



Estudo do ciclo epidemiológico do vírus rábico, por meio do levantamento de abrigos e populações de morcegos hematófagos e da diversidade da quiropterofauna na região de Presidente Prudente

LUIZA CRISTINA SAVIO RODENAS

**Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo
Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios
Instituto Biológico
Programa de Pós-Graduação em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no
Agronegócio**

Estudo do ciclo epidemiológico do vírus rábico, por meio do levantamento de abrigos e populações de morcegos hematófagos e da diversidade da quiropterofauna na região de Presidente Prudente

Luiza Cristina Savio Rodenas

Dissertação apresentada ao Instituto Biológico, da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, para obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

São Paulo
2021

Estudo do ciclo epidemiológico do vírus rábico, por meio do levantamento de abrigos e populações de morcegos hematófagos e da diversidade da quiropterofauna na região de Presidente Prudente

Dissertação apresentada ao Instituto Biológico, da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, para obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de concentração: Segurança alimentar e Sanidade no Agroecossistema

Orientadora: Dra. Ana Eugênia de Carvalho Campos

São Paulo
2021

Eu Luiza Cristina Savio Rodenas, autorizo o Instituto Biológico (IB-APTA), da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, a disponibilizar gratuitamente e sem ressarcimento dos direitos autorais, o presente trabalho acadêmico de minha autoria, no portal, biblioteca digital, catálogo eletrônico ou qualquer outra plataforma eletrônica do IB para fins de leitura, estudo, pesquisa e/ou impressão pela Internet desde que citada a fonte.

Assinatura: _____ Data ____ / ____ / ____

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo
Núcleo de Informação e Documentação – IB

Rodenas, Luiza Cristina Savio.

Estudo do ciclo epidemiológico do vírus rábico, por meio do levantamento de abrigos e populações de morcegos hematófagos e da diversidade da quiropterofauna na região de Presidente Prudente. / Luiza Cristina Savio Rodenas. - São Paulo, 2021.

75 p.

doi: 10.31368/PGSSAAA.2021D.LR006

Dissertação (Mestrado). Instituto Biológico (São Paulo). Programa de Pós-Graduação.

Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.
Linha de pesquisa: Manejo Integrado de pragas e doenças em ambientes rurais e urbanos.

Orientador: Ana Eugênia de Carvalho Campos.

Versão do título para o inglês: Study of the epidemiological cycle of the rabies virus, through a survey of shelters and populations of vampire bats and the diversity of chiropterofauna in the region of Presidente Prudente.

1. Mamíferos 2. Lyssavirus 3. Epidemiologia 4. Saúde Pública
I. Rodenas, Luiza Cristina Savio II. Campos, Ana Eugênia de Carvalho III. Instituto Biológico (São Paulo) IV. Título.

IB/IBI/2021/006

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Luiza Cristina Savio Rodenas

Título: Estudo do ciclo epidemiológico do vírus rábico, por meio do levantamento de abrigos e populações de morcegos hematófagos e da diversidade da quiroptero fauna na região de Presidente Prudente

Dissertação apresentado ao Programa de Pós-graduação em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio do Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Aprovado em: ___/___/___

Banca Examinadora

Dr. (a) _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dr. (a) _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dr. (a) _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTO

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida, por me sustentar em todos os momentos durante esses 2 anos de projeto.

Agradeço a toda a minha Família por me apoiar, acreditar no meu trabalho e me incentivar a lutar pelos meus sonhos.

Agradeço a minha orientadora **Dra. Ana Eugênia de Carvalho Campos**, por me acolher, confiar e acreditar em minha capacidade. Agradeço também por todos os ensinamentos transmitidos durante o mestrado, por toda paciência, apoio e dedicação ao me orientar.

Agradeço ao Pesquisador **Dr. Avelino Albas**, pela amizade e pelos 10 anos de trabalho que desenvolvemos juntos, por me ensinar desde o básico da rotina do laboratório até a escrita de um artigo científico. O senhor foi peça fundamental em todo o processo da minha formação profissional, sou eternamente grata.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação do Instituto Biológico de São Paulo pela oportunidade de realização do mestrado e a todos os professores por todos os ensinamentos.

Agradeço a Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela oportunidade da bolsa de mestrado e apoio financeiro obtido durante todo o desenvolvimento da pesquisa (Código de Financiamento 001).

Agradeço ao Laboratório da Apta regional do Polo da Alta Sorocabana em Presidente Prudente, por todo o apoio no desenvolvimento do projeto. Agradeço aos pesquisadores e doutores: **Eidi Yoshihara, Ricardo Firetti, Tatiana Evelyn Hayama Ueno**, por todas as vezes que precisei de auxílio e orientação, estavam sempre prontos a me ajudar. Agradeço especialmente ao Técnico **Edival Pereira dos Santos** por me acompanhar em toda etapa de levantamento de abrigos e coleta dos morcegos hematófagos.

Agradeço aos amigos biólogos **Pedro Felis, Vinicius Vasconcelos** e especialmente a **Dévlín Breda Boer**, pela ajuda nas coletas. Por estarem sempre dispostos a me ajudar, agradeço pelas noites que passaram acordados auxiliando o desenvolvimento do projeto, sem vocês as coletas da área urbana não seriam possíveis.

Agradeço a **Caroline Cotrim Aires, Gisely Toledo Barone e Juliana Amorim Conselheiro** do Laboratório de Diagnóstico de Zoonoses e Doenças Transmitidas por Vetores da Divisão de Vigilância de Zoonoses de São Paulo, pelo auxílio nas análises das amostras.

Agradeço ao **Dr. Rogério Giuffrida** da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), pela ajuda com as análises estatísticas deste trabalho e também pelas sugestões e orientações.

Agradeço ao Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal da Universidade Estadual Paulista (UNESP) – Araçatuba, pelos ensinamentos sobre ecologia e taxonomia de quirópteros.

Agradeço ao Escritório de Defesa Agropecuária (EDA) - Presidente Prudente pela parceria entre o nosso projeto e o programa de controle da Raiva dos herbívoros na região.

Agradeço a Secretaria do Meio Ambiente do Município de Presidente Prudente, por autorizar o desenvolvimento do trabalho na área urbana, em especial ao Biólogo **André Goncalves**.

Agradeço aos Doutores **Cristiano de Carvalho** e **Paulo Eduardo Brandão** membros da banca de Qualificação e Defesa de Mestrado pelas sugestões e correções para melhoria do trabalho.

Agradeço a todos os amigos que fiz nessa jornada que me ajudaram, ensinaram e viveram comigo todos os processos do mestrado. Agradeço especialmente a minha amiga **Juliana Borelli** por me apoiar e não me deixar desistir nos momentos difíceis.

Muito obrigada a todos!

RODENAS, Luiza Cristina Savio. **Estudo do ciclo epidemiológico do vírus rábico, por meio do levantamento de abrigos e populações de morcegos hematófagos e da diversidade da quiropteroфаuna na região de Presidente Prudente.** 2021. 73 f. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, 2021.

RESUMO

Estima-se que a ordem dos quirópteros contribua com cerca de um quarto das espécies de toda a fauna brasileira de mamíferos. Apresentam grande importância nos ecossistemas, inclusive no urbano, sendo excelentes polinizadores, controladores de insetos entre outras várias funções para a cadeia alimentar. Algumas espécies são uma ameaça à saúde pública. Frequentemente os abrigos de morcegos estão próximos à criação de animais domésticos ou a edificações utilizadas por pessoas e animais de companhia. Essa proximidade pode ocasionar a transmissão de diversas enfermidades, dentre elas a Raiva, especialmente pelos morcegos de hábitos hematófagos, que desempenham, importante papel como reservatórios e agentes transmissores do vírus que causa essa doença. O presente trabalho objetivou a identificação e levantamento de abrigos utilizados por morcegos hematófagos (*Desmodus rotundus*) e um levantamento de espécies de morcegos urbanos, a fim de verificar a presença do vírus da Raiva, detectar a presença de anticorpos antirrábicos e associar os resultados para entender o perfil epidemiológico da Raiva na região de Presidente Prudente. Para isso, o trabalho foi dividido em duas etapas. Na parte rural foi realizado um levantamento de abrigos e a busca ativa nas rodovias da região, sendo todos eles georeferenciados. Foram encontrados 48 abrigos e destes, apenas quatro encontravam-se ativos. Dois abrigos apresentaram somente *Desmodus rotundus* e outros dois apresentaram compartilhamento, sendo que em um deles se observou a presença das seguintes espécies: *D. rotundus*, *Carollia perspicillata* e *Chrotopterus auritus* e no outro abrigo, *D. rotundus* e *C. perspicillata*. Nas colônias onde havia compartilhamento do abrigo entre *D. rotundus* e outras espécies de morcegos, foi coletado um espécime de cada espécie. Na parte urbana foram selecionados nove pontos de coletas dentro da cidade e um espécime de cada espécie de cada ponto foi coletado. Foram coletados um total de 163 morcegos de 17 espécies, sendo oito delas registradas na área urbana de Presidente Prudente pela primeira vez. Os morcegos capturados foram encaminhados ao Laboratório de Raiva de Presidente Prudente, onde foram coletadas amostras de sangue, sendo posteriormente anestesiados e eutanasiados. Amostras de tecido cerebral foram submetidas aos testes de imunofluorescência direta e cultivo celular. Todas as amostras foram 100% negativas. Anticorpos séricos foram mensurados, apresentando uma variação de 0,07UI/mL a 0,87 UI/mL. Foi realizada a pesquisa de Lyssavirus na gordura marrom. Entretanto, somente um morcego da espécie *Phyllostomus discolor*, apresentou resultado positivo, cujo sequenciamento mostrou ser a variante AGV₂, sendo este o primeiro relato no Brasil. O presente trabalho contribui para a prevenção, proteção e promoção à saúde pública por meio da vigilância que se fez por meio do monitoramento da circulação do vírus na região estudada.

Palavras-chave: Mamíferos, Lyssavírus, Epidemiologia, Saúde Pública

RODENAS, Luiza Cristina Savio. **Study of the epidemiological cycle of the rabies virus, through a survey of shelters and populations of vampire bats and the diversity of chiropterofauna in the region of Presidente Prudente.** 2021. 73 f. Dissertation (Master Degree in Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, 2021.

ABSTRACT

It is estimated that the bat order contributes to about a quarter of the species of all Brazilian mammal fauna. They have great importance in ecosystems, including urban ones, being excellent pollinators, insect controllers, among other functions for the food chain. Some species are a threat to public health. Bat shelters are often close to the breeding of domestic animals or buildings used by people and companion animals. This proximity can cause the transmission of several diseases, including rabies, especially by bats with hematophagous habits, which play an important role as reservoirs and transmitting agents of the virus that causes this disease. The present work aimed to identify and survey shelters used by vampire bats (*Desmodus rotundus*) and a survey of urban bat species, in order to verify the presence of the rabies virus, detect the presence of anti-rabies antibodies and associate the results to understand the epidemiological profile of rabies in the Presidente Prudente region. For this, the work was divided into two stages. In the rural area, a survey of shelters was carried out and an active search was carried out on the region's highways, all of which were georeferenced. Forty-eight shelters were found and of these, only four were active. Two shelters showed only *Desmodus rotundus* and the other two showed sharing, and in one of them the following species were observed: *D. rotundus*, *Carollia perspicillata* and *Chrotopterus auratus*, and in the other shelter, *D. rotundus* and *C. perspicillata*. In colonies where there was shared shelter among *D. rotundus* and other bat species, one specimen of each species was collected. In the urban environment, nine collection points within the city were selected and a specimen of each species from each point was collected. A total of 163 bats of 17 species were collected, eight of them registered in the urban area of Presidente Prudente for the first time. The captured bats were sent to the Presidente Prudente Rabies Laboratory, where blood samples were collected, and subsequently anesthetized and euthanized. Brain tissue samples were submitted to direct immunofluorescence and cell culture tests. All samples were 100% negative. Serum antibodies were measured, ranging from 0.07UI/mL to 0.87UI/mL. The search for Lyssavirus in brown fat was carried out. However, only one bat of the species *Phyllostomus discolor* showed a positive result, whose sequencing proved to be the variant AGV2, this being the first report in Brazil. The present work contributes to the prevention, protection and promotion of public health through surveillance carried out by monitoring the circulation of the virus in the studied region.

Keywords: Mammals, Lyssaviruses, Epidemiology, Public Health

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação esquemática da classificação dos membros do gênero *Lyssavirus*.....17
- Figura 2.** Representação esquemática do vírus da Raiva. O genoma do vírus da Raiva codifica cinco proteínas: N – Nucleoproteína, P – Fosfoproteína, G - Glicoproteína (espículas triméricas – cerca de 400 de aprox. de 6-7 nm cada) L – Polimerase e M - Proteína da matriz.....18
- Figura 3.** Ciclo epidemiológico de transmissão do vírus da raiva..... 19
- Figura 4.** Taxa de mortalidade de Raiva humana por tipo de animal agressor (1986 – 2020).. 20
- Figura 5.** Distribuição dos casos de raiva no Brasil nos anos de 1999 a 2019 21
- Figura 6.** Série temporal histórica à contagem de diagnóstico positivos para a Raiva nos anos de 1996 a 2015, no município de Presidente Prudente. 23
- Figura 7.** Busca ativa por abrigos nas rodovias da região de Presidente Prudente..... 30
- Figura 8.** Levantamento de pontos em área urbana na cidade de Presidente Prudente, SP. 31
- Figura 9.** Preparo de redes para captura do *Desmodus rotundus* em túneis.. 32
- Figura 10.** Armação de redes em área urbana e redes abertas em horário de coleta33
- Figura 11.** Morcegos *Desmodus rotundus* capturados e acomodados em gaiola e a contenção em Laboratório para o procedimento de anestesia do animal.....34
- Figura 12.** Mapa da região de Presidente Prudente com as rotas que foram percorridas, e os abrigos inativos e ativos (Presença de *Desmodus rotundus*).....40
- Figura 13.** Abrigos de morcegos localizados na região de Presidente Prudente.....42
- Figura 14.** Espécies de morcegos que compartilhavam o mesmo abrigo, sendo respectivamente: *Carollia perspicillata*, *Chrotopterus auritus* e *Desmodus rotundus*....

- Figura 15.** Sorologia de Morcegos *Desmodus rotundus* naturalmente capturados na região oeste do Estado de São Paulo. Utilizou-se para tal, o teste RFFIT (Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test).....43
- Figura 16.** Mapa do município de Presidente Prudente com os pontos selecionadas para as coletas em área urbana..... 45
- Figura 17.** Quantidade de indivíduos de cada família de morcegos em área urbana, na cidade de Presidente Prudente.....48
- Figura 18.** Análise filogenética da amostra positiva de *Phyllostomus discolor* coletado em área urbana na cidade de Presidente Prudente, SP.....51

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Casos de Raiva em bovinos nos últimos cinco anos no Brasil e no Estado de São Paulo..... 23
- Tabela 2.** Abrigos de morcegos visitados durante o experimento conduzido pelo Laboratório no período de 2006 a 2008.....26
- Tabela 3.** Número de capturas de morcegos hematófagos, datas das coletas e coordenadas geográficas dos abrigos na região de Presidente Prudente.....41
- Tabela 4.** Sorologia de Morcegos *Desmodus rotundus* naturalmente capturados 10^a na região oeste do Estado de São Paulo, com características sexuais. Teste RFFIT (Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test).....44
- Tabela 5.** Títulos sorológicos expressos como medianas \pm Desvios Interquartílicos em Unidades Internacionais por mL de soro (UI/mL) e características sexuais de morcegos hematófagos da espécie *Desmodus rotundus* capturados em quatro abrigos diferentes localizados na região de Presidente Prudente.....44
- Tabela 6.** Títulos sorológicos expressos como medianas \pm Desvios Interquartílicos em Unidades Internacionais por mL de soro (UI/mL) segundo características sexuais de morcegos hematófagos da espécie *Desmodus rotundus* capturados em quatro abrigos diferentes localizados na região de Presidente Prudente.....44
- Tabela 7.** Número de morcegos capturados com redes de neblina em área urbana na cidade de Presidente Prudente, no ano de 2020 a 2021.....45
- Tabela 8.** Espécimes de morcegos capturados em relação ao seu ponto de coleta e a distribuição das espécies pela cidade de Presidente Prudente..... 47

Tabela 9. Sorologia para a Raiva nas diferentes espécies de morcegos e seus respectivos pontos de coleta.....49

Tabela 10. Frequência de sororegentes e de animas com títulos protetores, Medianas \pm desvios interquartílicos dos títulos sorológicos soroneutralizantes expressos em Unidades internacionais por mL de soro (UI/mL) em morcegos capturados em zonas urbanas do município de Presidente Prudente, SP.....50

Tabela 11. Relação entre a guilda trófica e a frequência de sororegentes e de animas com títulos protetores, Medianas \pm desvios interquartílicos dos títulos sorológicos soroneutralizantes expressos em Unidades internacionais por mL de soro (UI/mL) em morcegos capturados em zonas urbanas do município de Presidente Prudente, SP.....50

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xi
1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1. Lyssavírus	17
2.2. Caracterização geral da Raiva	19
2.3. Situação Epidemiológica e prejuízo econômico	20
2.4. Estudo sobre a Raiva na região	22
2.5. Importância dos quirópteros na veiculação do vírus	23
2.6. Resposta imune a Raiva em morcego	25
2.7. Morcegos em área urbana	26
3. OBJETIVOS	28
3.1. Objetivo Geral	28
3.2. Objetivos Específicos	28
4. MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1. Desenho do estudo	29
4.2. Área do estudo	30
4.3. Coletas nos abrigos ativos	30
4.4. Coletas em área urbana	31
4.5. Amostras	32
4.6. Detecção do vírus rábico	33
4.7. Detecção de anticorpos contra o vírus rábico	35
4.8. Pesquisa de Lyssavírus na gordura marrom	35
4.9. Sequenciamento da amostra positiva	36
4.9.1. Reação em Cadeia da polimerase com transcrição reversa(RT-PCR) para amplificação de trecho do gene G	36
4.9.2. Purificação dos produtos de PCR e sequenciamento	37
4.9.3. Edição e análise das sequências	37
4.9.4. Análise filogenética	38
4.10 Análise estatística	38
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5.1. Parte rural	39
5.1.1. Pesquisa por abrigos da região	39

5.1.2.	Detecção do vírus rábico	41
5.1.3.	Detecção de anticorpos contra o vírus da raiva	41
5.1.4.	Pesquisa de Lyssavírus na gordura marrom	43
5.2.	Parte urbana	43
5.2.1	Espécies de morcegos coletados em área urbana	44
5.2.2.	Espécies de morcegos por pontos de coleta	45
5.2.3.	Análise laboratorial para a detecção do vírus da raiva e de anticorpos contra o vírus	47
5.2.4.	Pesquisa por Lyssavírus na gordura marrom	49
6.	DISCUSSÃO	51
7.	CONCLUSÃO	56
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

1. INTRODUÇÃO

Os mamíferos, devido ao seu sistema nervoso altamente desenvolvido e sua capacidade de adaptação, estão presentes em diversos ambientes da terra e estima-se que existam cerca de 5.400 espécies (HICKMAN, 2013). Os morcegos são os únicos dentro da classe dos mamíferos com capacidade de voo, devido aos seus braços e mãos sustentados por membranas e os seus dedos alongados (BREDT et al., 2012).

Estima-se que a ordem dos quirópteros representa cerca de um quarto de toda a fauna brasileira, sendo assim, o segundo maior grupo de mamíferos (PERACCHI et al., 2006). Os últimos levantamentos dos morcegos que habitam o Brasil, totalizaram 180 espécies, agrupadas em nove famílias e 68 gêneros (REIS, 2017).

Os morcegos constituem um dos grupos mais diversificados em relação aos hábitos alimentares, sendo: carnívoros, fitófagos, insetívoros, piscívoros, onívoros e hematófagos (REIS et al., 2007). Somente três espécies apresentam hábito alimentar hematofago, *Diphylla ecaudata* Spix, 1823 e *Diaemus youngi* Jentink, 1893 que se alimentam preferencialmente de sangue de aves e a terceira espécie denominada *Desmodus rotundus* E. geoffroy, 1810 que se alimenta de sangue de mamíferos. As três espécies pertencem à família Phyllostomidae (OLIVEIRA et al., 2009).

Os abrigos diurnos utilizados por *D. rotundus* são sempre abrigos internos, nos quais as suas colônias são protegidas contra variações ambientais, como: luz, temperatura, umidade e ventos. Na maioria das vezes, os abrigos são compartilhados entre mais de uma espécie de morcegos (UIEDA, 2008).

O morcego hematofago, *D. rotundus*, tem importante papel como reservatório e agente transmissor da Raiva, porém, o vírus da Raiva tem sido isolado de várias outras espécies não hematofagas, principalmente no Estado de São Paulo. A Raiva é uma zoonose característica dos mamíferos e possui ampla distribuição geográfica mundial. Entre os mamíferos, os carnívoros e os morcegos são considerados os principais agentes transmissores da Raiva (MARTORELLI et al., 1996; UIEDA et al., 1996; ALBAS et al., 2005; SODRÉ et al., 2010).

A Raiva é responsável por enormes prejuízos econômicos na América Latina, sendo que a Raiva dos herbívoros causa um prejuízo anual de mais de 30 milhões de dólares. No Brasil esse valor aproxima-se de 15 milhões de dólares/ano, com a morte de cerca de 40.000 cabeças bovinas (TEIXEIRA et al., 2015)

Experimentos realizados na região de Presidente Prudente mostraram que o vírus rábico continua circulando na região com pelo menos três variantes antigênicas e que a coabitação de morcegos hematófagos com os não hematófagos pode ter relação com a disseminação do vírus rábico (ALBAS et al., 2011).

Nos morcegos hematófagos, o vírus da Raiva tem um dos mais eficientes veículos de propagação, uma vez que, para a sua alimentação se faz necessário o ataque de outros animais, assim como de seus próprios parceiros em suas interações sociais (BREDT et al., 1996).

Em 2001, na região de Presidente Prudente, houve um caso de Raiva humana, em que uma mulher foi agredida por um gato, que provavelmente adquiriu o vírus de um morcego não hematófago, portador da variante 3, que está associada ao morcego *D. rotundus* (KOTAIT, 2003).

O laboratório do Polo da Alta Sorocabana, Presidente Prudente, SP, foi credenciado pelo Ministério da Saúde em 1995 para realização do diagnóstico laboratorial da Raiva. A partir desse período vem desenvolvendo estudos (ALBAS et al., 2005; 2011) sobre a ecologia e epidemiologia desta zoonose na região oeste do Estado de São Paulo.

No presente estudo é apresentado o levantamento de abrigos diurnos e o monitoramento do vírus rábico entre os morcegos da espécie *D. rotundus* e outras espécies de morcegos que coabitam com eles.

O conhecimento destes fatores pode permitir formular hipóteses mais sólidas acerca da dinâmica de transmissão da Raiva por quirópteros e subsidiar futuras políticas de controle, tanto nas zonas urbanas como rurais.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Lyssavírus

De acordo com o Comitê Internacional para Taxonomia de Vírus (ICTV), os vírus do gênero *Lyssavirus* pertence à família *Rhabdoviridae*. Essa família abriga cerca de 20 gêneros de vírus que são patógenos de uma grande variedade de espécies, incluindo animais vertebrados e invertebrados e plantas (ICTV, 2020).

O gênero *Lyssavirus* é classificado conforme suas propriedades antigênicas e as suas relações filogenéticas; atualmente possui 16 genótipos/espécies que são subdivididos em dois filogrupos. No filogrupo I estão os genótipos: vírus (RABV), Australian bat lyssavirus (ABLV), Duvenhage virus (DUVV), European bat lyssavirus 1 (EBLV-1), European bat lyssavirus 2 (EBLV-2), Aravan virus (ARAV), Khujand virus (KHUV), Bokeloh bat lyssavirus (BBLV), Irkut virus (IRKV) e Gannoruwa bat lyssavirus (GBLV). No filogrupo II estão três genótipos: Lagos bat virus (LBV), Mokola virus (MOKV) e Shimoni bat virus (SHIBV).

Os genótipos West Caucasian bat Lyssavirus (WCBV), Ikoma virus (IKOV) e Lleida bat lyssavirus (LLBV) não pertencem a nenhum filogrupo, pois eles divergem características com os outros dois. A distribuição dos membros do gênero *Lyssavirus* foi exemplificado por (ICTV, 2020; SHIPLEY et al., 2019) conforme mostra a (Fig. 1).

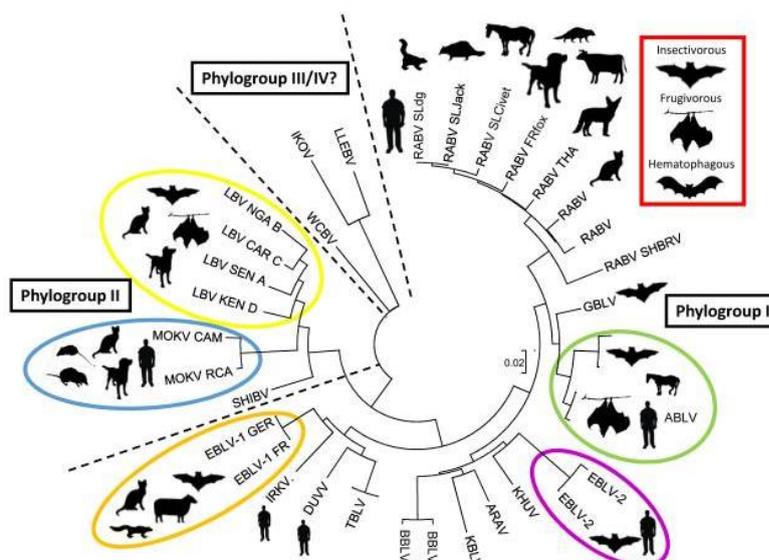


Figura 1. Representação esquemática da classificação genotípica dos membros do gênero

Lyssavirus. **Fonte:** SHIPLEY et al., 2019

Os genomas do Lyssavírus contêm apenas cinco genes de proteínas estruturais (3'- N - P- M - G - L-5 '), mas apresentam uma longa região 3' não traduzida após o G do RNA mensageiro. As partículas dos vírions apresentam uma estrutura de (60-110 nm x 130-250 nm), que é composta por duas estruturas: um nucleocapsídeo helicoidal interno de aproximadamente 50 nm de diâmetro, e um envelope lipídico. Essas partículas apresentam propriedades constituídas por RNA (2% a 3%), proteína (67% a 74%), lipídios (20% a 26%) e carboidratos (3%). A molécula de RNA é de fita simples com aproximadamente 11,9 a 12,3 kb de comprimento (RUPPRECHT ET AL., 2002; ICTV,2020) (Fig.2).

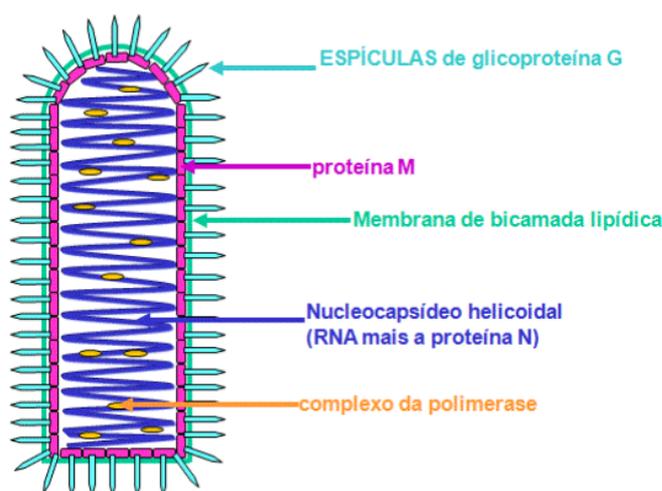


Figura 2. Representação esquemática do vírus da Raiva. O genoma do vírus da Raiva codifica cinco proteínas: N – Nucleoproteína, P – Fosfoproteína, G - Glicoproteína (espículas triméricas – cerca de 400 de aprox. de 6-7 nm cada) L – Polimerase e M - Proteína da matriz. **Fonte:** Internet

A veiculação dos Lyssavirus acontece durante agressões de animais infectados que introduzem o agente pela saliva nos tecidos expostos, onde multiplica-se e propaga-se para nervos periféricos e migram até o sistema nervoso central, pois são neurotróficos essenciais, causando em seus hospedeiros um quadro de mieloencefalite aguda. Uma vez manifestada nos hospedeiros, possui prognóstico praticamente fatal (HEMACHUDHA et al., 2013; KRISTENSSON; OLSSON, 1973; FOOKS et al., 2017)

2.2 Caracterização geral da Raiva

A Raiva é uma antropozoonose viral, negligenciada, de grande importância em saúde pública e veterinária, registrada em cinco continentes e em mais de 150 países (WHO,2018).

O vírus rábico pertence ao gênero *Lyssavirus* e pode afetar diversas espécies de mamíferos. Dessa forma, existem alguns animais reconhecidos como potenciais reservatórios do vírus para humanos, com destaque para cães domésticos, gatos, quirópteros e canídeos selvagens. Nas populações destes animais, o agente mantém-se em ciclos de transmissão periódicos, favorecidos pelo prolongado período de incubação (FINNEGAN et al., 2002; STONER et al., 2014).

O ciclo epidemiológico da Raiva na natureza é mantido através de quatro ciclo inter-relacionados: urbano, rural, silvestre aéreo e silvestre terrestre (Fig. 3). O ciclo urbano refere-se a transmissão do vírus a cães e gatos, que tem sido controlado por meio da vacinação dos animais de companhia. O ciclo rural refere-se à Raiva dos herbívoros, que envolve principalmente bovinos e equinos, na qual o principal transmissor é o morcego hematófago, a prevenção é feita através do controle do morcego hematófago e a vacinação dos animais. O ciclo aéreo e o silvestre referem-se à circulação do vírus em espécies silvestres. Em relação à espécie humana, todos os ciclos servem como fonte de transmissão ao homem (RODRIGUEZ, 2007; SAÚDE, 2019).

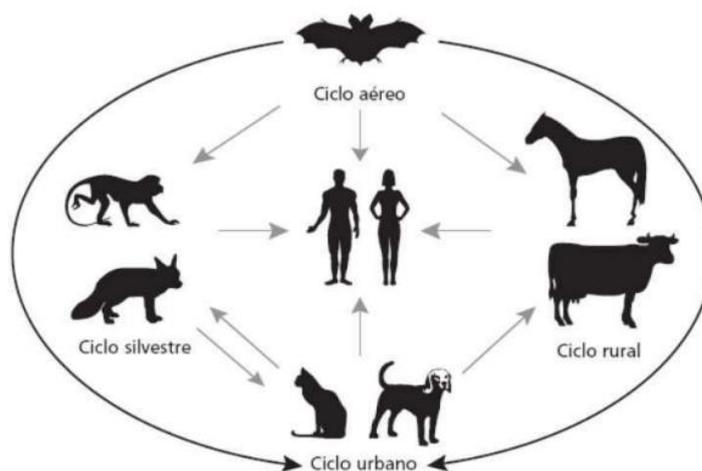


Figura 3. Ciclo epidemiológico de transmissão do vírus da raiva. **Fonte:** Ministério da Saúde, 2019

2.3 Situação epidemiológica e prejuízo econômico

Estima-se que ocorram no mundo, cerca de 55.000 mortes/ano em humanos decorrentes de Raiva, com casos concentrados em países da África e Ásia, onde a enfermidade apresenta caráter reemergente (KNOBEL et al., 2005). Nas Américas, a incidência de Raiva em humanos e caninos domésticos foi significativamente reduzida nos últimos 10 anos, entretanto, o número de infecções detectadas em quirópteros manteve-se relativamente elevado e estes animais passaram a constituir o principal reservatório do vírus no continente (ESCOBAR et al., 2015). Dados econômicos estimam que os gastos com a doença no mundo, pode chegar a 124 bilhões de dólares ao ano (ANDERSON; SHWIFF, 2015).

Segundo o Ministério da Saúde do Brasil (2020), nos últimos 30 anos, devido a ações de vigilância e controle da Raiva, as taxas de mortalidade por Raiva humana no Brasil vêm diminuindo, sendo que os casos relatados são de caráter esporádico e acidental. No período de 2010 a 2020, foram registrados 38 casos, conforme mostra o gráfico a seguir (Fig.4).

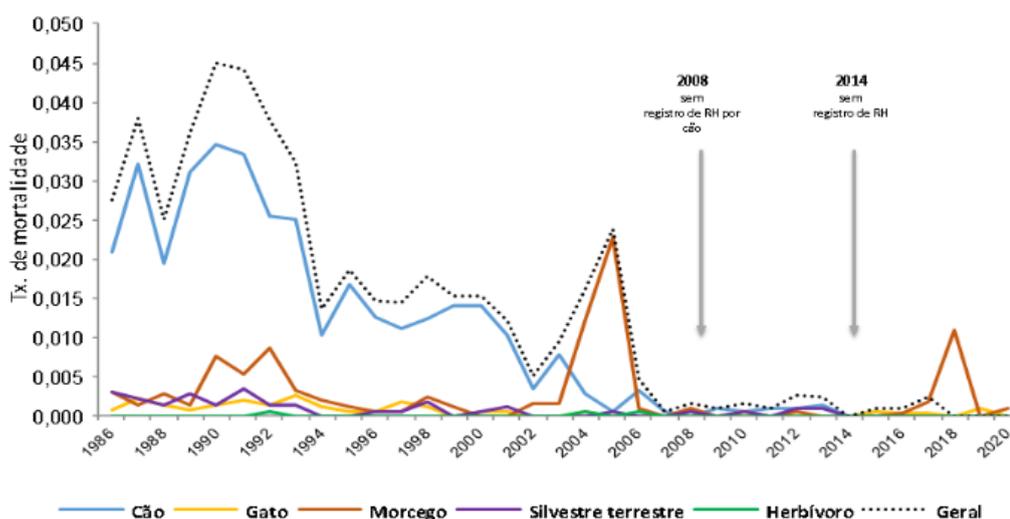


Figura 4. Taxa de mortalidade de Raiva humana por tipo de animal agressor (1986 – 2020). **Fonte:** Ministério da Saúde do Brasil, 2020.

Com a análise dos últimos 5 anos, foi observado, por meio de análises filogenéticas, que dos 23 casos de Raiva humana, um caso foi decorrente da variante AgV1, típica de cão, sendo que em um caso não foi realizada a análise e todos os outros ocorreram pela variante AgV3 de morcegos hematófagos (*D. rotundus*). Em relação ao

animal agressor, 18 casos ocorreram em razão de agressões diretas por morcegos, três após agressão por gatos e dois por meio de contato com cães contaminados (SAÚDE, 2020).

Segundo pesquisas, no Brasil circulam atualmente cerca de quatro variantes (AgV) do genótipo RABV, que estão associadas a alguns hospedeiros específicos: AgV2 (cão), AgV3 (*D. rotundus*), AgV4 (Morcego *Tadarida brasiliensis*) e AgV6 (morcego : *Lasiurus cinereus*) , além das 33 linhagens específicas do vírus adaptadas em espécies de morcegos (OLIVEIRA et al., 2010; ALBAS et al., 2011; MENOZZI et al., 2017).

Os prejuízos econômicos no setor da agropecuária são elevados, conforme os dados de notificação da doença disponíveis pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Desde 1999 até 2019 foram registrados no Brasil 49.562 casos de raiva em animais no geral (Fig.5). Destes, 38.892 casos foram em bovinos. Analisando os últimos 5 anos no Estado de São Paulo, houve uma queda no número de casos da doença em bovinos, mas observa-se que a doença vem se mantendo persistente (MAPA, 2020), (**Tabela 1**).

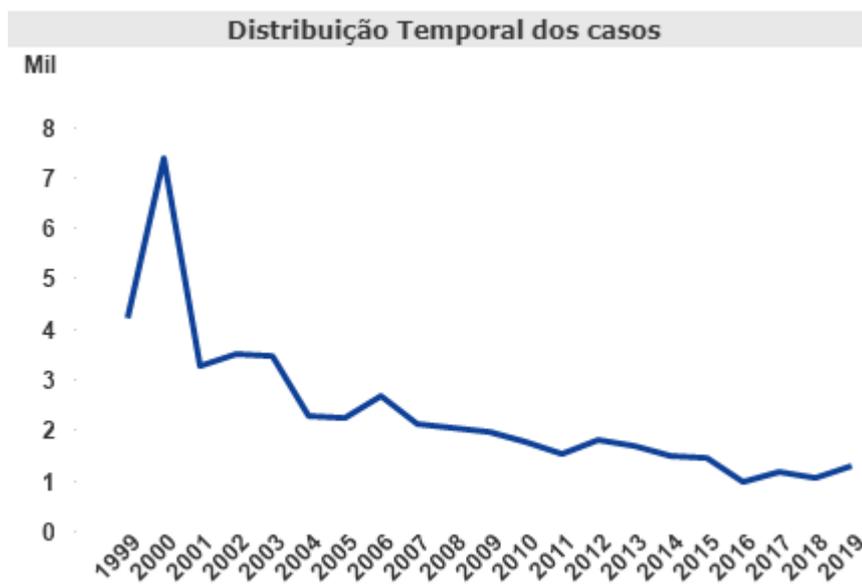


Figura 5. Distribuição dos casos de raiva no Brasil nos anos de 1999 a 2019. **Fonte:** MAPA, 2020

Tabela 1. Casos de Raiva em bovinos nos últimos cinco anos no Brasil e no Estado de São Paulo.

Ano	Brasil	São Paulo	Espécie
-----	--------	-----------	---------

2015	1.151	72	Bovino
2016	780	46	Bovino
2017	945	125	Bovino
2018	785	113	Bovino
2019	1.077	76	Bovino
Total	4.738	432	Bovino

Fonte: MAPA,2020

2.4 Estudo sobre a Raiva na Região

No município de Presidente Prudente os estudos sobre a epidemiologia da doença começaram no ano de 1995, quando o Laboratório do Polo da Alta Sorocabana da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA), foi credenciada pelo Ministério da Saúde para o diagnóstico laboratorial da Raiva. O pesquisador científico Dr. Avelino Albas, desde então, até o ano de 2015, implementou trabalhos sobre a perfil epidemiológico e diagnóstico laboratorial, contribuindo para entender a circulação do vírus no oeste do Estado de São Paulo (ALBAS et al., 2005).

Entre os anos de 1995 a 2015 foram realizados na região 9.624 diagnósticos de animais que apresentaram sintomas para a doença, com 111 amostras positivas, sendo 31 referentes a bovinos, três a equinos e 77 pertencentes aos morcegos não hematófagos. As demais amostras não apresentaram positividade para a raiva (ALBAS et al., 2018).

Segundo pesquisas sobre a distribuição temporal dos casos positivos da Raiva na região, visando entender o período de circulação do vírus, observou-se que entre os anos de 2001 a 2011 houve uma notável circulação, havendo um pico no ano de 2002 (Fig. 6), que possivelmente está relacionado a ocorrência de um caso de Raiva humana no município de Dracena no ano anterior, aumentando assim, a vigilância e o número de amostras enviadas para diagnóstico (CHRISTOFOLLI, 2020).

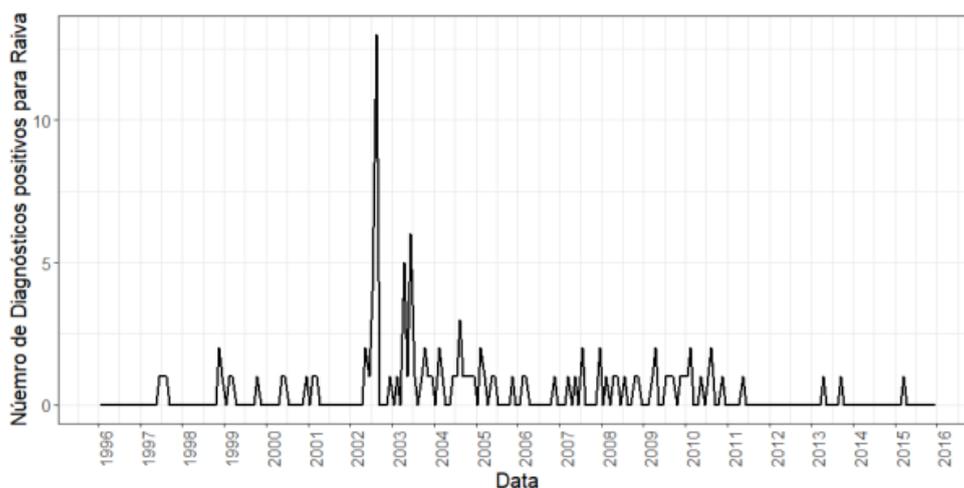


Figura 6. Série temporal histórica à contagem de diagnóstico positivos para a Raiva nos anos de 1996 a 2015, no município de Presidente Prudente. **Fonte:** CHRISTOFOLLI, 2020.

2.5 Importância dos quirópteros na veiculação do vírus

Morcegos são reconhecidos como transmissores de diversas enfermidades, com destaque para o morcego-vampiro (*D. rotundus*), principal reservatório da Raiva na América do Sul, tanto para humanos como em animais, em razão dos hábitos alimentares altamente especializados, baseados exclusivamente na hematofagia (GONÇALVES; SÁ-NETO; BRAZIL, 2002). Esta espécie de morcego costuma compartilhar nichos naturais com outras espécies não hematófagas, o que favorece a veiculação do vírus rábico para quirópteros de hábitos insetívoros e frugívoros. No Brasil, a infecção foi demonstrada em mais de 40 espécies, com destaque para quirópteros das famílias Vespertilionidae e Molossidae (SODRÉ; GAMA; ALMEIDA, 2010).

A disseminação do vírus rábico na população de morcegos está intimamente relacionada aos fatores extrínsecos ambientais, destacando-se preponderantemente, a disponibilidade de presas para hematofagia e de abrigos para a manutenção das colônias. A presença de presas, notadamente herbívoros domésticos, tem influenciado fortemente a migração de morcegos hematófagos dos nichos naturais silvícolas para zonas com grandes efetivos de rebanhos bovinos, animais abundantes nas zonas agropastoris da América Latina. Desta forma, encontra-se ampla e farta disponibilidade de alimento no território brasileiro, que detém um dos maiores efetivos bovinos do mundo (STONER-DUNCAN; STREICKER; TEDESCHI, 2014).

Com relação à disponibilidade de abrigos, verifica-se que morcegos tendem a

colonizar regiões favoráveis à instalação e a manutenção das colônias, incluindo abrigos naturais proporcionados por relevo acidentado e abrigos artificiais (DIAS et al., 2011).

A seleção de abrigos feita pela espécie *D. rotundus*, pode ocorrer pela proximidade com a fonte de alimentação ou por decorrência de elementos naturais, sendo eles: água e a borda de fragmentos, porém uma vez ocupando um espaço como abrigo, normalmente são fiéis por longos períodos. Quando indivíduos mudam de abrigo, geralmente dirigem-se para outro nas proximidades (KUNZ; FENTON, 2003).

Segundo pesquisas com a finalidade de cadastrar e localizar abrigos de *D. rotundus*, verificou que mais da metade dos locais utilizados são construções humanas, sendo assim, denominados abrigos artificiais, entre eles os mais utilizados respectivamente são: bueiros, pontes, manilhas de concreto, casas abandonadas, poços, galerias de água, fossas e galpão abandonados (NASSARDEN et al., 2016)

Estudos de caracterização de abrigos de *D. rotundus* na região de Adamantina - SP, verificou que de 31 abrigos cadastrados no ano de 2012, 96% são abrigos artificiais e encontraram coabitação de *D. rotundus* com outras espécies de morcegos. Três abrigos apresentaram coabitação com *Carollia perspicillata* Linnaeus, 1758 e um abrigo coabitação de *D. rotundus* com *Platyrrhinus lineatus* E. Geoffroy, 1810 (SANTANA, 2012).

O compartilhamento de abrigos de *D. rotundus* com outras espécies vem sendo estudado em outras regiões, tendo sido registrada coabitação com as seguintes espécies de morcegos: *Anoura caudifer* E. Geoffroy, 1818, *Glossophaga soricina* Pallas, 1766, *Lonchorhina aurita* Tomes, 1863, *Lophostoma brasiliense* Peters, 1866, *Trachops cirrhosus* Spix, 1823, *Carollia perspicillata*, *Platyrrhinus lineatus*, *Histiotus velatus* E. Geoffroy, 1824 e *Myotis riparius* Handley, 1960 (BIAVATTI; COSTA; ESBÉRARD, 2015).

Entre os anos de 2006 a 2008 foram estudados 16 abrigos da 10ª Região Administrativa do Estado de São Paulo (**Tabela 2**), que abrange um total de 31 municípios (ALBAS et al., 2011). Segundo o IBGE, o município de Presidente Prudente é o maior em número de habitantes com aproximadamente 228.743 habitantes (PRESIDENTE PRUDENTE, 2020).

O estudo foi realizado numa ação conjunta entre o Escritório de Defesa Agropecuária (EDA) e o Laboratório de Raiva de Presidente Prudente. O laboratório do Polo da Alta Sorocabana, Presidente Prudente, SP, foi credenciado pelo Ministério da Saúde em 1995 para realização do diagnóstico laboratorial da Raiva. Os abrigos

encontrados foram registrados com o auxílio de um aparelho Sensor Geográfico de Posição (GPS)

Tabela 2. Abrigos de morcegos visitados durante o experimento conduzido pelo Laboratório do Polo da Alta Sorocabana, Presidente Prudente, SP, no período de 2006 a 2008.

Abrigos	Municípios	Tipo
1	Pirapozinho	Barracão Subterrâneo
2	Anhumas	Túnel
3	Pirapozinho	Túnel
4	Pirapozinho	Túnel
5	Pauliceia	Casa Abandonada
6	Regente Feijó	Casa Abandonada
7	Rancharia	Bueiro
8	Nantes	Casa Abandonada
9	Indiana	Casa Abandonada
10	Taciba	Ponte
11	Estrela do Norte	Bueiro
12	Martinópolis	Casa Abandonada
13	Anhumas	Casa Abandonada
14	Alvares Machado	Casa Abandonada
15	Presidente Prudente	Túnel
16	Presidente Bernardes	Casa Abandonada

Fonte: Albas et al., 2011.

2.6 Resposta imune a Raiva em morcegos

Estudos baseados em ensaios experimentais com o *D. rotundus* sugerem que o desenvolvimento da enfermidade depende da via de inoculação viral e da dose infectante (ALBAS et al., 2013; MORENO; BAER, 1980). Uma vez infectados, os morcegos inicialmente reduzem o consumo de sangue, desenvolvendo desidratação, para em seguida manifestar sinais neurológicos que incluem tremores e perda da deambulação. A agressividade não é reconhecida como sinal clínico comum nestes animais (AGUILAR-SETIEN et al., 2005; ALMEIDA et al., 2005).

Em infecções naturais, o vírus rábico afeta os morcegos de forma variável. Alguns animais expostos manifestam sinais da infecção viral, vindo a óbito, enquanto que, outros podem tornar-se imunes, apresentando soroconversão. Modelos epidemiológicos sugerem que a probabilidade de um morcego exposto ao vírus manifestar a enfermidade é de aproximadamente 10%, determinando longos períodos de persistência na população destes animais (BLACKWOOD et al., 2013).

Aparentemente, a imunidade coletiva adquirida nas colônias de morcegos infectados desfavorece a propagação do vírus, que para manter-se endêmico entre as

populações destes mamíferos depende virtualmente da interação entre colônias (STREICKER et al., 2012). Acredita-se que este fato possa justificar a ocorrência de ciclos epidêmicos de Raiva na população de morcegos hematófagos da América do Sul (DELPIETRO et al., 1972). Além da imunidade humoral, de forma similar a observada em outras espécies, é possível que a imunidade mediada por células tenha papel fundamental na depuração viral no sistema nervoso (HIRAI et al., 1992; HOOPER et al., 2011).

Os mecanismos determinantes na progressão da enfermidade rábica em morcegos são pouco conhecidos. Reconhece-se que o período de incubação pode ultrapassar os 200 dias, e que a rota de infecção, dose infectante e soroconversão são fatores preponderantes para o estabelecimento da infecção clínica (DAVIS; DUPUIS; RUDD, 2012). A infecção da Raiva é natural em todas as espécies de mamíferos e geralmente causa uma doença fatal aguda, apesar de anticorpos antirrâbicos terem sido detectados em espécies aparentemente saudáveis, incluindo o morcego vampiro (WARRELL; WARRELL, 2004).

Quando a população de quirópteros aumenta devido a uma fonte de alimento abundante e uma escassez de predadores naturais, a superpopulação resultante gera estresse, o que pode levar a uma ruptura no equilíbrio interno da microbiota e, portanto, facilitando assim, a transmissão viral durante as lutas (KAHN, 2006).

Diante do exposto, verifica-se que são pouco conhecidos os fatores efetivamente relacionados à progressão da enfermidade rábica em morcegos hematófagos.

2.7 Morcego em áreas urbanas

A urbanização é o processo em que o espaço rural se transforma em espaço urbano. Este processo é uma das principais formas de mudança no uso da terra e vem se expandindo, especialmente no último século, com o aumento acelerado da população humana (MILLER; HOBBS, 2002).

Uma das consequências ambientais do processo de urbanização é a atração de animais silvestres para as áreas urbanas, onde conseguem alimento e abrigos para sobreviverem. Devido a uma alimentação versátil, a ordem dos quirópteros tem se adaptado muito bem ao ambiente urbano (BRASIL, 1988; BRASIL, 2009).

Utilizam como fonte de alimento as espécies arbóreas plantadas nas áreas urbanas, assim como os insetos que são atraídos pela iluminação noturna, sendo as

edificações ótimas adaptações de abrigos para os quirópteros (UIEDA et al, 1995).

Um estudo realizado sobre o *status* do conhecimento e ações para a conservação de morcegos urbanos, mostrou que pouco se conhece sobre a diversidade e a dinâmica das populações como elas se estabelecem nesses ambientes. O pouco que se conhece é referente a inventários faunísticos e referente as espécies que são enviadas ou coletadas pelos órgãos de saúde e/ou agricultura. Existe uma grande lacuna de informação referente ao comportamento; uso do habitat alterado, padrões de deslocamentos, preferências por abrigos, reprodução e outros (PACHECO et al., 2010).

Apesar desses mamíferos trazerem muitos benefícios ecológicos para as cidades, dependendo dos locais onde estão localizadas as suas colônias e a quantidade de indivíduos pertencente a elas, essa convivência com a população humana pode trazer transtornos para as pessoas e algumas doenças (CONSTANTINE, 1970; CONSTANTINE, 1988).

A mudança de cenários de recursos de uma área conservada em direção a uma área com pouca disponibilidade de recursos e as mudanças associadas em sua ecologia e comportamento de movimento, estão aumentando o risco de disseminação de vírus transmitidos por morcegos, principalmente os vírus de RNA, incluindo os vírus da raiva (RABV), Ebola, SARS-CoV, Hendra e Nipah (KESSLAR et al., 2018).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Mapear abrigos utilizados por morcegos hematófagos (*Desmodus rotundus*) e registrar as espécies de morcegos urbanos, a fim de verificar a presença do vírus da Raiva e detectar a presença de anticorpos antirrábicos e associar os resultados para entender o perfil epidemiológico da Raiva na região de Presidente Prudente.

3.2 Objetivos Específicos

- Realizar levantamento de abrigos de morcegos hematófagos (*Desmodus rotundus*) na região de Presidente Prudente.
- Identificar o compartilhamento de abrigos do *D. rotundus* com outras espécies de morcegos.
- Realizar levantamento de espécies de morcegos na área urbana do município.
- Analisar a riqueza de espécies em cada ponto de coleta.
- Analisar a frequência de machos e fêmeas e o padrão reprodutivo das espécies em cada local.
- Identificar a frequência de espécimes positivos para a Raiva.
- Analisar os títulos sorológicos para a Raiva.
- Analisar a frequência de machos e fêmeas dentro das colônias dos morcegos hematófagos e se existe diferença sorológica segundo as características sexuais.
- Analisar a diferença sorológica entre os espécimes de cada abrigo.
- Analisar a diferença sorológica entre as diferentes espécies de morcegos.
- Pesquisar por Lyssavirus na gordura marrom dos morcegos coletados.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos foram feitos de acordo com os princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório/Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (SBCAL/COBEA), pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos (DBCA). Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais - Instituto Biológico (CEUA-IB), Protocolo nº 163/19 de 27 de junho de 2019 (Anexos 1, 2 e 3).

4.1 Desenho do estudo

O experimento foi desenvolvido com parcerias envolvendo o Laboratório de Sanidade Animal do Polo Regional Alta Sorocabana da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA), Instituto Biológico, Escritório de Defesa Agropecuária (EDA), Laboratório de Diagnóstico de Zoonoses e Doenças Transmitidas por Vetores da Divisão de Vigilância de Zoonoses de São Paulo, Laboratório de Quirópteros da Faculdade de Medicina Veterinária do Campus de Araçatuba (UNESP) e a Secretaria Municipal do Meio Ambiente de Presidente Prudente.

O trabalho foi dividido em duas fases, sendo a primeira parte em área rural, onde foi realizado o levantamento de abrigos de morcegos hematófagos (**Fig. 7**). Para tanto, foi feita busca ativa por abrigos de morcegos hematófagos na região de Presidente Prudente, com rotas traçadas a partir da Cidade de Presidente Prudente até as cidades mais próximas que compõem a 10ª Região Administrativa do Estado de São Paulo.

Os locais foram georeferenciados com auxílio de um aparelho de GPS, onde foram identificados abrigos ativos (com a presença de morcegos hematofágos) e foi verificado se havia compartilhamento com outras espécies de morcegos. Foi realizada a coleta desses animais para verificar a presença do vírus da Raiva e detectar a presença de anticorpos antirrábicos.

A segunda parte do trabalho foi realizada em área urbana. Na cidade de Presidente Prudente foi realizado um levantamento de pontos de coleta, onde todos eles tinham três fatores em comum, ou seja, (i) locais usados pela população, onde, de alguma forma, tivesse a interação direta ou indireta da vida silvestre com os munícipes, (ii) algum fragmento de mata em seu entorno e (iii) todos os lugares selecionados

tinham que compor uma região da cidade, assim conseguindo fazer uma análise de todos os pontos do município (**Fig. 8**).



Figura 7. Busca ativa por abrigos nas rodovias da região de Presidente Prudente.



Figura 8. Levantamento de pontos em área urbana na cidade de Presidente Prudente, SP. **Foto:** Luiza C.S. Rodenas.

4.2. Área de estudo

O estudo foi desenvolvido na região de Presidente Prudente. Segundo a classificação climática de Koeppen, o clima regional é do tipo Aw (clima tropical com estação seca de Inverno) com temperatura média de 23°C. A sazonalidade climática da região pode ser resumida a um período quente e chuvoso entre outubro e março e, outro mais ameno e seco, entre abril e setembro (CARDOSO; AMORIN, 2015). A área escolhida teve formação original predominante classificada como Floresta de Mata Atlântica Estacional Semi decidual, em que 30 a 50% das espécies vegetais perdem as folhas na estação seca, bem marcada entre abril e setembro, com picos em julho e agosto. Devido às condições climáticas propícias da região, a economia tem grande

impacto pela atividade econômica da pecuária. Segundo o IBGE, entre os anos de 2017 a 2019, em Presidente Prudente, foram registradas 445.845,00 cabeças de gado de corte ao ano e 61.156,00 cabeças de gado de leite ao ano e 187.587,00 cabeças de gado mista (usadas para ambas atividades econômicas) (PRESIDENTE PRUDENTE, 2017 a 2019).

4.3. Coletas nos abrigos ativos

Os abrigos foram visitados no período do dia, uma vez que, os morcegos encontravam-se presentes, ou ao entardecer, quando saem para se alimentar. Eles foram caracterizados por ativos quando houve a presença de morcegos hematófagos (**Fig.9**).

As capturas dos morcegos hematófagos foram realizadas nos abrigos conforme orientação do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento MAPA (2009), em conjunto com os técnicos do Escritório de Defesa Agropecuária (EDA) de Presidente Prudente, SP, que realizam este trabalho rotineiramente, como parte do controle da Raiva em herbívoros no Estado de São Paulo.

As coletas dos morcegos em abrigos foram feitas utilizando redes de neblina (“mist nets”) de tamanhos variados (7 x 2 m; 10 x 2 m e 12 x 2 m), armadas em bastões telescópicos e estrategicamente colocadas dentro dos abrigos ou à sua entrada, e redes manuais (puçás), que foram utilizadas no interior dos abrigos.



Figura 9. Preparo de redes para captura do *Desmodus rotundus* em túneis. **Foto:** Avelino Albas

4.4. Coletas em área urbana

Foi realizado um levantamento de Praças e Parque dentro do município onde

tivesse por perto pequenas ilhas de matas e ocorrência de morcegos, todos os locais sendo utilizados pela população. Os locais de coletas dentro das praças foram locais com pouca iluminação artificial. As coletas dos morcegos foram feitas utilizando redes de neblina (“*mist nets*”) de tamanhos variados (7 x 2 m; 10 x 2 m e 12 x 2 m), armadas em bastões telescópicos fixados ao chão (**Fig. 10**). Para cada local de coleta foi utilizado 90 m² de redes.

Os pontos foram ordenados de um a nove. Em cada ponto de coleta foram instaladas três redes de neblina (“*mist nets*”), que ficaram abertas do pôr do sol até por volta de 00h, totalizando seis horas por noite. Em todos os pontos foram realizadas duas noites amostrais consecutivas. Todos os animais coletados foram fotodocumentados e receberam uma ficha catalográfica contendo suas características biométricas, foto e sua classificação até o nível de espécie. Em cada ponto de coleta, um espécime de cada espécie foi coletado e encaminhado ao laboratório para a realização dos exames para a detecção do vírus da Raiva, sorologia antirrábica e pesquisa de Lyssavírus na gordura marrom.



Figura 10. Armação de redes em área urbana e redes abertas em horário de coleta. **Foto:** Luiza C. S. Rodenas.

4.5. Amostras

Os morcegos *D. rotundus* capturados nos abrigos foram acomodados em gaiolas de metal, já os morcegos capturados em área urbana foram acomodados em sacos individuais de contenção próprio para morcegos. Os indivíduos foram encaminhados ao Laboratório de Raiva de Presidente Prudente, onde foram coletadas amostras de sangue (**Fig.11**). Nas colônias onde havia compartilhamento do abrigo entre *D. rotundus* e

outras espécies de morcegos, foi coletado um espécime de cada espécie. Os morcegos foram sedados com Cloridrato de Ketamina (Ketalar) na dose de 50 mg/kg, via intramuscular no músculo peitoral. Após a sedação, o morcego, em posição decúbito dorsal, teve seu sangue coletado por punção cardíaca com seringa descartável de 1 mL e agulha 25 x 6 mm. Após o óbito, foi coletado o tecido cerebral que foi armazenado e enviado para o Laboratório de Diagnóstico de Zoonoses e Doenças Transmitidas por Vetores da Divisão de Vigilância de Zoonoses de São Paulo, para a realização dos testes.

A eutanásia foi realizada utilizando a sobre dosagem da associação de anestésicos dissociativos (e.g. cetamina) com agonistas de adrenoreceptores alfa-2 (exemplo: xilazina, administrada pela via intraperitoneal).

Os procedimentos de coleta de sangue dos morcegos foram supervisionados pelo Dr. Eidi Yoshihara, Médico Veterinário, que é o Responsável Técnico da nossa Unidade de Pesquisa.

Os procedimentos estão de acordo com as normativas do CONCEA.



Figura 11. Morcegos *Desmodus rotundus* capturados e acomodados em gaiola e a contenção em Laboratório para o procedimento de anestesia do animal. **Foto:** Dévlin B. Boer.

4.6. Detecção do vírus rábico

No Laboratório de Raiva de Presidente Prudente, foram extraídas amostras do sistema nervoso central dos morcegos que foram armazenados em freezer -20°C e, posteriormente enviados para o CCZ, para pesquisa do vírus rábico empregando-se o método clássico de Imunofluorescência Direta (IFD), que utiliza anticorpos fluorescentes (conjugado antirrábico da Marca Millipore), que consiste em

imunoglobulina antirrábica marcada com fluorocromo (isotiocianato de fluoresceína) para detecção de inclusões virais (DEAN; ABELSETH; ATANASIU, 1996). Para a confirmação do vírus da Raiva foi realizada a Inoculação em Cultivo Celular, que utilizou células de neuroblastoma murino (N2A). Juntamente com as técnicas consideradas como padrão, foi realizado o Diagnóstico da Raiva pela detecção do RNA viral, pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR).

A técnica de IFD foi realizada com as impressões de fragmentos de tecido do sistema nervoso central (SNC), feitas em lâminas de microscopia quadriculadas de 26 x 76 mm, que foram fixadas em acetona refrigerada por pelo menos trinta minutos. A secagem das lâminas foi realizada em estufa a 37° C. A seguir, foram adicionados 25 µL das soluções de conjugado preparado com suspensão de Challenge Virus Standard (CVS) e SNC sobre a impressão nas duas extremidades quadriculadas da lâmina, separadamente. As lâminas foram incubadas em estufa a 37° C, em câmara úmida, por 30 minutos. Após esse período, foram realizadas duas lavagens das lâminas em solução salina tamponada (SST) pH 7,2 a 7,5. Após as lavagens, as lâminas foram secas em estufa. Após secagem, procedeu-se a montagem com glicerina tamponada pH 8,5, cobrindo-se com lamínula de 22 x 22 mm. A leitura das lâminas foi realizada em microscópio de imunofluorescência da Marca Olympus.

Para a confirmação do teste foi realizado o isolamento *in vitro* do vírus em culturas celulares, em microplacas com 96 poços, onde é colocado 40µL do inóculo previamente preparado com 160µL de meio essencial mínimo (MEM), gentamicina e aminoácidos não essenciais. Após a homogeneização, foram acrescentados 100µL (contendo 5×10^5 células) de suspensão de células de neuroblastoma de camundongo em cada poço. Cada suspensão foi inoculada em triplicata nas placas e foram utilizados controles positivos e negativos. As placas contendo células foram incubadas a 37°C em estufa com 5% de CO₂, por 96 horas. Após esse tempo, o meio foi removido e as células aderidas às placas foram fixadas com acetona a 80%, durante 15 min. Em seguida é acrescentado o conjugado antirrábico e foram incubadas a 37°C durante 1 hora. Logo após, as células foram lavadas três vezes em tampão fosfato salina (pH 7,4) e em água destilada. Para a revelação do teste, foi utilizada a técnica descrita por WEBSTER & CASEY (1996), e a leitura foi realizada em microscópio invertido de fluorescência.

A Transcrição Reversa para DNA Complementar (cDNA) foi realizada a partir do RNA total utilizando-se o kit *SuperScript™II Reverse Transcriptase* (Invitrogen,

Carlsbad, CA, USA), de acordo com as recomendações do fabricante. Nesta etapa foi feito um “mix” de reagentes, contendo, por amostra, 5 µL de *primer* senso (21G) e 5 µL de *primer* antissenso (304) na concentração de 10 µM (Quadro 1), 6 µL de dNTP (mix de 10mM – 2,5mM de cada: dATP, dTTP, dCTP e dGTP), 8 µL de 5×*First-Strand Buffer*, 4 µL de ditiotreitol 0,1 M (DTT), 1 µL de *SuperScript™II RT* (200 U/µL), 1 µL de RNase OUT 40U/µL e 12 µL de água ultrapura. Em seguida, 5 µL de RNA foram adicionados ao tubo de reação. As amostras foram colocadas em termociclador (*BIOER XP Cycler*) a 42°C por 60 minutos para extensão dos oligonucleotídeos iniciadores. Ao final da reação de transcrição, as amostras de cDNA foram armazenadas em freezer -20°C.

Para a realização do teste da RT-PCR em Tempo Real, foi utilizada placa de 96 orifícios *MicroAmp® Optical 96 well Reaction Plate*, e em cada orifício foram distribuídos 18 µL de *mix*, contendo 12,5 µL de SYBR Green (I), 200nM de cada primer (senso 504 e antissenso 304, Quadro 1) e água ultra-pura q.s.p. Após o *mix* ser distribuído nos orifícios, 2 µL de cDNA de cada amostra foi adicionado, totalizando um volume final de 20 µL. Cada amostra foi feita em triplicata. (AGNE et al., 2009)

A placa foi, então, colocada no aparelho de PCR em tempo real *Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System* e submetida a uma sequência de 35 ciclos. Os resultados foram analisados no programa *7500 Software v2.3*.

4.7. Detecção de anticorpos contra o vírus rábico

A dosagem de anticorpos antirrábicos foi determinada através de amostras de soro dos morcegos. Os títulos individuais de anticorpos neutralizantes foram determinados pela técnica de Soroneutralização em Células BHK21 clone 13. Essas células permitem a adsorção, penetração e replicação do vírus da Raiva. As proteínas virais expressas na superfície celular são reconhecidas pelo anticorpo específico, marcado com isotiocianato de fluoresceína. A fluorescência emitida poderá ser observada em microscopia de fluorescência.

A técnica foi realizada em microplacas com 96 poços, assim descrita: à diluição das amostras de soro dos morcegos foi adicionada 50 µL de vírus diluído e incubado uma hora em estufa de CO₂. A seguir, foi adicionado 50 µL de células em toda placa, incubada por 24 horas em estufa de CO₂. Após esse período foi acrescentado 80 µL de

acetona 80% gelada, suficiente para cobrir o fundo da placa e levar ao freezer por 10 minutos. A acetona foi desprezada por inversão da placa e colocada para secar em estufa 37°C, com a placa fixada foi colocado 40 µL do conjugado diluído em toda placa e permaneceu por uma hora em câmara úmida em estufa 37°C. Desprezado o conjugado por inversão, as placas são lavadas com solução salina tamponada e com água destilada. Após secagem foi acrescentado glicerina tamponada (pH básico - 8,0 a 8,5) - 1 gota/pocinho.

Esse teste teve como base o *Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test* - RFFIT (SMITH; KING, 1996) e o Fluorescent Antibody Vírus Neutralization (FAVN), realizado em microplacas de poliestireno com 96 orifícios (CARDOSO et al., 2006).

4.8. Pesquisa de Lyssavírus na gordura marrom

A Gordura marrom é um tecido adiposo que é especializado na produção de calor e participa ativamente na regulação da temperatura corporal dos mamíferos. Para os morcegos, esse tecido é extremamente importante durante o período de hibernação, sendo de intensa metabolização devido a sua reserva energética de glicogênio. Devido a isso, a gordura marrom tem sido estudada em diversos trabalhos para entender a importância na manutenção de patógenos. Foi demonstrado que a gordura marrom tem um percentual de positividade alta, assim como outros tecidos como glândulas salivar e o cérebro (ALLENDORF, 2011; SULKIN, 1962).

Todas as amostras coletadas foram submetidas a pesquisa de Lyssavírus na gordura marrom. Para essa análise foi utilizada a técnica de qPCR (PCR em tempo real). Primeiramente, foi feita a extração do RNA viral com TRIzol® (ThermoFisher), seguindo as instruções do fabricante. Após foi feita a reação de transcrição reversa com primers randômicos para conversão do RNA em cDNA utilizando o SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit (ThermoFisher). Com o cDNA foi realizada qPCR (PCR em tempo real) com primers JW-12 e N165-146 conforme descrito previamente WAKELEY ET AL., (2005). A reação de qPCR foi feita conforme Hayman et al. (2011), com algumas modificações: foi utilizado 10uL de Power Sybr® Green Master Mix (ThermoFisher), 0,5uL dos primers JW-12 e N165-146 (20pmol/uL), 6,5uL de água DEPC e 2,5uL do cDNA. A ciclagem obedeceu aos seguintes parâmetros: 1 ciclo de 95°C por 10 minutos seguido de 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 30

segundos. Após a ciclagem foi feita a curva de dissociação. Água DEPC foi utilizada como controle negativo e cDNA do vírus fixo CVS como controle positivo. As amostras que mostraram amplificação na qPCR foram submetidas a uma heminested PCR conforme descrito em WHITBY et al., (1997) utilizando os primers JW-12 e um coquetel dos primers JW-6 para a reação de PCR primária e os primers JW-12 e um coquetel dos primers JW-10 para a reação de PCR secundária.

4.9. Sequenciamento da amostra positiva

4.9.1 Reação em Cadeia da Polimerase com Transcrição Reversa (RT-PCR) para amplificação de trecho do gene G

Inicialmente foi feita a reação de transcrição reversa utilizando-se o *SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit* (Thermo Fisher), conforme as instruções do fabricante com oligonucleotídeos randômicos. A ciclagem para síntese do cDNA seguiu os seguintes parâmetros: 25°C por 10 minutos, 42°C por 60 minutos e 85°C por 5 minutos. Para a reação de PCR foram utilizados os oligonucleotídeos Ga3222-40 (5' CGCTGCATTTTRTCARAGT 3') e Gb4119-39 (5' GGAGGGCACCATTTGGTMTC 3') conforme descrito por Sato et al. (2004).

A reação de PCR foi feita em um volume final de 25 µL contendo 5 U/µL de *Platinum Taq DNA Polymerase* (Thermo Fisher), *Buffer 10 X*, 200 µM de dNTP's, 1,5 mM de MgCl₂, 0,5 µM de cada *primer* e 2,5 µL do cDNA. Os parâmetros para termociclagem consistiram em um estágio de 94°C por 30 segundos seguido de 35 ciclos de 94°C por 15 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto, além de um estágio final de 72°C por 5 minutos. Água DEPC e o cDNA do vírus CVS foram utilizados como controle negativo e positivo, respectivamente. Os produtos da PCR foram acrescidos de *BlueJuice® Gel Loading Buffer* (Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA) e submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com *Sybr® Safe* (Invitrogen™) para comprovação da amplificação do trecho do gene de interesse, gerando fragmento de 915 pares e bases (pb). O marcador de peso molecular 100 pb *DNA Ladder* (Invitrogen™) foi utilizado.

4.9.2 Purificação dos produtos de PCR e Sequenciamento

A purificação dos produtos da PCR foi feita pelo método enzimático com o kit *ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent* (Thermo Fisher), seguindo as instruções do fabricante. A seguir foi realizada a reação de sequenciamento baseada na metodologia de Sanger (SANGER; NICKLEN; COULSON 1977) com o *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit* e *Hi-Di™ Formamide* (Thermo Fisher), conforme protocolo do produto. As sequências foram obtidas em analisador genético automático ABI-3500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

4.9.3 Edição e Análise das sequências

O algoritmo PHRED (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>) foi utilizado para aferição da qualidade das bases. Valores iguais ou superiores a 20 foram considerados como reais. As bases para as quais foi atribuído valor inferior a 20 foram analisadas manualmente através do eletroferograma. O pacote de programas *BioEdit Sequence Alignment Editor* v. 7.0.3 (HALL, 1999) foi utilizado através do aplicativo *Contig Assembly Program* (CAP) para geração das sequências consenso. O alinhamento das sequências com sequências obtidas do GenBank foi efetuado com o uso do software MEGAX (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016).

4.9.4 Análise filogenética

A escolha do modelo evolutivo e a reconstrução da filogenia pelo método de Máxima Verossimilhança foram feitas com o uso do software PAUP* *Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and other methods)* (SWOFFORD, 2003). Para estimar a confiabilidade da árvore filogenética inferida foram aplicadas 1000 repetições de *bootstrap*.

Para edição da árvore foi utilizada a ferramenta *online Interactive Tree Of Life (iTOL)* v1.0 (CICCARELLI et al., 2006).

4.10. Análise Estatística

Os dados referentes à totalidade de quirópteros, espécies, locais, abrigos, data de coleta, coordenada geográfica e sexagem foram organizados em um banco de dados no

programa Microsoft Excel® 2010, contendo também informação do diagnóstico, sorologia e pesquisa de vírus.

Os títulos sorológicos foram comparados entre machos e fêmeas, entre machos escrotados e não escrotados (condição reprodutiva), entre fêmeas prenhes e fêmeas que não apresentam sinais externos visíveis de gestação, pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney e entre colônias de morcegos pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e contrastes pelo método de Dunn (FEINSTEIN, 2002). As frequências de animais com títulos considerados protetores ($\geq 0,5$ UI/mL) foram comparados. Todas as análises foram conduzidas no Software livre “R” e pacotes adicionais, considerando-se 5% de nível de significância (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2019).

As frequências de sororeagentes com títulos acima de $\geq 0,5$ UI/mL foram comparadas entre morcegos machos e fêmeas e entre animais com diferentes hábitos alimentares pelo teste exato de Fisher. A comparação entre títulos sorológicos médias foram comparadas entre os mesmos grupos, respectivamente pelo teste t não pareado e análise de variância em uma via (ANOVA one-way).

5 RESULTADOS

5.1 Parte Rural

5.1.1 Pesquisa por abrigos na região

A busca ativa na região de Presidente Prudente gerou o registro de 48 locais que podem ser utilizados como abrigos de morcegos, sendo que apenas quatro encontravam-se ativos (**Fig.12**).

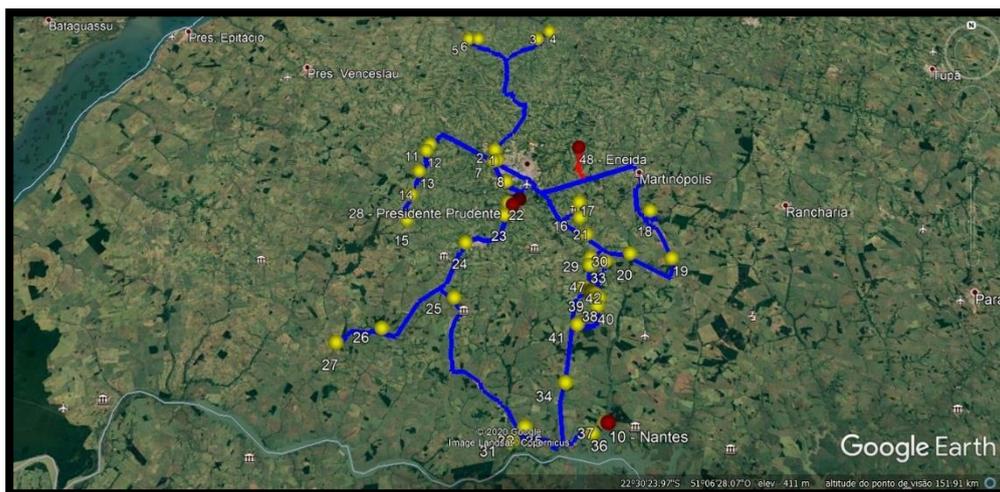


Figura 12. Mapa da região de Presidente Prudente com as rotas que foram percorridas, e os abrigos inativos e ativos (Presença de *Desmodus rotundus*). Pontos em Amarelo: Locais de possíveis abrigos para o morcego *D. rotundus* (inativos). Pontos em Vermelho: Abrigos ativos (com a presença do morcego *D. rotundus*). Traçado em Azul: Rotas percorridas. **Fonte:** Google Earth

Os abrigos B e C, foram vistoriados em setembro e realizada a captura, e novamente vistoriados em fevereiro quando havia novos indivíduos ocupando o espaço que foram coletados.

O número de capturas por abrigo variou de acordo com a densidade populacional de morcegos (**Tabela 3**).

Dois abrigos ativos devidamente registrados como 9 e 28, apresentaram somente morcegos da espécie *D. rotundus*, conforme mostra a (**Fig. 13**).

Tabela 3 – Número de capturas de morcegos hematófagos, datas das coletas e coordenadas geográficas dos abrigos na região de Presidente Prudente, Brasil.

Abrigo	Data	Captura	Coordenadas
B	Setembro/2018	1°	S 22° 11'57.9" W 051° 24'44.3"
C	Setembro/2018	1°	S 22° 12'37.3" W 051° 25'35.0"
B	Fevereiro /2019	2°	S 22° 11'57.9" W 051° 24'44.3"
C	Fevereiro /2019	2°	S 22° 12'37.3" W 051° 25'35.0"
A	Março /2019	Coleta Única	S 22° 05'35.0" W 051° 17'11.7"
D	Julho / 2019	Coleta Única	S 22° 37'03.1" W 051° 16'58.5"



A = Abrigo n. 48



B = Abrigo n. 9



C = Abrigo n. 28



D = Abrigo n. 10

Figura 13. Abrigos de morcegos localizados na região de Presidente Prudente.

Os outros dois apresentaram compartilhamento de espécies, sendo que no abrigo 10 foram observadas as seguintes espécies: *D. rotundus*, *Carollia perspicillata* e *Chrotopterus auritus* e no abrigo 48, *D. rotundus* e *C. perspicillata*, conforme mostra a (Fig. 14).



Figura 14. Espécies de morcegos que compartilhavam o mesmo abrigo, sendo respectivamente: *Carollia perspicillata*, *Chrotopterus auritus* e *Desmodus rotundus*. Foto: Dévlin B. Boer e Cristiano de Carvalho

5.1.2 Detecção do vírus rábico

Foram realizadas 118 análises laboratoriais para detecção do vírus rábico, sendo (115 amostras de morcegos hematófagos, duas de *C. Perspicillata* e uma de *Chrotopterus auritus*). Sendo assim, foram utilizadas três metodologias para pesquisar a presença do vírus rábico, no entanto, todas elas apresentaram resultados negativos.

Foram utilizados, para esse fim, o Teste de Imunofluorescência Direta, Inoculação de Células de Neuroblastoma Murino (N2A) e RT-PCR. Em todos os testes, se fez uso de controles sabidamente positivos e negativos.

5.1.3 Detecção de anticorpos contra o vírus da raiva

Para a detecção de anticorpos contra o vírus rábico foi realizada o método FAVN, nas duas amostras de *C. perspicillata* e na amostra de *C. auritus* que apresentaram o mesmo valor de 0,10 UI/m.

Por outro lado, em relação à sorologia para a espécie *D. rotundus*, foram constatados valores que variaram de 0,07 a 0,66 UI/m, conforme pode-se observar na **(Fig.15)**, sendo que o ponto *cutoff* considerado foi $\geq 0,5$ Unidades Internacionais por mL (UI/mL).

Deste total, 24 amostras (20,9%) foram negativas, 85 (73,9%) apresentaram resultados baixos, apenas uma (0,9%) foi de valor médio e cinco (4,3%) tiveram títulos protetores com valores $\geq 0,5$ UI/mL.

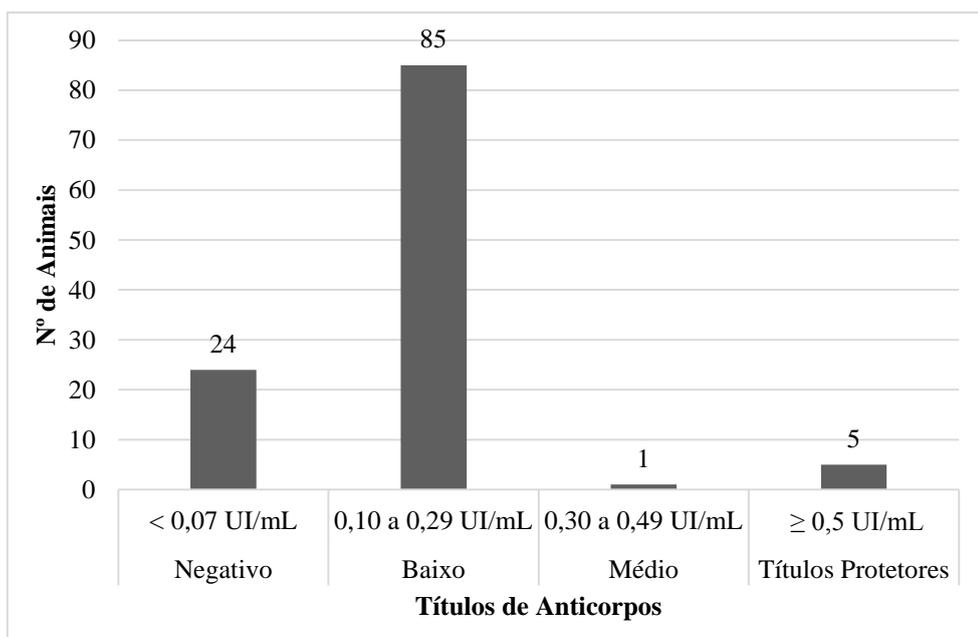


Figura 15 – Sorologia de Morcegos *Desmodus rotundus* naturalmente capturados na 10ª região oeste do Estado de São Paulo. Teste RFFIT (Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test).

Não foram observadas diferenças entre os títulos sorológicos de machos e fêmeas de *D. rotundus*, bem como entre percentuais de animais soro reagentes com títulos considerados protetores ($\geq 0,5$ UI/mL). Conforme (**Figura 15**), não foi possível comparar percentuais de animais soro reagentes pois 100% dos morcegos apresentaram anticorpos detectáveis. Os títulos sorológicos diferiram entre abrigos, observando-se que os morcegos provenientes do abrigo 10, apresentaram títulos superiores aos demais abrigos, além de proporção quase equivalente de machos e fêmeas e o único a abrigar fêmeas prenhes ou com filhotes (**Tabela 5**). Os títulos sorológicos não diferiram entre machos escrotados e não escrotados e entre fêmeas prenhes/com filhotes e entre fêmeas que não apresentam sinais externos visíveis de gestação (**Tabela 6**).

Tabela 4. Sorologia de Morcegos *Desmodus rotundus* naturalmente capturados na região de Presidente Prudente, com características sexuais. Teste RFFIT (Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test).

Resultados	Parâmetros	Nº de Animais	M	Escrotado	F	Prenha	C/ filhote
Negativo	< 0,07 UI/mL	24	19	5	5	0	0
Baixo	0,10 a 0,29 UI/mL	85	47	18	38	20	1
Médio	0,30 a 0,49 UI/mL	1	0	0	1	0	0
Títulos Protetores	≥ 0,5 UI/mL	5	2	0	3	2	0
Total		115	68	23	47	22	1

Tabela 5. Títulos sorológicos expressos como medianas \pm Desvios Interquartílicos em Unidades Internacionais por mL de soro (UI/mL) e características sexuais de morcegos hematófagos da espécie *Desmodus rotundus* capturados em quatro abrigos diferentes localizados na **região de Presidente Prudente**.

Parâmetro	Abrigos			
	Abrigo 48 (N =22)	Abrigo 10 (N = 73)	Abrigo 9 (N = 11)	Abrigo 28 (N=9)
Títulos sorológicos*	0,1 \pm 0,15 (a)	0,29 \pm 0,19 (b)	0,07 \pm 0,15 (b)	0,07 \pm 0,06 (b)
Freq Machos escrotados	4/18 (22,2%)	13/35 (37,1%)	5/8 (62,5%)	5/7(71,4%)
Freq Fêmeas prenhes	0/4 (0%)	21/38 (55,3%)	0/3 (0%)	0/2 (0%)
Relação Machos:Fêmeas	18:4 (4,5)	35:38 (0,92)	8:3 (2,6)	7:2 (3,5)

(a) E (b) diferem entre si

Tabela 6. Títulos sorológicos expressos como medianas \pm Desvios Interquartílicos em Unidades Internacionais por mL de soro (UI/mL) segundo características sexuais de morcegos hematófagos da espécie *Desmodus rotundus* capturados em quatro abrigos diferentes localizados na **região de Presidente Prudente**.

Sexo	Categoria		p
Machos	Escrotados	Não escrotados	0.714
	0,22 \pm 0,19	0,13 \pm 0,15	
Fêmeas	Prenhas ou amamentado		0.183
	0,17 \pm 0,12	0,115 \pm 0,19	

5.1.4. Pesquisa de Lyssavírus na gordura marrom

Todos os morcegos foram submetidos a pesquisa de Lyssavírus na gordura marrom, sendo todos negativos.

5.2 Área Urbana

Na segunda etapa do trabalho, em área urbana, foram selecionados nove pontos conforme mostra a Figura abaixo. Cada ponto escolhido pertence a uma área do município, tendo sido amostrada grande parte da cidade de Presidente Prudente (**Fig 16**).

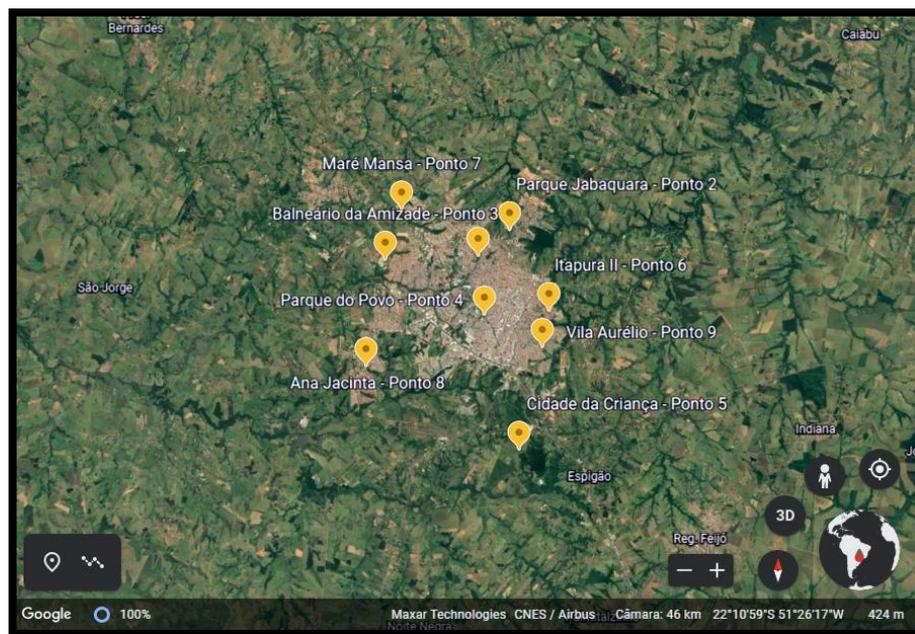


Figura 16. Mapa do município de Presidente Prudente com os pontos selecionados para as coletas em área urbana.

5.2.1 Espécies de morcegos coletados em Área Urbana

Com um esforço de captura de 9.720 horas por m² e um total de 18 noites de capturas, equivalente a 108h de amostragem, ocorreram 163 capturas de morcegos, pertencentes a 17 espécies, 11 gêneros e quatro famílias: Phyllostomidae, Vespertilionidae, Molossidae, Noctilionidae. Foram encontrados 88 machos e 75 fêmeas. Seis guildas tróficas de morcegos neotropicais foram registradas: insetívoros (sete espécies), frugívoros (seis) hematófagos (uma), nectarívoros (uma), onívoros (uma) e piscívoros (uma), como mostra a **(Tabela 7)**.

Tabela 7. Número de morcegos capturados com redes de neblina em área urbana na cidade de Presidente Prudente, no ano de 2020 a 2021.

Espécies	Guilda Trófica	♂	♀	Nº de Capturas
Phyllostomidae				
<i>Artibeus fimbriatus</i> (Gray, 1838)	FRU	2	3	5
<i>Artibeus lituratus</i> (Olfers, 1818)	FRU	18	14	32
<i>Artibeus obscurus</i> (Schinz, 1821)	FRU	20	17	37
<i>Artibeus planirostris</i> (Spix, 1823)	FRU	4	8	12
<i>Carollia perspicillata</i> (Linnaeus, 1758)	FRU	7	1	8
<i>Desmodus rotundus</i> (É. Geoffroy, 1810)	HEM	5	6	11
<i>Glossophaga soricina</i> (Pallas, 1766)	NEC	7	10	17
<i>Phyllostomus discolor</i> (Wagner, 1843)	ONI	3	1	4
<i>Platyrrhinus lineatus</i> (É. Geoffroy, 1810)	FRU	11	8	19

Noctilionidae				
<i>Noctilio albiventris</i> (Desmarest, 1818)	PIS	1	0	1
Molossidae				
<i>Cynomops planirostris</i> (Peters, 1866)	INS	0	1	1
<i>Molossus molossus</i> (Pallas, 1766)	INS	1	2	3
<i>Molossus rufus</i> (É. Geoffroy, 1805)	INS	1	0	1
Vespertilionidae				
<i>Eptesicus furinalis</i> (d'Orbigny & Gervais, 1847)	INS	2	1	3
<i>Myotis albescens</i> (É. Geoffroy, 1806)	INS	2	1	3
<i>Myotis levis</i> (É. Geoffroy, 1824)	INS	1	0	1
<i>Myotis nigricans</i> (Schinz, 1821)	INS	3	2	5
Total	6	88	75	163

Legenda: FRU – Frugívoro, HEM – Hematófago, NEC- Nectarívoro, ONI- Onívoro, PIS- Píscivoro, INS- Insetívoro.

5.2.2 Espécies de morcegos por pontos de coleta

O ponto de coleta com maior número de capturas foi o ponto um (P1), sendo este o único com a captura da espécie *Phyllostomus discolor* e que também apresentou o maior número de indivíduos da espécie *Artibeus obscurus* e *Platyrrhinus lineatus*. Nesse ponto foram coletados somente morcegos da família Phyllostomidae. Assim como no ponto um (P1), os pontos dois, três e quatro (P2, P3 e P4) apresentaram somente espécies da família Phyllostomidae (**Tabela 8**).

O ponto cinco (P5) apresentou maior diversidade em número de espécies coletadas, sendo que as espécies *Noctilio albiventris*, *Myotis albescens*, *M. levis* e *M. nigricans* foram capturados somente nesse ponto e sendo também o único possuindo representantes de todas as famílias de morcegos coletadas no trabalho (**Tabela 8**).

O ponto (P6) foi o único onde teve a ocorrência da espécie *A. fimbriatus* e *Molossus rufus*. O ponto (P9) foi o único a apresentar um espécime da espécie *Cynomops planirostris* (**Tabela 8**).

Tabela 8 - Espécimes de morcegos capturados em relação ao seu ponto de coleta e a distribuição das espécies pela cidade de Presidente Prudente.

Espécies	Pontos								
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9

Phyllostomidae									
<i>Artibeus fimbriatus</i>						5			
<i>Artibeus lituratus</i>	4	1	9	7	2	7		1	1
<i>Artibeus obscurus</i>	22	2	1	8	4				
<i>Artibeus planirostris</i>		5	3	2				2	
<i>Carollia perspicillata</i>	3					2			3
<i>Desmodus rotundus</i>						11			
<i>Glossophaga soricina</i>	1					16			
<i>Phyllostomus discolor</i>	4								
<i>Platyrrhinus lineatus</i>	16	3							
Noctilionidae									
<i>Noctilio albiventris</i>						1			
Molossidae									
<i>Cynomops planirostris</i>									1
<i>Molossus molossus</i>						2		1	
<i>Molossus rufus</i>						1			
Vespertilionidae									
<i>Eptesicus furinalis</i>						1	1	1	
<i>Myotis albescens</i>						3			
<i>Myotis levis</i>						1			
<i>Myotis nigricans</i>						5			
Total	50	11	13	17	47	14	1	5	5
Total de Espécies	6	4	3	3	10	4	1	4	3

Os morcegos da família Phyllostomidae mostram-se ser morcegos comuns na área urbana da cidade, estando presente em quase todos os pontos de coletas, conforme mostra a (Fig.17). O gênero *Artibeus* representa mais da metade dos morcegos capturados no estudo, sendo pertencente a esse gênero a espécie *Artibeus obscurus* que teve o maior número de capturas no período do trabalho.

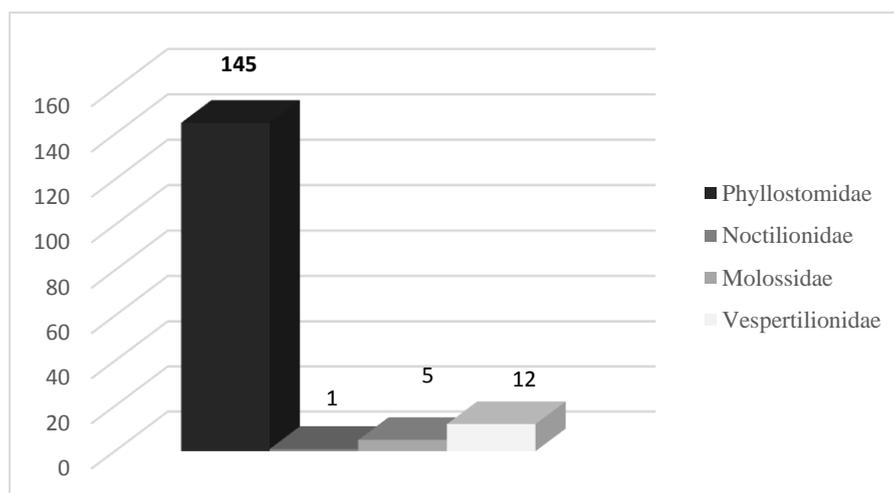


Figura 17. Quantidade de indivíduos de cada família de morcegos em área urbana, na cidade de Presidente Prudente.

5.2.3 Análise laboratorial para a detecção do vírus da raiva e de anticorpos contra o vírus

Um indivíduo de cada espécie de cada ponto de coleta foi encaminhado ao laboratório, totalizando 38 amostras analisadas.

Três indivíduos não foram submetidos a detecção de anticorpos contra o vírus rábico, pois a quantidade das amostras foram insuficientes para a análise.

Todas as amostras encaminhadas para os testes de Imunofluorescência Direta, Inoculação de Células de Neuroblastoma Murino (N2A), apresentaram resultado negativo.

Em relação a detecção de anticorpos contra o vírus rábico foi realizada o método FAVN, que apresentou em alguns casos títulos diferentes em relação as espécies e os pontos de coletas.

As espécies *A. fimbriatus*, *C. perspicillata*, *D. rotundus*, *Glossophaga soricina*, *P. discolor*, *Platyrrhinus lineatus*, *N. albiventris*, *Molossus molossus*, *M. rufus* e *Myotis albescens*, apresentaram título sorológico (0,17 UI/mL) em todos os espécimes coletados durante o período do estudo (**Tabela 9**).

Os morcegos da espécie *A. lituratus*, *A. obscurus*, *A. planirotris*, *Eptesicus furinalis* tiveram títulos sorológicos diferentes nos indivíduos coletados em diferentes pontos (**Tabela 9**).

Dos cinco indivíduos da espécie *Artibeus obscurus*, três deles apresentaram soro reagentes com títulos considerados protetores (0,5 UI/mL) (**Tabela 9**).

Foram coletados oito espécimes de *A. lituratus*, seis apresentaram títulos

sorológico de (0,17 UI/mL) e os outros dois um apresentaram título de (0,29UI/mL) e (0,5 UI/mL) (**Tabela 9**).

Os morcegos das espécies *A. planirostris* e *E. furinalis*, foram coletados três exemplares de cada e somente um de cada espécie apresentou título (0,5 UI/mL), os outros dois indivíduos de cada espécie tiveram título sorológico de (0,17 UI/mL) (**Tabela 9**).

Em relação a sorologia e o ponto de coleta o único ponto que houve mais de um animal com título sorológico (0,5 UI/mL) foi o P3 sendo as duas espécies pertencentes ao gênero *Artibeus* (**Tabela 9**).

Tabela 9. Sorologia para a Raiva nas diferentes espécies de morcegos e seus respectivos pontos de coleta em área urbana na cidade de Presidente Prudente, SP.

Espécies	Títulos sorológicos (UI/mL)								
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
<i>Artibeus fimbriatus</i>	-	-	-	-	-	0,17	-	-	-
<i>Artibeus lituratus</i>	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,29	-	0,5	0,17
<i>Artibeus obscurus</i>	0,5	0,17	0,5	0,17	0,5	-	-	-	-
<i>Artibeus planirostris</i>	-	0,17	0,5	0,17	-	-	-	0,17	-
<i>Carollia perspicillata</i>	0,17	-	-	-	0,17	-	-	-	0,17
<i>Desmodus rotundus</i>	-	-	-	-	0,17	-	-	-	-
<i>Glossophaga soricina</i>	0,17	-	-	-	0,17	-	-	-	-
<i>Phyllostomus discolor</i>	0,17	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Platyrrhinus lineatus</i>	0,17	0,17	-	-	-	-	-	-	-
<i>Noctilio albiventris</i>	-	-	-	-	0,17	-	-	-	-
<i>Cynomops planirostris</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	s/a
<i>Molossus molossus</i>	-	-	-	-	0,17	-	-	0,17	-
<i>Molossus rufus</i>	-	-	-	-	-	0,17	-	-	-
<i>Eptesicus furinalis</i>	-	-	-	-	-	0,17	0,5	0,17	-
<i>Myotis albescens</i>	-	-	-	-	0,17	-	-	-	-
<i>Myotis levis</i>	-	-	-	-	s/a	-	-	-	-
<i>Myotis nigricans</i>	-	-	-	-	s/a	-	-	-	-

A comparação dos títulos sorológicos ($\geq 0,5$ UI/mL) entre machos e fêmeas das espécies de morcegos coletados em área urbana, não apresentou significância estatísticas, conforme mostra a **Tabela 10**.

Também não houve significância estatística nas comparações da frequência de sororeagentes e de animas com títulos protetores entre animas com diferentes hábitos

alimentares (**Tabela 11**).

Tabela 10. Frequência de sororeagentes e de animas com títulos protetores, Medianas \pm desvios interquartílicos dos títulos sorológicos soroneutralizantes expressos em Unidades internacionais por mL de soro (UI/mL) em morcegos capturados em zonas urbanas do município de Presidente Prudente, SP.

Sexo	Freq (soreagentes)	Freq ($\geq 0,5$ UI/mL)	Título sorológico
Machos (N=23)	23/23 (100%)	3/23 (2,9%)	0,22 \pm 0,12
Fêmeas (N =12)	12/12 (100%)	3/12 (6,5%)	0,25 \pm 0,15
Geral (N=35)	35/35(100%)	6/35(4,3%)	0,23 \pm 0,12
p	NA	0,391	0,496

NA = Não aplicável; p = significância estatística nas comparações entre machos e fêmeas; * p <0,05.

Tabela 11. Relação entre a guilda trófica e a frequência de sororeagentes e de animas com títulos protetores, Medianas \pm desvios interquartílicos dos títulos sorológicos soroneutralizantes expressos em Unidades internacionais por mL de soro (UI/mL) em morcegos capturados em zonas urbanas do município de Presidente Prudente, SP.

Guilda	Freq (soreagentes)	Freq ($\geq 0,5$ UI/mL)	Título sorológico
Frugívoros	23/23 (100%)	6/23 (26,1%)	0,247 \pm 0,139
Insetívoros	7/7 (100%)	0/7 (0%)	0,217 \pm 0,125
Outros	5/5 (100%)	0/5 (0%)	0,17 \pm 0
P	NA	0.255	0.459

NA = Não aplicável; p = significância estatística nas comparações entre animas com diferentes hábitos alimentares.

5.2.4 Pesquisa por Lyssavírus na gordura marrom

Para a pesquisa de Lyssavírus em gordura marrom foram testadas as 38 amostras encaminhadas. Uma se mostrou sugestiva e foi testada para confirmação no PCR convencional na qual se mostrou negativa. Somente uma amostra apresentou resultado positivo tendo sido realizado o PCR convencional com os *primers* 504 e 304, que são usados para o diagnóstico da raiva, o que confirmou a positividade da amostra.

A amostra positiva na pesquisa de Lyssavírus na gordura marrom foi de um exemplar de morcego da espécie *Phyllostomus discolor* que foi coletado no ponto um (P1). Ele teve como título sorológico (0,17 UI/mL) e apresentou resultado negativo nos testes de Imunofluorescência Direta e Inoculação de Células de Neuroblastoma Murino (N2A), tanto em fragmentos de cérebro como em gordura marrom.

A amostra positiva foi submetida a reação em Cadeia da Polimerase com Transcrição Reversa (RT-PCR) para amplificação de trecho do gene G. Após a purificação do produto do PCR, foi realizado o sequenciamento e a análise filogenética, onde foi identificado que a amostra positiva pertence a Variante 2 do RABV, conforme mostra a (Fig.18).

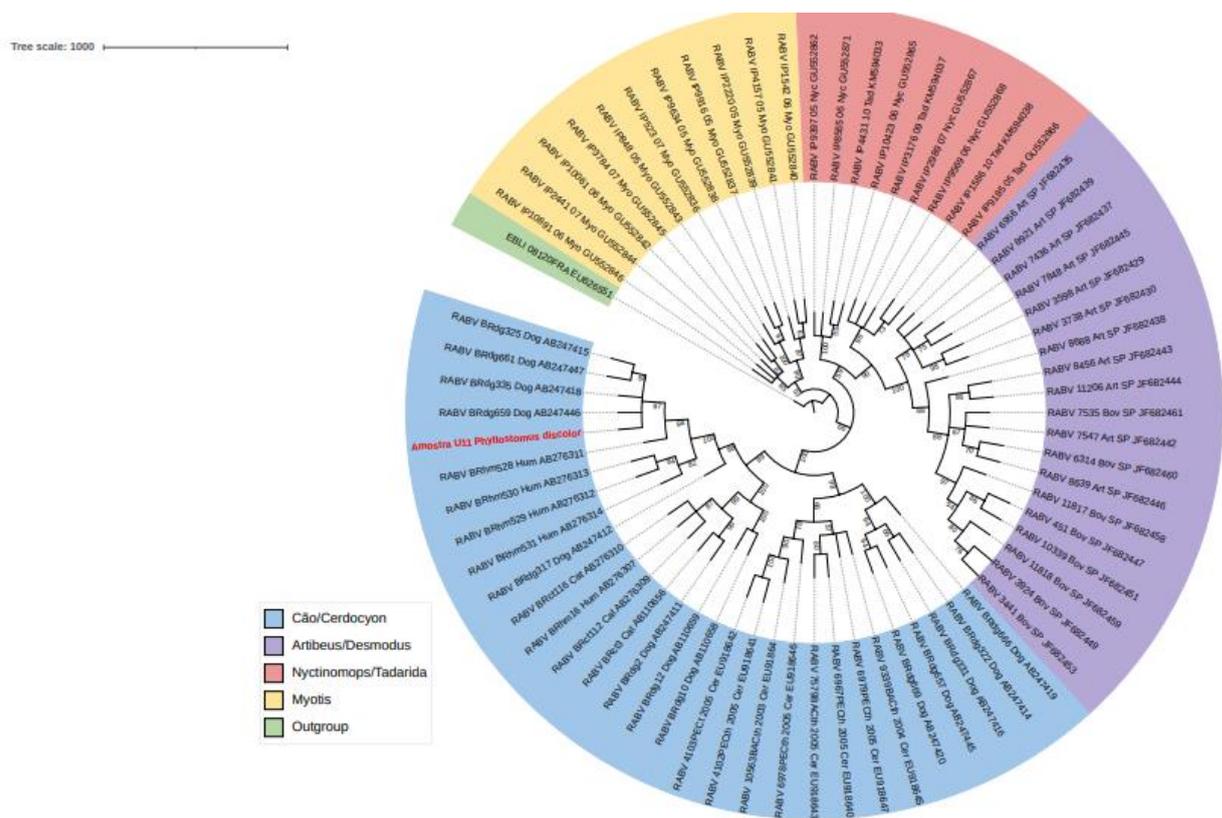


Figura 18. Análise filogenética da amostra positiva de *Phyllostomus discolor* coletado em área urbana na cidade de Presidente Prudente, SP.

6. DISCUSSÃO

No presente trabalho foram encontrados quatro abrigos ativos na região, sendo que dois deles são conhecidos da equipe de pesquisa, pois já haviam sido cadastrados com a habitação de morcegos vampiros em outros trabalhos (Albas et al., 2011). Mesmo com medidas de controle de morcegos hematófagos preconizadas pelo Programa Nacional de Controle da Raiva dos Herbívoros do Ministério da Agricultura, utilizando o tratamento com a pasta vampiricida realizado pelas equipes da CDA-SAA/SP, os morcegos voltam a utilizar essas construções como abrigos, fato este, que também foi demonstrado em trabalho de pesquisa realizado na região de Adamantina, SP, onde se propôs a avaliar os efeitos da ação de controle dos morcegos hematófagos (SANTANA, 2012).

Em relação aos outros dois abrigos encontrados, um foi referente a comunicação de munícipes feita à equipe da CDA- SAA/SP, devido a mordeduras em bovinos e à presença de morcegos em um reservatório de captação de água. O outro abrigo foi resultado da busca ativa nas rodovias da região, sobre uma ponte em rodovia, o que corrobora com o que foi encontrado por Albas et al. (2011), que observaram a eficácia da busca ativa por abrigos, e assim mapearam locais que são utilizados como abrigos de morcegos vampiros na região, verificando que 50% deles eram artificiais. No presente trabalho, observou-se que 100% dos abrigos foram artificiais, ou seja, oriundos de construções humanas.

A coabitação de morcegos hematófagos e outras espécies de morcegos tem sido demonstrada em alguns trabalhos. O compartilhamento com *C. perspicillata* é bem comum, conforme já foi descrito por Taddei et al. (1991), demonstrando que essas duas espécies coabitam com frequência.

Foram identificadas 17 espécies de quirópteros em área urbana. Comparando os encontrados com o último levantamento faunístico do município de Presidente Prudente, publicado em 2020, a pesquisa apresenta oito novas espécies de quirópteros que ainda não haviam registros de ocorrência dentro do município, sendo elas: *Artibeus obscurus*, *A. planirostris*, *Phyllostomus discolor*, *Noctilio albiventris*, *Cynomops planirostris*, *Myotis albescens* e *M. levis* (PRUDENTE, 2020).

No levantamento de fauna urbana realizado por Carvalho et al. (2011), através de dados de morcegos que chegaram para diagnóstico na região noroeste do Estado de

São Paulo, houve predominância de morcegos da família Molossidae, o que difere do encontrado no presente estudo, onde a maior número de ocorrência de morcegos se deu na família Phyllostomidae.

Grande parte dos trabalhos de levantamento de quirópteros dos municípios vem de dados de coletas realizadas por agentes da saúde e Centros de Controle de Zoonoses. Foram encaminhados para a detecção do vírus rábico no ano de 2013, 178 amostras de morcegos, somente um caso foi positivo no município de Presidente Prudente, sendo que a amostra foi de um morcego frugívoro da espécie *Artibeus lituratus*, pertencente à família Phyllostomidae. No trabalho foi constatado que o maior número de espécies coletadas pertenciam a família Molossidae (ALBAS et al., 2017).

Metodologias de coleta de forma passiva, quando a população solicita a coleta dos morcegos pelos agentes municipais de saúde, demonstram uma alta incidência de indivíduos da família dos molossídeos. Vários trabalhos pelo Brasil têm relatado essa situação, o que demonstra a necessidade de estudos mais detalhados sobre esses animais em vida livre para compreender mais sobre sua diversidade, ecologia e transmissão de patógenos desses animais em área urbana (CHAVES; SODRÉ, 2007; BREDT; ARAUJO; JUNIOR, 1998).

Todas as amostras de *D. rotundus* que foram submetidas ao diagnóstico, quando analisadas por imunofluorescência direta e inoculação de células de neuroblastoma murinho (N2A) foram negativas, corroborando com o estudo conduzido por Langoni et al. (2008), que realizaram diagnóstico e sorologia em 204 morcegos hematófagos na região de Botucatu, SP. Todas as amostras avaliadas foram negativas quando analisadas por imunofluorescência direta. No entanto, em relação à sorologia, os autores mencionados encontraram 7,35% dos valores acima do ponto de corte (0,5 UI / ML), diferente de nossa pesquisa, que foi de 4,3%.

Das amostras de morcegos coletados em área urbana, somente uma se mostrou positiva no PCR da gordura marrom, apresentando resultado negativo para os testes convencionais. *Phyllostomus discolor* tem ampla distribuição geográfica apresentando registro em quase todos os estados brasileiros, porém essa espécie não tem sido relatada com frequência em áreas urbanas (FERRACIOLI et al., 2017).

A espécie *P. discolor* foi encontrada infectado pelo vírus da raiva em alguns países da América, como: Belize, Guatemala e México (CONSTANTINE; BLEHERT, 2009), porém em território brasileiro não encontramos registros dessa espécie positiva para o vírus. Portanto, este é o primeiro registro em território brasileiro.

Analisando os títulos de anticorpos para a raiva em morcegos vampiros, Almeida et al. (2011) encontraram prevalência de 12,1% ao analisar os soros de 276 morcegos hematófagos, resultado muito superior ao encontrado em nosso experimento onde 79,1% dos morcegos apresentaram títulos de anticorpos, considerando valores baixos, médios e altos.

Em todas as colônias de *D. rotundus* a proporção de machos superou em muito a de fêmeas, com exceção da colônia mais populosa (abrigo 10), que se encontrava distante das demais. Nas colônias analisadas, consideramos improvável que tenha ocorrido viés amostral, pois, apesar dos machos serem mais fáceis de capturar em redes dispostas a noite, as capturas foram diurnas. Desta forma, o mais provável é que as colônias sejam majoritariamente compostas por machos, que são reconhecidos como dispersores do vírus da raiva entre as populações (STREICKER et al., 2016) e costumam formar colônias isoladas de animais solteiros (DELPIETRO; RUSSO, 2002; LORD; MURADALI; LAZARO, 1976).

Machos jovens (não escrotados) não apresentaram soropositividade superior aos machos sexualmente maduros (**Tabela 6**). Estes resultados contrariam outros estudos realizados no Peru (STREICKER et al., 2012), onde a idade foi um fator determinante para a soropositividade dos morcegos hematófagos ao vírus rábico. A idade é um fator que impacta diretamente na imunidade contra o vírus rábico, na população de morcegos. Morcegos hematófagos juvenis em geral são menos resistentes ao vírus, o que pode contribuir para as altas taxas de mortalidade (mais de 50%) observadas durante o primeiro ano de vida (WILKINSON, 1984).

Consideramos que o número de capturas de morcegos nas colônias da região são indicadores fidedignos da densidade populacional em cada uma delas. Os títulos sorológicos na colônia localizada no Abrigo N° 10 foram estatisticamente superiores aos outros. O que distingue esse abrigo dos outros é densidade populacional de morcegos mais alta que as demais, e a relação macho:fêmea menos assimétrica (0,92). Estes resultados sugerem que em abrigos mais populosos, onde os animais se reproduzem mais ativamente e com população de machos e fêmeas similares, o vírus rábico pode propagar-se entre animais com facilidade. Com efeito, nas colônias onde a reprodução dos morcegos é mais ativa, o vírus tem mais oportunidades para propagar-se, posto que a alimentação por regurgitação é mais comum em razão das fêmeas prenhes se preservam dos riscos de abandonarem os abrigos para se alimentar (DELPIETRO; MARCHEVSKY; SIMONETTI, 1992). Contudo, estes resultados

diferem do esperado, visto que, em grandes colônias, qualquer animal terá um número limitado de vizinhos para morder, o que reduz a probabilidade de circulação viral. Ademais, para morcegos vampiros, os contatos infecciosos podem ser ainda menos homogêneos devido à estrutura social diversificada dentro das colônias (STREICKER et al., 2012).

Contudo, não é possível inferir se as colônias de morcegos interagem entre si. A colônia mais populosa (Abrigo 10) apresenta-se, no mínimo, a aproximadamente 28 km das outras três colônias. Esta distância é superior aos 12 km de raio, reconhecidos como a máxima percorrida pelos morcegos vampiros em busca de fontes alimentares (BRASIL, 2009). Desta forma, é improvável que os morcegos desta grande colônia ocupem os espaços deixados pelos morcegos abatidos pelo serviço de controle oficial nas três colônias menores, conforme preconizam alguns estudiosos (STREICKER et al., 2012).

Além dos fatores estudados, outras características das colônias podem influenciar significativamente na circulação viral nas colônias, incluindo mecanismos imunológicos ou comportamentais complexos, como período de incubação prolongado durante a hibernação (GEORGE et al., 2011).

O levantamento sorológico realizado por Costa et al. (2013), na região nordeste do Brasil em 2009, detectou que naquela região, a prevalência de anticorpos antirrábicos foi de 50,8% em 307 espécimes de quirópteros de 28 espécies diferentes. Esses pesquisadores concluíram que a alta proporção de soros positivos indicava a alta circulação do vírus da Raiva. Por outro lado, concluíram, também, que a baixa ocorrência de Raiva em morcegos estaria relacionada à alta prevalência sérica. Nesse sentido, nossos resultados corroboram esse pensamento, pois também encontramos uma alta taxa de soros positivos.

Durante cinco anos no estado de Rondônia, foi monitorado o vírus da raiva em 1.183 morcegos. Todos apresentaram resultados negativos para o vírus, onde foram realizadas análises sorológicas considerando como reagentes amostras $\geq 0,5$ UI/mL. A prevalência de anticorpos anti-rábicos foi de 17,5% em 1.049 morcegos. As famílias Phyllostomidae e Molossidae apresentaram taxa de soro prevalência de 18,9% e 7,7%, respectivamente. As espécies *Artibeus lituratus*, *A. planirostis* e *A. Obscurus*, assim como neste trabalho, também apresentaram soros considerados reagentes. Contudo, as espécies *Desmodus rotundus*, *Phyllostomus discolor*, *Glossophaga soricina*, *Carollia perspicillata*, *Noctillio albiventris* e *Molossus molossus* foram considerados reagentes.

Essas mesmas espécies foram coletadas na presente pesquisa não apresentando títulos \geq 0,5 UI/mL (ALMEIDA et al., 2019).

A amostra positiva decorrente do morcego *Phyllostomus discolor* foi enviada para análise filogenética e segregou com amostras da ordem carnívora, variante 2. Um perfil antigênico do vírus da raiva isolado de diferentes espécies de morcegos não hematófagos foi realizado em Presidente Prudente no ano de 2009, onde 18 amostras foram tipificadas e 15 foram definidas como variante 3 e três amostras como variante 4 (ALBAS et al., 2009).

Segundo Albas et al. (2011) em seu trabalho de caracterização molecular do vírus da raiva em isolado de morcegos proveniente da região oeste do Estado de São Paulo, a análises antigênica de 27 amostras determinou três variantes distintas: Agv-3, Agv-4 e Agv-6.

De 1995 a 2015, o laboratório do Polo Alta Sorocabana pertencente a APTA realizou diagnóstico laboratorial da raiva para a região oeste do estado de São Paulo, em 20 anos foram analisadas 2.613 amostras caninas e 760 felinos, nenhuma amostra apresentou resultado positivo (ALBAS et al., 2018).

Segundo o Ministério da Saúde (2020), houve um caso de raiva humana transmitido por raposa infectada com a AgV2 no município de Catolé do Rocha/PB no ano de 2020. Os últimos registros de raiva humana decorrente da variante 2, havia acontecido em 2013 onde foram registrados três casos onde o animal agressor foi da espécie canina.

De acordo com os dados do presente estudo, o vírus rábico esta circulando na região de Presidente Prudente, onde uma investigação epidemiológica mais complexa em todos os segmentos do ciclo da área urbana seria importante para a prevenção, proteção e promoção à saúde pública.

7. CONCLUSÕES

- Foram identificados quatro abrigos ativos na área estudada, sendo que em dois havia coabitação com outras espécies de morcegos.
- Foram identificadas 17 espécies de morcegos em área urbana, sendo sete delas novos registros no município de Presidente Prudente.
- Todos os morcegos submetidos ao diagnóstico da Raiva, apresentaram resultado negativo nos testes convencionais IFD e IVCC.
- Foi identificado que estes animais, em algum momento, tiveram contato com o vírus rábico, uma vez que, foram registradas amostras reagentes com títulos superiores a 0,5 UI/mL.
- Não houve diferença significativa entre os títulos sorológicos entre machos e fêmeas.
- A pesquisa por Lyssavírus na gordura marrom dos morcegos, apresentou-se positiva em um indivíduo da espécie *P. Discolor*.
- A amostra positiva para o vírus da raiva pertence a AgV2.

O presente trabalho é importante para a prevenção, proteção e promoção à saúde pública por meio da vigilância que se fez em função do monitoramento da circulação do vírus, alertando assim, os órgãos oficiais que controlam esta zoonose da presença do vírus rábico em circulação na região em estudo.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABASTECIMENTO, Ministério da Agricultura Pecuária e. **Distribuição temporal dos casos de raiva.** 2020. Disponível em: <http://indicadores.agricultura.gov.br/saudeanimal/index.htm>. Acesso em: 01 set. 2020.

AGUILAR-SETIEN, A. et al. Salivary excretion of rabies virus by healthy vampire bats. **Epidemiology and Infection**, [S.L.], v. 133, n. 3, p. 517-522, 7 fev. 2005. Cambridge University Press (CUP). <http://dx.doi.org/10.1017/s0950268805003705>.

ALBAS, A. et al. Diagnóstico laboratorial da Raiva em diferentes espécies animais na região oeste do estado de São Paulo, Brasil, no período de 1995 a 2015. in: congresso de iniciação científica em ciências agrárias, biológicas e ambientais, 16., 2018, São Paulo. **O Biológico/Suplemento**. São Paulo: Instituto Biológico, 2018. v. 80, p.37. Disponível em: http://www.biologico.sp.gov.br/uploads/docs/bio/suplementos/V80_1/a8d463d0-9328-4643-90fd-8fdbb615d1ce.pdf. Acesso em: 02 set. 2020.

ALBAS, A. et al. Diagnóstico laboratorial da raiva na região oeste do Estado de São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [S.L.], v. 38, n. 6, p. 493-495, dez. 2005. Fap UNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0037-86822005000600009>.

ALBAS, A. et al. Different clinical manifestations observed in mice inoculated with several rabies virus variants in southeast Brazil. **Proceedings of anual Rabies Meeting**. Anais. Toronto: Research Global Alliance for Rabies Control, 2013

ALBAS, A. et al. Levantamento da fauna de morcegos com pesquisa do vírus rábico dos municípios da 10ª região administrativa do estado de são paulo, no ano de 2013. **Veterinária e Zootecnia**, Presidente Prudente, v. 1, n. 24, p. 174-183, mar. 2017. Disponível em: <file:///C:/Users/Luiza/Desktop/FACULDADE/APTA%20DOCUMENTOS/APTA%202015/ARTIGOS%20PUBLICADOS/PUBLICACAO.pdf>. Acesso em: 22 abr. 2021.

ALBAS, A. Et al. Molecular characterization of rabies virus isolated from non-haematophagous bats in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [S.L.], v. 44, n. 6, p. 678-683, dez. 2011. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0037-86822011000600006>.

ALBAS, A. et al. Os morcegos e a raiva na região oeste do Estado de São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [s.l.], v. 44, n. 2, p. 201-205, 18 mar. 2011. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0037-86822011005000001>.

ALBAS, A. et al. Perfil antigênico do vírus da raiva isolado de diferentes espécies de morcegos não hematófagos da Região de Presidente Prudente, Estado de São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [S.L.], v. 42, n. 1, p. 15-17, fev. 2009. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0037-86822009000100004>.

ALLENDORF, Susan Dora. **Análise filogenética correlacionada com a distribuição do vírus rábico em quirópteros naturalmente infectados**. 2011. 96 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu – Sp, 2011. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/94601>. Acesso em: 13 out. 2020.

ALMEIDA, M. et al. Rabies virus monitoring in bat populations in Rondônia state, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [S.L.], v. 52, p. 1-6, 2019. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0199-2018>.

ALMEIDA, M. F. et al. Experimental rabies infection in hematophagous bats *Desmodus rotundus*. **Epidemiology and Infection**, [S.L.], v. 133, n. 3, p. 523-527, 15 mar. 2005. Cambridge University Press (CUP). <http://dx.doi.org/10.1017/s0950268804003656>.

ALMEIDA, M. F. et al. Rabies diagnosis and serology in bats from the State of São Paulo, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [S.L.], v. 44, n. 2, p. 140-145, 1 abr. 2011. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0037-86822011005000011>.

ALMEIDA, M. F. et al. Vaccinating the vampire bat *Desmodus rotundus* against rabies. **Virus Research**, v. 137, n. 2, p. 275–277, nov. 2008.

ANDERSON, A.; SHWIFF, S. A. The Cost of Canine Rabies on Four Continents. **Transboundary and Emerging Diseases**, [S.L.], v. 62, n. 4, p. 446-452, 24 set. 2013. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/tbed.12168>.

BIAVATTI, T; COSTA, L.M; ESBÉRARD, C.E.L. Morcegos (mammalia, chiroptera) em refúgios diurnos artificiais na região sudeste do Brasil. **Mastozoología Neotropical**, Tucumán, Argentina, v. 22, n. 2, p. 239-253, jun. 2015. Disponível em: <https://www.redalyc.org/pdf/457/45743273003.pdf>. Acesso em: 30 set. 2020.

BLACKWOOD, J. C. et al. Resolving the roles of immunity, pathogenesis, and immigration for rabies persistence in vampire bats. **Proceedings of The National Academy of Sciences**, [S.L.], v. 110, n. 51, p. 20837-20842, 2 dez. 2013. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1308817110>.

BRASIL. **Controle da raiva dos herbívoros: manual técnico**. 1. ed. Brasília: Elsevier Editora Ltda, 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Controle da raiva dos herbívoros: manual técnico**. Brasília: MAPA, 2009. 124p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Morcegos em áreas urbanas e rurais: manual de manejo e controle. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 1988. 117p.

BREDT A.; ARAUJO F.; JUNIOR J. Noções gerais sobre morcegos. In: Bredt A, Araujo FAA, Junior JC. **Morcegos em áreas urbanas e rurais: manual de manejo e controle**. 1a ed. Brasília: Fundação Nacional de Saúde; 1998. p.9-22.

BREDT, A.; ARAUJO, F.A.A. JUNIOR, J.C. Morcegos em áreas urbanas e rurais: manual de manejo e controle. 1. ed. Brasília :Fundação Nacional de Saúde,1996. Cap.1: **Os morcegos e o homem**, p.10-20.

BREDT, A.; UIEDA, W.; PEDRO, W. A. **Plantas & morcegos: na recuperação de áreas degradadas e na paisagem urbana**. 1.ed. Brasília: Rede de Sementes do Cerrado,2012.

CARDOSO, R. S.; AMORIM, M. C. C. T. Características do clima urbano em Presidente Prudente/SP a partir de dados de temperatura e umidade relativa do ar e técnicas de sensoriamento remoto. **Geography Department University of Sao Paulo**, [S.L.], v. 28, p. 39, 2 fev. 2015. Universidade de São Paulo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBiUSP. <http://dx.doi.org/10.11606/rdg.v28i0.494>.

CARDOSO, T.C. et al. Chicken embryo related (CER) cell line for quantification of rabies neutralizing antibody by fluorescent focus inhibition test. **Biologicals**, [S.L.], v.34, n.1, p.2932, mar.2006.ElsevierBV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biologicals.2005.08.001>.

CARNEIRO, A. J. B. et al. Rabies virus RNA in naturally infected vampire bats, northeastern Brazil. **Emerging infectious diseases**, v. 16, n. 12, p. 2004–6, dez. 2010.
CARVALHO, C. et al. Caracterização da fauna de morcegos (mammalia, chiroptera) e ocorrência de vírus rábico na região noroeste do estado de são paulo, brasil. **Veterinária e Zootecnia**, Araçatuba, v. 3, n. 18, p. 490503,set.2011.Disponívelem:file:///C:/Users/Luiza/Downloads/TrabalhoMestradoCristianoVet.ZootBotucatu%20(1).pdf. Acesso em: 22 abr. 2021.

CASTILHO J.G. et al. Padronização e aplicação da técnica de isolamento do vírus da raiva em células de neuroblastoma de camundongo (N2A). **Bepa**. 2007;47(4):12-8.

CHAVES M.;SODRÉ M. **Manejo de morcegos em áreas urbanas**. 1a ed. Piracicaba: CP 2; 2007. p.139-44.

CHRISTOFOLLI, A. M. **Distribuição espacial e temporal dos casos de raiva animal diagnosticados entre 1996 e 2015 na região oeste do estado de São Paulo**. 2020. 30f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, 2020.

CONSTANTINE, D.; BLEHERT, D. Bat Rabies and Other Lyssavirus Infections. **Circular**, Virginia, p. 1-68, 2009. US Geological Survey. <http://dx.doi.org/10.3133/cir1329>.

CONSTANTINE, D.G. Bats in relation to the health, welfare, and economy of man. In: Wimsatt, W.A. **Biology of bats**. New York, Academic Press, 1970. v.2 p. 319-449

CONSTANTINE, D.G. Health precautions for bat researchers. In: Kunz, T. H. **Ecological and behavioral methods for the study of bats**. Washington, Smithsonian Inst. Press, 1988. p. 491-528.

COSTA, L. J. C. et al. Serological investigation of rabies virus neutralizing antibodies in bats captured in the eastern Brazilian Amazon. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, [S.L.], v. 107, n. 11, p. 684-689, 6 out. 2013. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/trstmh/trt080>.

DAVIS, A. D.; DUPUIS, M.; RUDD, R. J. Extended Incubation Period of Rabies Virus in a Captive Big Brown Bat (*Eptesicus fuscus*). **Journal of Wildlife Diseases**, [S.L.], v. 48, n. 2, p. 508-511, abr. 2012. Wildlife Disease Association. <http://dx.doi.org/10.7589/0090-3558-48.2.508>.

DEAN D.; ABELSETH M.K.; ATANASIU P. The fluorescent antibody test. In: Meslin FX, Kaplan MM, Koprowski H, editors. **Laboratory techniques in rabies**. 4th ed. Geneva: World Health Organization; 1996. p. 88-95.

DELPIETRO, H. A.; MARCHEVSKY, N.; SIMONETTI, E. Relative population densities and predation of the common vampire bat (*Desmodus rotundus*) in natural and cattle-raising areas in north-east Argentina. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 14, n. 1-2, p. 13-20, out. 1992.

DELPIETRO, H. A.; RUSSO, R. G. Observations of the common vampire bat (*Desmodus rotundus*) and the hairy-legged vampire bat (*Diphylla ecaudata*) in captivity. **Mammalian Biology**, v. 67, n. 2, p. 65-78, 2002.

DELPIETRO, H. et al. [Determination of the rate of rabies attack in bats]. **Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana**. Pan American Sanitary Bureau, v. 73, n. 3, p. 222-30, set. 1972.

DIAS, R. A et al. Modelo de risco para circulação do vírus da raiva em herbívoros no Estado de São Paulo, Brasil. **Revista Panamericana de Salud Pública**, Brasil, v. 4, n. 30, p. 6-370, 04 abr. 2011.

ESCOBAR, L. E. et al. Bat-borne rabies in latin America. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, [S.L.], v. 57, n. 1, p. 63-72, fev. 2015. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0036-46652015000100009>.

FEINSTEIN, A. R. **Principles of medical statistics**. 1. ed. Boca Raton: Chapman & Hall/CRC, 2002.

FERRACIOLI, P. Subfamília Phyllostominae. In: REIS, Nelio Roberto dos. **História Natural dos Morcegos Brasileiros**. Rio de Janeiro: Technical Books Editora Ltda, 2017. p. 137.

FINNEGAN, C. J. et al. Rabies in North America and Europe. **Jrsm**, [S.L.], v. 95, n. 1, p. 9-13, 1 jan. 2002. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1258/jrsm.95.1.9>.

FOOKS, A. R et al. Rabies. **Nature Reviews Disease Primers**, [S.L.], v. 3, n. 1, p.

17091-17091, 30 nov. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrdp.2017.91>

GEORGE, D. B. et al. Host and viral ecology determine bat rabies seasonality and maintenance. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 25, p. 10208–10213, 21 jun. 2011.

GONÇALVES, M.A.; SÁ-NETO, R. J.; BRAZIL, T. K. Outbreak of aggressions and transmission of rabies in human beings by vampire bats in northeastern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [S.L.], v. 35, n. 5, p. 461-464, out. 2002. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0037-86822002000500006>.

HEMACHUDHA, T. et al. Human rabies: neuropathogenesis, diagnosis, and management. **The Lancet Neurology**, [S.L.], v. 12, n. 5, p. 498-513, maio 2013. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1474-4422\(13\)70038-3](http://dx.doi.org/10.1016/s1474-4422(13)70038-3).

HICKMAN JR, C. P. Mamíferos. In: HICKMAN JR, C.P; ROBERTS, L.S.; LARSON, A. **Princípios integrados de zoologia**. 15. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.p.647

HIRAI, K. et al. Suppression of Cell-Mediated Immunity by Street Rabies Virus Infection. **Microbiology and Immunology**, [S.L.], v. 36, n. 12, p. 1277-1290, dez. 1992. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1348-0421.1992.tb02130.x>.

HOOVER, D. C. et al. Rabies Virus Clearance from the Central Nervous System. **Advances in Virus Research**, [S.L.], p. 55-71, 2011. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-387040-7.00004-4>.

ICTV. **Gênero: Lyssavirus**. Disponível em: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/negativesenserviruses/mononegavirales/w/rhabdoviridae/795/genus-lyssavirus. Acesso em: 27 ago. 2020.

ICTV. **Rhabdoviridae: rhabdoviridae**. Rhabdoviridae. 2020. Disponível em: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>. Acesso em: 26 ago. 2020.

KAHN, L. H. Confronting zoonoses, linking human and veterinary medicine. **Emerging infectious diseases**, v. 12, n. 4, p. 556–61, abr. 2006.

KESSLER, M. et al. Changing resource landscapes and spillover of henipaviruses. **Annals of The New York Academy of Sciences**, [S.L.], v. 1429, n. 1, p. 78-99, 23 ago. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/nyas.13910>.

KNOBEL, D. L. et al. Re-evaluating the burden of rabies in Africa and Asia. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 83, n. 5, p. 360–368, 2005. Disponível em: <https://www.who.int/bulletin/volumes/83/5/360arabic.pdf?ua=1>

KOTAIT I. Past. In: Raiva humana causada pela variante 3 *Desmodus rotundus*. **Instituto Pasteur**, São Paulo 7:3, 2003.

KRISTENSSON, K.; OLSSON, Y. Diffusion pathways and retrograde axonal transport

of protein tracers in peripheral nerves. **Progress in neurobiology**, v. 1, n. 2, p. 87–109, jan. 1973.

KUNZ, T. H.; FENTON M. B. **Bat ecology**. Chicago: The University of Chicago Press, 2003.

LANGONI, H. et al. Serological survey for rabies in serum samples from vampire bats (*Desmodus rotundus*) in Botucatu region, SP, Brazil. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, [S.L.], v. 14, n. 4, p. 651-659, 2008. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1678-91992008000400008>.

LEE, D. N.; PAPEŞ, M.; VAN DEN BUSSCHE, R. A. Present and Potential Future Distribution of Common Vampire Bats in the Americas and the Associated Risk to Cattle. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, p. e42466, 10 ago. 2012.

LORD, R. D.; MURADALI, F.; LAZARO, L. Age Composition of Vampire Bats (*Desmodus rotundus*) in Northern Argentina and Southern Brazil. **Journal of Mammalogy**, v. 57, n. 3, p. 573–575, 27 ago. 1976.

MARTORELLI, L. F. A. et al. Isolamento do vírus rábico de morcego insetívoro *Lasiurus borealis*. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v.30, n.1, p. 101-102, fev. 1996.

MENOZZI, B. D et al. Antigenic and genotypic characterization of rabies virus isolated from bats (Mammalia: chiroptera) from municipalities in São Paulo state, southeastern brazil. **Archives of Virology**, [S.L.], v. 162, n. 5, p. 1201-1209, 20 jan. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00705-017-3220-9>

MILLER, J.; HOBBS, R. Conservation Where People Live and Work. **Conservation Biology**, [S.L.], v. 16, n. 2, p. 330-337, abr. 2002. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1523-1739.2002.00420.x>.

Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento. secretaria de defesa agropecuária. **ISBN 978-85-99851-81-4**: Controle da raiva dos herbívoros. 2 ed. Brasília: Assessoria de Comunicação Social, 2009. 124 p. Disponível em:https://www.gov.br/agricultura/pt/br/assuntos/sanidadeanimalvegetal/saudeanimal/programasdesaudeanimal/raivadosherbivoroseeb/manual_raivaherbvoros2009.pdf. Acesso em: 14 ago. 2020.

MORENO, J.A.; BAER, G. M. Experimental Rabies in the Vampire Bat. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, [S.L.], v. 29, n. 2, p. 254-259, 1 mar. 1980. American Society of Tropical Medicine and Hygiene. <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.1980.29.254>.

NASSARDEN, S. M. et al. Cadastramento de abrigos de morcego *Desmodus rotundus* no município de Tangará da Serra, Mato Grosso. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do Crmv-Sp**, São Paulo, v. 14, n. 2, p. 83-84, 29 ago. 2016. Disponível em: <https://revistamvez-crmvsp.com.br/index.php/recmvz/article/view/32125>. Acesso em: 29 set. 2020.

OLIVEIRA, P. R. et al. Levantamento, cadastramento e estimativa populacional das habitações de morcegos hematófagos, antes e após atividades de controle, no município de Araguari. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.76, n.4, p.553-560, out/dez.2009.

OLIVEIRA, R. N. et al. Rabies virus in insectivorous bats: implications of the diversity of the nucleoprotein and glycoprotein genes for molecular epidemiology. **Virology**, [S.L.], v.405, n.2, p.352-360, set.2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2010.05.030>.

ORGANIZATION, World Health. **Rabies**. 2020. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/rabies>. Acesso em: 03 set. 2020.

PACHECO, S. et al. Morcegos Urbanos: Status do Conhecimento e Plano de Ação para a Conservação no Brasil. **Chiroptera Neotropical**, Porto Alegre, v. 1, n. 16, p. 629-647, jul. 2010. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Rosane-Marques/publication/272563542_Morcegos_Urbanos_Status_do_Conhecimento_e_Plan_o_de_Acao_para_a_Conservacao_no_Brasil/links/54e9dae20cf2f7aa4d546cbc/Morcegos-Urbanos-Status-do-Conhecimento-e-Plano-de-Acao-para-a-Conservacao-no-Brasil.pdf. Acesso em: 09 abr. 2021.

PERACCHI, A. L. et al. Ordem Chiroptera. In: REIS, N.R. et al. **Mamíferos do Brasil**. 1. ed. Londrina: UEL, 2006. p.153.

PRESIDENTE PRUDENTE. IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **IBGE Cidades: população**. População. 2020. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/sp/presidente-prudente/panorama>. Acesso em: 25 jun. 2020.

PRESIDENTE PRUDENTE. Instituto de Economia Agrícola (IEA). Secretaria de Agricultura e Abastecimento (org.). **Estatísticas da Produção Paulista: bovinos**. Bovinos. 2017 a 2019. Disponível em: http://ciagri.iea.sp.gov.br/nia1/subjetiva.aspx?cod_sis=1&idioma=1. Acesso em: 13 ago. 2020.

PRUDENTE, P. **Levantamento Prévio da fauna do município de Presidente Prudente - SP 2020**. 697. ed. Presidente Prudente: Diário Oficial Eletrônico, 2020. Disponível em: [file:///C:/Users/Luiza/Downloads/Di%C3%A1rio%20Oficial%20de%20Presidente%20Prudente%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/Luiza/Downloads/Di%C3%A1rio%20Oficial%20de%20Presidente%20Prudente%20(1).pdf). Acesso em: 22 abr. 2021.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R Software: A Language and Environment for Statistical Computing**, Vienna, 2019. Disponível em: <<http://www.r-project.org>>

REIS, N. R. et al. **História Natural dos Morcegos Brasileiros**. Rio de Janeiro: Technical Books Editora Ltda, 2017.

REIS, R. R. et al. Sobre os morcegos brasileiros. In: REIS, N.R. et al. **Morcegos do Brasil**. 1.ed. Londrina: UEL, 2007. p.17

RODRIGUEZ, L.L. RHABDOVIRIDAE: raiva. In: FLORES, Eduardo Furtado. **virologia veterinária**. Santa Maria: Ufsm, 2007. p. 705.

RUPPRECHT CE, HANLON CA, HEMACHUDHA T. **Rabies re-examined**. *Lancet Infect Dis*. 2002; 2: 327–343.

SANTANA, A. P. L. **Controle da população de morcegos hematófagos na região de Andradina, São Paulo**. 2012. 48 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência Animal (Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal), Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba 2013. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/121914/000814242.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 29 set. 2020.

SAÚDE, Ministério da. : **Casos de Raiva Humana por espécie animal agressora no período de 2010 a 2020. Brasil, 2020**. 2020. Disponível em: https://www.gov.br/saude/ptbr/media/pdf/2020/dezembro/22/tabela2_2020_atualizada.pdf. Acesso em: 04 maio 2021.

SAÚDE, Ministério da. **Casos de raiva humana por município de ocorrência, espécie animal agressora e variante genética no período de 2010 a 2020. Brasil, 2020**. 2020. Disponível em: <https://www.saude.gov.br/images/pdf/2020/May/29/Tabela-6-2020.pdf>. Acesso em: 01 set. 2020.

SAÚDE, Ministério da. **Guia de vigilância em saúde: raiva**. Raiva. 2019. Disponível em: <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/junho/25/guia-vigilancia-saude-volume-unico-3ed.pdf>. Acesso em: 30 ago. 2020.

SAÚDE, Ministério da. **Raiva: o que é, causas, sintomas, tratamento, diagnóstico e prevenção: situação epidemiológica da raiva**. 2020. Disponível em: <https://saude.gov.br/saude-de-a-z/raiva>. Acesso em: 01 set. 2020.

SHIPLEY, R. et al. Bats and Viruses: emergence of novel lyssaviruses and association of bats with viral zoonoses in the eu. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, [S.L.], v. 4, n. 1, p. 31-31, 7 fev. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/tropicalmed4010031>.

SMITH, J. S.; KING, H. Monoclonal antibodies for the identification of rabies and non-rabies lyssaviruses. In: MESLIN, F. X.; KAPLAN, N. M.; KOPROWSKY, H. (Eds.). **Laboratory techniques in rabies**. 1. ed. Geneva: World Health Organization, 1996. p. 145–155.

SODRÉ, M. M.; GAMA, A. R. da; ALMEIDA, M. F. de. Updated list of bat species positive for rabies in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, [S.L.], v. 52, n. 2, p. 75-81, abr. 2010. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0036-46652010000200003>.

STONER-DUNCAN, B.; STREICKER, D. G.; TEDESCHI, C. M. Vampire Bats and Rabies: toward an ecological solution to a public health problem. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [S.L.], v. 8, n. 6, p. 2867-2867, 19 jun. 2014. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0002867>.

STREICKER, D. G. et al. Ecological and anthropogenic drivers of rabies exposure in vampire bats: implications for transmission and control. **Proceedings of The Royal Society B: Biological Sciences**, [S.L.], v. 279, n. 1742, p. 3384-3392, 13 jun. 2012. The

Royal Society. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2012.0538>.

STREICKER, D. G. et al. Host–pathogen evolutionary signatures reveal dynamics and future invasions of vampire bat rabies. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 39, p. 10926–10931, 27 set. 2016.

STREICKER, D. G. et al. Rates of viral evolution are linked to host geography in bat rabies. **PLoS pathogens**, v. 8, n. 5, p. e1002720, jan. 2012.

SULKIN, S. Edward. Bat Rabies: experimental demonstration of the reservoiring mechanism. **American Journal of Public Health and The Nations Health**, [S.L.], v. 52, n. 3, p. 489-498, mar. 1962. American Public Health Association. <http://dx.doi.org/10.2105/ajph.52.3.489>.

TADDEI, V. A. et al. Distribuição do morcego vampiro *Desmodus rotundus* (Chiroptera, Phyllostomidae) no Estado de São Paulo e a raiva dos animais domésticos. Campinas: **CATI**, 1991. 107 p.

TEIXEIRA, L.H.M. et al. Distribuição espaço-temporal dos diagnósticos laboratoriais da raiva animal. **Ciência Animal Brasileira**, [S.L.], v. 16, n. 1, p. 144-157, mar. 2015. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1809-6891v16i131282>.

UIEDA, W. et al. Espécies de quirópteros diagnosticadas com raiva no Brasil. **Boletim do Instituto Pasteur**, São Paulo, v.1, n.2, p.17-36, 1996

UIEDA, W. et al. Raiva em morcegos insetívoros (Molossidae) do Sudeste do Brasil. **Revista de Saúde Pública**, [S.L.], v. 29, n. 5, p. 393-397, out. 1995. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0034-89101995000500009>.

UIEDA, W.; CHAVES, M.; SANTOS, C. **Guia das principais espécies de morcegos brasileiros**. 1. ed. Botucatu: s.n., 2008.

WAKELEY, P. R. et al. Development of a Real-Time, TaqMan Reverse Transcription-PCR Assay for Detection and Differentiation of Lyssavirus Genotypes 1, 5, and 6. **Journal of Clinical Microbiology**, [S.L.], v. 43, n. 6, p. 2786-2792, 1 jun. 2005. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.43.6.2786-2792.2005>.

WARRELL, M.; WARRELL, D. Rabies and other lyssavirus diseases. **The Lancet**, [S.L.], v. 363, n. 9413, p. 959-969, mar. 2004. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(04\)15792-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(04)15792-9).

WEBSTER W.A.; CASEY G.A. Virus isolation in neuroblastoma cell culture. In: Meslin FX, Kaplan MM, Koprowisk H, editors. **Laboratory techniques in rabies**. 4th ed. Geneva: World Health Organization; 1996. p. 96-104

WHITBY, J.E. et al. Rapid detection of rabies and rabies-related viruses by RT-PCR and enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal of Virological Methods**, [S.L.], v. 69, n. 1-2, p. 63-72, dez. 1997. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0166-0934\(97\)00143-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0166-0934(97)00143-2).

WILKINSON, G. S. Reciprocal food sharing in the vampire bat. **Nature**, v. 308, n. 5955, p. 181–184, mar. 1984.

ANEXOS

1. Anexo – Declaração de parceria entre a equipe de pesquisa e o escritório de Defesa agropecuária.



GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
COORDENADORIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA



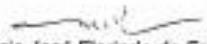
DECLARAÇÃO DE PARCERIA

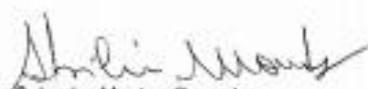
O Escritório de Defesa Agropecuária (EDA) de Presidente Prudente, SP, com base no Decreto nº 45.781 de 27 de Abril de 2001, que regulamentou a Lei nº 10.670 de 24 de Outubro de 2000, tem a missão de controlar a raiva no Estado de São Paulo, inclusive realizar o controle populacional do morcego hematófago (*Desmodus rotundus*), principal transmissor desta doença para os herbívoros. Portanto, realiza este trabalho rotineiramente, capturando amostras em abrigos referenciados e usando a pasta vampiricida nos mesmos.

Declaramos neste momento, que estamos realizando parceria com o Dr. Avelino Albas, Pesquisador Científico, responsável pelo laboratório de raiva da APTA – Presidente Prudente, em função do Projeto de Pesquisa nº 2017/23667/1 concedido ao Pesquisador pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) intitulado: "Pesquisa do Vírus Rábico em Morcegos Hematófagos (*Desmodus rotundus*) na Região Oeste do Estado de São Paulo".

Esta parceria envolve a cessão ao laboratório de exemplares vivos do citado morcego na quantidade aproximada de 20% do total encontrado em cada abrigo. Estes exemplares serão acondicionados em gaiolas apropriadas e encaminhados para o laboratório de raiva para proceder os experimentos propostos no Projeto.

Sem mais para o momento,


Márcio José Florindo de Freitas
Assistente de Planejamento
EDA P. Prudente


Abílio Salvador Montes Gonçalves
Diretor Técnico
EDA P. Prudente

Presidente Prudente, 15 de Agosto de 2018.

2. Anexo - Licença de coleta da equipe de trabalho (Frente)

 Ministério do Meio Ambiente - MMA Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO		
Licença permanente para coleta de material zoológico		
Número: 27346-1	Data da Emissão: 28/04/2011 10:30	
Dados do titular		
Nome: WAGNER ANDRÉ PEDRO	CPF: 074.889.608-23	
Nome da Instituição: Faculdade de Odontologia do Campus de Aracaju - UNESP	CNPJ: 48.031.915/0013-68	
Observações e ressalvas		
1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passa da, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.	
2	A licença permanente não é válida para: a) coleta ou transporte de espécies que constem nas listas oficiais de espécies ameaçadas de extinção; b) manutenção de espécimes de fauna silvestre em cativeiro; c) recebimento ou envio de material biológico ao exterior; e d) realização de pesquisa em unidade de conservação federal ou em caverna. A restrição prevista no item d não se aplica às categorias Reserva Particular do Patrimônio Natural, Área de Relevante Interesse Ecológico e Área de Proteção Ambiental constituídas por terras privadas.	
3	O pesquisador titular da licença permanente, quando acompanhado, deverá registrar a expedição de campo no Sisbio e informar o nome e CPF dos membros de sua equipe, bem como dados da expedição, que constarão no comprovante de registro de expedição para eventual apresentação à fiscalização.	
4	Esta licença permanente NÃO exclui o pesquisador titular da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal.	
5	Esta licença permanente não poderá ser utilizada para fins comerciais, industriais ou esportivos ou para realização de atividades integrantes do processo de licenciamento ambiental de empreendimentos.	
6	Este documento NÃO exclui o pesquisador titular da necessidade de atender ao disposto na Instrução Normativa Ibrama nº 27/2002, que regulamenta o Sistema Nacional de Aranhamento de Aves Silvestres.	
7	O pesquisador titular da licença permanente será responsável pelos atos dos membros da equipe (quando for o caso).	
8	O órgão gestor de unidade de conservação estadual, distrital ou municipal poderá, a despeito da licença permanente e das autorizações concedidas pelo ICMBio, estabelecer outras condições para a realização de pesquisas nessas unidades de conservação.	
9	O titular da licença ou autorização e os membros de sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condições in situ.	
10	O titular da licença permanente deverá apresentar, anualmente, relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias após o aniversário de emissão da licença permanente.	
11	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando de violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa declaração de informações relevantes que subdarem a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.	
12	A licença permanente será válida enquanto durar o vínculo empregatício do pesquisador com a instituição científica a qual ele estava vinculado por ocasião da solicitação.	
13	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso e componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospeção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/gen .	
14	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constantes de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobrepovoadas ou ameaçadas de sobrepovoadas.	
Taxons autorizados		
#	Nível taxonômico	Taxon(s)
1	ORDEM	Chiroptera
2		
Destino do material biológico coletado		
#	Nome local destino	Tipo Destino
1	Faculdade de Odontologia do Campus de Aracaju - UNESP	coleta



SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO BIOLÓGICO

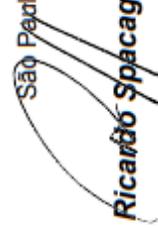
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA-IB

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 163/19** sobre o Projeto: “**Identificação de abrigos e populações de morcegos para o monitoramento do vírus rábico.**”, sob a responsabilidade de **Ana Eugênia Carvalho Campos**, está de acordo com os princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL/COBEA), pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos (DBCA).

Protocolo aprovado pela **CEUA-IB** em 27 de junho de 2019.

São Paulo, 27 de junho de 2019


Ricardo Spacagna Jordão
Coordenador da CEUA-IB

Comite de Ética (Verso)**CEUA - IB****Registro****Número : 163/19****Livro : 02****Folha : 63****Data: 27/06/19**

4. Anexo – Planilha descritiva das coordenadas Geográficas e municípios onde foram catalogados os abrigos.

Código do abrigo	Coordenada		Município
			Presidente Prudente
1	S 22° 06'48.8"	W 051° 27'05.0"	Presidente Prudente
2	S 22° 05'27.8"	W 051° 27'19.8"	Alvares Machado
3	S 21° 49'51.3"	W 051° 21'04.7"	Santo Expedito
4	S 21° 48'44.9"	W 051° 19'29.8"	Santo Expedito
5	S 21° 49'25.0"	W 051° 29'57.5"	Emilianópolis
6	S 21° 49'29.0"	W 051° 28'46.4"	Emilianópolis
			Presidente Prudente
7	S 22° 06'55.0"	W 051° 27'33.2"	Presidente Prudente
			Presidente Prudente
8	S 22° 09'39.7"	W 051° 26' 10.8"	Presidente Prudente
			Presidente Prudente
9	S 22° 11'57.9"	W 051° 24'44.3"	Presidente Prudente
10	S 22° 37'03.1"	W 051° 16'58.5"	Nantes
			Presidente
11	S 22° 04'20.7"	W 051° 35'07.8"	Bernardes
			Presidente
12	S 22° 05'08.9"	W 051° 35'35.2"	Bernardes
			Presidente
13	S 22° 07'47.9"	W 051° 36'29.0"	Bernardes
			Presidente
14	S 22° 10'47.0"	W 051° 37'24.9"	Bernardes
			Presidente
15	S 22° 13'51.8"	W 051° 37'56.0"	Bernardes
16	S 22° 14'32.7"	W 051° 17'54.0"	Regente Feijó
17	S 22° 12'40.2"	W 051° 17'47.2"	Regente Feijó
18	S 22° 14'03.5"	W 051° 09'37.0"	Martinópolis
19	S 22° 19'51.2"	W 051° 07'54.3"	Martinópolis
20	S 22° 19'06.0"	W 051° 12'33.2"	Taciba
21	S 22° 16'37.7"	W 051° 17'18.2"	Taciba
22	S 22° 12'19.6"	W 051° 26'06.0"	Pirapozinho
23	S 22° 13'51.4"	W 051° 26'35.3"	Pirapozinho
24	S 22° 16'59.2"	W 051° 31'13.6"	Pirapozinho
			Narandiba/ Tarabai
25	S 22° 23'14.9"	W 051° 32'40.2"	Narandiba/ Sandovalina
26	S 22° 26'13.6"	W 051° 40'39.9"	Sandovalina
27	S 22° 27'31.9"	W 051° 45'35.3"	Sandovalina
28	S 22° 12'37.3"	W 051° 25'35.0"	Pirapozinho
29	S 22° 19'23.6"	W 051° 17'04.5"	Taciba
30	S 22° 19'52.8"	W 051° 15'26.5"	Taciba
31	S 22° 38'24.2"	W 051° 27'16.6"	Taciba/Narandiba

32	S 22° 38'24.2"	W 051° 27'16.6"	Taciba
33	S 22° 20'14.6"	W 051° 17'16.6"	Taciba
34	S 22° 32'52.3"	W 051° 21'04.8"	Taciba
35	S 22° 37'07.3"	W 051° 25'40.0"	Taciba
36	S 22° 37'03.1"	W 051° 16'58.5"	Taciba
37	S 22° 38'09.2"	W 051° 19'48.9"	Taciba
38	S 22° 23'37.5"	W 051° 16'56.4"	Taciba
39	S 22° 23'56.9"	W 051° 16'54.4"	Taciba
40	S 22° 24'54.9"	W 051° 16'53.8"	Taciba
41	S 22°26'50.2"	W 051° 19'16.8"	Taciba
42	S 22° 24'01.7"	W 051° 16'34.3"	Taciba
43	S 22° 23'17.7"	W 051° 17'22.9"	Taciba
44	S 22° 23'24.5"	W 051° 17'19.1"	Taciba
45	S 22° 23'24.5"	W 051° 17'19.1"	Taciba
46	S 22° 23'10.7"	W 051° 17'35.5"	Taciba
47	S 22° 22'41.4"	W 051° 18'13.4"	Taciba
48	S 22° 05'35.0"	W 051° 17'11.7"	Eneida