

**Sequenciamento parcial do gene Citocromo C oxidase (COI) para
determinação de espécies de morcegos enviados para diagnóstico de
raiva no Instituto Pasteur**

**Partial sequencing of the Cytochrome C oxidase (COI) gene for the
determination of bat species sent for the diagnosis of rabies at the
Pasteur Institute**

DOI:10.34117/bjdv9n1-155

Recebimento dos originais:12/12/2022

Aceitação para publicação: 10/01/2023

Camila Mosca Barboza

Doutoranda em Biosistemas

Instituição: Instituto Pasteur

Endereço: Av. Paulista, 393, Bela Vista, São Paulo - SP, CEP: 01311-000

E-mail: cml_mb@hotmail.com

Micheli Cocchi

Mestranda em Biosistemas

Instituição: Instituto Pasteur

Endereço: Av. Paulista, 393, Bela Vista, São Paulo - SP, CEP: 01311-000

E-mail: mi_cocchi@hotmail.com

Tatiane de Cássia Pardo de Souza

Mestre em Ciências

Instituição: Instituto Pasteur

Endereço: Av. Paulista, 393, Bela Vista, São Paulo - SP, CEP: 01311-000

E-mail: tatianedcassia@hotmail.com

Marcélia Emanuele Sad Fernandes

Doutorada em Biosistemas

Instituição: Instituto Pasteur

Endereço: Av. Paulista, 393, Bela Vista, São Paulo - SP, CEP: 01311-000

E-mail: marceliaemanuele@hotmail.com

Pedro Carnieli Junior

Doutor em Ciências

Instituição: Instituto Pasteur

Endereço: Av. Paulista, 393, Bela Vista, São Paulo - SP, CEP: 01311-000

E-mail: pedrocarnielijunior@ymail.com

Helena Beatriz de Carvalho Ruthner Batista

Doutora em Ciências Veterinárias

Instituição: Instituto Pasteur

Endereço: Av. Paulista, 393, Bela Vista, São Paulo - SP, CEP: 01311-000

E-mail: batistahbcr@gmail.com

RESUMO

Os morcegos são mamíferos de grande diversidade, amplamente distribuídos no mundo. Apesar da importância desses animais na manutenção dos ecossistemas, estes também representam uma preocupação na saúde pública, uma vez que atuam como reservatórios ou hospedeiros de diferentes patógenos, principalmente vírus. A identificação das espécies de morcegos é essencial para melhor compreensão da origem e da epidemiologia de diversas doenças. Além disso, o entendimento sobre a interação vírus/hospedeiro e o papel dos morcegos na disseminação das doenças é essencial para a manutenção da diversidade e consequente conservação desses animais, permitindo assim, o controle racional dos patógenos albergados por estes. Desta forma, é imprescindível realizar a identificação correta das espécies de morcegos recebidas nos laboratórios, a fim de implantar medidas adequadas de vigilância. Neste sentido, este estudo teve como objetivo identificar geneticamente as espécies de morcegos enviados para diagnóstico de raiva no Instituto Pasteur através do sequenciamento genético parcial do gene citocromo C oxidase subunidade I (COI). Para este estudo foram selecionadas 127 amostras de pulmão de morcegos negativos para raiva obtidos em 2015. As amostras foram submetidas a extração de DNA e PCR tendo como alvo o COI e sequenciamento genético. Como resultado, foram identificadas oito espécies: *Artibeus lituratus*, *Cynomops planirostris*, *Eumops glaucinus*, *Glossophaga soricina*, *Lasiurus ega*, *Molossus molossus*, *Molossus rufus* e *Myotis riparius*, distribuídas em três famílias (Phyllostomidae, Molossidae e Vespertilionidae) comumente encontradas no Brasil. O sequenciamento parcial do gene COI foi eficaz na identificação das espécies de quirópteros podendo ser uma ferramenta auxiliar na identificação morfológica e facilmente implantada em laboratórios de biologia molecular.

Palavras-chave: morcegos, vírus, sequenciamento genético, DNA mitocondrial

ABSTRACT

Bats are mammals widely distributed in the world. Although its importance in the ecosystems, they also represent preoccupation in public health, once act as reservoirs or hosts of different pathogens mainly viruses. The bats identification is essential for better comprehension of origin and the epidemiology of many diseases. Besides that, the understanding about interaction virus/host and the role of bats in the dissemination of diseases is essential for maintenance of diversity and consequently conservation these animals and rational control of pathogens inner bats. Therefore, the correct identification of bats received in laboratories is necessary to implement suitable measures of surveillance. In this sense, this study had as goal to identify genetically species of bats sent for rabies diagnosis in Pasteur Institut, trough partial genetic sequencing of the cytochrome C oxidase subunit I (COI) gene. For this study, 127 lung samples from rabies-negative bats obtained in 2015 were selected. The samples were subjected to DNA extraction and PCR targeting COI and genetic sequencing. As a result, eight species were identified: *Artibeus lituratus*, *Cynomops planirostris*, *Eumops glaucinus*, *Glossophaga soricina*, *Lasiurus ega*, *Molossus molossus*, *Molossus rufus* and *Myotis riparius*, distributed in three families (Phyllostomidae, Molossidae and Vespertilionidae) commonly found in Brazil. The partial sequencing of the COI gene was effective and can be an auxiliary tool in the morphological identification and easily implemented in molecular biology laboratories.

Keywords: bats, virus, genetic sequencing, mitochondrial DNA.

1 INTRODUÇÃO

Os morcegos são mamíferos amplamente distribuídos no mundo que pertencem a ordem Chiroptera onde estão incluídas mais de 1.300 espécies. No Brasil já foram descritas 181 espécies de morcegos, representando aproximadamente 20% de toda a diversidade mundial (NOGUEIRA *et al.*, 2014; SBEQ, 2022a).

Os morcegos têm importante papel na manutenção dos ecossistemas, pois fertilizam o solo, controlam pragas, são dispersores de sementes e polinizadores (SBEQ, 2022b). Apesar desta reconhecida importância, estes animais representam uma preocupação na saúde pública, visto que podem albergar agentes infecciosos com potencial zoonótico. Vírus pertencentes a diferentes famílias, como os coronavírus, filovírus, paramyxovírus e adenovírus já foram detectados em diferentes espécies de morcegos. Além das famílias mencionadas, vale destacar os vírus Hendra, Nipah, Ebola e vírus da raiva (RABV) que são altamente patogênicos e já foram reportados nesses animais (BRANDÃO *et al.*, 2008; LIMA *et al.*, 2013; SODRÉ; GAMA; ALMEIDA, 2010; WANG & ANDERSON, 2019; WOO & LAU, 2019; ABREU; RODRIGUES, 2022).

A raiva é uma antropozoonose altamente fatal ocasionada por um RNA vírus. A doença acomete mamíferos e a transmissão ocorre através da inoculação deste, por meio principalmente da mordedura de animais infectados (BRASIL, 2022). Na América Latina, os morcegos juntamente com os cães são os principais reservatórios do RABV. Nesse sentido, a identificação das espécies de morcegos é imprescindível, pois permite a implementação de ações de vigilância epidemiológica, possibilita o levantamento de espécies de uma determinada região e auxilia no estudo do comportamento e biologia desses animais.

A análise morfométrica para identificação de espécies de morcegos consiste na observação de características morfológicas e outras medidas adicionais (REIS *et al.*, 2017). Apesar de sua eficiência, este método apresenta algumas limitações como: a necessidade de um profissional especializado e a dificuldade em diferenciar espécies crípticas que são, espécies morfológicamente similares, porém, geneticamente distintas (SCHLOTTAU *et al.*, 2020). Outro desafio, é o recebimento, em laboratórios, de animais danificados ou em estado avançado de decomposição, o que dificulta a identificação morfométrica. Recentemente, as ferramentas de biologia molecular têm sido essenciais

em diversas áreas, não somente na análise de amostras em decomposição, mas também para análise de pequenas quantidades de amostras (ARNAOUT *et al.*, 2022).

O DNA mitocondrial é uma molécula circular dupla, pequena, que contém 37 genes, sem introns e apresenta recombinação limitada. Está presente em quase todos os eucariotos e apresenta herança materna. Os genes mitocondriais têm sido utilizados como ferramentas moleculares para identificação genética, sistemática e evolução (HEBERT *et al.*, 2003). Genes como citocromo B (CytB) e a região controle (D-loop) têm sido comumente utilizados (CARNIELI *et al.*, 2008). Dentre esses genes, podemos destacar ainda o citocromo C oxidase subunidade I (COI) que consiste em um marcador já estabelecido para estudos de identificação de espécies conhecidas e para o descobrimento de novas espécies (SHARMA; KOBAYASHI, 2014).

O objetivo deste estudo foi realizar a identificação genética de espécies através do sequenciamento do gene COI de morcegos enviados para diagnóstico de raiva no Instituto Pasteur.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MORCEGOS

Foram selecionados aleatoriamente 127 morcegos, provenientes de diferentes regiões do Brasil e enviados para diagnóstico de raiva no Instituto Pasteur de São Paulo em 2015. Foi realizada a necropsia de cada um dos morcegos e coletadas amostras de pulmão. As amostras foram armazenadas em freezer -80°C até o momento do uso.

2.2 EXTRAÇÃO DE DNA

A extração de DNA foi realizada a partir das amostras de pulmão coletadas com o kit RTP DNA/RNA Virus Mini Kit (STRATEC), conforme as instruções do fabricante. Como controle negativo, foi utilizado água nuclease *free* em todas as etapas.

2.3 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada em um volume final de 50 μL com a enzima Taq DNA polymerase (Invitrogen) e com *primers* na concentração de 10 μM (Quadro 1). A reação foi submetida aos ciclos de amplificação em termociclador conforme descrito no quadro 2.

Quadro 1. Sequência dos *primers* utilizados para amplificação parcial do gene Citocromo Oxidase Subunidade I (COI).

Primer	Sentido	Sequência (5'-3')	Tamanho amplicon	Referência
LCO1490	Senso	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	710 pb	FOLMER <i>et al.</i> , 1994
HCO219	Antissenso	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAA		
8	o	TCA		

Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1% com brometo de etídio e visualizados em transiluminador sob luz ultravioleta. Foram considerados positivas, as amostras que amplificaram na altura de aproximadamente 710 pb.

Quadro 2. Descrição dos ciclos para amplificação parcial do gene Citocromo C Oxidase (COI) na reação de PCR.

Número de ciclos	Temperatura	Tempo	Etapa
1	94°C	5 minutos	Desnaturação
35	94°C	45 segundos	Desnaturação
	55°C	45 segundos	Anelamento
	72°C	2 minutos	Extensão
	72°C	10 minutos	Extensão final
1	8°C	∞	Conservação

2.4 SEQUENCIAMENTO GENÉTICO

Os amplicons foram purificados com *GFX PCR DNA and a Gel Band Purification Kit* (Amersham Biosciences) de acordo com as instruções do fabricante e submetidos a reação de sequenciamento com os *primers* na concentração de 3,2 μM descritos no item 2.3 em um volume final de 10 μL com o reagente *Big Dye* (Applied Biosystems). A reação foi incubada em termociclador conforme condições do quadro 3. Após a reação, as amostras foram purificadas em placa de 96 poços com *Sephadex G-50 fine* (GE Healthcare) e em seguida, processadas no analisador genético.

Quadro 3. Descrição dos ciclos para reação de sequenciamento.

Número de ciclos	Temperatura	Tempo	Etapa
1	96°C	1 minuto	Desnaturação
35	96°C	10 segundos	Desnaturação
	50°C	45 segundos	Anelamento
	60°C	2 minutos	Extensão
1	10°C	∞	Conservação

2.5 ANÁLISE FILOGENÉTICA

As sequências obtidas foram editadas no software CHROMAS (Versão 2.24 Copyright© 1998-2004 Technelysium Pty Ltd), as sequências finais foram submetidas ao BLAST/n no site www.ncbi.nlm.nih.gov para confirmação da identidade da espécie. Posteriormente as sequências foram alinhadas no *bioEdit sequence alignment editor* (versão 7.0.9.0) e a árvore filogenética construída no MEGA (versão 10.2.6) através do método *Neighbor-Joining*. As sequências finais foram depositadas no GenBank.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo, foi possível realizar a identificação genética de 127 morcegos pertencentes a 8 espécies, distribuídas em 3 famílias (Quadro 4). Todas as espécies identificadas são frequentemente encontradas nas cidades brasileiras (MELO *et al.*, 2021). As sequências obtidas neste estudo foram depositadas no GenBank e os respectivos números de identificação estão descritos no quadro 5.

Quadro 4. Classificação das espécies de morcegos identificadas através do sequenciamento genético parcial do gene COI.

Família	Espécie	Número de amostras (N= 127)
Phyllostomidae	<i>Artibeus lituratus</i>	11
	<i>Glossophaga soricina</i>	20
Molossidae	<i>Cynomops planirostris</i>	19
	<i>Eumops glaucinus</i>	22
	<i>Molossus molossus</i>	45
	<i>Molossus rufus</i>	7
Vespertilionidae	<i>Lasiurus ega</i>	2
	<i>Myotis riparius</i>	1

A família Molossidae (4 espécies) foi a mais comumente identificada neste estudo, seguida pela família Phyllostomidae (2 espécies) e Vespertilionidae (2 espécies). Os

morcegos das espécies *Molossus molossus*, *Artibeus lituratus* e *Glossophaga soricina* são amplamente encontradas no Brasil, inclusive em ambientes urbanos. O que pode justificar o número elevado de indivíduos destas espécies (PACHECO *et al.*, 2010).

A associação de morcegos com diferentes zoonoses tem sido crescente, dentre as quais a raiva merece destaque uma vez que estes mamíferos são os principais reservatórios do RABV (RUPPRECHT; HANLON; HEMACHUDHA, 2002; SCHEFFER *et al.*, 2014). Apesar dos morcegos hematófagos *Desmodus rotundus* atuarem como um dos principais reservatórios deste vírus, nenhum indivíduo desta espécie foi identificado no presente estudo. Este fato pode estar relacionado aos seus hábitos alimentares, quando infectados esses morcegos transmitem a raiva para bovinos e estes sim são enviados para diagnóstico (TEIXEIRA *et al.*, 2015).

Atualmente sabe-se que diferentes espécies de morcegos são capazes de manter diferentes linhagens genéticas do RABV (OLIVEIRA *et al.*, 2010). As oitos espécies identificadas neste trabalho apresentam diferentes hábitos alimentares e já foram diagnosticadas positivas para raiva (SODRÉ *et al.*, 2010). Além do RABV, os morcegos são responsáveis por albergar uma grande diversidade de vírus, alguns, altamente patogênicos como: Nipah e Ebola, por isso, apesar de sua importância na natureza, estudos visando o maior conhecimento sobre a fisiopatologia dos morcegos devem ser realizados a fim de que se possa compreender os motivos pelos quais estes animais são reservatórios de tantos vírus (BANERJEE *et al.*, 2019; WOO & LAU, 2019). Os morcegos nectarívoros, como por exemplo, *Glossophaga soricina* auxiliam na polinização de plantas e os frugívoros, como o *Artibeus lituratus* são excelentes disseminadores de sementes. Já a espécie *Molossus molossus* desempenha papel no controle de insetos por se tratar de uma espécie insetívora.

Quadro 5. Amostras utilizadas no estudo com sua respectiva espécie e número de acesso GenBank.

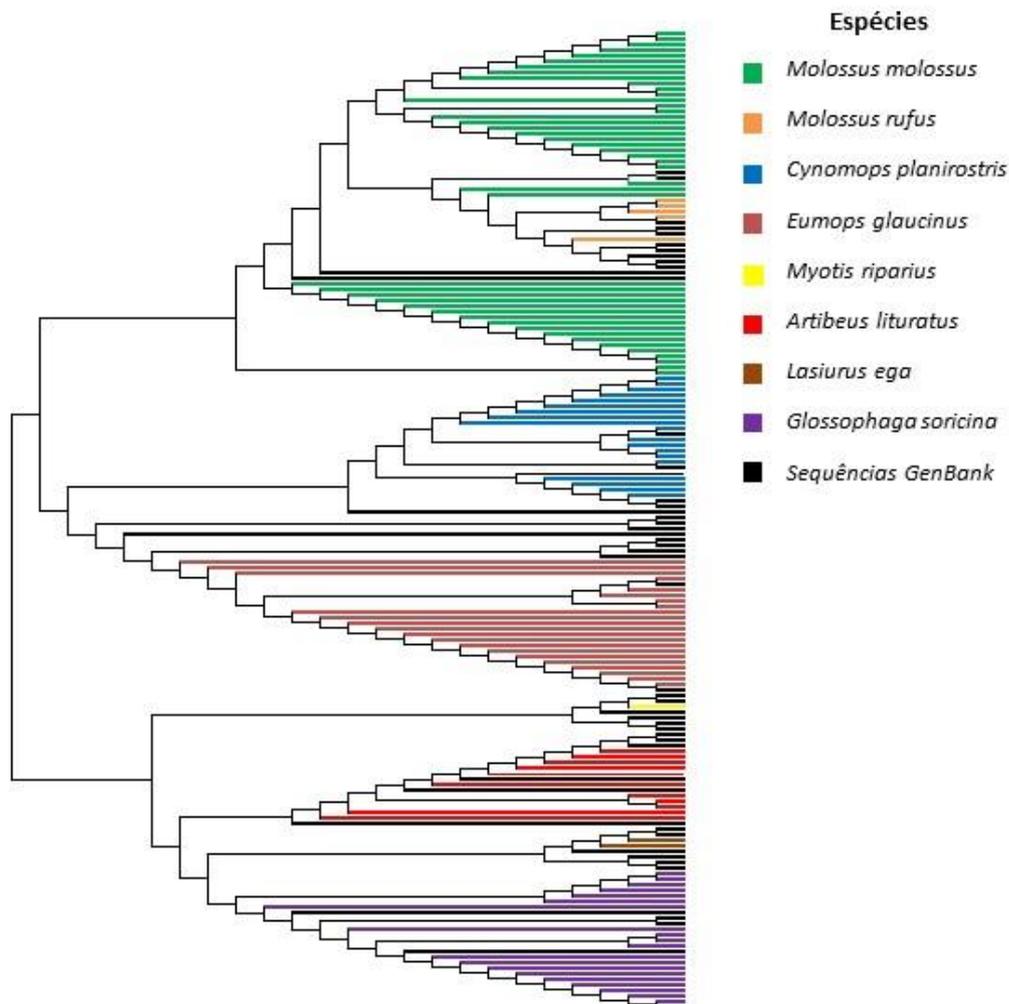
Número	Amostra	Espécie	Órgão	Número de acesso GenBank
1	IP1141/2015	<i>Molossus molossus</i>	Pulmão	OK425855
2	IP1143/2015	<i>Molossus rufus</i>	Pulmão	OK425856
3	IP1159/2015	<i>Artibeus lituratus</i>	Pulmão	OK398131
4	IP1161/2015	<i>Cynomops planirostris</i>	Pulmão	OK423448
5	IP1163/2015	<i>Glossophaga soricina</i>	Pulmão	OK398155
6	IP1181/2015	<i>Myotis riparius</i>	Pulmão	OK398129
7	IP1182/2015	<i>Cynomops planirostris</i>	Pulmão	OK423449
8	IP1183/2015	<i>Molossus molossus</i>	Pulmão	OK425857
9	IP1184/2015	<i>Molossus molossus</i>	Pulmão	OK562112
10	IP1185/2015	<i>Cynomops planirostris</i>	Pulmão	OK423450
11	IP1186/2015	<i>Molossus molossus</i>	Pulmão	OK425858
12	IP1187/2015	<i>Cynomops planirostris</i>	Pulmão	OK423451

13	IP1188/2015	<i>Eumops glaucinus</i>	Pulmão	OK509182
14	IP1189/2015	<i>Molossus molossus</i>	Pulmão	OK425877
15	IP1190/2015	<i>Cynomops planirostris</i>	Pulmão	OK429132
16	IP1191/2015	<i>Cynomops planirostris</i>	Pulmão	OK429133
17	IP1192/2015	<i>Cynomops planirostris</i>	Pulmão	OK429134
18	IP1193/2015	<i>Cynomops planirostris</i>	Pulmão	OK429135
19	IP1195/2015	<i>Cynomops planirostris</i>	Pulmão	OK560887
20	IP1196/2015	<i>Molossus molossus</i>	Pulmão	OK430884
21	IP1197/2015	<i>Molossus molossus</i>	Pulmão	OK430885
22	IP1198/2015	<i>Cynomops planirostris</i>	Pulmão	OK430886
23	IP1200/2015	<i>Molossus molossus</i>	Pulmão	OK442642
24	IP1201/2015	<i>Molossus molossus</i>	Pulmão	OK442643
25	IP1202/2015	<i>Molossus rufus</i>	Pulmão	OK425873
26	IP1205/2015	<i>Molossus molossus</i>	Pulmão	OK442645
27	IP1207/2015	<i>Molossus molossus</i>	Pulmão	OK561347
28	IP1208/2015	<i>Molossus molossus</i>	Pulmão	OK444826
29	IP1209/2015	<i>Molossus molossus</i>	Pulmão	OK444827
30	IP1210/2015	<i>Molossus molossus</i>	Pulmão	OK444828
31	IP1213/2015	<i>Artibeus lituratus</i>	Pulmão	OK398132
32	IP1214/2015	<i>Molossus molossus</i>	Pulmão	OK442646
33	IP1215/2015	<i>Molossus molossus</i>	Pulmão	OK442647
34	IP1217/2015	<i>Molossus rufus</i>	Pulmão	OL544971
35	IP1219/2015	<i>Molossus rufus</i>	Pulmão	OK649960
36	IP1222/2015	<i>Glossophaga soricina</i>	Pulmão	OL307715
37	IP1302/2015	<i>Molossus molossus</i>	Pulmão	OL307711
38	IP1303/2015	<i>Molossus rufus</i>	Pulmão	OK649972
39	IP1304/2015	<i>Molossus molossus</i>	Pulmão	OK444829
40	IP1305/2015	<i>Glossophaga soricina</i>	Pulmão	OK398156
41	IP1306/2015	<i>Eumops glaucinus</i>	Pulmão	OK509183
42	IP1317/2015	<i>Molossus molossus</i>	Pulmão	OK493310
43	IP1318/2015	<i>Artibeus lituratus</i>	Pulmão	OK398133
44	IP1319/2015	<i>Molossus molossus</i>	Pulmão	OL584416
45	IP1322/2015	<i>Molossus molossus</i>	Pulmão	OK493301
46	IP1323/2015	<i>Cynomops planirostris</i>	Pulmão	OL307712
47	IP1326/2015	<i>Eumops glaucinus</i>	Pulmão	OK509184
48	IP1327/2015	<i>Molossus molossus</i>	Pulmão	OL986400
49	IP1328/2015	<i>Eumops glaucinus</i>	Pulmão	OK509185
50	IP1329/2015	<i>Eumops glaucinus</i>	Pulmão	OK509186
51	IP1330/2015	<i>Artibeus lituratus</i>	Pulmão	OK398134
52	IP1332/2015	<i>Molossus molossus</i>	Pulmão	OM033632
53	IP1333/2015	<i>Molossus rufus</i>	Pulmão	OK649962
54	IP1334/2015	<i>Molossus molossus</i>	Pulmão	OL476378
55	IP1335/2015	<i>Glossophaga soricina</i>	Pulmão	OM112315
56	IP1338/2015	<i>Glossophaga soricina</i>	Pulmão	OM112316
57	IP1344/2015	<i>Molossus molossus</i>	Pulmão	OL476379
58	IP1347/2015	<i>Artibeus lituratus</i>	Pulmão	OL455610
59	IP1350/2015	<i>Eumops glaucinus</i>	Pulmão	OM164022
60	IP1351/2015	<i>Eumops glaucinus</i>	Pulmão	OM164023
61	IP1352/2015	<i>Eumops glaucinus</i>	Pulmão	OM164024
62	IP1353/2015	<i>Molossus molossus</i>	Pulmão	OL476380
63	IP1371/2015	<i>Artibeus lituratus</i>	Pulmão	OK398135
64	IP1372/2015	<i>Molossus molossus</i>	Pulmão	OK493302
65	IP1373/2015	<i>Molossus molossus</i>	Pulmão	OK493303
66	IP1377/2015	<i>Molossus molossus</i>	Pulmão	OM049229
67	IP1378/2015	<i>Molossus molossus</i>	Pulmão	OM177263

68	IP1379/2015	<i>Molossus molossus</i>	Pulmão	OK667181
69	IP1380/2015	<i>Cynomops planirostris</i>	Pulmão	OK493381
70	IP1383/2015	<i>Molossus molossus</i>	Pulmão	OK493304
71	IP1388/2015	<i>Molossus molossus</i>	Pulmão	OK493305
72	IP1656/2015	<i>Lasiurus ega</i>	Pulmão	OK398126
73	IP1657/2015	<i>Molossus molossus</i>	Pulmão	OK493306
74	IP1659/2015	<i>Eumops glaucinus</i>	Pulmão	OK509187
75	IP1661/2015	<i>Cynomops planirostris</i>	Pulmão	OK493382
76	IP1671/2015	<i>Cynomops planirostris</i>	Pulmão	OM049224
77	IP1673/2015	<i>Artibeus lituratus</i>	Pulmão	OL455611
78	IP1674/2015	<i>Eumops glaucinus</i>	Pulmão	OM189520
79	IP1675/2015	<i>Molossus molossus</i>	Pulmão	OL307713
80	IP1676/2015	<i>Glossophaga soricina</i>	Pulmão	OM049220
81	IP1677/2015	<i>Cynomops planirostris</i>	Pulmão	OM049225
82	IP1678/2015	<i>Artibeus lituratus</i>	Pulmão	OM049203
83	IP1679/2015	<i>Eumops glaucinus</i>	Pulmão	OM049199
84	IP1680/2015	<i>Molossus rufus</i>	Pulmão	OK649963
85	IP1681/2015	<i>Eumops glaucinus</i>	Pulmão	OK509188
86	IP1694/2015	<i>Artibeus lituratus</i>	Pulmão	OL455612
87	IP1695/2015	<i>Artibeus lituratus</i>	Pulmão	MZ926805
88	IP1698/2015	<i>Molossus molossus</i>	Pulmão	OL476381
89	IP1699/2015	<i>Glossophaga soricina</i>	Pulmão	OM185533
90	IP1700/2015	<i>Molossus molossus</i>	Pulmão	OL539382
91	IP1703/2015	<i>Eumops glaucinus</i>	Pulmão	OM168999
92	IP1704/2015	<i>Glossophaga soricina</i>	Pulmão	OM185323
93	IP1705/2015	<i>Glossophaga soricina</i>	Pulmão	MZ893442
94	IP1706/2015	<i>Eumops glaucinus</i>	Pulmão	OM169000
95	IP1707/2015	<i>Eumops glaucinus</i>	Pulmão	OM169001
96	IP1709/2015	<i>Eumops glaucinus</i>	Pulmão	MZ893459
97	IP1741/2015	<i>Eumops glaucinus</i>	Pulmão	OK018349
98	IP1730/2015	<i>Artibeus lituratus</i>	Pulmão	OM181933
99	IP1739/2015	<i>Glossophaga soricina</i>	Pulmão	OM185324
100	IP1740/2015	<i>Glossophaga soricina</i>	Pulmão	OM185325
101	IP1843/2015	<i>Eumops glaucinus</i>	Pulmão	OM169002
102	IP2017/2015	<i>Eumops glaucinus</i>	Pulmão	MZ893460
103	IP1845/2015	<i>Glossophaga soricina</i>	Pulmão	OM185326
104	IP1846/2015	<i>Glossophaga soricina</i>	Pulmão	OM185327
105	IP1979/2015	<i>Lasiurus ega</i>	Pulmão	MZ893437
106	IP1990/2015	<i>Glossophaga soricina</i>	Pulmão	OM185534
107	IP1992/2015	<i>Cynomops planirostris</i>	Pulmão	MZ926854
108	IP1994/2015	<i>Glossophaga soricina</i>	Pulmão	OM185535
109	IP2016/2015	<i>Molossus molossus</i>	Pulmão	OL539383
110	IP2020/2015	<i>Eumops glaucinus</i>	Pulmão	OM169003
111	IP2018/2015	<i>Glossophaga soricina</i>	Pulmão	OM185536
112	IP2019/2015	<i>Glossophaga soricina</i>	Pulmão	MZ893443
113	IP2052/2015	<i>Eumops glaucinus</i>	Pulmão	OM169004
114	IP2021/2015	<i>Glossophaga soricina</i>	Pulmão	OM189516
115	IP2030/2015	<i>Molossus molossus</i>	Pulmão	MZ926829
116	IP2039/2015	<i>Molossus molossus</i>	Pulmão	OL539384
117	IP2040/2015	<i>Cynomops planirostris</i>	Pulmão	MZ926855
118	IP2044/2015	<i>Molossus molossus</i>	Pulmão	MZ926830
119	IP2047/2015	<i>Glossophaga soricina</i>	Pulmão	MZ893444
120	IP2049/2015	<i>Molossus molossus</i>	Pulmão	OL539385
121	IP2050/2015	<i>Molossus molossus</i>	Pulmão	OL539386
122	IP2066/2015	<i>Eumops glaucinus</i>	Pulmão	OK509189

123	IP2055/2015	<i>Molossus molossus</i>	Pulmão	MZ926831
124	IP2056/2015	<i>Cynomops planirostris</i>	Pulmão	MZ984177
125	IP2057/2015	<i>Cynomops planirostris</i>	Pulmão	OL455613
126	IP2058/2015	<i>Molossus molossus</i>	Pulmão	OL539387
127	IP2060/2015	<i>Glossophaga soricina</i>	Pulmão	OM185537

Figura 1. Árvore filogenética obtida a partir da sequência parcial do gene COI.



Foram geradas 127 sequências de COI neste estudo e outras 48 sequências de diferentes espécies de morcegos foram retiradas do Genbank. Dois grandes clados foram observados (Fig. 1), sendo o primeiro clado (1) com 119 sequências, relacionado à família Molossidae, dividido em 3 subclados representados pela espécie *Molossus molossus* e *Molossus rufus*, *Cynomops planirostris* e *Eumops glaucinus*. O segundo clado (2) com 57 sequências, relacionado a família Vespertilionidae e a família Phyllostomidae, foi dividido em 4 subclados das espécies *Myotis riparius*, *Artibeus lituratus*, *Lasiurus ega* e *Glossophaga soricina*. Portanto, foi possível observar o agrupamento das espécies aqui sequenciadas com as sequências obtidas no Genbank com as respectivas espécies. Ainda

na figura 1, é possível observar que as divisões dos clados ocorrem de forma semelhante as divisões das espécies encontradas. Cabe ressaltar a importância do depósito de sequências nos bancos de dados atualmente disponíveis, pois possibilita o enriquecimento de novas informações sobre um determinado organismo.

4 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que o sequenciamento genético parcial do citocromo C oxidase do DNA mitocondrial foi eficaz para a determinação das espécies de quirópteros analisadas e pode ser utilizada em substituição ou em associação a identificação morfológica de espécies. Por se tratar de um gene mitocondrial, o sequenciamento genético pode ser realizado a partir de qualquer tecido e a ferramenta pode ser facilmente empregada em laboratórios de biologia molecular.

FINANCIAMENTO

FAPESP número do processo 2015/25367-0

REFERÊNCIAS

- ABREU, W. U.; RODRIGUES, L. R. R. Diversidade viral em morcegos no Brasil: Uma revisão sistemática do período 2000 a 2020. **Brazilian Journal of Development**, v. 8, n. 1, p. 579-592, 2022.
- ARNAOUT, Y. *et al.* Genetic identification of bat species for pathogen surveillance across France. **PloS one**, v. 17, n. 1, p. 1-16, 2022.
- BANERJEE, S. *et al.* Nipah virus disease: A rare and intractable disease. **Intractable & rare diseases research**, v.8, n. 1, p. 1-8, 2019.
- BRANDÃO, P. E. A. *et al.* Coronavirus detected in the vampire bat *Desmodus rotundus*. **Brazilian Journal of Infectious**, v. 12, n. 6, p. 466-468, 2008.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Raiva. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/r/raiva;>. Acesso em 21 jul. 2022.
- CARNIELI JUNIOR, P. *et al.* Species determination of Brazilian mammals implicated in the epidemiology of rabies based on the control region of mitochondrial DNA. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 12, n. 6, p. 462-465, 2008.
- FOLMER, O. *et al.* DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. **Molecular Marine Biology and Biotechnology**, v. 3, n. 5, p. 294-9, 1994.
- HEBERT, P. D. N. *et al.* Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 270, n. 1512, p. 313-321, 2003.
- LIMA, F. E. *et al.* First detection of adenovirus in the vampire bat (*Desmodus rotundus*) in Brazil. **Virus Genes**, v. 47, n. 2, p. 378-381, 2013.
- MELO, M A. *et al.* Morcegos urbanos de Guarulhos: alta riqueza de espécies e dominância de espécies ecologicamente flexíveis reveladas a partir de dados de monitoramento da raiva. Iheringia. **Série Zoologia**, v. 111, 2021.
- NOGUEIRA, M. R. *et al.* Checklist of Brazilian bats, with comments on original records. **Check List**, v. 10, n. 4, p. 808-821, 2014.
- OLIVEIRA, R. *et al.* Rabies virus in insectivorous bats: implications of the diversity of the nucleoprotein and glycoprotein genes for molecular epidemiology. **Virology**, v. 405, n. 2, p. 352-360, 2010.
- PACHECO, S. M. *et al.* Morcegos urbanos: status do conhecimento e plano de ação para a conservação no Brasil. **Chiroptera neotropical**, v. 16, n. 1, p. 629-647, 2010.
- REIS, N. R. *et al.* **História natural dos morcegos brasileiros: chave de identificação de espécies.** Technical Books Editora, 2017.

RUPPRECHT, C. E.; HANLON, C. A.; HEMACHUDHA, T. Rabies re-examined. **The Lancet infectious diseases**, v. 2, n. 6, p. 327-343, 2002.

SBEQa. Sociedade Brasileira para o Estudo de quirópteros. Disponível em: <https://www.sbeq.net/lista-de-especies;>. Acesso em: 22 jul. 2022a.

SBEQ. Sociedade Brasileira para o Estudo de quirópteros. Disponível em: <https://www.sbeq.net/morcegos;>. Acesso em: 22 jul. 2022b.

SCHEFFER, K. C. *et al.* Hematophagous bats as reservoirs of rabies. **Revista peruana de medicina experimental y salud pública**, v. 31, n. 2, p. 302-309, 2014.

SCHLOTTAU, K. *et al.* Rapid molecular species identification of indigenous bats from Germany for surveillance purposes. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 78, p. 104140, 2020.

SHARMA, P.; KOBAYASHI, T. Are “universal” DNA primers really universal? **Journal of Applied Genetics**, v. 55, n. 4, p. 485-496, 2014.

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

TEIXEIRA, L. H. M. *et al.* Distribuição espaço-temporal dos diagnósticos laboratoriais da raiva animal. **Ciência Animal Brasileira**, v. 16, p. 144-157, 2015.

WANG, L.F.; ANDERSON, D. E. Viruses in bats and potential spillover to animals and humans. **Current opinion in virology**, v. 34, p. 79-89, 2019.

WOO, P. C. Y.; LAU, S. K. P. Viruses and Bats. **Viruses**. v. 11, n. 10, p. 884. 2019.