁVALOS, L.I.I.; DOMINGUEZ, S.R. Novel bat coronaviruses, Brazil and Mexico. **Emerging infectious diseases**, v. 19, n. 10, p. 1711, 2013.

GOLDBERG, T.L.; BENNETT, A.J.; KITYO, R.; KUHN, J.H.; CHAPMAN, C.A. Kanyawara virus: a novel rhabdovirus infecting newly discovered nycteribiid bat flies infesting previously unknown pteropodid bats in Uganda. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, 2017.

GRACIOLLI, G; CARVALHO, C.J.B. Moscas ectoparasitas (Diptera, Hippoboscoidea) de morcegos (Mammalia, Chiroptera) do Estado do Paraná. II. Streblidae. Chave pictórica para gêneros e espécies. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 18, n. 3, p. 907-960, 2001.

GRIFFIN, D.R.; WEBSTER, F.A.; MICHAEL, C.R. The echolocation of flying insects by bats. **Animal Behavior**, v. 8, p. 141-154, 1960

GUERRERO, R. Catalogo de los streblidae (Diptera: pupipara) parasitos de murcielagos (Mammalia: chiroptera) del nuevo mundo II: Los grupos: pallidus, caecus, major, uniformis y longipes del género Trichobius gervais, 1844. **Acta biologica venezolica**, v. 15, n. 1, p. 1-18, 1994.

GUERRERO, R. Catalogo de los Streblidae (Diptera: Pupipara) parasitos de murcielagos (Mammalia: Chiroptera) del Nuevo Mundo. III. Los grupos: Dugesii, Dumni y Phyllostomae del genero Trichobius gervais, 1844. **Acta Biologica Venezuelica**, v. 15, n. 3-4, 1995.

HALPIN, K.; YOUNG, P.L.; FIELD, H. E.; & MACKENZIE, J. S. Isolation of Hendra virus from pteropid bats: a natural reservoir of Hendra virus. **Journal of General Virology**, v. 81, n. 8, p. 1927-1932, 2000.

HAMRE, D.; PROCKNOW, J.J. A new virus isolated from the human respiratory tract. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 121, n. 1, p. 190-193, 1966.

HEALD-SARGENT, T.; GALLAGHER, T. Ready, set, fuse! the coronavirus spike protein and acquisition of fusion competence. **Viruses**, v. 4, n. 4, p. 557–580, 2012.

HERRIN, C.S; TIPTON, V.J. Spinturnicid mites of Venezuela (Acarina: Spinturnicidae). **Brigham Young University Science Bulletin, Biological Series**, v. 20, n. 2, p. 1, 1975.

HOCK, R.J. The metabolic rates and body temperatures of bats. **The Biological Bulletin**, v. 101, n. 3, p. 289-299, 1951.

HOGUE, B.G., & MACHAMER, C.E. Coronavirus structural proteins and virus assembly. In: Nidoviruses. **American Society of Microbiology**, p. 170-200, 2008.

HOST, K.M.; Damania, B. Discovery of a novel bat gammaherpesvirus. **mSphere**, v. 1, n. 1, 2016.

HOUCK, M.A.; QIN, H.; ROBERTS, H.R. Hantavirus transmission: potential role of ectoparasites. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, v. 1, n. 1, p. 75-79, 2001.

HUMPHREY, S.R.; BONACCORSO, F.J. Population and community ecology. In: BAKER, R.J.; JONES Jr, J.K.; CERTER, D.C. (Eds). *Biology of bats the new world Family Phyllostomidae*, part III. Special Publication Museum Texas Tech University, v. 16, p. 409-441, 1979.

HUYNH, J.; Li, S.; YOUNT, B.; SMITH, A.; STURGES, L.; OLSEN, J. C.; ... FRIEMAN, M. B. Evidence supporting a zoonotic origin of human coronavirus strain NL63. **Journal of virology**, v. 86, n. 23, p. 12816-12825, 2012.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES – ICTV. 2017. Available from: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> [2017 Mar 30]

JONES, J.K.; CARTER, D.C. Annotated checklist with keys to subfamilies and genera. *In*: BAKER R.J. JONES Jr, J.K.; KARTER, D.C. (Eds). *Biology of bats the new world family Phyllostomatidae, part I. Special Publication Museum Texas Tech University*, v. 10, p. 7-38, 1976.

KLUGER, M.J., KOZAK, W., CONN, C.A., LEON, L.R., & SOSZYNSKI, D. Role of fever in disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 856, n. 1, p. 224-233, 1998.

KOTAIT, I.; CARRIERI, M.L.; CAMIELI JR, P.; CASTILHO, J.G.; OLIVEIRA, R.D.N.; MACEDO, C.I.; FERREIRA, K.C.S.; ASCHKAR, S.M. Reservatórios silvestres do vírus da raiva: um desafio para a saúde pública. *BEPA. Boletim Epidemiológico Paulista (Online)*, v. 4, n. 40, p. 02-08, 2007.

LABRUNA, M.B.; MARCILI, A.; OGRZEWALSKA, M.; BARROS-BATTESTI, D. M.; DANTAS-TORRES, F.; FERNANDES, A. A.; ... VENZAL, J. M. New records and human parasitism by *Ornithodoros mimon* (Acari: Argasidae) in Brazil. *Journal of Medical Entomology*, v. 51, n. 1, p. 283-287, 2014.

LIMA, I.P. Espécies de morcegos (Mammalia, Chiroptera) registradas em parques nas áreas urbanas do Brasil e suas implicações no uso deste ambiente. *In*: Reis, N.R.; PERACCHI, A.L.; SANTOS, G.A.S.D. (Orgs). *Ecologia de Morcegos. Technical Books Editora*, p. 71-85, 2008.

LI, W.; SHI, Z.; YU, M.; REN, W.; SMITH, C.; EPSTEIN, J.H.; WANG, H.; CRAMERI, G.; HU, Z.; ZHANG, H.; Zhang, J.; McEachern, J.; Field, H.; Daszak, P.; Eaton B.T.; Zhang, S.; WANG, L. Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses. *Science*, v. 310, n. 5748, p. 676-679, 2005.

LEROY, E.M.; KUMULUNGUI, B.; POURRUT, X.; ROUQUET, P.; HASSANIN, A.; YABA, P.; SWANEPOEL, R. Fruit bats as reservoirs of Ebola virus. *Nature*, v. 438, n. 7068, p. 575, 2005.

LOURENÇO, E.C.; GOMES, L.A.C.; VIANA, A.O.V.; FAMADAS, K. M. (2020). Co-occurrence of Ectoparasites (Insecta and Arachnida) on Bats (Chiroptera) in an Atlantic Forest Remnant, Southeastern Brazil. *Acta Parasitologica*, 2020.

LOURENÇO, E.C.; PATRICIO, P.M.P; FAMADAS, K.M. Community components of spinturnicid mites (Acari: Mesostigmata) parasitizing bats (Chiroptera) in the Tingua Biological Reserve of Atlantic Forest of Brazil. *International Journal of Acarology*, v. 42, n. 2, p. 63-69, 2016.

LUCAN, R.K. Relationships between the parasitic mite *Spinturnix andegavinus* (Acari: Spinturnicidae) and its bat host, *Myotis daubentonii* (Chiroptera: Vespertilionidae): seasonal, sex-and age-related variation in infestation and possible impact of the parasite on the host condition and roosting behaviour. *Folia parasitologica*, v. 53, n. 2, p. 147, 2006.

- MAHONY, J.B., & RICHARDSON, S. Molecular diagnosis of severe acute respiratory syndrome: the state of the art. **The Journal of Molecular Diagnostics**, v. 7, n. 5, p. 551-559, 2005.
- MARSHAL, A.G. Ecology of insects ectoparasitic on bats. In: **Ecology of bats**. Springer, p. 369-401, 1982.
- MASTERS, P.S.; PERLMAN, S. Coronaviridae. In: **Fields Virology 6th Edition**. Lippincott, Williams & Wilkins, p. 1732-1767, 2013.
- MEDRONHO R.; BLOCH K.V.; LUIZ R.R.; WERNECK G.L. Epidemiologia. **Atheneu**, 2009.
- McGEOCH, D.J.; GATHERER, D. integrating reptilian herpesviruses into the family herpesviridae. **Journal of Virology**, v. 79, n. 2, p. 725-731, 2005.
- MORALES-MALACARA, J.B.; GUERRERO, R. A new species of Parichoronyssus (Acari: Dermanyssoidea: Macronyssidae) from bats of the Genus Phyllostomus (Chiroptera: Phyllostomidae) in Peru and Venezuela, with keys to the species of Parichoronyssus. **Journal of medical entomology**, v. 44, n. 1, p. 08-13, 2007.
- O'SHEA, T.J.; CRYAN, P.M.; CUNNINGHAM, A.A.; FOOKS, A.R.; HAYMAN, D.T.; LUIS, A.D.; PEL, A.J.; PLOWRIGHT, R.K.; WOOD, J.L.N. Bat flight and zoonotic viruses. *Emerging infectious diseases*, v. 20, n. 5, p. 741, 2014.
- PAYNE, S. Family Herpesviridae. In: PAYNE, S. (Eds). *Viruses*. Academic Press, p. 269-278, 2017.
- PELLETT, P.E.; ROIZMAN, B. Herpesviridae. In: **Fields Virology 6th Edition**. Lippincott, Williams & Wilkins, p. 1732-1767, 2013.
- PERACCHI, A.L.; LIMA, I.P.; REIS, N.L.; NOGUEIRA, M.R.; ORTÊNCIO-FILHO, H. Ordem Chiroptera. In: REIS, N.L.; PERACCHI, A.L.; PEDRO, W.A.; LIMA, I.P. (Orgs). *Mamíferos do Brasil*. **Universidade Estadual de Londrina**, p. 155-217, 2011.
- PLANT, E. P.; DINMAN, J. D. The role of programmed-1 ribosomal frameshifting in coronavirus propagation. **Frontiers in bioscience : a journal and virtual library**, v. 13, p. 4873-4881, 2008.
- PLOWRIGHT, R.K., FIELD, H.E., SMITH, C., DIVLJAN, A., PALMER, C., TABOR, G., ... & FOLEY, J. E. Reproduction and nutritional stress are risk factors for Hendra virus infection in little red flying foxes (*Pteropus scapulatus*). **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 275, n. 1636, p. 861-869, 2008.
- POON, L.L. M., CHU, D.K.W., CHAN, K.H., WONG, O.K., ELLIS, T.M., LEUNG, Y.H.C., ... & GUAN, Y. Identification of a novel coronavirus in bats. **Journal of virology**, V. 79, N. 4, P. 2001-2009, 2005.

POZO, F., JUSTE, J., VÁZQUEZ-MORÓN, S., AZNAR-LÓPEZ, C., IBÁÑEZ, C., GARIN, I., ... & ECHEVARRÍA, J.E. Identification of novel betaherpesviruses in Iberian bats reveals parallel evolution. **PloS one**, v. 11, n. 12, 2016.

RADOVSKY, F.J. The Macronyssidae and Laelapidae (Acarina: mesostigmata) Parasitic on Bats. **University of California Publications in Entomology**, v. 46, 1967.

RAZAFINDRATSIMANDRESY, R., JEANMAIRE, E.M., COUNOR, D., VASCONCELOS, P.F., & REYNES, J.M. Partial molecular characterization of alphaherpesviruses isolated from tropical bats. **Journal of General Virology**, v. 90, n. 1, p. 44-47, 2009.

REHMAN S.U.; SHAFIQUE, L.; IHSAN, A.; LIU, Q. Evolutionary trajectory for the emergence of novel coronavirus SARS-CoV-2. **Pathogens**, v. 9, n. 3, 240, 2020.

REIS, N.R., FREGONEZI, M.N., PERACCHI, A. L., & SHIBATTA, O. A. (Eds.). (2013). Morcegos do Brasil: guia de campo. **Technical Books**, 2013.

REIS, N.R., PERACCHI, A.L., BATISTA, C.B., DE LIMA, I.P., & PEREIRA, A.D. (Eds.). História Natural dos morcegos brasileiros: chave de identificação de espécies. **Technical Books**, 2017.

REIS, N.R.; SHIBATTA, O.A.; PERACCHI, A.L.; PEDRO, W.A.; LIMA, I.P. Sobre os morcegos brasileiros. *In*: REIS, N.R.; PERACCHI, A.L.; PEDRO, W.A.; LIMA, I.P. (Orgs). Morcegos do Brasil. **Universidade Estadual de Londrina**, p. 17-25, 2007.

REIS, N.R. Sobre a conservação dos morcegos. **Semina**, v. 3, n. 10, p. 107-109, 1982.

SHABMAN, R. S.; SHRIVASTAVA, S.; TSIBANE, T.; ATTIE, O.; JAYAPRAKASH, A.; MIRE, C.E.; ... SACHIDANANDAM, R. Isolation and characterization of a novel gammaherpesvirus from a microbat cell line. **Mosphere**, V. 1, N. 1, 2016.

SWANEPOEL, R.; SMIT, S.B.; ROLLIN, P.E.; FORMENTY, P.; LEMAN, P.A.; KEMP, A.; BURT, F.J.; GROBBELAAR, A.A.; CROFT, J.; BAUSCH, D.G.; ZELLER, H.; LEIRS, H.; BRAACK, L.E.; LIBANDE, M.L.; ZAKI, S.; NICHOL, S.T.; KSIAZEK, T.G.; PAWESKA, J.T. International Scientific and Technical Committee for Marburg Hemorrhagic Fever Control in the Democratic Republic of Congo. Studies of reservoir hosts for Marburg virus. **Emerg Infect Dis**, v. 13, n. 12, p. 1847-1851, 2007.

TANDLER, B. Cytomegalovirus in the principal submandibular gland of the little brown bat, *Myotis lucifugus*. **Journal of comparative pathology**, v. 114, n. 1, p. 1-9, 1996.

TEELING, E.C.; SPRINGER, M.S.; MADSEN, O.; BATES, P.; O'BRIEN, S. J.; MURPHY, W.J. A molecular phylogeny for bats illuminates biogeography and the fossil record. **Science**, v. 307, n. 5709, p. 580-584, 2005.

TURMELLE, A.S.; OLIVAL, K.J. Correlates of viral richness in bats (Order Chiroptera). **Ecohealth**, v. 6, n. 4, p. 522-539, 2009.

VAN DER HOEK, L., PYRC, K.; BERKHOUT, B. Human coronavirus NL63, a new respiratory virus. **FEMS microbiology reviews**, v. 30, n. 5, p. 760-773, 2006.

VANDEVANTER, D.R., WARRENER, P., BENNETT, L., SCHULTZ, E.R., COULTER, S., GARBER, R.L.; ROSE, T. M. Detection and analysis of diverse herpesviral species by consensus primer PCR. **Journal of clinical microbiology**, v. 34, n. 7, p. 1666-1671, 1996.

VAN VUREN, P.J., WILEY, M. R., PALACIOS, G., STORM, N., MARKOTTER, W., BIRKHEAD, M., ... & PAWESKA, J. T. Isolation of a novel orthobunyavirus from bat flies (*Eucampsipoda africana*). **The Journal of general virology**, v. 98, n. 5, p. 935, 2017.

WADA, Y., SASAKI, M., SETIYONO, A., HANDHARYANI, E., RAHMADANI, I., TAHA, S., ... & KOBAYASHI, S. Detection of novel *Gammaherpesviruses* from fruit bats in Indonesia. **Journal of medical microbiology**, v. 67, n. 3, p. 415-422, 2018.

WANG, Q.; QI, J.; YUAN, Y.; XUAN, Y.; HAN, P.; WAN, Y.; ... IWAMOTO, A. Bat origins of MERS-CoV supported by bat coronavirus HKU4 usage of human receptor CD26. **Cell host & microbe**, v. 16, n. 3, p. 328-337, 2014.

WENZEL, R. L. A catalogue of the Diptera of the Americas south of the United States. 100. Family Streblidae. **Mususeu de Zoologia, Universidade de Sao Paulo**, v. 100, p. 1-25, 1970.

WHITAKER JR, J.O. Collecting and preserving ectoparasites for ecological study. 1988.

WHITAKER J.R, J.O.; RITZI, C.M.; DICK, C.W. Collecting and preserving bat ectoparasites for ecological study. **Ecological and behavioral methods for the study of bats**, v. 2, p. 806-827, 2009.

WIBBELT, G., KURTH, A., YASMUM, N., BANNERT, M., NAGEL, S., NITSCHKE, A.; EHLERS, B. Discovery of herpesviruses in bats. **Journal of General Virology**, v. 88, n. 10, p. 2651-2655, 2007.

WOZNIAKOWSKI, G; SAMOREK-SALAMONOWICZ, E. Animal herpesviruses and their zoonotic potential for cross-species infection. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v. 22, n. 2, 2015.

Wu, Y.; Xu, X.; Chen, Z.; Duan, J.; Hashimoto, K.; Yang, L.; ...Yang, C. Nervous system involvement after infection with COVID-19 and other coronaviruses. **Brain, behavior, and immunity**, 2020.

YOU, Y., CHENG, A.C., WANG, M.S., JIA, R.Y., SUN, K.F., YANG, Q., ... & ZHAO, X.X. The suppression of apoptosis by α -herpesvirus. **Cell death & disease**, v. 8, n. 4, p. e2749, 2017.

ZAKI, A.M., VAN BOHEEMEN, S., BESTEBROER, T.M., OSTERHAUS, A.D.; FOUCHIER, R.A. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. **New England Journal of Medicine**, V. 367, N. 19, P. 1814-1820, 2012.

ZHENG, X.Y., QIU, M., CHEN, S.W., XIAO, J.P., MA, L.Z., LIU, S., ... & WU, Y. High prevalence and diversity of viruses of the subfamily Gammaherpesvirinae, family Herpesviridae, in fecal specimens from bats of different species in southern China. **Archives of virology**, V. 161, N. 1, P. 135-140, 2016.

ZHENGLI, S. Emerging infectious diseases associated with bat viruses. **Science China Life Sciences**, v. 56, n. 8, p. 678-682, 2013.

ZHOU, P., FAN, H., LAN, T., YANG, X.L., SHI, W F., ZHANG, W., ... & ZHENG, X.S. Fatal swine acute diarrhoea syndrome caused by an HKU2-related coronavirus of bat origin. **Nature**, v. 556, n. 7700, p. 255, 2018.

Zhou, P.; Yang, X. L.; Wang, X. G.; Hu, B.; Zhang, L.; Zhang, W.; ... Chen, H. D. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. **Nature**, v. 579, n. 7798, p 270-273, 2020.