

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

DISSERTAÇÃO

**Análise citológica, detecção e caracterização
molecular de bactérias das famílias
Anaplasmataceae e Mycoplasmataceae em
populações de pequenos mamíferos em áreas de
Floresta Amazônica**

Isaac Leandro Lira Pinto

2023



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS

ANÁLISE CITOLÓGICA, DETECÇÃO E
CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE BACTÉRIAS DAS
FAMÍLIAS ANAPLASMATACEAE E MYCOPLASMATACEAE
EM POPULAÇÕES DE PEQUENOS MAMÍFEROS EM ÁREAS
DE FLORESTA AMAZÔNICA

ISAAC LEANDRO LIRA PINTO

Sob a orientação da professora
Maristela Peckle Peixoto

e Co-orientação dos Doutores
Carlos Luiz Massard e Bernardo
Rodrigues Teixeira

Dissertação submetida como
requisito parcial para obtenção do
grau de **Mestre em Ciências**, no
Programa de Pós-Graduação em
Ciências Veterinárias.

Seropédica, RJ
Setembro de 2023

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

P659a Pinto, Isaac Leandro Lira, 13/07/1991-
Análise citológica, detecção e caracterização
molecular de bactérias das famílias Anaplasmataceae e
Mycoplasmataceae em populações de pequenos mamíferos em
áreas de Floresta Amazônica / Isaac Leandro Lira
Pinto. - Nova Iguaçu, 2023.
72 f.: il.

Orientadora: Maristela Peckle Peixoto.
Coorientador: Bernardo Rodrigues Teixeira.
Coorientador: Carlos Luiz Massard.
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-graduação em
Ciências Veterinárias, 2023.

1. Micoplasmas hemotrópicos . 2. Pequenos mamíferos
silvestres. 3. Bactérias intracelulares obrigatórias.
4. Anaplasmataceae. I. Peixoto, Maristela Peckle ,
1986-, orient. II. Teixeira, Bernardo Rodrigues ,
1977-, coorient. III. Massard, Carlos Luiz , 1947-
coorient. IV Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro. Programa de Pós-graduação em Ciências
Veterinárias. V. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



ATA Nº 3958/2023 - PPGCV (12.28.01.00.00.00.50)

Nº do Protocolo: 23083.065186/2023-70

Seropédica-RJ, 27 de setembro de 2023.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

ISAAC LEANDRO LIRA PINTO

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre(a) em Ciências**, no Programa de Pós- Graduação em Ciências Veterinárias.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 27/09/2023

(Assinado digitalmente em 27/09/2023 12:37)

HUARRISSON AZEVEDO SANTOS

PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR

DESP (12.28.01.00.00.00.00.52)

Matrícula: ###014#2

(Assinado digitalmente em 29/09/2023 16:24)

MARISTELA PECKLE PEIXOTO

PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR

DepiPA (12.28.01.00.00.00.00.55)

Matrícula: ###034#8

(Assinado digitalmente em 03/10/2023 15:01)

ALINE MOREIRA DE SOUZA

ASSINANTE EXTERNO

CPF: ###.###.317-##

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: 3958, ano: 2023, tipo: ATA, data de emissão: 27/09/2023 e o código de verificação: c9be3fcaaf

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu pai, o homem que me ensinou a valorizar o estudo e a entender o poder de transformação que ele tem em nossas vidas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meu pais, Paulo César Pinto e Rosiane Berto Lira Pinto, e a minha irmã, Thayane Paula Lira Pinto, que nunca mediaram esforços para me apoiar e fazer com que eu tivesse condições de conquistar todos os meus sonhos.

À minha segunda família, os Cunha-Curvello, pela torcida e por todo suporte dado a mim durante mais um ciclo da minha vida. Um agradecimento extra a minha sogra, Tânia da Cunha, que foi a maior incentivadora para que eu fizesse Mestrado.

Ao meu noivo Luan da Cunha Curvello D'avilla por sonhar mais um sonho comigo como se fosse dele e por todo conforto dado a mim nos momentos difíceis.

À minha orientadora Maristela Peckle Peixoto e ao meu co-orientador Luís Carlos Massard por terem me recebido no Laboratório de Hemoparasitos e Vetores (LHV), por me inspirarem como profissionais e pessoas e por serem as melhores referências que eu poderia ter no início da minha caminhada na ciência. E ao Dr. Bernardo Teixeira por ter aceitado ser meu co-orientador e por ter sido tão solícito sempre que precisei de ajuda.

À toda equipe do Laboratório de Biologia e Parasitologia de Pequenos Mamíferos Silvestres (LABPMR/IOC/FIOCRUZ) pelo auxílio e parceria que fizeram com que esse projeto acontecesse. Um agradecimento especial a Tatiana Pádua por todas as inúmeras vezes que ela ajudou, sem hesitar, para que esse projeto pudesse acontecer.

Aos meus colegas do LHV Eduarda Machado, Thiago Dutra, Tatiana Pádua, Laís Oliveira, Letícia da Silva e Juliana Leal por terem sido os melhores companheiros que eu poderia ter escolhido para essa experiência e por me ensinarem todos os dias que ciência não é sobre competição e sim sobre cooperação. Um agradecimento especial à Eduarda que mudou a minha vida ao ser a ponte que me levou para esse laboratório.

Aos meus amigos Jônathan Chagas, Shayne Abranches e Jéssica Figueiredo por acreditarem em mim e sempre me incentivarem a ser uma melhor versão de mim mesmo.

Ao Prof. Dr. Huarrisson Azevedo Santos e toda equipe do laboratório de Sanidade Avícola (LASAVE/UFRRJ) por toda contribuição e generosidade sempre que precisei de ajuda.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV/UFRRJ) por terem me proporcionado uma oportunidade enriquecedora e transformadora.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, agradeço o financiamento desta pesquisa.

E por fim, à Universidade Rural por ter sido, mais uma vez, o cenário perfeito de mais uma conquista na minha vida.

RESUMO

PINTO, Isaac Leandro Lira. **Análise citológica, detecção e caracterização molecular de bactérias das famílias Anaplasmataceae e Mycoplasmataceae em populações de pequenos mamíferos em áreas de Floresta Amazônica.** 2023. 72p. Dissertação. (Mestrado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2023.

O presente trabalho teve por objetivo realizar a detecção e a caracterização molecular de bactérias da família Anaplasmataceae e Mycoplasmataceae em populações de pequenos mamíferos em áreas de Floresta Amazônica, no estado do Acre, Brasil. A importância desta investigação está pautada em bactérias intracelulares obrigatórias que participam nos ciclos silvestres como agentes zoonóticos, e, portanto, de interesse para a saúde humana, além de parasitos de importância para os animais domésticos, e a própria ecologia e ciclo de vida do animal hospedeiro. As áreas de estudos se concentram em áreas de mata da floresta amazônica, na cidade de Rio Branco, estado do Acre, Brasil. Para o diagnóstico direto foram utilizadas 186 amostras de lâminas de esfregaço sanguíneo, oriundas de roedores, marsupiais e morcegos capturados previamente, visando a detecção e caracterização de bactérias da família Anaplasmataceae e Mycoplasmataceae. Amostras de parênquima hepático armazenadas em RNA Later® tiveram seu DNA extraído pelo kit “DNeasy Blood & Tissue” (Qiagen®) e foram utilizadas no diagnóstico molecular. Dentre as amostras analisadas 14,52% (n=27/186) foram consideradas positivas para hemoplasmas hemotrópicos através de PCR usando os primers Myco 322s e Myco 938as, que amplificam 620 pares de bases do fragmento de *16S rDNA*. O diagnóstico para Anaplasmataceae foi dificultado pela inespecificidade das reações de PCR com os pares de primers testados, e quando a técnica foi específica, resultou em fragmento de *16S rDNA* de *Wolbachia* sp. Por esse motivo, estes dados de positividade não foram considerados para análise. A positividade em lâmina de esfregaço sanguíneo para bactérias da família Anaplasmataceae foi de 6,99% (n=13/186), enquanto para micoplasmas hemotrópicos foi de 1,61% (n=3/186). A localidade de Santa Cecília apresentou a maior frequência de positividade para no diagnóstico molecular de *Mycoplasma* spp. (25,9%, n=7/48). Com relação ao resultado de sequenciamento do fragmento do *16S rDNA* de micoplasmas hemotrópicos, três amostras de morcegos dos gêneros *Glossophaga* (ID 22052), *Artibeus* (ID 22108), *Carollia* (ID 22152) tiveram suas sequências com boa leitura no cromatograma, com aproximadamente 600pb. O maior percentual de similaridade Blast para 22052 foi de 98,41% com amostra de *Mycoplasma* sp. de um *Glossophaga commissarisi* (LR699022) da Costa Rica; para 22108 foi de 99,82% com amostra de *Mycoplasma* sp. de um *Platyrrhinus lineatus* (MZ048291) do Mato Grosso do Sul, Brasil; e para 22152 foi de 98,28% com amostra de *Mycoplasma* sp. de um *Desmodus rotundus* de Belize (KY932722). Este estudo revelou diferentes genótipos de micoplasmas hemotrópicos presentes em morcegos e demonstrou a presença de mórulas características de bactérias da família Anaplasmataceae em leucócitos e plaquetas de roedores, marsupiais e morcegos. Estes achados sugerem que micoplasmas hemotrópicos circulem entre morcegos do Acre, e que muito ainda há de ser descoberto em relação as espécies de bactérias intracelulares obrigatórias nestes animais.

Palavras-chave: *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Mycoplasma*, Morcegos, Roedores.

ABSTRACT

PINTO, Isaac Leandro Lira. **Cytological analysis, detection and molecular characterization of bacteria from the Anaplasmataceae and Mycoplasmataceae families in populations of small mammals in areas of the Amazon Rainforest.** 2023. 72p. Dissertation. (Master in Veterinary Sciences). Institute of Veterinary Medicine, Department of Animal Parasitology, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropedica, RJ, 2023.

The aim of this study was to detect and molecularly characterize bacteria from the Anaplasmataceae and Mycoplasmataceae families in populations of small mammals in areas of the Amazon rainforest in the state of Acre, Brazil. The importance of this research is based on obligate intracellular bacteria that participate in wild cycles as zoonotic agents, and therefore of interest to human health, as well as parasites of importance to domestic animals, and the host animal's own ecology and life cycle. The study areas are concentrated in jungle areas of the Amazon rainforest, in the city of Rio Branco, state of Acre, Brazil. For the direct diagnosis, 186 samples of blood smear slides from previously captured rodents, marsupials and bats were used to detect and characterize bacteria from the Anaplasmataceae and Mycoplasmataceae families. Liver parenchyma samples stored in RNA Later® had their DNA extracted using the "DNeasy Blood & Tissue" kit (Qiagen®) and were used for molecular diagnosis. Of the samples analyzed, 14.52% (n=27/186) were positive for hemotropic hemoplasmas by PCR using the primers Myco 322s and Myco 938as, which amplify 620 base pairs of the *16S rDNA* fragment. Diagnosis for Anaplasmataceae was hampered by the non-specificity of the PCR reactions with the primer pairs tested, and when the technique was specific, it resulted in a *16S rDNA* fragment of *Wolbachia* sp. For this reason, these positivity data were not considered for analysis. Positivity on blood smear slides for bacteria from the Anaplasmataceae family was 6.99% (n=13/186), while for hemotropic mycoplasmas was 1.61% (n=3/186). Santa Cecília had the highest positive rate in molecular diagnosis of *Mycoplasma* spp. (25.9%, n=7/48). The results of sequencing of the *16S rDNA* fragment of hemotropic mycoplasmas, three bat samples from the genera *Glossophaga* (ID 22052), *Artibeus* (ID 22108), *Carollia* (ID 22152) had their sequences read well on the chromatogram, with approximately 600pb. The highest percentage of Blast similarity for 22052 was 98.41% with a sample of *Mycoplasma* sp. from a *Glossophaga commissarisi* (LR699022) from Costa Rica; for 22108 it was 99.82% with a sample of *Mycoplasma* sp. from a *Platyrrhinus lineatus* (MZ048291) from Mato Grosso do Sul, Brazil; and for 22152 it was 98.28% with a *Mycoplasma* sp. sample from a *Desmodus rotundus* from Belize (KY932722). This study revealed different genotypes of hemotropic mycoplasmas present in bats and demonstrated the presence of morulae characteristic of bacteria from the Anaplasmataceae family in leukocytes and platelets from rodents, marsupials and bats. These findings suggest that hemotropic mycoplasmas circulate among bats in Acre, and that much remains to be discovered about the species of obligate intracellular bacteria in these animals.

Keywords: *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Mycoplasma*, Bats, Rodents.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Primers, sequências, tamanho do amplicon e gene alvo utilizados em ensaios de PCR convencional e touchdown.	24
Tabela 2. Identificação da amostra neste estudo, hospedeiro, local de origem da amostra, tamanho do “contig” após sequenciamento, e característica da sequência depositada.	25
Tabela 3. Número de pequenos mamíferos silvestres coletados separados por ordem, gênero, e área de estudo.	27
Tabela 4. Número de pequenos mamíferos silvestres amostrados entre outubro e novembro de 2021 em regiões de floresta de Rio Branco, Acre, por espécie, e frequência de positividade para micoplasmas hemotrópicos através de análise citológica e PCR baseada no <i>16S rDNA</i>	28
Tabela 5. Número de pequenos mamíferos silvestres amostrados entre outubro e novembro de 2021 em regiões de floresta de Rio Branco, Acre por espécie, e frequência de positividade para Anapasmataceae através de análise citológica e PCR baseada no 16S rDNA.	30
Tabela 6. Número de pequenos mamíferos silvestres amostrados entre outubro e novembro de 2021 em regiões de floresta de Rio Branco, Acre e positivos na PCR para micoplasmas hemotrópicos por ordem e sexo.	31
Tabela 7. Número de pequenos mamíferos silvestres amostrados entre outubro e novembro de 2021 em regiões de floresta de Rio Branco, Acre, positivos na PCR para Anapasmataceae por ordem e sexo.	32
Tabela 8. Número de amostras positivas de animais amostrados entre outubro e novembro de 2021 em regiões de floresta de Rio Branco, Acre, para micoplasmas hemotrópicos na PCR para o gene <i>16S rDNA</i> e na análise citológica em cada área de estudo.	35
Tabela 9. Número de animais amostrados entre outubro e novembro de 2021 em regiões de floresta de Rio Branco, Acre, positivos para Anapasmataceae na PCR para o gene <i>16S rDNA</i> e na análise citológica em cada área de estudo.	36
Tabela 10. Análise bivariada da frequência de Hemoplasmas em pequenos mamíferos silvestres amostrados entre outubro e novembro de 2021 em regiões de floresta de Rio Branco, Acre, através da PCR baseada no <i>16S rDNA</i> , em função da área de estudo, gênero do hospedeiro e sexo.	37
Tabela 11. Análise da frequência de Anapasmataceae em pequenos mamíferos silvestres amostrados entre outubro e novembro de 2021 em regiões de floresta de Rio Branco, Acre, através da análise citológica, em função da área de estudo, gênero do hospedeiro e sexo.	38
Tabela 12. Resultado do sequenciamento baseado no <i>16S rDNA</i> de amostras positivas para micoplasmas hemotrópicos.	39

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Áreas de captura de pequenos mamíferos silvestres nas regiões periurbanas da cidade de Rio Branco, Acre, e suas respectivas coordenadas.	16
Figura 2. Área de coleta de pequenos mamíferos silvestres APA do Amapá	16
Figura 3. Área de coleta de pequenos mamíferos silvestres Colégio agrícola	17
Figura 4. Área de coleta de pequenos mamíferos silvestres EMBRAPA	17
Figura 5. Área de coleta de pequenos mamíferos silvestres Floresta Piracema.....	18
Figura 6. Área de coleta de pequenos mamíferos silvestres Santa Cecília.	18
Figura 7. Área de coleta de pequenos mamíferos silvestres São Raimundo	19
Figura 8. Áreas de captura de pequenos mamíferos silvestres em regiões com diferentes fitofisionomias na região periurbana da cidade de Rio Branco, Acre.	20
Figura 9. A e B - Instalação de redes de neblina para a captura de quirópteros. C - Pesagem de morcego capturado. D - Coleta de valores relacionados ao tamanho do morcego da espécie <i>Artibeus planirostris</i> capturado	21
Figura 10. A - Espécime de <i>Carollia perspicillata</i> coletado. B - Espécime de <i>Platyrrhinus</i> sp. coletado.....	27
Figura 11. Bactérias dispostas em cocos, diplococos e em cadeia na superfície de eritrócitos. A) <i>Carollia perspicillata</i> B) <i>Glossophaga soricina</i> C) <i>Artibeus planirostris</i>	32
Figura 12. Inclusões plaquetárias sugestivas de hemoparasitos da Família Anaplasmataceae. A) <i>Sturnira giannae</i> B) <i>Artibeus planirostris</i> C) <i>Monodelphis glirina</i> D) <i>Proechimys simonsi</i>	33
Figura 13. Inclusões leucocitárias em mononucleares sugestivas de hemoparasitos da Família Anaplasmataceae. A) <i>Proechimys gardneri</i> B) <i>Proechimys gardneri</i> C) <i>Proechimys gardneri</i> D) <i>Proechimys brevicauda</i>	34
Figura 14. Árvore filogenética de <i>Mycoplasma</i> spp. com a probabilidade mais alta, inferida usando o método de Máxima Verossimilhança.....	40
Figura 15. Produtos de PCR de aproximadamente 345pb das amostras enviadas para amplificação usando os primers EHR16SD e EHR16SR em Gel de agarose à 2,0%	41

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Pequenos Mamíferos Silvestres (Didelphimorphia, Rodentia e Chiroptera)	3
2.2 Pequenos Mamíferos Silvestres como Reservatórios de Agentes Infecciosos de Importância em Saúde	5
2.3 Agentes Infecciosos da Família Mycoplasmataceae	7
2.3.1 Fatores associados à positividade por micoplasmas hemotrópicos	9
2.4 Agentes Infecciosos da Família Anaplasmatataceae.....	10
2.5 Métodos de Diagnóstico de Agentes Infecciosos das Famílias Anaplasmatataceae e Mycoplasmataceae em Pequenos Mamíferos Silvestres.....	13
2.5.1 Diagnóstico citológico.....	13
2.5.2 Diagnóstico sorológico.....	13
2.5.3 Diagnóstico molecular.....	14
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1 Aspectos Éticos de Pesquisa e Licenças Envolvendo Coletas de Mamíferos Hospedeiros	15
3.2 Áreas de Estudo.....	15
3.3 Tamanho da Amostragem e Coleta	20
3.4 Diagnóstico Direto em Lâmina de Esfregaço Sanguíneo	22
3.5 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR).....	22
3.5.1 Extração de DNA de amostras de parênquima hepático	22
3.5.2 Reação em cadeia da polimerase	23
3.5.3 Eletroforese em gel de agarose	24
3.6 Caracterização Molecular e Análise Filogenética	24
3.7 Análise estatística.....	26
4 RESULTADOS	26
4.1 Frequência de Positividade no Exame Citológico e Molecular	26
4.2 Fatores Associados à Positividade por Micoplasmas Hemotrópicos em Pequenos Mamíferos Silvestres.....	36
4.3 Fatores Associados à Positividade para Anaplasmatataceae em Pequenos Mamíferos Silvestres	37

4.4 Caracterização Molecular de Bactérias das Famílias Anaplasmataceae e Mycoplasmataceae em Pequenos Mamíferos Silvestres	38
5 DISCUSSÃO.....	41
6 CONCLUSÕES.....	45
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	45
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46
ANEXOS.....	68
Anexo A - Número de pequenos mamíferos silvestres amostrados por localidade e espécie, e frequência de positividade para <i>Mycoplasma</i> através de análise citológica e PCR baseada no <i>16S rDNA</i>	68
Anexo B - Número de pequenos mamíferos silvestres amostrados por localidade e espécie, e frequência de positividade para Anaplasmataceae através de análise citológica e PCR baseada no <i>16S rDNA</i>	70

1 INTRODUÇÃO

Humanos, animais e o meio ambiente desempenham um papel significativo no surgimento e na transmissão de diversas doenças infecciosas (THOMPSON & KUTZ, 2019). Tratando-se da vertente animal, a riqueza de espécies hospedeiras encontradas na vida selvagem é considerada um preditor significativo para o surgimento de doenças infecciosas emergentes de caráter zoonótico (JONES et al., 2008). Além disso, os crescentes desequilíbrios ambientais gerados pela invasão do homem em nichos selvagens têm proporcionado um estreitamento da relação de novas espécies de agentes zoonóticos circulantes com possíveis hospedeiros (SACRISTÁN et al., 2019; GONÇALVES et al., 2020).

Rodentia, Didelphimorphia e Chiroptera compreendem três das principais ordens do grupo dos mamíferos, e desempenham um papel crucial na manutenção do equilíbrio ecológico (PAGLIA et al., 2012). Dentre os seus diferentes papéis ecológicos, os animais pertencentes ao grupo dos pequenos mamíferos silvestres atuam como importantes reservatórios para muitos patógenos e desempenham um papel crucial nos estágios imaturos de vetores responsáveis pela manutenção de agentes etiológicos (LABRUNA, 2009; STUEN et al., 2013; ROQUE et al., 2014; RODRIGUES et al., 2019).

Os micoplasmas hemotrópicos ou hemoplasmas são bactérias não cultiváveis que se localizam na superfície de eritrócitos individualmente ou em grupos, e tal característica epieritrocítica facilita uma possível transmissão através de vetores hematófagos (WOODS et al., 2005). Embora os hemoplasmas sejam mais conhecidos por acometerem felinos domésticos, essas bactérias já foram descritas infectando uma gama de hospedeiros, abrangendo uma grande variedade de espécies de mamíferos, incluindo o homem (NEIMARK et al., 2001; TANAKA et al., 1965). Dentre os pequenos mamíferos não voadores diversos relatos confirmam a circulação de hemoplasmas entre roedores e marsupiais selvagens que habitavam regiões periurbanas (GONÇALVES et al., 2015; DE SOUSA et al., 2017; MASSINI et al., 2019). Equitativamente, já é sabido que morcegos também são suscetíveis a infecções por esses agentes apresentando uma alta diversidade de hospedeiros descritas apresentando hábitos alimentares diferentes (VOLOKHOV et al., 2017; IKEDA et al., 2017; MILLÁN et al., 2019; BECKER et al., 2020).

Os agentes da família Anaplasmataceae são bactérias intracelulares pertencentes a ordem Rickettsiales, cujo ciclo envolve interações complexas entre vetores invertebrados e hospedeiros vertebrados (DE SOUSA et al., 2017). Alguns indivíduos pertencentes a essa família, como *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp., apresentam grande importância na medicina veterinária e na medicina humana por serem causadores de doenças zoonóticas como a Anaplasmoose granulocítica humana (AGH), causada pela bactéria *Anaplasma phagocytophilum* (AARDEMA et al., 2022). Apesar do número de relatos seja menor comparado aos hemoplasmas, os agentes da família Anaplasmataceae também já foram descritos em pequenos mamíferos silvestres. Os gêneros *Anaplasma* e *Ehrlichia* representam grande parte das detecções dessa família em roedores, marsupiais e morcegos (BRAGA et al., 2018; IKEDA et al., 2021; Vieira et al., 2022; ANDRÉ et al., 2022). Entretanto, infecções por espécies do gênero *Neorickettsia* já foram relatadas em morcegos (DE MELLO et al. 2023).

Para o diagnóstico desses agentes além de técnicas citológicas, técnicas moleculares que buscam a amplificação do gene *16S rDNA*, bem como os genes enzima citrato sintetase (*glbA*), operon *groESL*, e genes responsáveis pela codificação de proteínas formadoras das ligações dissulfeto (*dsb*) ou proteínas de superfície (*OMPs*) tem sido amplamente utilizados para a detecção

de hemoparasitos da família Anaplasmataceae (DUMLER et al., 2001). Embora o gene *16S rDNA* também seja utilizado para a detecção de hemoplasmas, é sugerida a utilização de forma complementar de marcadores como *rpoB*, *rpoC*, *gyrB*, *dnaK*, *23S rRNA* ou a utilização de técnicas de sequenciamento para aumentar a confiabilidade do diagnóstico (SYKES & TASKER, 2013; MILLÁN et al., 2021; VALENTE et al., 2021).

Apesar da infecção por hemoplasmas e agentes da família Anaplasmataceae em animais domésticos ser bem documentada, o potencial de infecção em espécies hospedeiras de vida selvagem, incluindo os pequenos mamíferos estudados nesse trabalho, ainda precisa ser elucidado. Da mesma forma, a diversidade genética das espécies circulantes, e fatores como ciclos de transmissão e o impacto direto da infecção na saúde desses animais ainda é pouco conhecido.

O presente estudo teve como objetivo realizar a análise citológica, a detecção molecular a partir de fragmentos da sequência *16S rDNA*, e a determinação da diversidade genética de micoplasmas hemotrópicos e bactérias da família Anaplasmataceae presentes em populações de pequenos mamíferos que habitam regiões de mata densa na cidade de Rio Branco, Acre.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Pequenos Mamíferos Silvestres (Didelphimorphia, Rodentia e Chiroptera)

De acordo com a última compilação a respeito da composição da fauna do planeta Terra, o Brasil detém a fauna mais rica do mundo, composta por mais de 701 espécies conhecidas. Entretanto, a diversidade de mamíferos no Brasil não se apresenta homogênea quando se trata de mamíferos. A ordem Rodentia é a mais diversificada e constitui 34,7% das espécies brasileiras, seguida da ordem Chiroptera com 24,8%, Primatas 16,8% e Didelphimorphia 7,9% (PAGLIA et al., 2012).

Além da manutenção do funcionamento dos processos ecossistêmicos, os pequenos mamíferos contribuem para a manutenção das ligações tróficas, ao servirem como fontes de alimento para espécies carnívoras (HENDERSON et al., 1987; FACURE & MONTEIRO-FILHO, 1996). Por fim, algumas espécies também podem ser consideradas como indicadores biológicos, por serem sensíveis às alterações no habitat, o que permite, por exemplo, a observação do desequilíbrio na relação parasito-hospedeiro em decorrência de ações antrópicas (BANKS-LEITE et al., 2014).

A ordem Rodentia é composta por mamíferos caracterizados por apresentarem dentes incisivos que permanecem crescendo durante toda a sua vida (MUSSE, 2023). Os roedores compõem o maior grupo entre os mamíferos possuindo cerca de 2.277 espécies conhecidas em 33 famílias, o que representa quase 42% da biodiversidade global da classe Mammalia (DAHMANA et al., 2020). Esse imenso plantel pode ser encontrado em quase todos os tipos de áreas terrestres, com exceção das regiões polares (DAHMANA et al., 2020; MUSSE, 2023). Esta ordem está atualmente dividida em cinco subordens: Sciuromorpha, Hystricomorpha, Myomorpha, Anomaluromorpha e Castorimorpha, sendo apenas as três primeiras encontradas no Brasil (CARLETON & MUSSE, 2005; GARDNER, 2007; PAGLIA et al., 2012). Além dos ratos e camundongos “verdadeiros” (família Muridae), essa enorme ordem de animais abrange grupos diversos como porcos-espinhos, castores, capivaras, marmotas, esquilos e chinchilas (MUSSE, 2023).

Ao contrário de Rodentia a ordem Didelphimorphia é composta por um número de espécies mais limitado, sendo registradas apenas 98 espécies, que estão distribuídas em 17 gêneros e que habitam toda região neotropical e neártica (GARDNER, 2007; PATTON et al., 2015). Destas, 16 gêneros e 55 espécies são encontradas no Brasil (GARDNER, 2007; PAGLIA et al., 2012). Os didelfídeos são providos de uma série de adaptações morfológicas que foram responsáveis por conceder a esses animais a possibilidade de adotar diferentes hábitos de vida, e que se alimentassem de diferentes fontes nutricionais, facilitando a sua colonização nos ambientes encontrados nas Américas (LOW, 1986; FLECK & HARDER, 1995).

A riqueza total de pequenos mamíferos não-voadores descrita para o Bioma Amazônico é de 113 espécies, sendo 39 pertencentes à ordem Didelphimorphia e 74 pertencentes à ordem Rodentia. Dentro dos roedores, 44 espécies pertencem à família Cricetidae e 30 espécies pertencem à família Echimyidae (PERCEQUILLO et al., 2015). Os pequenos mamíferos não-voadores Amazônicos apresentam hábitos bastante variados em relação ao uso de estratos florestais, podendo ser arborícolas, terrícolas e escansoriais (PERCEQUILLO et al., 2015).

Roedores da subfamília Sigmodontinae compõem o segundo grupo mais diverso dentro dos mamíferos, sendo superado em riqueza de espécies apenas pelos murídeos asiáticos da família

Muridae (MUSSEY & CARLETON, 2005). Possuem uma extensa distribuição e estão presentes em diversos habitats, desde planícies em nível do mar até planaltos andinos com cerca de 4.000 a 5.000 metros de altitude. Habitam florestas secas e úmidas, cerrados, campos secos e úmidos, estepes e desertos. Estes roedores podem ser terrestres, escansoriais, arborícolas, semi-aquáticos, semi-fossoriais, fossoriais e podem utilizar os mais variados recursos alimentares, sendo onívoros, carnívoros, frugívoros, granívoros e pastadores (PERCEQUILLO et al., 2015).

Com relação à alimentação, em função das dificuldades metodológicas de estudos desta natureza, poucas espécies de pequenos mamíferos não voadores realmente têm suas dietas descritas baseadas em dados consistentes de estudos específicos, que envolvem análises de conteúdo estomacal e ou fecal (CASTILHEIRO & SANTOS-FILHO, 2013; PERCEQUILLO et al., 2015). A maioria das espécies de pequenos mamíferos não voadores é generalista, se alimentando principalmente de insetos, frutos, néctar e pequenos vertebrados. Entretanto a dieta destes animais pode variar de acordo com o que está disponível no habitat, dependendo inclusive da sazonalidade, da idade e de fatores reprodutivos (CASELLA & CÁRCERES, 2006).

Os quirópteros compõem a segunda maior ordem entre os mamíferos, perdendo apenas para a ordem Rodentia, e embora sejam conhecidos por serem os únicos mamíferos capazes de voar, os indivíduos dessa ordem mantêm características comuns da classe Mammalia, como o corpo coberto por pelos, a presença de glândulas mamárias e a endotermia (ALTRINGHAM et al., 2005). A ordem Chiroptera é dividida nas subordens Megachiroptera e Microchiroptera, mas apesar da terminologia, elas não diferem pelo tamanho, e sim pela anatomia e ecologia (KUNZ, 2003; SIKES, 2011). De acordo com seu tipo de alimentação os morcegos podem ser classificados como insetívoros, frugívoros, carnívoros e nectívoros, e várias espécies usam a ecolocalização para caracterizar seu ambiente circundante e localizar possíveis presas (BRUSSEL & HOLMES, 2022). Assim como a ordem Rodentia as mais de 1.300 espécies de quirópteros podem ser encontradas em todos os continentes, exceto nas regiões polares e algumas ilhas oceânicas isoladas. No Brasil é possível encontrar aproximadamente 9 famílias, 65 gêneros e 179 espécies, distribuídas em todos os domínios morfoclimáticos brasileiros e áreas urbanas (BERNARD & FENTON, 2002; PAGLIA et al., 2012; REIS et al., 2013).

A diversidade nas características alimentares dos morcegos, combinada com sua longa expectativa de vida e habilidade para ocupar diferentes nichos ecológicos (BROOCK & DOBSON, 2015), permite que esses animais se movam por diversas matrizes ecológicas e explorando grandes distâncias. Vários morcegos, como os das subfamílias Stenodermatinae e Carolliinae, alimentam-se predominantemente de frutas, atuando como "jardineiros da floresta" ao espalhar sementes por diversos locais (REGOLIN et al., 2020; LÓPEZ-BAUCELLS et al., 2016). Frequentemente, eles introduzem sementes em áreas anteriormente antropizados, auxiliando, assim, a floresta na recuperação de ambientes degradados pela ação humana. Algumas outras espécies da subfamília Glossophaginae são polinizadores eficazes contribuindo para a manutenção da diversidade genética das plantas floríferas (TREJO-SALAZAR et al., 2016; TURCHETTO et al., 2018). Esses grupos de morcegos frugívoros e nectarívoros são de grande relevância ecológica, pois são excelentes polinizadores de várias espécies vegetais e dispersores de uma ampla variedade de sementes na natureza. Aproximadamente 25% das espécies de árvores em florestas tropicais dependem deles para a dispersão, reforçando a ideia de que eles são fundamentais para a regeneração de florestas neotropicais (PAROLIN et al., 2021). Assim, em áreas de florestas alteradas ou fragmentadas, o papel dos morcegos como dispersores de sementes é de importância crucial.

Entretanto, a maioria dos morcegos na Amazônia se alimenta de insetos e pode ser

classificada como obrigatória ou facultativa. Eles coletam insetos e outros artrópodes diretamente da vegetação no sub-bosque da floresta ou capturam presas em áreas abertas, seja acima ou abaixo do dossel florestal (LÓPEZ-BAUCELLS et al., 2016). Esses morcegos insetívoros desempenham um papel ecológico e econômico significativo, pois, devido aos seus hábitos alimentares, consomem várias espécies de insetos, ajudando a reduzir suas populações nas plantações. Estima-se que os serviços ecológicos fornecidos por esses animais representem uma economia de 3,7 a 53 bilhões de dólares por ano em custos com inseticidas (ADAMS & PEDERSEN, 2013; BOYLES et al., 2011).

2.2 Pequenos Mamíferos Silvestres como Reservatórios de Agentes Infecciosos de Importância em Saúde

As alterações nas paisagens de diversos locais geradas por ações antropológicas ao longo dos anos, além da falta de saneamento básico, permitiram que animais periurbanos passassem a ter um contato mais estreito com o homem, levando a uma exposição humana à agentes de caráter zoonótico que antes circulavam apenas em ecossistemas naturais (MEERBURG et al., 2009; MURRAY & DASZA, 2013). Somado a isso, a alta capacidade de adaptação destes pequenos mamíferos e sua ampla distribuição e dispersão, aumentaram a relevância desses animais na perpetuação de diversas espécies de agentes etiológicos transmitidos por vetores artrópodes (ROQUE et al., 2014; RODRIGUES et al., 2019).

Os pequenos mamíferos silvestres podem assumir um papel de hospedeiro paratênico ao atuarem como transportadores e permitirem que agentes infecciosos permaneçam circulando no ambiente, ou assumir um papel de reservatório quando demonstram competência para transmiti-los a outros hospedeiros e vetores suscetíveis (HAN et al., 2016). Os riscos da interface silvestre-urbano têm sido relatados em diversas partes do mundo, e em muitos casos animais silvestres podem atuar como reservatórios de agentes que são uma ameaça não só para populações de animais domésticos, mas também, para a população humana devido ao seu potencial zoonótico (SU et al., 2020; KRUGEL et al., 2022). Até o presente momento são reconhecidas mais de 60 doenças onde há a participação ativa de pequenos mamíferos na manutenção de ciclos de agentes etiológicos, e embora vários estudos sobre patógenos zoonóticos tenham sido realizados em diferentes ordens taxonômicas de mamíferos na América do Sul, esses dados ainda são considerados qualitativos e geograficamente subestimados (POVILL et al., 2018; BITTENCOURT & BEZERRA, 2022).

Vários fatores contribuem para que os morcegos sejam disseminadores de patógenos com potencial zoonótico, como por exemplo, sua facilidade de deslocamento e de se adaptar aos mais diversos ambientes. Além disso, os morcegos apresentam uma suscetibilidade reduzida a vários patógenos humanos e animais, permanecendo assintomáticos na maior parte do tempo (BROOK & DOBSON, 2015; ALLOCATI et al., 2016).

Os pequenos mamíferos não voadores por outro lado, apresentam uma alta capacidade de adaptação e encontram-se presentes em ampla variedade de habitats e, por esse motivo, representam os mamíferos que mais frequentemente acompanham os humanos em sua dispersão global (DAHMANA et al., 2020). Como consequência, esses animais tiveram a oportunidade de se estabelecer onde foram introduzidos e depois se tornaram invasivos, com vários efeitos sobre a biodiversidade e impactos profundos na saúde humana (CAPIZZI et al., 2014).

Os pequenos mamíferos silvestres desempenham um importante papel como reservatórios de agentes causadores de infecções zoonóticas. Numerosos agentes infecciosos já foram identificados parasitando esses animais, incluindo vírus, bactérias, fungos e protozoários (BROOK

& DOBSON, 2015; PONTAROLO et al., 2021; DE OLIVEIRA et al., 2023).

Os marsupiais são conhecidos por atuarem como reservatórios de diversas espécies de bactérias patogênicas para a espécie humana como, por exemplo, as Rickettsias (BARBIERI, 2016; UENO et al., 2020; FERNANDES et al., 2020; PONTAROLO et al., 2021). Além disso, existem diversos relatos da detecção molecular e sorológica de outras classes de agentes patológicos de caráter zoonótico nesses animais. Os gêneros *Flavivírus* e *Lyssavírus*, por exemplo, que abrangem as espécies responsáveis por causar a Dengue e a Raiva, respectivamente, já foram relatados em marsupiais (ARAÚJO et al., 2014; BERNAL et al., 2021). Adicionalmente, protozoários como *Leishmania* spp., *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma* spp. e *Neospora caninum* também já foram diagnosticados em indivíduos da ordem Didelphimorphia (HORTA et al., 2016; TRUEB et al., 2018; BRITO-JUNIOR et al., 2020).

Apesar dos roedores serem parte integrante dos ecossistemas, eles também carregam muitos patógenos que podem se espalhar e causar diversas enfermidades. Dentre as mais importantes em termos de saúde pública estão a Salmonelose, a Peste, a Leptospirose e a Leishmaniose (DAHMANA et al., 2020; MULL et al., 2023). Ademais, estes animais podem abrigar diferentes bactérias complexas como *Mycobacterium tuberculosis*, *Escherichia coli*, além de agentes encontrados em carrapatos conhecidos por causarem Erliquiose, Febre Q, Doença de Lyme, entre outras doenças (DAHMANA et al., 2020; PITTERMANNOVÁ et al., 2021).

A associação entre morcegos e patógenos de doenças que acometem humanos tem sido reconhecida há mais de um século desde a primeira identificação de *Lyssavírus* responsável por causar a raiva em morcegos hematófagos assintomáticos (CARINI, 1911). Os morcegos têm sido cada vez mais reconhecidos como um reservatório excepcional para vírus zoonóticos emergentes. Estudos indicam que o sistema imunológico único dos morcegos pode ser parcialmente responsável por sua capacidade de coexistir com agentes virais apresentando doenças clínicas mínimas ou inexistentes (PAVLOVICH et al., 2018; IRVING et al., 2021). Por esse motivo diversos agentes virais já foram identificados em exemplares dessa ordem no mundo (BANERJEE et al., 2019; ARAI & YANAGIHARA, 2022; RAMOS et al., 2023). Para mais, alguns protozoários e fungos tem frequente associação com espécies de morcegos, sugerindo que esses animais possam contribuir também para a manutenção de agentes não-virais extremamente patogênicos como o fungo *Histoplasma capsulatum* e o protozoário *Trypanosoma cruzi* (BROOK & DOBSON, 2015; DIMKI'C et al., 2021).

Tratando-se de organismos unicelulares, bactérias do gênero *Bartonella* têm sido descritas no Brasil e no mundo como um dos patógenos zoonóticos mais emergentes do mundo moderno. Atualmente, a doença da arranhadura do gato, causada principalmente pelas espécies *B. henselae* e *B. clarridgeiae*, é a doença humana mais comum dentre as muitas causadas por esse grupo (IANNINO et al., 2018). Embora a presença de *Bartonella* sp. seja constantemente associada a pequenos mamíferos silvestres pouco se sabe sobre o papel desses animais na transmissão das enfermidades causadas por esses organismos para animais domésticos e humanos (BREITSCHWERDT et al., 2010; ANDRÉ et al., 2019; ALCANTARA et al., 2020; GONÇALVES-OLIVEIRA, 2023).

Os apicomplexos são parasitos intracelulares obrigatórios que podem causar graves doenças aos seus hospedeiros e provocar prejuízos econômicos significativos em todo o mundo (VOTÝPKA et al., 2017). As espécies de *Babesia* do complexo microti são agentes zoonóticos que já foram relatados em roedores em diversos continentes, sendo em alguns casos as cepas encontradas consideradas patogênicas (GOETHERT, 2021; SANTODOMINGO et al., 2022). Além disso, espécies do gênero *Hepatozoon* podem usar roedores e outros pequenos mamíferos

como hospedeiros intermediários e paratênicos com o objetivo de perpetuarem na natureza (MUÑOZ-LEAL et al., 2019; PERLES et al., 2019; SANTOS et al., 2020; ALABI et al., 2021).

No Brasil, espécies da família Trypanosomatidae são frequentemente encontradas em marsupiais e roedores, sendo a espécie *Trypanosoma cruzi* a mais frequente (ZITELLI et al., 2021; SANTOS et al., 2023; DE OLIVEIRA et al., 2023). Entre os vírus, o Rotavírus A, o Hantavírus e o Alfacoronavírus, juntamente com o vírus da raiva, são as espécies virais que apresentam maior prevalência em morcegos que habitam os biomas brasileiros (CASTELO-BRANCO et al., 2023). A respeito da ordem Eucoccidiorida já foram identificados agentes do gênero *Hepatozoon* em roedores e marsupiais (ANDRÉ et al., 2022; WECK et al., 2022), e em morcegos (PERLES et al., 2020; SANTOS et al., 2020) de diversos biomas, incluindo o Cerrado, o Pantanal e a Mata Atlântica. Adicionalmente, Colle et al. (2019) conseguiram não só observar a presença de *Hepatozoon* spp. em dois exemplares da espécie *Didelphis marsupialis* que habitavam a Floresta Amazônica, mas também a coinfeção com o gênero *Babesia*.

2.3 Agentes Infeciosos da Família Mycoplasmataceae

Reino: Bacteria (WOESE et al., 1990)

Filo: Bacillota (GIBBONS & MURRAY, 2021)

Classe: Mollicutes (EDWARD & FREUNDT, 1967)

Ordem: Mycoplasmatales (FREUNDT, 1955)

Família: Mycoplasmataceae (FREUNDT, 1955)

Gênero: *Mycoplasma* (NOWAK, 1929)

Micoplasmas são bactérias gram-negativas pertencentes a classe dos Mollicutes. Estes indivíduos não apresentam parede celular, e tem o seu diâmetro variando entre 0,3 e 0,8 μm (RAZIN, 1992; BERENT & MESSICK, 2003). Sua delimitação por membrana determina sua característica pleomórfica, o que faz com que sua visualização microscópica seja heterogênea, isto é, esses microrganismos podem se apresentar em formato de anel, ou ainda de forma circular ou como pequenos bacilos e filamentos (STALHEIM, 1990).

A família Mycoplasmataceae contém dois gêneros, *Mycoplasma* e *Ureaplasma*, que abrangem patógenos de humanos, animais, plantas e insetos, sendo eles parasitos ou de vida livre, presentes em ambientes extremamente diversos como o intestino e o rúmen da vaca, fontes de águas termais e minas de carvão abandonadas (STALHEIM, 1990). A espécie *Mycoplasma pulmonis* é uma das principais bactérias dessa família que acomete pequenos mamíferos, sendo responsável por causar uma doença respiratória conhecida como “murine respiratory mycoplasmosis” (MRM) especialmente em roedores (LINDSAY et al., 1991; SCHOEB et al., 1996).

Micoplasmas hemotrópicos, amplamente conhecidos como hemoplasmas, são bactérias epieritrocíticas capazes de infectar uma grande diversidade de hospedeiros mamíferos, incluindo animais selvagens e humanos, e diferem das demais espécies da família Mycoplasmataceae por apresentarem tropismo por eritrócitos (MILLÁN et al., 2021). Os hemoplasmas são conhecidos por possuírem o menor genoma não-viral conhecido, e acredita-se que este fato esteja associado ao processo evolutivo que levou esses microrganismos a manterem apenas os genes essenciais para a sua sobrevivência, ou seja, aqueles responsáveis pela replicação, transcrição e síntese proteica, deixando de fora as vias metabólicas, o que ocasionou na necessidade de se tornarem parasitos das células de seus hospedeiros (WOESE, 1987). No passado esse grupo de bactérias foi classificado

como pertencente aos gêneros *Haemobartonella* e *Eperythrozoon*, porém análises moleculares do gene *16S rDNA* verificaram que esses indivíduos pertenciam na verdade à Classe Mollicutes, Família Mycoplasmataceae (WILLI et al., 2007).

Por meio de análises filogenéticas, o grupo dos hemoplasmas pode ser dividido em dois subgrupos, suis e haemofelis (MILLÁN et al., 2021). Até o presente momento, não há evidências de culturas axênicas bem-sucedidas para espécies de hemoplasmas. Por esse motivo quase todas as espécies de hemoplasmas conhecidas são consideradas como sendo incultiváveis *in vitro*, o que faz com que muitas dessas espécies apresentem o status de *Candidatus*, uma nomenclatura de caráter provisório proposta para procariotos não-cultiváveis cujas características biológicas e genômicas não estejam totalmente elucidadas (VOLOKHOV et al., 2012; OREN et al., 2020).

O conhecimento sobre a patologia de hemoplasmas se restringe a espécies domésticas, onde esses agentes podem causar anemia aguda e crônica, especialmente em hospedeiros imunocomprometidos (MESSICK, 2004). As principais espécies envolvidas em infecções de animais de companhia são *Mycoplasma haemofelis*, '*Candidatus M. haemominutum*' e '*Candidatus M. turicensis* em felinos (MICELI et al., 2013; ANDRÉ et al., 2014; MARCONDES et al., 2018) e *Mycoplasma haemocanis* e '*Candidatus M. haematoparvum*' em canídeos (ALVES et al., 2014; SILVA-SANTOS et al., 2014; SOARES et al., 2016;). Com relação aos ruminantes domésticos a espécie *Mycoplasma ovis* é associada aos ovinos (SOUZA et al., 2019; MONGRUEL et al., 2020) e ocasionalmente aos caprinos (MACHADO et al., 2017). A detecção molecular de hemoplasmas também já foi realizada em bovinos onde as espécies '*Candidatus M. haemobos*' e *Mycoplasma wenyonii* foram encontradas (GIROTTO et al., 2012; DE MELLO et al., 2019).

Muitos trabalhos buscam entender o papel de roedores como reservatórios de espécies de hemoplasmas que apresentam um potencial risco para a saúde humana. Roedores sinantrópicos como *Rattus* spp. e *Mus musculus* foram investigados como potenciais reservatórios de hemoplasmas em diversos continentes como América do Sul, Ásia e Europa. A prevalência de hemoplasmas em roedores sinantrópicos foi próximo ou acima de 50% (WILLI et al., 2007; SASHIDA et al., 2013; CONRADO et al., 2015; GONÇALVES et al., 2015; HORNOK et al., 2015).

Duas espécies conhecidas por infectarem camundongos de laboratório e espécies selvagens foram descritas em roedores entre as décadas de 50 e 60 (THURSTON, 1954; KREIER e HALL, 1968). *Mycoplasma coccoides* e '*Ca. M. haemomuris*' pertencem ao grupo haemofelis e a grande maioria das sequências genéticas oriundas de roedores do Brasil estão filogeneticamente agrupados com uma dessas duas espécies. Entretanto, um estudo realizado por Vieira et al. (2009) observaram uma positividade em capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) para hemoplasmas que apresentavam apenas 92% de similaridade genética pelo *16S rDNA* para a espécie *M. coccoides* e 86% para '*Ca. M. haemomuris*', sugerindo que capivaras possuem a sua própria espécie de *Mycoplasma*. Além disso, o mesmo genótipo foi observado onze anos depois em outro estudo com capivaras realizado por Gonçalves et al. (2020). Outra espécie de micoplasma hemotrópico foi descrita no estado do Paraná em porcos-espinhos anões (*Sphiggurus villosus*) por Valente et al. (2021), e assim como os estudos citados anteriormente os animais positivos apresentavam uma análise filogenética dos "amplicons" dos genes *16S* e *23S rDNA* que sugeriam uma nova espécie que também pertencia ao grupo haemofelis. A respeito de pequenos roedores selvagens, Gonçalves et al. (2015) identificaram 10 genótipos presentes em diferentes espécies de roedores selvagens, pertencentes a diferentes tipos de biomas encontrados no Brasil, incluindo a Floresta Amazônica. No estudo foi possível observar entre 86-99% de identidade com conhecidos hemoplasmas murinos. Dois anos depois De Sousa et al. (2017) também encontrou um genótipo relacionado filogeneticamente de

forma íntima com a espécie *M. haemomuris* em um roedor selvagem capturado no pantanal mato-grossense, sugerindo que essa espécie seja o principal hemoplasma parasitando roedores no Brasil.

Ao contrário dos roedores pouco se sabe sobre os hemoplasmas que acometem os marsupiais. O primeiro relato em indivíduos dessa espécie ocorreu em um gambá norte-americano (*Didelphis virginianus*) nos Estados Unidos, no qual a espécie *Candidatus Mycoplasma haematodidelphidis* foi identificada (MESSICK et al., 2002). Anos depois um estudo realizado no Parque da cidade de Maringá no Paraná, detectou a presença de hemoplasmas em sete dos oito gambás-de-orelha-branca capturados que apresentavam 99% de identidade com a espécie citada anteriormente (MASSINI et al., 2019). Posteriormente Gonçalves et al. (2020) identificaram sequências genômicas idênticas às encontradas no estudo realizado por Massini et al. (2019) em gambás de orelha branca que habitavam florestas urbanas no estado do Mato Grosso do Sul. No mesmo ano Pontarolo et al. (2020) sugeriram, através de amplificação de fragmentos dos genes *16S* e *23S rRNA*, que esta espécie de hemoplasma encontrada se tratava na verdade de uma nova espécie chamada '*Candidatus Mycoplasma haemoalbiventris*'.

O potencial de morcegos como hospedeiros de agentes bacterianos tem instigado e motivado diversas pesquisas, e estudos envolvendo espécies de hemoplasmas em quirópteros cresceram consideravelmente na última década comparado a períodos anteriores. O primeiro relato aconteceu nos Estados Unidos onde foi possível diagnosticar por meio de técnicas moleculares micoplasmas hemotrópicos em morcegos marrons (*Myotis lucifungus*) que apresentavam 91,8% de semelhança filogenética com a espécie *Mycoplasma haemomuris* sugerindo que se tratava de uma nova espécie de *Mycoplasma* (MASCARELI et al., 2014). Desde então diversos trabalhos identificaram a presença de hemoplasmas em uma grande diversidade de espécies de quirópteros incluindo morcegos hematófagos como a espécie *Desmodus rotundus* (VOLOKHOV et al., 2017), morcegos frugívoros como *Micropteropus* sp. (DI CATALDO et al., 2020) e os molossídeos *Molossus molossus* e *Molossus nigricans* (IKEDA et al., 2017; BECKER et al., 2020). Ikeda et al. (2017) detectaram em indivíduos da espécie *Molossus molossus* hemoplasmas que apresentavam semelhanças filogenéticas que variavam entre 93-96% com a espécie *M. coccoides* conhecida até aquele momento por infectar roedores e felinos. Salientando o potencial zoonótico desses animais se tratando de patógenos bacterianos Millán et al. (2015) observaram resultados de 97% de similaridade para a espécie '*Candidatus Mycoplasma haemohominis*', conhecida por infectar humanos, em morcegos da espécie *Miniopterus schreibersii* na Espanha e posteriormente no Chile na espécie *Myotis chiloensis* (MILLÁN et al., 2019).

2.3.1 Fatores associados à positividade por micoplasmas hemotrópicos

Alguns fatores ecológicos e evolutivos parecem aumentar o risco de aparecimento de hemoplasmas em animais silvestres. Espécies que apresentam hábitos sociais mais presentes estão mais suscetíveis a apresentarem altas taxas de prevalência de infecções por espécies de micoplasmas hemotrópicos como é o caso dos guaxinins (VOLOKHOV et al., 2017). Em relação aos quirópteros, espécies mais pesadas e com colônias maiores apresentaram uma prevalência maior, o que poderia apoiar ainda mais a transmissão dependente da densidade populacional (BECKER et al., 2020).

Hábitos alimentares também podem estar associados a uma maior exposição de animais a espécies de hemoplasmas, especialmente os carnívoros, onde pode ter se originado uma rota de transmissão predador-presa (WILLI et al., 2007). Uma boa dieta e, conseqüentemente, uma boa manutenção do sistema imunológico parece estar diretamente ligada a resistência de mamíferos

predadores a infecções por hemoplasmas. Becker et al. (2018) sugeriram que uma presença abundante de gado pode reduzir de forma significativa as chances de morcegos hematófagos desenvolverem infecções por hemoplasmas. Além disto, sugeriram que a ausência da fome permite um melhor direcionamento energético desses animais ao fortalecimento de sua defesa inata que irá proporcionar uma maior atividade microbicida em momentos agudos da infecção, e o mesmo parece acontecer com roedores. Um estudo realizado por Gonçalves et al. (2020) constatou uma resistência à infecção desses patógenos por animais que viviam em áreas urbanas onde há uma oferta de alimento maior do que em áreas florestais onde vivem roedores silvestres que apresentaram uma prevalência maior de hemoplasmas. A grande disponibilidade de alimento nesse caso pode ter contribuído para diminuir a interação agressiva entre os indivíduos, diminuindo, portanto, a transmissão de agentes através de sangue e saliva contaminados (COHEN et al., 2018).

A idade parece ser um fator relevante para a infecção de morcegos por hemoplasmas. Em um estudo realizado por Volokhov et al. (2017) foi possível observar que indivíduos subadultos e não reprodutivos de uma colônia de morcegos tiveram uma prevalência maior de infecção por hemoplasmas.

Por fim, morcegos neotropicais expostos ao mercúrio, demonstraram apresentar uma vulnerabilidade menor a infecções por hemoplasmas em um estudo realizado por Becker et al. (2020), onde foi sugerido as hipóteses de que a ação do contaminante poderia modificar o habitat desses patógenos ao causar uma anemia severa ou ainda, diminuir a eficiência na transmissão mecânica por causar a morte de vetores.

2.4 Agentes Infeciosos da Família Anaplasmataceae

Reino: Bacteria (WOESE et al., 1990)

Filo: Pseudomonadota (OREN & GARRITY, 2021)

Classe: Alphaproteobacteria (GARRITY et al., 2005)

Ordem: Rickettsiales (GIESZCZYKIEWICZ, 1939)

Família: Anaplasmataceae (PHILIP, 1957)

Gêneros: *Neorickettsia*, *Anaplasma*, *Ehrlichia* (DUMLER et al., 2001) e *Wolbachia* (HERTIG, 1936)

A família Anaplasmataceae é composta por alfa-proteobactérias, pequenas bactérias parasitas de células eucarióticas que se replicam dentro de vacúolos derivados da célula hospedeira (KERSTERS et al., 2006). Os gêneros *Neorickettsia*, *Anaplasma*, *Ehrlichia* e *Wolbachia*, que compõem essa família, são compostos por bactérias gram-negativas, muito pequenas com tamanho variando entre 0,3 e 2,0µm, pleomórficas, sem motilidade e com a característica de serem intracelulares obrigatórias se replicando no interior de vacúolos intracitoplasmáticos de neutrófilos, monócitos, macrófagos e eritrócitos, formando micro colônias características dessa família conhecidas como mórulas (DUMLER et al., 2001). Infecções por esses agentes são frequentemente vistas em animais domésticos e selvagens, e a espécie humana quando acometida geralmente apresenta viés zoonótico por meio da transmissão de carrapatos (ISMAIL et al., 2010; DOUDIER et al., 2010). A importância dos pequenos mamíferos silvestres na manutenção de agentes dessa família no ambiente também tem sido amplamente investigada, já que estes animais são potenciais reservatórios para patógenos por atuarem como hospedeiros para estágios imaturos de carrapatos vetores (OLIVEIRA et al., 2020; DIARRA et al., 2020; IKEDA et al., 2021).

O gênero *Neorickettsia* abrange bactérias intracelulares obrigatórias que, diferentemente de

outros indivíduos da família Anaplasmataceae pertencentes aos gêneros *Ehrlichia* e *Anaplasma*, são endossimbióticas e dependentes de trematódeos para realizar o seu ciclo de vida (GREIMAN et al., 2015). Quatro enfermidades estão relacionadas a agentes desse gênero: febre do cavalo de Potomac (PHF) causada por *N. risticii*; doença do envenenamento por salmão em cães, que é principalmente causada por *N. helminthoeca*; febre do verme de Elokomina (EFF) em canídeos e ursos, causada por *N. elokominica*; febre de Sennetsu em humanos causada pelo agente *N. sennetsu* (IKEDA et al., 2021).

As espécies de bactérias englobadas pelo gênero *Wolbachia*, são amplamente encontradas em artrópodes, onde são difundidas, e em nematóides filariais, onde estão restritos a única, mas notável família de parasitos, Onchocercidae, que abrange os agentes da oncocercose humana e da filariase linfática (TAYLOR et al., 2005). Assim como os espécimes do gênero *Neorickettsia*, as espécies de *Wolbachia* tendem a assumir um papel simbiótico ao se associarem a filarídeos (TAYLOR et al., 2005). Entretanto, a infecção de artrópodes por esses parasitos pode levar a incapacidade de machos infectados de se reproduzirem com fêmeas não infectadas (WERREN, 1998).

A anaplasmoze é uma doença transmitida por carrapatos causada por várias espécies do gênero *Anaplasma*. As espécies *Anaplasma marginale*, *Anaplasma centrale*, *Anaplasma ovis*, são frequentemente associadas a infecções em ruminantes domésticos (VILLAR et al., 2023; LI et al., 2023), sendo a primeira ocasionalmente encontrada em equídeos (ASIF et al., 2020). Já a espécie *Anaplasma platys* é conhecida principalmente por apresentar uma alta prevalência em caninos (BRANDÃO et al., 2019; YAN et al., 2023). Entretanto, felinos domésticos também já demonstraram potencial para serem hospedeiros dessa espécie (LIMA et al., 2010; SALAKIJ et al., 2012; ANDRÉ et al., 2022). Por outro lado, a espécie *Anaplasma phagocytophilum*, responsável por causar a Anaplasmoze Granulocítica Humana (AGH), é uma bactéria patogênica para humanos e animais domésticos e pode ser transmitida por uma série de carrapatos, com destaque para os exemplares dos gêneros *Ixodes*, *Amblyomma* e *Dermacentor* (AARDEMA et al., 2022).

A Erliquiose é causada por bactérias leucocitofílicas que se multiplicam dentro de vacúolos citoplasmáticos de monócitos circulantes e macrófagos teciduais (ETTINGER & FELDMAN, 2005). O gênero *Ehrlichia* consiste em seis espécies formalmente descritas: *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia ewingii*, *Ehrlichia minasensis*, *Ehrlichia muris* e *Ehrlichia ruminantium*, que acometem animais de companhia e selvagens de várias partes do mundo (PETER et al., 2020; RAR et al., 2020; CÂNDIDO et al., 2023). Carrapatos dos gêneros *Rhipicephalus*, *Amblyomma* e *Ixodes* são considerados os principais vetores na transmissão desses patógenos para animais, sendo a espécie *Rhipicephalus sanguineus*, conhecido vulgarmente como “carrapato vermelho do cão”, frequentemente associada a infecções por *E. canis* em cães (OLIVEIRA et al., 2019; SEBASTIAN et al., 2021).

Infecções humanas pela espécie *E. chaffeensis* vem sendo registradas desde 1986, quando se aumentou a conscientização sobre *Ehrlichia* spp. como um patógeno zoonótico (MAEDA et al., 1987). Mais de duas décadas depois foi levantada a hipótese de que roedores eram possíveis hospedeiros vertebrados de *E. chaffeensis* (CAO et al., 2000). Entretanto, até o presente momento a detecção dessa espécie só foi possível em roedores selvagens que habitam o continente asiático (CAO et al., 2000; CHAO et al., 2005; CHAE et al., 2008). Em contrapartida, o agente responsável pela AGH já foi reportado em roedores selvagens em diversos continentes (NIETO & FOLEY, 2009; ROSSO et al., 2017; ZHENG et al., 2018), sendo em alguns casos a proximidade desses animais com os humanos considerado um fator de risco, já que algumas espécies, como a *Tamias ochrogenys*, já demonstraram ser capazes de sustentar longos períodos de infecção pelo *A. phagocytophilum* (NIETO & FOLEY, 2009). A detecção molecular do mesmo agente também foi

observada em DNA fecal de morcegos da espécie *Rhinolophus hipposideros* no interior da França (AFONSO & GOYDADIN, 2018), e nas espécies *Pipistrellus pipistrellus* e *P. kuhlii* presentes na Rússia, onde também foi possível a detecção de *Ehrlichia* spp. (ZABASHTA et al., 2019). Exemplares da espécie *Didelphis virginiana* já demonstraram potencial para atuarem como hospedeiros de *A. phagocytophilum*, primeiro nos Estados Unidos (KESSING et al., 2012) e anos depois no México (ROJERO-VASQUÉZ et al., 2017) quando também foi possível o diagnóstico deste agente na espécie *Didelphis marsupialis*.

Apesar da ocorrência de espécies da família Anaplasmataceae transmitidas por carrapatos em uma variedade de vertebrados, poucos estudos relataram até o momento evidências sorológicas e moleculares desses agentes em marsupiais, sendo o conhecimento sobre a presença de agentes do gênero *Ehrlichia*, por exemplo, restrito a espécies que habitam continente sul-americano (LOPES et al., 2018; ANDRÉ et al., 2022; TARRAGONA et al., 2022).

Poucos estudos foram realizados até o momento no Brasil a respeito da prevalência de agentes da família Anaplasmataceae em pequenos mamíferos silvestres. Um estudo realizado por Benevute et al. (2017) observou uma prevalência dos agentes da família Anaplasmataceae parasitando roedores do Brasil variando entre 1,96% e 2,40% para indivíduos do gênero *Anaplasma* e entre 0,44% e 1,09% para agentes do gênero *Ehrlichia*. Em estudo realizado por Wolf et al. (2016), no qual houve a investigação da circulação de *Ehrlichia* e *Anaplasma* spp. em pequenos mamíferos capturados no Pantanal do Mato Grosso do Sul, foi detectado a presença de um genótipo apresentando 99% de similaridade com *Anaplasma* spp. em um roedor da espécie *Hylaeamys megacephalus*. Braga et al. (2018), por sua vez, detectaram a presença de fragmentos genômicos de espécies dessa família em 4/24 (16,7%) cotias capturadas na Reserva Ambiental de Itapiracó no estado do Maranhão, que eram filogeneticamente compatíveis com a espécie *Ehrlichia canis*. Mais recentemente, Vieira et al. (2022) detectaram em capivaras a presença de uma nova espécie de *Anaplasma* sp. e de *Ehrlichia* sp. através de técnicas moleculares e de sequenciamento visando os genes *16S rDNA*, *dsb* e *sodB* e *groEL*.

Em relação aos marsupiais, o número de trabalhos visando a detecção de agentes dessa família é ainda menor sendo eles restritos as regiões sudeste, centro-oeste e nordeste do Brasil (GUIMARÃES et al., 2018; LOPES et al., 2018; ANDRÉ et al., 2022; BRAGA et al., 2023). Guimarães et al. (2018) detectaram a presença de um novo genótipo de *Ehrlichia* sp., que se assemelhava de forma íntima a genótipos de *E. Canis* previamente encontrados em espécies domésticas e selvagens, em um exemplar da espécie *Didelphis aurita* capturado no estado do Rio de Janeiro. O mesmo feito foi realizado por André et al. (2022) quatro anos depois na espécie *Didelphis abiventris*. Um novo genótipo também foi encontrado por Lopes et al. (2018) em um exemplar da espécie *Didelphis albiventris* presente em Natal, estado do Rio Grande do Norte, cidade que deu nome à nova variante encontrada, chamada de *Ehrlichia* sp. variante Natal. Mais recentemente, Braga et al. (2023) obtiveram através da utilização da técnica de PCR positividade em oito (17,77%) amostras oriundas da espécie *Didelphis marsupialis* para *Ehrlichia* spp. baseando-se no gene *dsb*.

Já em morcegos, Ikeda et al. (2021) observaram positividade para *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp. e *Neorickettsia* spp. em amostras de DNA extraídas de ectoparasitos, sangue e baço de morcegos não-hematófagos pertencentes a uma área periurbana da cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. Recentemente, De Mello et al. (2023) detectaram o DNA de *Neorickettsia* sp. através de Nested PCR baseada no *16SrDNA* em amostras de fígado de morcegos hematófagos, sendo o primeiro relato de bactérias desse gênero nesse grupo de quirópteros.

2.5 Métodos de Diagnóstico de Agentes Infeciosos das Famílias Anaplasmataceae e Mycoplasmataceae em Pequenos Mamíferos Silvestres

2.5.1 Diagnóstico citológico

A citologia é o exame que busca classificar e entender um determinado grupo de células presente em diferentes fluídos corporais e tecidos (RASKIN & MEYER, 2009). O diagnóstico de hemoparasitoses pode ser feito através da confecção de esfregaços sanguíneos feitos a partir de uma gota de sangue extraído por punção venosa e devidamente corados por corantes do tipo Romanowsky ou panótico rápido (VIDAL, 2013; THRALL, 2014).

Na microscopia os hemoplasmas podem ser visualizados como estruturas basofílicas podendo assumir o formato cocóide, em bastão ou anel, e podendo ser encontrados individualmente, agrupados, em pares (diplococos) ou em cadeias ao longo da superfície dos eritrócitos (NEIMARK et al., 2001; TANAKA et al., 1965).

Em relação aos agentes da família Anaplasmataceae, estes podem ser visualizados como estruturas basofílicas de formato cocóide a elipsóide, que estão presentes em vacúolos intracitoplasmáticos formando mórulas em células de origem hematopoiética (POPOV et al., 1998).

Embora essa técnica possua grandes vantagens como, o baixo custo, ser pouco invasiva, apresentar uma alta segurança, permitir ampla amostragem e um curto tempo entre a realização da técnica e o resultado, a sua eficiência está diretamente associada a execução de uma boa fase pré-analítica, ou seja, uma coleta adequada e uma coloração que evidencie características citoplasmáticas e nucleares (RASKIN & MEYER, 2009). Além disso, essa técnica apresenta uma baixa sensibilidade, sendo cocos de hemoplasmas e mórulas frequentemente ausentes em lâminas de animais infectados (SYKES & TASKER, 2013; VIDAL, 2013). Ademais, a alta especificidade do exame citológico é proporcional ao nível de experiência do profissional realizando a técnica. A presença de artefatos gerados por colorações indesejadas e outros tipos de inclusões na lâmina de esfregaço sanguíneo podem levar a um diagnóstico falso positivo (THRALL, 2014). A presença de vestígios nucleares em eritrócitos como o corpúsculo de Howell-Jolly e o pontilhado basofílico podem ser facilmente confundidos por profissionais inexperientes com o parasitismo de cocos de hemoplasmas (THRALL, 2014; STOCKHAM & SCOTT, 2011). Por outro lado, a presença de inclusões virais em leucócitos, como por exemplo o corpúsculo de Lentz, podem ser facilmente confundidas com a infecção por agentes da família Anaplasmataceae (THRALL, 2014).

2.5.2 Diagnóstico sorológico

Essa técnica consiste no ensaio diagnóstico baseado na detecção de anticorpos séricos de animais infectados. A utilização de técnicas sorológicas para o diagnóstico de hemoplasmas se resumem a animais domésticos até o presente momento a animais de companhia, sendo uma excelente alternativa para casos em que se deseja superar lacunas deixadas pelo diagnóstico molecular, isto é, situações em que a bacteremia se apresente baixa após o início do tratamento com antibióticos ou em situações em que o hospedeiro apresente um status de portador crônico (WOLF-JACKEL et al., 2010).

No entanto, os dados publicados sobre esse tipo de diagnóstico se demonstram promissores para futuros estudos a respeito da patogênese, podendo ter aplicação em diagnósticos de hemoplasmoses em animais silvestres (WILLI et al., 2007; WOLF-JACKEL et al., 2010).

Por outro lado, o uso isolado de técnicas sorológicas para o diagnóstico de espécies da família Anaplasmataceae em animais silvestres é raro, mesmo a nível experimental, sendo poucos trabalhos encontrados na literatura com esse objetivo (NICHOLSON et al., 1998; PUSTERLA et al., 1999). Em contrapartida, sua associação com técnicas moleculares pode auxiliar de forma complementar quando se tem por objetivo elucidar possíveis infecções superadas tanto em animais domésticos, como em animais silvestres (ANDRÉ et al., 2010; ÇETINKAYA et al., 2016).

2.5.3 Diagnóstico molecular

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma técnica molecular poderosa e amplamente utilizada no diagnóstico de hemoparasitoses em animais domésticos e selvagens. Essa técnica de diagnóstico se assemelha a uma forma elementar e in vitro da replicação do DNA, um processo fisiológico usado por todas as células vivas para duplicar seu material genético antes de divisão celular (JALALI et al., 2017). A técnica de PCR consiste na multiplicação de um trecho específico do DNA (gene completo ou parte dele) através de ciclos repetidos de aquecimento e resfriamento de um mix contendo o DNA molde (BAYNES & DOMINICZAK, 2009). Comparada a outras técnicas de diagnóstico a PCR apresenta uma alta sensibilidade visto que apresenta alta eficiência na amplificação de baixas quantidades de DNA alvo na maioria dos tecidos vivos, resultando em milhões de cópias com apenas um fragmento de DNA (JALALI et al., 2017).

Estudos têm mostrado o uso de diferentes genes conservados como alvo para a detecção de agentes patogênicos da família Anaplasmataceae, tais como: o gene *16S rDNA*, o gene que codifica a enzima citrato sintetase (*gltA*), o operon *groESL*, genes responsáveis por codificação de proteínas formadoras das ligações dissulfeto (*dsb*) e genes que codificam outras proteínas de superfície (*OMPs*) (DUMLER et al., 2001). O diagnóstico molecular de hemoplasmas também pode ser realizado pela amplificação do fragmento do gene *16S rDNA* (HIDALGO-HERMOSO et al., 2022; MAGGI, 2013; SANTOS et al., 2019; PONTAROLO et al., 2021). Mas embora seja usado com frequência o gene *16rRNA* não é capaz de fornecer um diagnóstico preciso quando utilizado de forma isolada para a identificação ao nível de espécie de bactérias das famílias Anaplasmataceae e Mycoplasmataceae filogeneticamente semelhantes. De forma complementar a utilização de outros marcadores genéticos como genes de limpeza e o sequenciamento parcial ou completo de genomas podem diminuir de forma significativa os riscos de identificação incorreta (VOLOKHOV, 2012, 2017).

Tratando-se de hemoplasmas vale salientar que até mesmo as espécies de *Mycoplasma* mais conhecidas por afetarem animais de companhia (*Mycoplasma haemocanis* e *Mycoplasma haemofelis*) não são distinguíveis em primers que codificam sequências do gene *16S rDNA*, necessitando de marcadores mais específicos como *rpoB*, *rpoC*, *gyrB*, *dnaK*, *23S rRNA* (SYKES & TASKER, 2013; MILLÁN et al., 2021; VALENTE et al., 2021). Por esse motivo, hemoplasmas detectados a partir de amostras oriundas de animais silvestres, que foram submetidas ao sequenciamento parcial com base no gene *16S rDNA* e que apresentam uma semelhança genética considerada muito semelhante a espécies conhecidas (>97%) são frequentemente classificadas como “espécies semelhantes”.

Da mesma forma algumas espécies de *Ehrlichia* spp. também apresentam uma grande semelhança genética. A espécie causadora da AGH, por exemplo, possui membros do genogrupo *Anaplasma phagocytophilum* intimamente relacionados, senão co-específicos (ALTAY et al., 2022). Grande parte dessa semelhança genética é baseada em análises de sequência do gene *16S rDNA*. Análises adicionais de sequências gênicas e análises antigênicas são necessárias para

esclarecer as posições taxonômicas desses agentes com precisão (NICHOLSON et al., 1998; ALTAY et al., 2022). Adicionalmente, quase todos os primers publicados para detecção de hemoplasmas apresentam potencial para amplificar de forma cruzada o gene *16S rDNA* de outras espécies bacterianas que são estreitamente relacionadas aos hemoplasmas. Logo, é altamente recomendado que após a reação de PCR seja realizado o sequenciamento direto de “amplicons” (MILLÁN et al., 2021).

O sequenciamento de nova geração (NGS) é uma alternativa para a identificação de novas espécies de hemoparasitos. O NGS, por exemplo, é capaz de amplificar e detectar de forma aleatória e imparcial todo e qualquer microrganismo que possivelmente possa estar presente em uma amostra (GU et al., 2019). Entretanto, essa técnica pode apresentar uma sensibilidade inferior a apresentada pela técnica de PCR em casos em que o patógeno se encontre em baixas quantidades na amostra (ANIS et al., 2018). Outro fator a ser considerado é o fato de que o NGS sequencia todo e qualquer material genético presente numa amostra. Dessa forma, os produtos de ácido nucléico que possuem como origem as células do hospedeiro também serão amplificadas. Logo, milhões de leituras de NGSs precisarão ser analisadas a partir de ferramentas bioinformáticas para identificar o patógeno de interesse (HATTORI et al., 2020).

A ausência de protocolos específicos para a identificação de hemoplasmas na vida selvagem demanda que cada caso seja avaliado individualmente levando em consideração o tipo de amostra e o patógeno alvo (MILLÁN et al., 2021). A eficiência de uma reação de PCR não é igual para a detecção de hemoplasmas em diferentes tipos de tecido. A intensidade da presença de DNA do patógeno nesse caso está inversamente associada ao tempo de infecção (MILLÁN et al., 2021). A comparação entre diferentes tipos de tecido no diagnóstico molecular, embora seja indicada, nem sempre é viável quando se trata de animais silvestres, especialmente no caso de pequenos mamíferos. Logo, na ausência do sangue total, fragmentos de tecidos que participam ativamente na manutenção dos componentes sanguíneos, como o fígado e baço, são frequentemente utilizados para o diagnóstico molecular de patógenos em pequenos mamíferos (BERTÃO-SANTOS et al., 2023; MELLO et al., 2023).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Aspectos Éticos de Pesquisa e Licenças Envolvendo Coletas de Mamíferos Hospedeiros

Todos os procedimentos na coleta das amostras foram realizados após a sedação dos animais, e seguem o protocolo experimental aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Fundação Oswaldo Cruz (L- 036/2018).

Os animais coletados foram taxidermizados e seus esqueletos preparados para depósito na coleção científica do LABPMR/IOC-Fiocruz e na coleção do Museu Nacional, UFRJ. Todas as expedições de coleta estão de acordo com as licenças de captura do ICMBIO, número 13373 para todo o território nacional.

3.2 Áreas de Estudo

As áreas de estudos se concentram em áreas adjacentes a cidade de Rio Branco localizada no estado do Acre (Figura 1) e representam 6 localidades diferentes inseridas em mata densa de

regiões de floresta amazônica, sendo elas nomeadas como: Área de proteção ambiental do Lago Amapá (APA do Amapá) (Figura 2), Colégio Agrícola (Figura 3), EMBRAPA (Figura 4), Floresta Piracema (Figura 5), Santa Cecília (Figura 6) e São Raimundo (Figura 7). As localidades estão inseridas em matrizes urbanas (Santa Cecília e São Raimundo) ou em matrizes rurais (APA do Amapá, EMBRAPA, Colégio Agrícola e Floresta Piracema). Em ambos os casos há a modificação da paisagem natural por ações antrópicas e o contato evidente entre animais silvestres e o Homem, alertando para a possível ocorrência de zoonoses na região estudada.



Figura 1. Áreas de captura de pequenos mamíferos silvestres nas regiões periurbanas da cidade de Rio Branco, Acre, e suas respectivas coordenadas. Barra de escala: 7.000 m. Fonte: Google Earth.

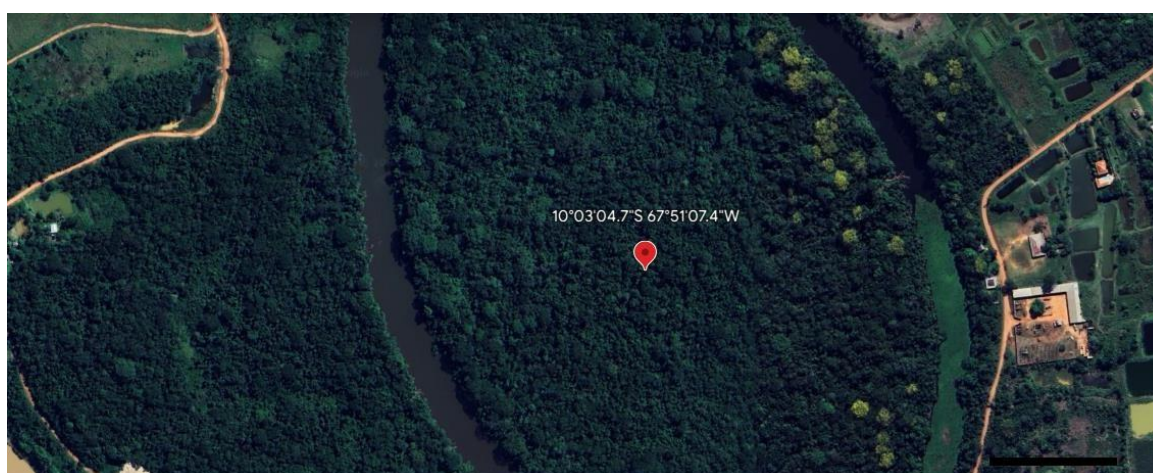


Figura 2. Área de coleta de pequenos mamíferos silvestres APA do Amapá. Barra de escala: 200 m. Fonte: Google Earth.



Figura 3. Área de coleta de pequenos mamíferos silvestres Colégio agrícola. Barra de escala: 200 m. Fonte: Google Earth.

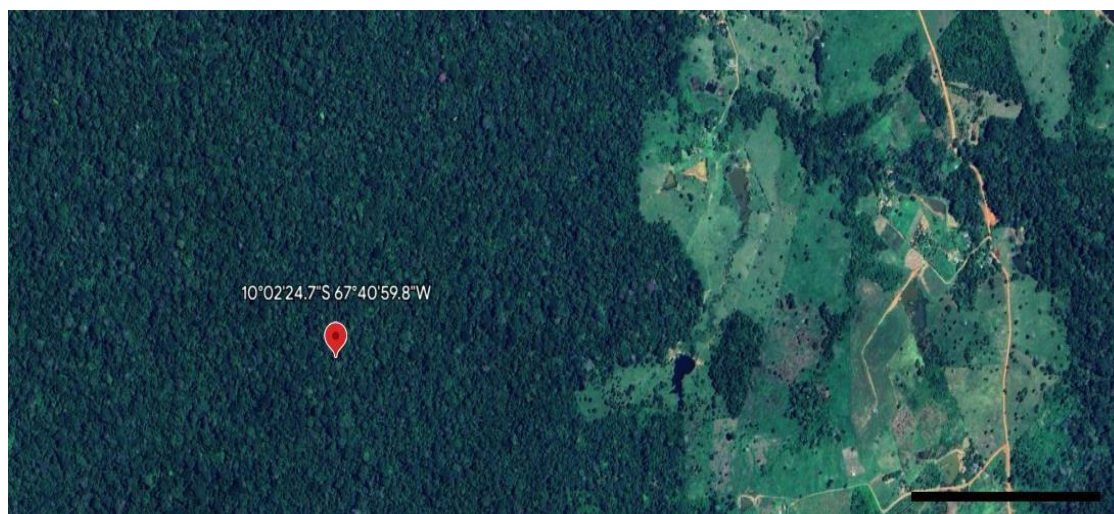


Figura 4. Área de coleta de pequenos mamíferos silvestres EMBRAPA. Barra de escala: 600 m. Fonte: Google Earth.



Figura 5. Área de coleta de pequenos mamíferos silvestres Floresta Piracema. Barra de escala: 400m. Fonte: Google Earth.

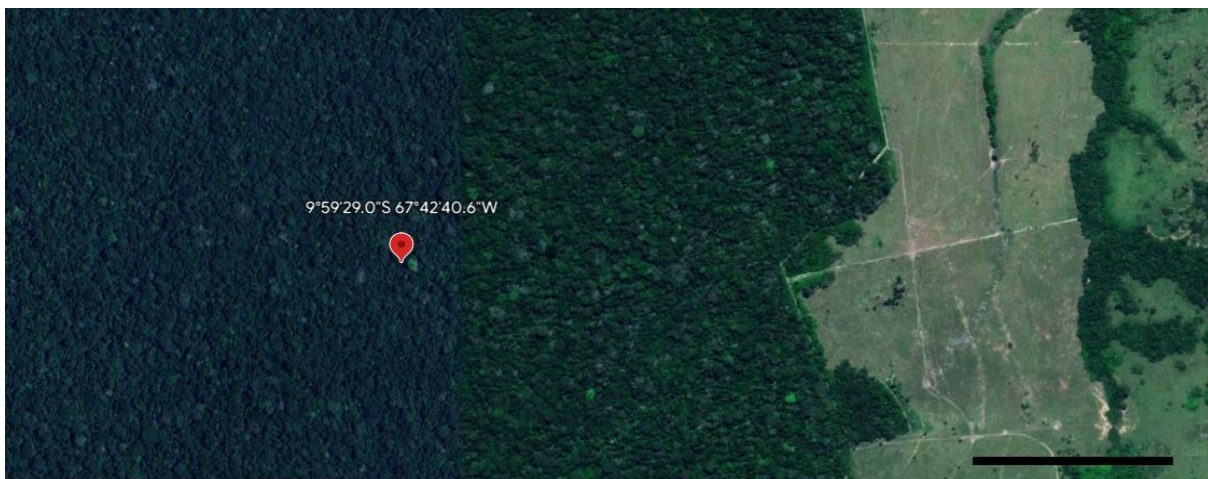


Figura 6. Área de coleta de pequenos mamíferos silvestres Santa Cecília. Barra de escala: 400 m. Fonte: Google Earth.

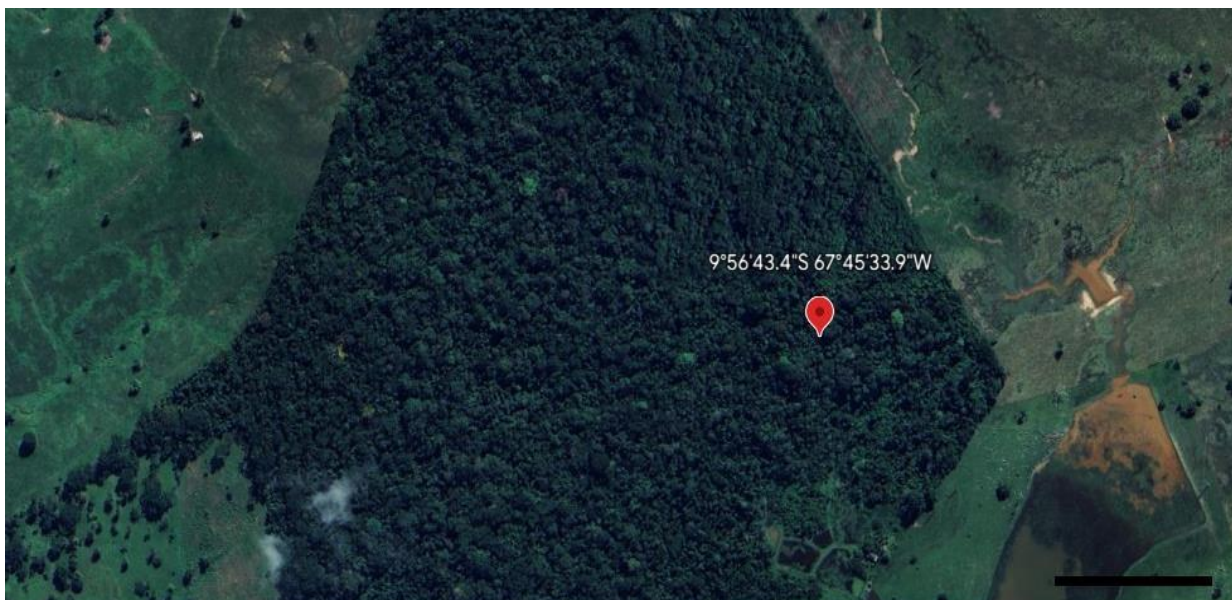


Figura 7. Área de coleta de pequenos mamíferos silvestres São Raimundo. Barra de escala: 200 m. Fonte: Google Earth.

As regiões periurbanas avaliadas nesse trabalho apresentam diferentes graus de fitofisionomias (Figura 8). As regiões da EMBRAPA e de Santa Cecília são caracterizadas por uma extensa área de floresta com pouca influência de antropização. Em contraste, a região de São Raimundo é o local mais próximo do centro urbano de Rio Branco, e por consequência, a área que apresenta o maior grau de antropização. As demais áreas de coleta apresentam graus intermediários de fitofisionomias.

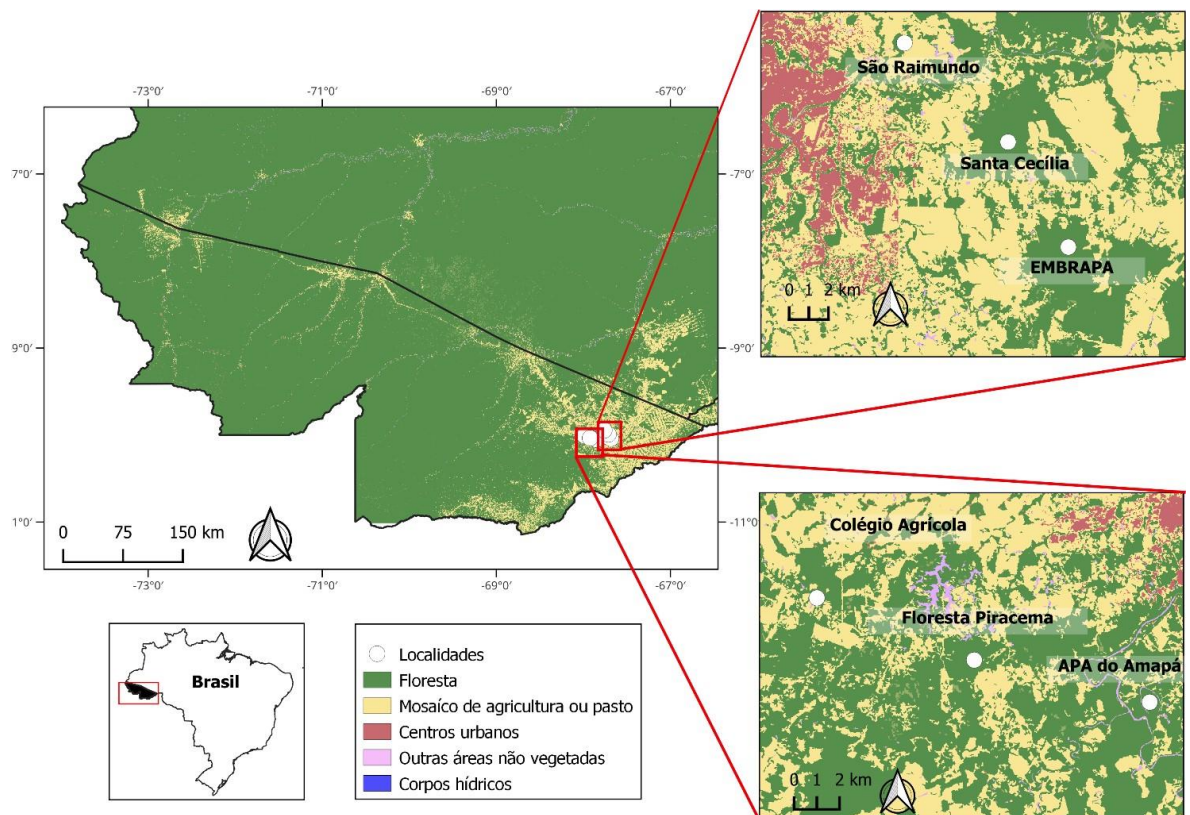


Figura 8. Áreas de captura de pequenos mamíferos silvestres em regiões com diferentes fitofisionomias na região periurbana da cidade de Rio Branco, Acre.

3.3 Tamanho da Amostragem e Coleta

A expedição de campo, realizada pelo Laboratório de Biologia e Parasitologia de Pequenos Mamíferos Silvestres Reservatórios (LABPMR/IOC/FIOCRUZ), na qual foram feitas as coletas das amostras utilizadas nesse estudo foi realizada no período correspondente entre 29 de outubro a 09 de novembro de 2021 por conveniência não probabilística. O número total de amostras coletadas nas seis regiões localizadas dentro das áreas periurbanas da cidade de Rio Branco foi de 186 pequenos mamíferos silvestres, sendo 111 de pequenos mamíferos voadores e 75 de pequenos mamíferos não voadores. Os animais foram capturados em armadilhas modelos Tomahawk® (40,64cm x 12,70cm x 12,70cm), Sherman® (7,62cm x 9,53cm x 30,48cm) e redes de neblina para a captura de quirópteros (Figura 9), tendo como base um esforço de captura de 120 armadilhas por noite. Todos os espécimes capturados foram removidos para um laboratório de campo respeitando as normas de biossegurança de nível 3. Os animais capturados foram eutanasiados para a coleta de amostras de sangue e órgãos.

Antes do protocolo de eutanásia os animais foram pesados para o cálculo da dose de sedação. Sob a supervisão de um médico veterinário responsável, foi realizada a assepsia com álcool 70% e a anestesia utilizando-se agulhas de tamanho 13 x 0,38 mm acoplada em seringa de 1ml, e introduzidas de forma intramuscular (IM) na parte externa do músculo quadríceps femoral dos animais ou de forma intraperitoneal (volume máximo = 0,05 mL por membro para pequenos

mamíferos com menos de 100 g). Em seguida, os animais permaneceram no saco até o início do efeito da anestesia. O protocolo anestésico incluiu a associação de 200mg/Kg de Cloridrato de Quetamina à 10% e 20 mg/Kg de Cloridrato de Xilazina à 2%, na proporção de 2:1. Dose = 0,30 ml / 100 g peso vivo (P.V.). O tempo de duração foi de 20 a 30 minutos, sendo a manutenção da anestesia, quando necessário feita com metade da dose inicial. Os animais foram retirados do saco quando constatado a ausência de consciência, e colocados em decúbito dorsal para verificação do reflexo corneal e resposta à estímulo nociceptivo.

Caso não houvesse ocorrido a morte pela exsanguinação, administrava-se Tiopental Sódico (Dosagem = 120 mg/Kg) por via intracardíaca. A dose utilizada foi de 0,24 ml/100 g peso corpóreo de Tiopental Sódico à 5%. Ao final do procedimento foi realizada nova avaliação dos parâmetros cardiopulmonares e repetida a administração de Tiopental caso fosse necessário. Somente após a constatação clínica da morte do animal foram feitas a coleta de amostras biológicas.

Os animais capturados foram identificados ao nível de espécie, através de análises de taxonomia integrativa, incluindo análises morfológicas, citogenéticas e moleculares (DALAPICOLLA & PERCEQUILLO, 2020). Além disso, informações inerentes aos pequenos mamíferos como o sexo, tamanho e peso (Figura 9), e inerentes ao local, como o bioma foram obtidos.



Figura 9. A e B - Instalação de redes de neblina para a captura de quirópteros. C - Pesagem de morcego capturado. D - Coleta de valores relacionados ao tamanho do morcego da espécie *Artibeus planirostris* capturado. Fonte: Arquivo Pessoal.

As amostras biológicas coletadas foram recebidas pelo Laboratório de Hemoparasitos e Vetores (LHV-UFRRJ) e consistiam em fragmentos de parênquima hepático, armazenados em solução de RNAlater®. As amostras foram mantidas em temperatura ambiente até a chegada no laboratório, onde foram estocadas em freezer -80° C até que fosse feito o procedimento de extração de DNA. Para o diagnóstico citológico de infecção por hemoplasmas foram preparados dois esfregaços sanguíneos a partir de amostras de sangue fresco dos pequenos mamíferos coletados.

3.4 Diagnóstico Direto em Lâmina de Esfregaço Sanguíneo

Foram coletadas amostras de sangue fresco para a confecção do esfregaço sanguíneo em lâmina à campo. Em seguida as lâminas foram fixadas em metanol durante dez minutos, secas ao ar e armazenadas em caixas de lâminas. As lâminas confeccionadas foram enviadas para o LHV para serem coradas pelo método de Giemsa (1:10) por 45 minutos e submetidas a microscopia óptica através da objetiva de imersão (1000x).

O diagnóstico direto em lâmina foi realizado a partir da visualização de cocos em eritrócitos sugestivos de micoplasmas hemotrópicos e de mórulas em leucócitos e plaquetas que sugerem a infecção pelos gêneros Ehrlichia e Anaplasma. As lâminas foram analisadas por dois observadores para confirmação do diagnóstico. Foram obtidas imagens de eritrócitos contendo estruturas compatíveis com cocos e de leucócitos apresentando mórulas bacterianas através do equipamento Olympus BX-51 no Laboratório Multiusuário de Bioimagem do Departamento de Parasitologia Animal – LAMBIO (DPA/IV/UFRRJ).

3.5 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

3.5.1 Extração de DNA de amostras de parênquima hepático

Para a extração de DNA total das amostras de parênquima hepático foi utilizado o kit “DNeasy Blood and Tissue” (Qiagen, Hilden, Alemanha) seguindo orientações do fabricante com algumas adaptações. 186 amostras de fígado foram cortadas em fragmentos de 25mg com auxílio de tesoura oftálmica cirúrgica de ponta fina e armazenados em tubos de polipropileno 1,5 ml. Em seguida foram adicionados 180µl do Buffer ALT ao tubo contendo os fragmentos de fígado. Com o auxílio de uma tesoura oftálmica cirúrgica de ponta fina as amostras de 25mg de fígado foram cortadas em fragmentos menores. A fim de evitar contaminação, a tesoura foi higienizada com Hipoclorito de Sódio a 5%, álcool 70% e água destilada e foi flambada em chama fria, entre cada amostra. Posteriormente foi adicionado 20µl de Proteinase K, seguido de homogeneização no Vortex por 15 segundos. As amostras foram então incubadas à 56°C no termobloco por 12 horas. Após este processo, as amostras foram homogeneizadas no Vortex por 15 segundos e, em seguida, foram adicionados 200µl de Buffer AL e 200µl de etanol absoluto (100%). Os tubos foram centrifugados a uma velocidade de 6000 x g por 1 minuto. Em seguida o precipitado foi descartado juntamente com o tubo coletor. A coluna com a sílica foi reservada e introduzida em um novo tubo de 2ml onde na etapa seguinte foi adicionado 500µl de Buffer AW1. Após nova centrifugação a 6000 x g por 1 minuto, o precipitado obtido foi descartado novamente. A coluna foi novamente inserida em um novo tubo de polipropileno de 2ml onde foi adicionado 500µl de Buffer AW2. Nessa etapa foram feitas duas centrifugações, uma a 20000 x g por 3 minutos para secar a membrana da coluna e outra a 20000 x g por 1 minuto para eliminar possíveis resíduos de

álcool. A coluna foi colocada em um novo microtubo de polipropileno de 1,5ml que foi previamente identificado com o número da amostra. Na última etapa foram pipetados 200µl de Buffer AE delicadamente na membrana de cada coluna. As amostras foram incubadas por 1 minuto em temperatura ambiente e centrifugadas a 6000 x g por 1 minuto para eluir o DNA. A quantificação e avaliação da qualidade do DNA extraído foi realizada através do espectrofotômetro NanoDrop® 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc, Wilmington, DE, EUA). Posteriormente a medição foi feita a padronização das amostras de DNA através de alíquotas na concentração de 60 ng/µL.

3.5.2 Reação em cadeia da polimerase

Para o diagnóstico molecular de hemoplasmas foram utilizados os primers Myco 322s e Myco 938as (Tabela 1) que permitem a amplificação de fragmento de aproximadamente 620 pares de base (pb) do gene *16S rDNA* (VARANAT et al., 2011).

As reações de PCR foram realizadas com volume final de 25 µL, sendo 1,5mM de Mg, 0,2 mM de dNTPs, 0,5µM de cada primer, 1,25U de Taq DNA Polimerase e 180ng de DNA. As condições de termociclagem foram de: 95°C por 2 minutos, 55 ciclos a 94°C por 15 segundos, 68°C por 15 segundos e 72°C por 18 segundos, e extensão final a 72°C por 1 minuto.

Para o controle positivo foi utilizado o DNA de um felino doméstico positivo para a espécie *Mycoplasma haemofelis*, e para o controle negativo foi utilizado água ultrapura (Nuclease-Free Water, Ambion®).

Na tentativa de otimizar o diagnóstico molecular de bactérias da família Anaplasmataceae foram utilizados quatro pares de primers (Tabela 1). Os primers EHR16SD e EHR16SF, responsáveis por amplificar produtos de aproximadamente 345 pb do gene *16S rDNA* de indivíduos da família Anaplasmataceae (PAROLA et al., 2000), foram utilizados em reações com volume final de 25 µL, sendo 3,0mM de Mg, 0,4mM de dNTPs, 0,5µM de cada primer, 1U de Taq DNA Polimerase e 180ng de DNA. As condições de termociclagem foram de: 95°C por 5 minutos, 35 ciclos a 95°C por 30 segundos, 54°C por 30 segundos, 72°C por 90 segundos e 72°C por 5 minutos.

Já os primers ECC e ECB, que amplificam 500 pb do gene *16S rDNA* da família Anaplasmataceae (DAWNSON et al. 1996), foram utilizados em reações com volume final de 25 µL, sendo 3,0mM de Mg, 0,2mM de dNTPs, 500nM de cada primer, 1,25U de Taq DNA Polimerase e 180ng de DNA. As condições de termociclagem foram de: 95°C por 5 minutos, 35 ciclos a 95°C por 30 segundos, 62°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos e extensão final a 72°C por 5 minutos.

Os primers Ecp28-F e Ecp28-R, que amplificam 843 pb do gene p28 da família Anaplasmataceae (MCBRIDE et al., 2000), foram utilizados em reações com volume final de 25 µL, sendo 2,5mM de Mg, 0,2mM de dNTPs, 500nM de cada primer, 1,25U de Taq DNA Polimerase e 180ng de DNA. As condições de termociclagem foram de: 95°C por 5 minutos, 40 ciclos a 95°C por 30 segundos, 55°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos e extensão final a 72°C por 5 minutos.

Os primers DSB 330 e DSB 728, que amplificam 409 pb do gene *Dsb* da família Anaplasmataceae (LA BRUNA et al., 2007), foram utilizados em reações com volume final de 25 µL, sendo 2,5mM de Mg, 0,4mM de dNTPs, 0,4µM de cada primer, 1U de Taq DNA Polimerase e 180ng de DNA. As condições de termociclagem foram de: 95°C por 2 minutos, 50 ciclos a 95°C por 15 segundos, 58°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos e extensão final a 72°C por 5 minutos.

Para o controle positivo foi utilizado o DNA de um cão doméstico positivo para as espécies *Anaplasma platys* e *Ehrlichia canis*, e para o controle negativo também foi utilizado água ultrapura (Nuclease-Free Water, Ambion®).

As amostras consideradas positivas nas reações de PCR onde foram utilizados os primers Myco 322s e Myco938as para hemoplasmas e EHR 16SD e EHR 16SR para Anaplasmataceae foram submetidas a uma Touchdown PCR, que tinha como objetivo amplificar um fragmento maior, de aproximadamente 1600 pb, do gene 16SrDNA, para posterior sequenciamento e análise filogenética. Para essa reação foram utilizados os primers 16SD e 16SR (BECKER et al., 2020). As reações foram realizadas com volume final de 25 µL, sendo 2,5mM de Mg, 0,2 mM de dNTPs, 0,4µM de cada primer, 1,5U de Taq DNA Polimerase e 180ng de DNA. As condições de termociclagem foram de: 95°C por 2 minutos, 10 ciclos a 95°C por 30 segundos, 61°C diminuindo 0,5°C a cada ciclo por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, seguido de 30 ciclos a 95°C por 30 segundos, 57°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, e extensão final a 72°C por 7 minutos.

Tabela 1. Primers, sequências, tamanho do amplicon e gene alvo utilizados em ensaios de PCR convencional e touchdown.

Primer	Sequência de DNA (5'-3')	Tamanho do fragmento	Gene	Referência
Myco 322s Myco 938as	GCCCATATTCCTACGGGGAAGCAGCAG CTCCACCACTTGTTTCAGGTCCCCGTC	620pb	<i>16SrDNA</i>	VARANAT et al., 2011
EHR 16SD EHR 16SR	GGTACCYACAGAAGAAGTCC TAGCACTCATCGTTTACAGC	345pb	<i>16SrDNA</i>	PAROLA et al., 2000
ECC ECB	AGAACGAACGCTGGCGGCAAGC CGTATTACCGCGGCTGCTGGCA	478pb	<i>16SrDNA</i>	DAWSON et al., 1996
Ecp28-F Ecp28-R	ATGAATTGCAAAAAAATTCTTATA TTAGAAGTTAAATCTTCCTCC	843pb	<i>p28</i>	McBRIDE et al., 2000
DSB 330 DSB 728	GATGATGTCTGAAGATATGAAACAAAT CTGCTCGTCTATTTTACTTCTTAAAGT	409pb	<i>Dsb</i>	LABRUNA et al., 2007
16SD 16SR	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG CTCAAACTGAAAGYCATCCGC	1450-1560pb	<i>16SrDNA</i>	BECKER et al., 2020

3.5.3 Eletroforese em gel de agarose

Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese por meio de gel de agarose na concentração de 1,5%. A corrida eletroforética foi de 45 minutos a 125V (5V/cm) em tampão TAE (Tris, acetato e EDTA). Foi utilizado um marcador de peso molecular de 100-15.000 pb (Invitrogen 1 Kb Plus DNA – ThermoFisher Scientific) para determinar a tamanho dos produtos amplificados. Posteriormente, os géis foram corados com brometo de etídio e visualizados sob luz UV nos fotodocumentadores E-Gel™ Imager System with UV Light Base (Thermo Fisher Scientific) e L-Pix Touch (Loccus) para que pudessem ser analisados quanto à presença e ausência de bandas.

3.6 Caracterização Molecular e Análise Filogenética

As amostras consideradas positivas nas reações de PCR onde foram utilizados os primers

Myco322s e Myco938as para *Mycoplasma* e EHR16SD e EHR16SR para Anaplasmatidae foram submetidas a uma Touchdown PCR, que tinha como objetivo amplificar um fragmento maior, de aproximadamente 1600 pb, do gene *16S rDNA*. Os produtos de PCR foram, em seguida, purificados utilizando o kit Wizard® Genomic DNA Purification e enviados para sequenciamento pelo método de Sanger (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977) no Centro de Pesquisa Sobre o Genoma Humano e Células Tronco (IB/USP).

Visando o aumento da cobertura de sequenciamento das amostras positivas para hemoplasmas foram enviados além dos primers 16SF e 16SR, dois primers internos, Myco322s e Myco938as, resultando em 4 cromatogramas para cada amostra. Já para o sequenciamento da amplificação dos primers EHR16SD e EHR16SR, foram enviados apenas os primers citados, resultando em dois cromatogramas para cada amostra.

O resultado do sequenciamento, os cromatogramas, foram analisados, editados e montados em “contigs” utilizando o programa CLC Main Workbench 23 (CLC Bio-Qiagen, Aarhus, Dinamarca). Em seguida, o algoritmo “Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool” (BLASTn) foi utilizado para identificar sequências similares na base de dados pública “National Center for Biotechnology Information” (ALTSCHUL et al., 1990).

A análise filogenética de micoplasmas hemotrópicos em morcegos foi construída a partir de um banco de dados de 1181pb do *16S rDNA* utilizando-se três sequências deste estudo sendo elas: *Mycoplasma* sp. em *Glossophaga soricina* (amostra número: 22052), em *Artibeus lituratus* (amostra número: 22108), e em *Carollia brevicauda* (amostra número: 22152) (Tabela 2). Outras sequências que compõem a análise foram selecionadas a partir de publicações existentes nesta área do conhecimento e baixadas através da base de dados Genbank.

Tabela 2. Identificação da amostra neste estudo, hospedeiro, local de origem da amostra, tamanho do “contig” após sequenciamento, e característica da sequência depositada.

ID Amostra	Hospedeiro	Local de Origem	"Contig" (pb)
22052	<i>Glossophaga soricina</i>	APA do Amapá	630
22108	<i>Artibeus lituratus</i>	EMBRAPA	550
22152	<i>Carollia brevicauda</i>	São Raimundo	1104

Para a análise filogenética foram utilizados um total de 86 sequências de *16S rDNA* de *Mycoplasma* spp. Dentre eles, 58 foram detectados em morcegos (KM538691, KM538692, KM538693, KM538695, MK295626, MK295627, MK295628, MK295630, KY356747, KY356748, KY356749, KY356750, KY356751, KY932682, KY932684, KY932685, KY932693, KY932695, KY932696, KY932721, KY932722, KY932723, MN687571, MN715763, MN710404, MN710405, MN710406, MN710410, MN710412, LR699022, KF713538, MN170512, MH245135, MH245147, MH245148, MH245149, MH245163, MH245164, MH245165, MH245169, MH245170, MH245171, MH245176, MH245180, MH245188, MH245189, MH245190, MH245191, MH245192, MH245193, MH245194, MZ048287, MZ048288, MZ048289, MZ048290, MZ048291, MZ048295, MZ048296), sete em roedores (KT215636, U82963, AB758434, AB758436, AB758440, KM203857, AY171918), três em primatas (KT314160, KC512401, KT314161), uma em quatis (KU554425), nove em cães e gatos (U88563, EU145745, AY150973, AY831867, AY150984, DQ157155, DQ825453, AY297712, AY383241), duas em capivaras (FJ667773, FJ667774) uma em ruminantes (JF931133), duas em

suínos (U88565, EU603330), uma no homem (GU562823). As sequências utilizadas como “outgroup” foram *Mycoplasmoides fastidiosum* (NR024987) e *Mycoplasma gallisepticum* (CP001872).

Os “contigs” gerados neste estudo foram alinhados com amostras de micoplasmas hemotrópicos de várias espécies animais e de todo o mundo usando o método ClustalW, com atenção e seleção especial às amostras de morcegos. A seleção das sequências deu-se através da busca em base de dados (Genbank) e escolha das que foram publicadas em revistas indexadas. A reconstrução filogenética foi realizada utilizando o método de máxima verossimilhança. O melhor modelo evolutivo foi Kimura-2 + G selecionado através do software jModelTest_2.1.4 (DARRIBA et al., 2012). As distâncias de divergência evolutiva foram calculadas utilizando parâmetros Kimura-2 (TAMURA, 1993). A combinação de grupos filogenéticos foi avaliada testando 500 réplicas de “Bootstrap”. Um total de 1181 posições foram analisadas ao final do conjunto de dados. As análises foram realizadas utilizando o software MEGA10.2 (KUMAR et al., 2016).

3.7 Análise estatística

A frequência de positividade para micoplasmas hemotrópicos e bactérias da família Anaplasmataceae só foi analisada na ordem Chiroptera devido ao baixo número de amostras positivas apresentado pelas ordens Rodentia e Didelphimorphia. A frequência de positividade para hemoplasmas detectados molecularmente foi associada através do teste Qui-quadrado ou exato de Fisher em nível de 5% de significância com as variáveis em relação ao local de coleta e inerentes ao animal como gênero do hospedeiro (*Artibeus* e *Carollia*) e sexo (macho e fêmea).

Para Anaplasmataceae a frequência de positividade para os animais positivos considerados positivos no exame citológico foi associada através do exato de Fisher em nível de 5% de significância com as mesmas variáveis citadas anteriormente para hemoplasmas. Todas as análises estatísticas básicas foram realizadas no BioEstat 5.3 (AYRES et al., 2007).

4 RESULTADOS

4.1 Frequência de Positividade no Exame Citológico e Molecular

Entre 29 de outubro e 09 de novembro de 2021 foram coletados 186 pequenos mamíferos selvagens, entre eles: 59,68% (n=111/186) morcegos (Figura 10), 23,12% (n=43/186) roedores e 17,20% (n=32/186) marsupiais, presentes em 6 localidades diferentes dentro da cidade de Rio Branco, Acre (Tabela 3). Com relação ao sexo dos animais coletados, entre morcegos foram coletados 60 machos, 49 fêmeas e 2 espécimes não tiveram seu sexo identificado. Dentre os roedores, foram coletados 14 machos e 29 fêmeas. Por fim, entre os marsupiais foram coletados 15 machos, 16 fêmeas e 1 espécime dessa ordem não teve o seu sexo identificado.

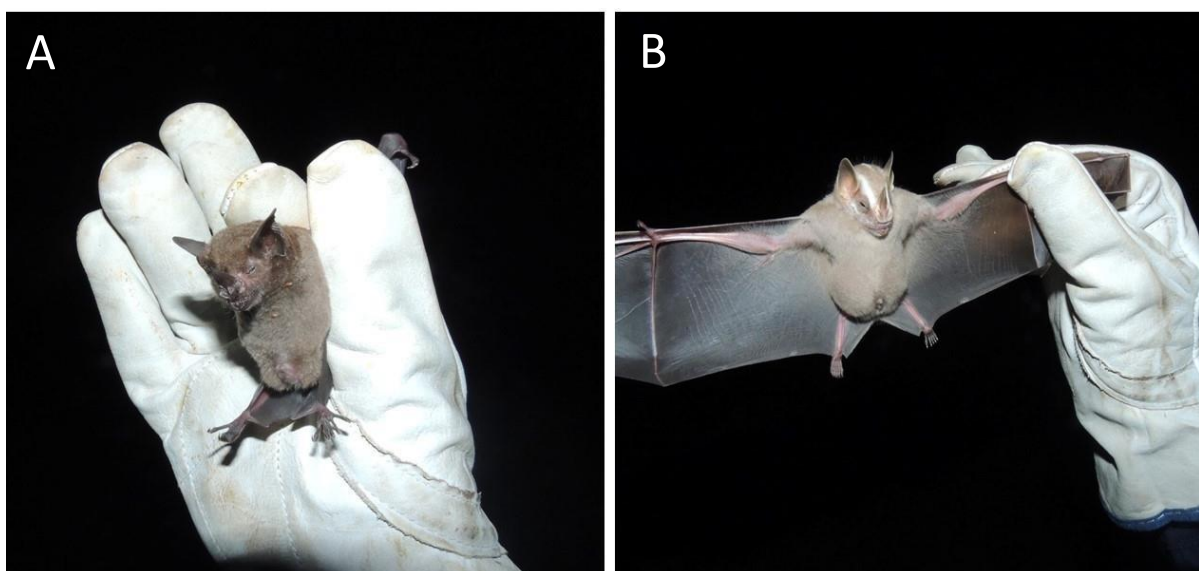


Figura 10. A - Espécime de *Carollia perspicillata* coletado. B - Espécime de *Platyrrhinus* sp. coletado. Fonte: Arquivo Pessoal.

Tabela 3. Número de pequenos mamíferos silvestres coletados separados por ordem, gênero, e área de estudo. Continua.

Táxons	Área de Estudo						Total
	Santa Cecília	EMBRAPA	Floresta Piracema	Colégio Agrícola	APA do Amapá	São Raimundo	
Chiroptera							
<i>Artibeus</i>	10	17	7	6	1	4	45
<i>Carollia</i>	1	7	3	3	5	7	26
<i>Desmondus</i>	0	0	0	3	0	0	3
<i>Gardnerycteris</i>	0	0	2	0	0	0	2
<i>Glossophaga</i>	0	0	0	0	3	0	3
<i>Hsunycteris</i>	0	0	2	0	2	0	4
<i>Lophostoma</i>	5	1	0	0	0	0	6
<i>Phyllostomus</i>	2	0	0	0	1	0	3
<i>Platyrrhinus</i>	0	0	0	0	1	0	1
<i>Rhinophylla</i>	0	0	0	1	1	0	2
<i>Sturnira</i>	1	0	1	5	1	0	8
<i>Uroderma</i>	1	3	0	1	3	0	8
Didelphimorphia							
<i>Caluromys</i>	0	0	0	1	0	0	1
<i>Didelphis</i>	0	1	1	1	0	0	3
<i>Marmosa (Micoureus)</i>	0	1	2	1	0	0	4

Tabela 3. Continuação

<i>Marmosops</i>	0	1	0	0	3	0	4
<i>Monodelphis</i>	1	2	0	3	0	0	6
<i>Philander</i>	1	0	0	3	10	0	14
Rodentia							
<i>Mesomys</i>	3	0	0	0	0	0	3
<i>Neacomys</i>	0	0	2	1	0	0	3
<i>Oecomys</i>	0	0	0	1	0	0	1
<i>Oligoryzomys</i>	0	0	0	0	0	1	1
<i>Proechimys</i>	23	9	0	2	0	1	35
Total	48	42	20	32	31	13	186

Na análise citológica das lâminas de esfregaço sanguíneo foi possível observar a presença de cocos em eritrócitos sugestivos de micoplasmas hemotrópicos em 1,61% (n=3/186) das lâminas. As espécies consideradas positivas nessa técnica de diagnóstico foram: *Artibeus planirostris* (n=1/3), *Carollia perspicillata* (n=1/3) e *Glossophaga soricina* (n=1/3), todas pertencentes a ordem Chiroptera. A espécie *Artibeus planirostris*, pertencente a ordem Chiroptera, foi responsável por apresentar a maior positividade na PCR para os hemoplasmas (n=7/27) (Tabela 4). Dentro da mesma ordem também foi possível observar resultados positivos nas espécies *Artibeus lituratus* (n=2/27), *Artibeus obscurus* (n=1/27), *Artibeus anderseni* (n=1/27), *Carollia perspicillata* (n=4/27), *Carollia brevicauda* (n=3/27), *Desmodus rotundus* (n=1/27), *Glossophaga soricina* (n=1/27), *Lophostoma silvicola* (n=1/27), *Sturnira giannae* (n=2/27), e *Phyllostomus hastatus* (n=1/27). As demais amostras positivas pertenciam às espécies *Proechimys simonsi* (n=1/27) e *Proechimys brevicauda* (n=1/27) da ordem Rodentia e *Philander canus* (n=1/27) da ordem Didelphimorphia.

Tabela 4. Número de pequenos mamíferos silvestres amostrados entre outubro e novembro de 2021 em regiões de floresta de Rio Branco, Acre, por espécie, e frequência de positividade para micoplasmas hemotrópicos através de análise citológica e PCR baseada no *16S rDNA*. Continua.

Espécie	N	Positivos na PCR	Positivos na citologia
<i>Artibeus lituratus</i>	10	2 (20,0%)	0,0
<i>Artibeus obscurus</i>	3	1 (33,3%)	0,0
<i>Artibeus planirostris</i>	31	7 (22,6%)	1 (3,2%)
<i>Artibeus anderseni</i>	1	1 (100,0%)	0,0
<i>Caluromys lanatus</i>	1	0,0	0,0
<i>Carollia brevicauda</i>	7	3 (42,9%)	0,0
<i>Carollia perspicillata</i>	19	4 (21,1%)	1 (5,3%)
<i>Desmodus rotundus</i>	3	1 (33,3%)	0,0

Tabela 4. Continuação.

<i>Didelphis marsupialis</i>	3	0,0	0,0
<i>Gardnerycteris crenulatum</i>	2	0,0	0,0
<i>Glossophaga soricina</i>	3	1 (33,3%)	1 (33,3%)
<i>Hsunycteris pattoni</i>	4	0,0	0,0
<i>Lophostoma brasiliense</i>	2	0,0	0,0
<i>Lophostoma silvícola</i>	4	1 (25,0%)	0,0
<i>Marmosa (Micoureus) constantiae</i>	4	0,0	0,0
<i>Marmosops noctivagus</i>	1	0,0	0,0
<i>Marmosops ocellatus</i>	3	0,0	0,0
<i>Mesomys hispidus</i>	3	0,0	0,0
<i>Monodelphis peruviana</i>	2	0,0	0,0
<i>Monodelphis glirina</i>	4	0,0	0,0
<i>Neacomys spinosus</i>	3	0,0	0,0
<i>Oecomys bicolor</i>	1	0,0	0,0
<i>Oligoryzomys microtis</i>	1	0,0	0,0
<i>Philander canus</i>	14	1 (7,1%)	0,0
<i>Phyllostomus elongatus</i>	2	0,0	0,0
<i>Phyllostomus hastatus</i>	1	1 (100,0%)	0,0
<i>Platyrrhinus brachycephalus</i>	1	0,0	0,0
<i>Proechimys brevicauda</i>	5	1 (20,0%)	0,0
<i>Proechimys gardneri</i>	23	0,0	0,0
<i>Proechimys longicaudatus</i>	1	0,0	0,0
<i>Proechimys simonsi</i>	6	1 (16,7%)	0,0
<i>Rhinophylla pumilio</i>	2	0,0	0,0
<i>Sturnira giannae</i>	6	2 (33,3%)	0,0
<i>Stunira tildae</i>	2	0,0	0,0
<i>Uroderma bilobatum</i>	4	0,0	0,0
<i>Uroderma magnirostrum</i>	4	0,0	0,0
Total	186	27	3

Por outro lado, 6,99% (n=13/186) das lâminas apresentavam mórulas sugestivas de bactérias da família Anaplasmataceae, sendo 38,46% (n=5/13) presentes em leucócitos e 61,54% (n=8/13) observadas em plaquetas. Todas as lâminas que apresentavam inclusões leucocitárias eram oriundas de roedores pertencentes ao gênero *Proechimys*, sendo quatro da espécie *Proechimys gardneri* e uma da espécie *Proechimys brevicauda* (Tabela 5). Já em plaquetas as lâminas apresentando inclusões sugestivas da família Anaplasmataceae pertenciam às espécies *Artibeus planirostris* (2/8), *Carollia perspicillata* (1/8), *Rhinophylla pumilio* (1/8) e *Sturnira giannae* (1/8) da ordem Chiroptera, as espécies *Monodelphis glirina* (1/8) e *Philander canus* (1/8) da ordem Didelphimorphia e a espécie *Proechimys simonsi* da ordem Rodentia (1/8) (Tabela 5).

No diagnóstico molecular 14,52% (n=27/186) das amostras amplificaram o DNA de micoplasmas hemotrópicos na PCR utilizando os primers Myco 322s e Myco 938as. Com a utilização dos primers EHR16SD e EHR16SR, 5,91% (n=11/186) das amostras amplificaram DNA de hemoparasitos da família Anaplasmataceae. Nas reações de PCR onde foram utilizados os

primers ECC e ECB, Ecp28-F e Ecp28-R, DSB 330 e DSB 728, não foram observadas amostras positivas.

Assim como nos resultados observados para micoplasmas hemotrópicos a espécie *Artibeus planirostris* também foi responsável por deter o maior número de amostras positivas na PCR para espécies da família Anaplasmataceae (n=4/11) (Tabela 5). As demais amostras positivas pertenciam as espécies de morcego *Carollia perspicillata* (n=2/11), *Sturnira giannae* (n=2/11), e *Uroderma bilobatum* (n=1/11) e a dois indivíduos da espécie de roedor *Proechimys brevicauda* (n=2/11). Nenhuma das amostras oriundas de espécies da ordem Didelphimorphia apresentou positividade na PCR para Anaplasmataceae.

Tabela 5. Número de pequenos mamíferos silvestres amostrados entre outubro e novembro de 2021 em regiões de floresta de Rio Branco, Acre por espécie, e frequência de positividade para Anapasmataceae através de análise citológica e PCR baseada no *16S rDNA*. Continua.

Espécie	N	Positivos na PCR	Positivos na citologia
<i>Artibeus lituratus</i>	10	0,0	0,0
<i>Artibeus obscurus</i>	3	0,0	0,0
<i>Artibeus planirostris</i>	31	4 (10,9%)	2 (6,5%)
<i>Artibeus anderseni</i>	1	0,0	0,0
<i>Caluromys lanatus</i>	1	0,0	0,0
<i>Carollia brevicauda</i>	7	0,0	0,0
<i>Carollia perspicillata</i>	19	2 (10,5%)	1 (5,3%)
<i>Desmodus rotundus</i>	3	0,0	0,0
<i>Didelphis marsupialis</i>	3	0,0	0,0
<i>Gardnerycteris crenulatum</i>	2	0,0	0,0
<i>Glossophaga soricina</i>	3	0,0	0,0
<i>Hsunitycteris pattoni</i>	4	0,0	0,0
<i>Lophostoma brasiliense</i>	2	0,0	0,0
<i>Lophostoma silvícola</i>	4	0,0	0,0
<i>Marmosa (Micoureus) constantiae</i>	4	0,0	0,0
<i>Marmosops noctivagus</i>	1	0,0	0,0
<i>Marmosops ocellatus</i>	3	0,0	0,0
<i>Mesomys hispidus</i>	3	0,0	0,0
<i>Monodelphis peruviana</i>	2	0,0	0,0
<i>Monodelphis glirina</i>	4	0,0	1 (25,0%)
<i>Neacomys spinosus</i>	3	0,0	0,0
<i>Oecomys bicolor</i>	1	0,0	0,0
<i>Oligoryzomys microtis</i>	1	0,0	0,0
<i>Philander canus</i>	14	0,0	1 (7,1%)
<i>Phyllostomus elongatus</i>	2	0,0	0,0

Tabela 5. Continuação.

<i>Phyllostomus hastatus</i>	1	0,0	0,0
<i>Platyrrhinus brachycephalus</i>	1	0,0	0,0
<i>Proechimys brevicauda</i>	5	2 (40,0%)	1 (20,0%)
<i>Proechimys gardneri</i>	23	0,0	4 (17,4%)
<i>Proechimys longicaudatus</i>	1	0,0	0,0
<i>Proechimys simonsi</i>	6	0,0	1 (16,7%)
<i>Rhinophylla pumilio</i>	2	0,0	1 (50,0%)
<i>Sturnira giannae</i>	6	2 (33,3%)	1 (16,7%)
<i>Sturnira tildae</i>	2	0,0	0,0
<i>Uroderma bilobatum</i>	4	1 (25,0%)	0,0
<i>Uroderma magnirostrum</i>	4	0,0	0,0
Total	186	11	13

Em termos de análise comparativa, dos 1,61% (n=3/186) dos animais positivos na análise citológica 1,07% (n=2/186) também demonstraram positividade nos ensaios de PCR convencional para hemoplasmas com alvo no *16S rDNA*, sendo essas amostras pertencentes às espécies *Glossophaga soricina* (n=1/2) e *Artibeus planirostris* (n=1/2). No caso de Anaplasmataceae dos 6,99% (n=13/186) animais que apresentavam inclusões compatíveis com mórulas na citologia 1,61% (n=3/186) mostraram-se positivos na PCR convencional onde foram utilizados os primers EHR16SD e EHR16R para o diagnóstico dessa família. Destes, 1,07% (n=2/186) apresentavam mórulas em plaquetas, sendo essas amostras pertencentes às espécies de morcego *Sturnira giannae* (n=1/2) e *Carollia perspicillata* (n=1/2), e 0,53% (n=1/186) em leucócitos de um roedor da espécie *Proechimys brevicauda* (n=1/1).

A respeito do sexo dos pequenos mamíferos positivos na PCR para hemoplasmas, o total de machos positivos (n=15/27) foi ligeiramente maior do que o número de fêmeas (n=12/27) (Tabela 6), sendo na ordem Chiroptera o número de morcegos machos positivos (n=14/24) superior ao observado em espécimes do sexo feminino (n=10/24), na ordem Didelphimorphia a positividade observada em um macho (n=1/15) e na ordem Rodentia em duas fêmeas (n=2/29).

Tabela 6. Número de pequenos mamíferos silvestres amostrados entre outubro e novembro de 2021 em regiões de floresta de Rio Branco, Acre e positivos na PCR para micoplasmas hemotrópicos por ordem e sexo.

Sexo Táxon	Sexo		Total
	Macho	Fêmea	
Chiroptera	14/60	10/49	24/109
Didelphimorphia	1/15	0/16	1/31
Rodentia	0/14	2/29	2/43
Total	15/118	12/94	27/183*

*Três animais não tiveram o seu sexo identificado

Na PCR para Anaplasmataceae o número de amostras positivas para pequenos mamíferos silvestres machos foi ligeiramente inferior (n=5/11) ao encontrado em fêmeas (n=6/11) (Tabela 7). Assim como observado na família Mycoplasmataceae o número de morcegos machos positivos (n=5/60) foi ligeiramente superior ao visto em fêmeas (n=4/60), enquanto em roedores apenas fêmeas apresentaram amostras positivas (n=2/49) (Tabela 7).

Tabela 7. Número de pequenos mamíferos silvestres amostrados entre outubro e novembro de 2021 em regiões de floresta de Rio Branco, Acre, positivos na PCR para Anaplasmataceae por ordem e sexo.

Táxon	Sexo		Total
	Macho	Fêmea	
Chiroptera	5/60	4/49	9/109
Didelphimorphia	0/15	0/16	0/31
Rodentia	0/14	2/29	2/43
Total	5/118	6/94	11/183*

*Três animais não tiveram o seu sexo identificado

Quanto à disposição morfológica das estruturas observadas nas lâminas de esfregaço sanguíneo dos pequenos mamíferos silvestres considerados positivos no exame citológico, os cocos sugestivos de hemoplasmas apresentaram-se com coloração basofílica e dispostos de forma única ou diplococos, agrupados ou em cadeias ao longo da superfície dos eritrócitos (Figura 11).

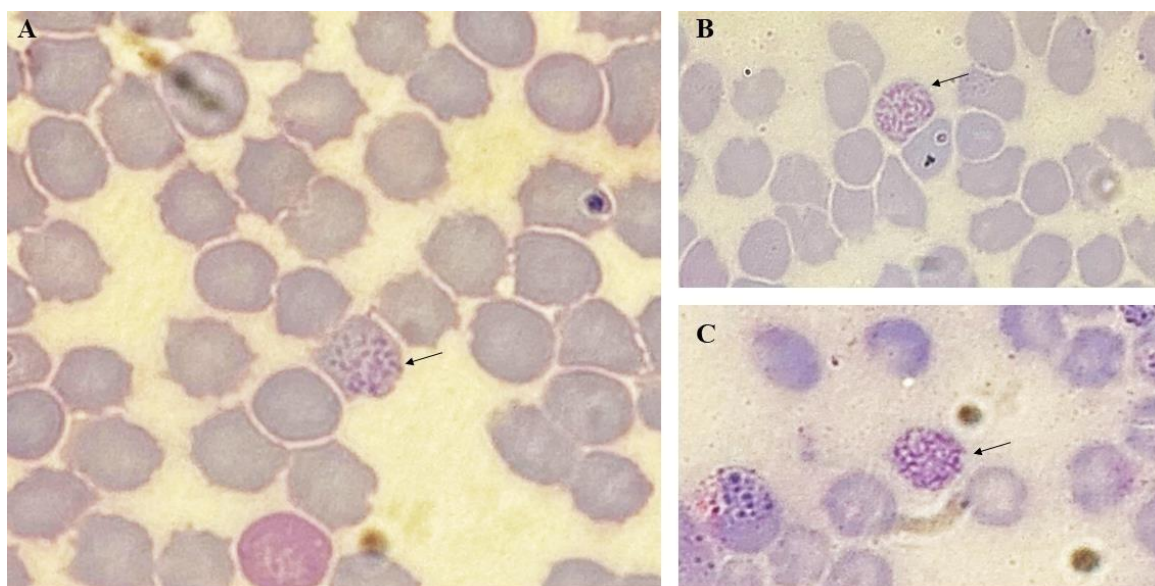


Figura 11. Bactérias dispostas em cocos, diplococos e em cadeia na superfície de eritrócitos (setas). A) *Carollia perspicillata* B) *Glossophaga soricina* C) *Artibeus planirostris*. Objetiva de 100x. Coloração Giemsa. Fonte: Arquivo Pessoal.

Já as plaquetas apresentando inclusões sugestivas de hemoparasitos da família

Anaplasmataceae apresentaram-se dispondo de uma ou mais estruturas arredondadas ou formato irregular em seu citoplasma, de coloração basofílica, apresentando pontilhados característicos de mórulas dessa família (Figura 12).

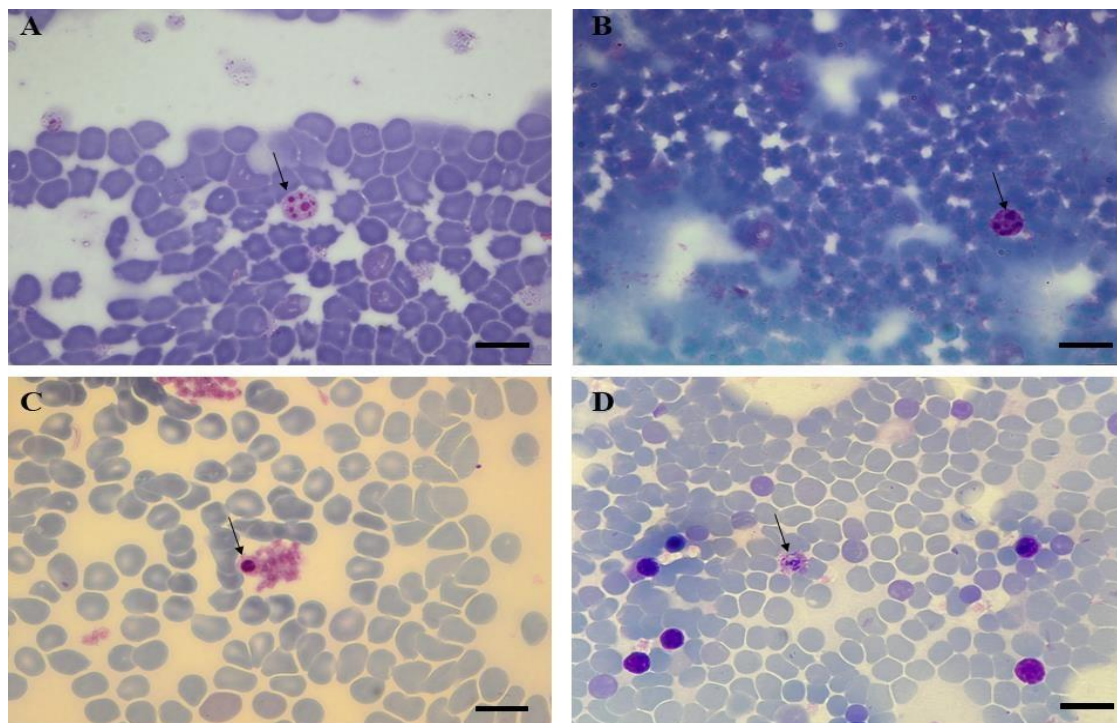


Figura 12. Inclusões plaquetárias sugestivas de hemoparasitos da Família Anaplasmataceae (setas). A) *Sturnira giannae* B) *Artibeus planirostris* C) *Monodelphis glirina* D) *Proechimys simonsi*. Objetiva de 100x. Coloração Giemsa. Barra de escala: 10 μ m. Fonte: Arquivo Pessoal.

Por fim, foram observadas estruturas no interior de leucócitos com morfologia semelhante à de mononucleares que apresentaram de uma a duas inclusões com coloração basofílica, formato arredondado e apresentando um pontilhado sugestivo de mórulas da família Anaplasmataceae (Figura 13).

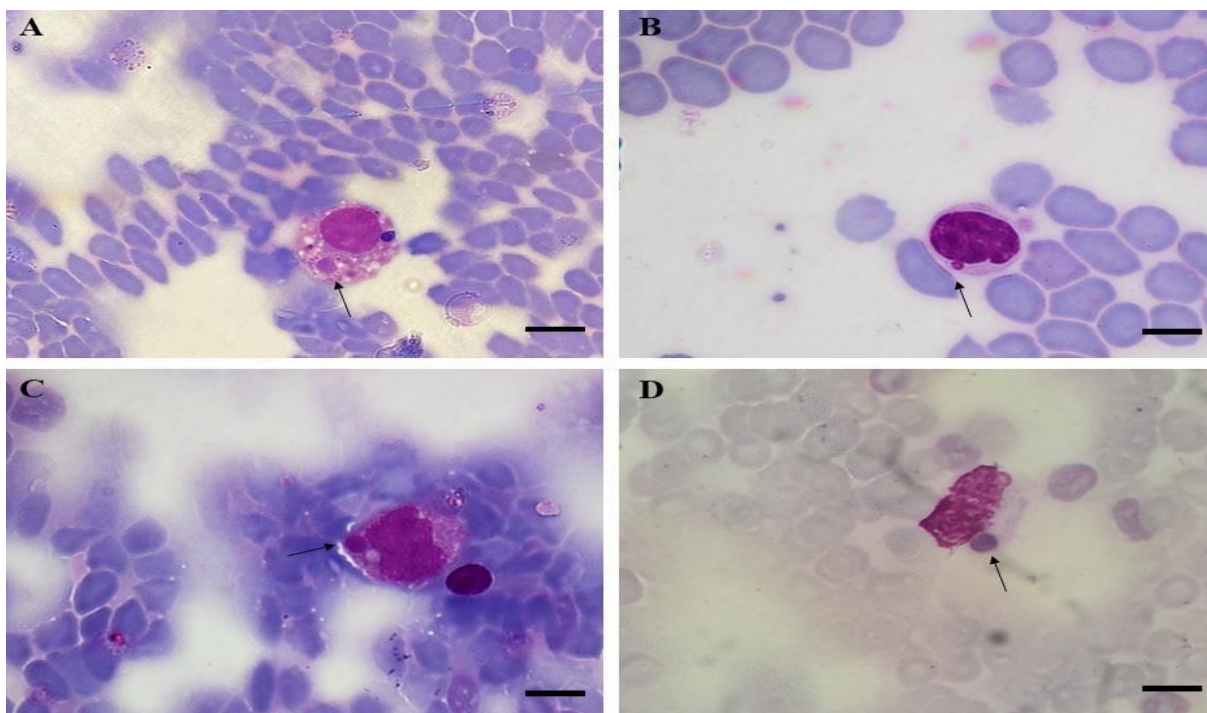


Figura 13. Inclusões leucocitárias em mononucleares sugestivas de hemoparasitos da Família Anaplasmataceae (setas). A) *Proechimys gardneri* B) *Proechimys gardneri* C) *Proechimys gardneri* D) *Proechimys brevicauda*. Objetiva de 100x. Coloração Giemsa. Barra de escala: 10 μ m. Fonte: Arquivo Pessoal.

A área de coleta com maior frequência de positividade dentre as amostras positivas de pequenos mamíferos infectados por hemoplasmas na PCR para o gene *16S rDNA* foi Santa Cecília (25,9%, n=7/48), seguida de São Raimundo (22,2%, n=6/13) e EMBRAPA (22,2%, n=6/42), Floresta Piracema (20,0%, n=4/20), e por fim, APA do Amapá (7,4%, n=2/31) e Colégio Agrícola (7,4%, n=2/32) (Tabela 8). Com relação ao diagnóstico citológico apenas três áreas de estudo apresentaram lâminas com estruturas semelhantes a cocos parasitando hemácias. De todas as lâminas de esfregaço sanguíneo oriundas de pequenos mamíferos das regiões do APA do Amapá, EMBRAPA e São Raimundo apenas uma em cada uma das áreas de estudo citadas foi considerada positiva nessa técnica de diagnóstico (Tabela 8).

Tabela 8. Número de amostras positivas de animais amostrados entre outubro e novembro de 2021 em regiões de floresta de Rio Branco, Acre, para micoplasmas hemotrópicos na PCR para o gene *16S rDNA* e na análise citológica em cada área de estudo.

Área de estudo	N	Positivos na PCR	Positivos na citologia
APA do AMAPÁ	31	2	1
Colégio Agrícola	32	2	0
EMBRAPA	42	6	1
Floresta Piracema	20	4	0
Santa Cecília	48	7	0
São Raimundo	13	6	1
Total	186	27	3

Na região de Santa Cecília a positividade para hemoplasmas foi encontrada nas espécies *Artibeus planirostris* (n=1/4), *Artibeus obscurus* (n=1/2), *Artibeus literatus* (n=1/4), *Phyllosmus hastatus* (n=1/1), *Lophostoma silvicola* (n=1/4), pertencentes a ordem Chiroptera, *Proechimys brevicauda* (n=1/4) da ordem Rodentia e *Phillander canus* (n=1/1) da ordem Didelphimorphia. Em contrapartida, na EMBRAPA não foi observado positividade para hemoplasmas em indivíduos da ordem Didelphimorphia, sendo observada apenas nas espécies *Artibeus planirostris* (n=2/12), *Artibeus lituratus* (n=1/4), *Carollia perspicillata* (n=1/4) e *Carollia brevicauda* (n=1/3) da ordem Chiroptera, e *Proechimys simonsi* (n=1/4) da ordem Rodentia. Já em São Raimundo a positividade para hemoplasmas foi ainda mais restrita sendo observada apenas em quirópteros das espécies *Artibeus planirostris* (n=2/3), *Carollia perspicillata* (n=2/4) e *Carollia brevicauda* (n=2/3). Na Floresta Piracema a positividade também se resumiu a ordem Chiroptera e abrangeu as espécies *Artibeus planirostris* (n=3/6), *Artibeus anderseni* (n=1/1) e *Sturnira giannae* (n=1/1). As ordens Rodentia e Didelphimorphia também não demonstraram positividade para bactérias da família Mycoplasmataceae na área do APA do Amapá, sendo os resultados positivos restritos aos quirópteros *Carollia perspicillata* (n=1/5) e *Glossophaga soricina* (n=1/3). Por fim, duas amostras de quirópteros pertencentes as espécies *Stunira giannae* (n=1/4) e *Desmodus rotundus* (n=1/3) oriundas do Colégio Agrícola foram positivas na PCR para hemoplasmas. A tabela contendo todos os resultados encontrados em cada região avaliada na PCR para hemoplasmas encontra-se disponível como Anexo A.

Para indivíduos da família Anaplasmataceae o maior número de amostras positivas na PCR foi observado na EMBRAPA (36,36%, n=4/11), seguido do Colégio Agrícola (27,27%, n=3/11) e das regiões de Santa Cecília (18,18%, n=2/11) e do APA do Amapá 18,18% (n=2/11) (Tabela 9). Não foram observadas positivities para essa família nas áreas de coleta Floresta Piracema e São Raimundo. Ao avaliar a frequência de positividade para Anaplasmataceae observou-se que a área de coleta que apresentou o maior percentual foi a EMBRAPA (9,5%, n=4/42), seguida de Colégio Agrícola (9,4%, n=3/32), APA do Amapá (6,5%, n=2/31) e Santa Cecília (4,2%, n=2/48).

No diagnóstico citológico foram observadas mórulas em plaquetas e leucócitos em lâminas de cinco áreas de estudo, sendo ausentes nas lâminas da região de São Raimundo. Os animais

coletados na região do Colégio Agrícola apresentaram a maior frequência de lâminas contendo inclusões sugestivas de hemoparasitos da família Anaplasmataceae (n=4/32) (Tabela 9). As demais regiões apresentaram os seguintes valores: APA do Amapá (n=3/31), Santa Cecília (n=2/48), EMBRAPA (n=3/42) e Floresta Piracema (n=1/20).

Tabela 9. Número de animais amostrados entre outubro e novembro de 2021 em regiões de floresta de Rio Branco, Acre, positivos para Anaplasmataceae na PCR para o gene *16S rDNA* e na análise citológica em cada área de estudo.

Área de estudo	N	Positivos na PCR	Positivos na citologia
APA do AMAPÁ	31	2	3
Colégio Agrícola	32	3	4
EMBRAPA	42	4	3
Floresta Piracema	20	0	1
Santa Cecília	48	2	2
São Raimundo	13	0	0
Total	186	11	13

A positividade na PCR para Anaplasmataceae na EMBRAPA foi vista na espécie de quiróptero *Artibeus planirostris* (n=3/12) e no roedor *Proechimys brevicauda* (n=1/1). Por outro lado, na região de Santa Cecília a positividade para esta família de bactérias foi vista em um roedor da espécie *Proechimys brevicauda* (n=1/4) e em um morcego da espécie *Artibeus planirostris* (n=1/4). As ordens Rodentia e Didelphimorphia não demonstraram positividade para indivíduos da família Anaplasmataceae nos locais de coleta APA do Amapá e Colégio Agrícola, sendo observada apenas na espécie de morcego *Carollia perspicillata* (n=2/5) no APA do Amapá e nas espécies *Uroderma bilobatum* (n=1/1) e *Stunira giannae* (n=2/4) no Colégio Agrícola. A tabela contendo todos os resultados encontrados em cada região avaliada na PCR para Anaplasmataceae encontra-se disponível como Anexo B.

4.2 Fatores Associados à Positividade por Micoplasmas Hemotrópicos em Pequenos Mamíferos Silvestres

A região de São Raimundo apresentou a maior frequência de positividade de pequenos mamíferos silvestres infectados por hemoplasmas (46,2%, n=6/13), seguida de Floresta Piracema (20,0%, n=4/20), Santa Cecília (14,6%, n=7/48), EMBRAPA (14,3%, n=6/42), APA do Amapá (6,5%, n=2/31) e por fim, Colégio Agrícola (6,2%, n=2/32). Houve diferença estatística da frequência de positividade entre as áreas de coleta São Raimundo e Floresta Piracema comparadas as demais áreas de estudo (p=0,0228) (Tabela 10). Entretanto, não houve diferença estatística entre as duas áreas citadas anteriormente (p > 0,5).

Quanto ao táxon do hospedeiro, dois gêneros da ordem Chiroptera apresentaram uma maior frequência de amostras positivas para hemoplasmas na PCR para o gene *16SrDNA* em relação aos

demais, sendo eles: *Artibeus* (24,4%, n= 11/45) e *Carollia* (26,9%, n=7/26) (Tabela 10). Entretanto, não houve diferença estatística de positividade entre os dois gêneros citados ($p > 0,5$).

A respeito do sexo dos animais infectados por hemoplasmas, a ordem Chiroptera apresentou positividade em 23,3% (n=14/60) dos machos e 20,4% (n=10/49) das fêmeas amostradas (Tabela 10). Todavia, não houve diferença estatística entre a positividade observada para machos e fêmeas na PCR para micoplasmas hemotrópicos ($p > 0,5$).

Tabela 10. Análise bivariada da frequência de Hemoplasmas em pequenos mamíferos silvestres amostrados entre outubro e novembro de 2021 em regiões de floresta de Rio Branco, Acre, através da PCR baseada no *16S rDNA*, em função da área de estudo, gênero do hospedeiro e sexo.

Variáveis	N	%	Bivariada		
			χ^2	P	
Áreas de estudo*					
São Raimundo	13	46,2%	a	-	0,0228
Floresta Piracema	20	20,0%	a		
Santa Cecília	48	14,6%	b		
Embrapa	42	14,3%	b		
APA do Amapá	31	6,5%	b		
Colégio Agrícola	32	6,2%	b		
Gênero do Hospedeiro*/y					
<i>Carollia</i>	26	26,9%	a	-	0,5155
<i>Artibeus</i>	45	24,4%	a		
Sexo do Hospedeiro ^z					
Macho	60	23,3%	a	0,134	0,7139
Fêmea	49	20,4%	a		

*Exato de Fisher

^yForam avaliados apenas gêneros de morcegos que apresentavam N amostral maior do que 10.

^zForam considerados apenas o sexo de animais da ordem Chiroptera.

4.3 Fatores Associados à Positividade para Anaplasmataceae em Pequenos Mamíferos Silvestres

O exame citológico foi utilizado como padrão para o diagnóstico de bactérias da família Anaplasmataceae de importância para animais e humanos (*Ehrlichia* e *Anaplasma*) nesta amostragem, pois os resultados de sequenciamento de fragmento do *16SrDNA* amplificado para diagnóstico molecular resultaram no gênero *Wolbachia* para todas as amostras submetidas para esta técnica abordado no tópico caracterização molecular.

No exame citológico a maior frequência de positividade foi observada na região do Colégio Agrícola (12,5%, n=4/32), seguido das regiões APA do Amapá (9,7%, n=3/31), Santa Cecília (6,2%, n=2/48), Floresta Piracema (5,0%, n=1/20) e por fim, EMBRAPA (4,8%, n=3/42) (Tabela

11). Não houve diferença estatística entre as áreas de coleta nas frequências de positividade no exame citológico ($p > 0,5$).

Quanto ao táxon do hospedeiro, os gêneros da ordem Chiroptera que apresentaram a maior frequência de positividade no exame citológico foram *Artibeus* (4,4%, $n=2/45$) e *Carollia* (3,8%, $n=1/26$) (Tabela 11). Entretanto, não houve diferença estatística de positividade entre os dois gêneros citados ($p > 0,5$).

A respeito do sexo dos animais positivos no exame citológico, a ordem Chiroptera apresentou positividade em 8,3% ($n=5/60$) dos machos e 8,2% ($n=4/49$) das fêmeas amostradas (Tabela 11). Não houve diferença estatística entre machos e fêmeas no exame citológico para a família Anaplasmataceae ($p > 0,5$).

Tabela 11. Análise da frequência de Anaplasmataceae em pequenos mamíferos silvestres amostrados entre outubro e novembro de 2021 em regiões de floresta de Rio Branco, Acre, através da análise citológica, em função da área de estudo, gênero do hospedeiro e sexo.

Variáveis	N	%	Bivariada		
			χ^2	p	
Áreas de estudo*					
Colégio Agrícola	32	12,5%	a	-	0,2177
APA do Amapá	31	9,7%	a		
Santa Cecília	48	6,2%	a		
Floresta Piracema	20	5,0%	a		
Embrapa	42	4,8%	a		
São Raimundo	13	0%	-		
Gênero do Hospedeiro ^y					
<i>Artibeus</i>	45	4,4%	a	-	0,6986
<i>Carollia</i>	26	3,8%	a		
Sexo do Hospedeiro ^{*/z}					
Macho	60	8,3%	a	-	0,6272
Fêmea	49	8,2%	a		

*Exato de Fisher

^yForam avaliados apenas gêneros de morcegos que apresentavam N amostral maior do que 10.

^zForam considerados apenas o sexo de animais da ordem Chiroptera.

4.4 Caracterização Molecular de Bactérias das Famílias Anaplasmataceae e Mycoplasmataceae em Pequenos Mamíferos Silvestres

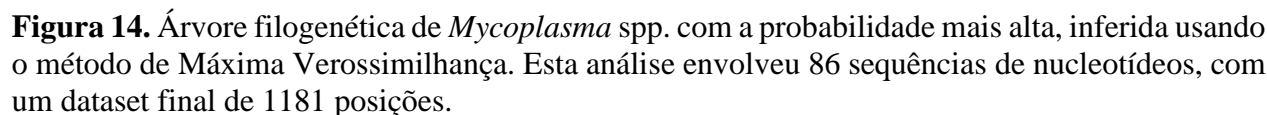
Com relação ao resultado de sequenciamento de fragmento do *16S rDNA* de *Mycoplasma* sp., três amostras de morcegos das espécies *Glossophaga soricina* (ID 22052), *Artibeus lituratus* (ID 22108), *Carollia brevicauda* (ID 22152) tiveram suas sequências com boa leitura no cromatograma, apresentando 630pb, 550pb e 1104pb, respectivamente. O maior percentual de

similaridade Blast para 22052 foi de 98,41% com uma amostra de *Mycoplasma* sp. Isolada de um espécime de *Glossophaga commissarisi* (LR699022) da Costa Rica; para 22108 foi de 99,82% com amostra de *Mycoplasma* sp. isolada de um espécime de *Platyrrhinus lineatus* (MZ048291) do Mato Grosso do Sul, Brasil; e para 22152 foi de 98,28% com amostra de *Mycoplasma* sp. encontrada em um espécime de *Desmodus rotundus* de Belize (KY932722) (Tabela 12).

Tabela 12. Resultado do sequenciamento baseado no *16S rDNA* de amostras positivas para micoplasmas hemotrópicos.

ID Amostras	Maior similaridade Blast	Origem	Percentual de Identidade	Query Coverage	Referência
22052	<i>Glossophaga commissarisi</i> (LR699022)	Costa Rica	98,41%	99%	FRITSCHI et al., 2020
22108	<i>Platyrrhinus lineatus</i> (MZ0482911)	Mato Grosso do Sul	99,82%	100%	IKEDA et al., 2022
22152	<i>Desmodus rotundus</i> (KY932722)	Belize	98,28%	100%	VOLOKHOV et al., 2017

A análise filogenética de um alinhamento de aproximadamente 1181pb do gene *16S rRNA* posicionou as sequências oriundas de morcegos obtidas no presente estudo dentro do grande “grupo hemofelis”, em um ramo com alto valor de Bootstrap (100%) junto com outras sequências de hemoplasmas detectados previamente em morcegos hematófagos (*D. rotundus*, *D. ecaudata*) e morcegos não-hematófagos (*Artibeus lituratus*, *Platyrrhinus lineatus*, *Glossophaga soricina*, *Glossophaga commissarisi*) do Brasil, Costa Rica, Belize e Peru (Figura 14).



A respeito de Anaplasmataceae, a presença de bandas fracas ou inespecíficas resultaram na dificuldade do sequenciamento das amostras positivas na PCR para os primers 16SF e 16SR, gerando cromatogramas apresentando picos duplos ou triplos. Como alternativa, os produtos de PCR da reação utilizando os primers EHR16SD e EHR16SF (345pb) das amostras 22068, 22089, 22091, 22116, 22119 e 22120 (Figura 15) foram enviados para sequenciamento. Os “contigs” montados resultaram em similaridade Blast de 100% para *Wolbachia* sp.

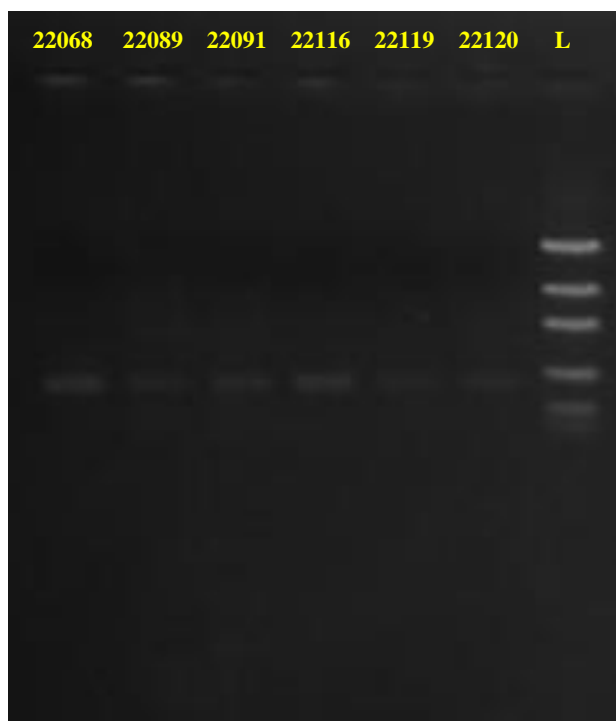


Figura 15. Produtos de PCR de aproximadamente 345pb das amostras enviadas para amplificação usando os primers EHR16SD e EHR16SR em Gel de agarose à 2,0%. L representa o marcador Low DNA Mass Ladder.

5 DISCUSSÃO

Embora os agentes das famílias Mycoplasmataceae e Anaplasmataceae sejam bem documentados em animais de companhia e de produção, ainda há um número limitado de trabalhos que buscam entender o papel de animais silvestres como reservatórios de indivíduos dessas famílias. A nível de táxons a ordem Chiroptera apresenta menos estudos quando comparados a pequenos mamíferos não-voadores. Tratando-se especificamente do Brasil os trabalhos que buscaram amplificar o DNA de hemoplasmas em morcegos concentram-se nas regiões Sul e Centro-oeste (DOS SANTOS et al., 2020; IKEDA et al., 2022; COLLERE et al., 2022), sendo poucos os trabalhos que amostraram morcegos nas demais regiões do país (IKEDA et al., 2017; DE MELLO et al., 2023).

O diagnóstico citológico, realizado através da visualização de estruturas compatíveis com o organismo alvo em lâminas de esfregaço sanguíneo coradas com o método de Giemsa é considerado um exame de triagem para o diagnóstico de hemoparasitos (NEIMARK et al., 2001). Ainda que a análise citológica de microrganismos seja altamente utilizada devido à sua simplicidade e acessibilidade, sabe-se que essa técnica de diagnóstico apresenta uma baixa sensibilidade quando comparada a outras técnicas de diagnóstico, uma vez que a eficiência dessa técnica está diretamente associada a parasitemia.

A visualização de estruturas compatíveis com cocos de hemoplasmas nesse estudo foi possível em 1,61% (3/186) dos animais amostrados, sendo todos pertencentes a ordem Chiroptera. Mesmo com uma baixa prevalência, a positividade observada no diagnóstico citológico para Hemoplasmas nesse trabalho foi superior à de estudos com amostragens superiores. Volokhov et al. (2017), por exemplo, não observaram cocos sugestivos de micoplasmas em nenhum dos 223 morcegos amostrados no trabalho. Por outro lado, Dos Santos et al. (2020) observaram positividade em 20% (2/10) das lâminas de esfregaço sanguíneo, ambas de morcegos da espécie *Desmodus rotundus*. Corroborando com o presente estudo a descrição das estruturas observadas no trabalho citado anteriormente foram descritas como redondas ou em formato de bastonete, sendo dispostas de forma individual ou em cadeias na superfície de eritrócitos.

Já no diagnóstico citológico de indivíduos da família Anaplasmataceae a observação de lâminas contendo estruturas semelhantes a mórulas possivelmente pertencentes a essa família foi superior ao observado na família Mycoplasmataceae sendo possível a visualização de mórulas em leucócitos e plaquetas em 2,68% (5/186) e 4,30% (8/186) das lâminas, respectivamente. Previamente a esse trabalho estruturas semelhantes foram visualizadas em plaquetas de morcegos da espécie *Noctilio albiventris* (VILLALBA-ALEMÁN et al., 2020) e em monócitos de um didelídeo da espécie *Didelphis albiventris* (ANDRÉ et al., 2022).

A baixa prevalência de bactérias em eritrócitos, leucócitos e plaquetas de morcegos pode ser explicada pela sensibilidade inferior apresentada pela citologia quando comparada a técnicas de sensibilidade superior como a PCR. É possível que a infecção por bactérias das famílias Mycoplasmataceae e Anaplasmataceae em morcegos possa assumir uma característica subclínica, resultando em baixos níveis de parasitemia, já que é sugerido que os quirópteros podem ter desenvolvido mecanismos para controlar a replicação viral de forma mais eficaz do que a maioria dos outros mamíferos, podendo provavelmente ser aplicado também a infecções bacterianas (O'SHEA et al., 2014; PAVLOVICH et al., 2018; IRVING et al., 2021). Vale salientar que as condições extremamente úmidas de florestas ombrófilas, como é o caso da Floresta Amazônica, acarretam dificuldades para a confecção do esfregaço sanguíneo, como, por exemplo, o aumento do tempo no processo de secagem das lâminas, diminuindo a sua qualidade e, por consequência, os resultados do exame citológico.

Estudos que buscaram amplificar o DNA de hemoplasmas em morcegos na PCR encontraram taxas de positividade variando entre 6-97% (MILLÁN et al., 2015; VOLOKHOV et al., 2017; IKEDA et al., 2017; MILLÁN et al., 2019; BECKER et al., 2020; DI CATALDO et al., 2020; IKEDA et al., 2022, DE MELLO et al., 2023). Nesse estudo a taxa de positividade encontrada para esse agente na ordem Chiroptera foi de 21,6% (24/111). Entretanto, vale salientar que os estudos citados anteriormente tinham como alvo apenas um grupo de morcegos como, por exemplo, morcegos hematófagos (VOLOKHOV et al., 2017; DE MELLO et al., 2023) e morcegos frugívoros (DI CATALDO et al., 2020) ou uma única espécie de morcegos (MILLÁN et al., 2019). Por outro lado, esse trabalho objetivou a detecção de micoplasmas hemotrópicos em morcegos

encontrados na cidade de Rio Branco sem distinção de espécie ou hábitos ecológicos, sendo possível a detecção do DNA de hemoplasmas em 11 espécies de morcegos.

Em contraste com o presente trabalho, estudos anteriores que investigaram a ocorrência de hemoplasmas em morcegos utilizaram amostras de sangue ou baço (VOLOKHOV et al., 2017; BECKER et al., 2020; DI CATALDO et al., 2020; SANTOS et al., 2020; IKEDA et al., 2022). Estudos que utilizaram o sangue total de morcegos para o diagnóstico molecular de hemoplasmas demonstraram uma taxa de frequência mais elevada do que a observada no presente trabalho. Entretanto, o fígado pode ser uma alternativa para a detecção de hemoplasmas na ausência do sangue total como uma amostra viável. O sequestro hepático da espécie '*Candidatus Mycoplasma turicensis*', por exemplo, foi reportado por Novacco et al. (2013) em gatos inoculados com essa espécie de hemoplasma. No mesmo estudo também foi observado que com o passar da infecção a quantidade de cópias de hemoplasmas presentes em órgãos menos vascularizados diminuía, enquanto tecidos extremamente vascularizados como o fígado, o baço e o pulmão mantinham níveis mais altos de hemoplasmas mesmo na fase crônica da infecção. A nível de comparação um estudo realizado por Wang et al. (2023) identificou uma taxa de positividade para hemoplasmas através de PCR para o gene *16S rDNA* em morcegos de 78,8% (78/99) para sangue total, 21,7% (20/92) para fígado e 2,3% (2/88) para baço, entretanto nem todas as amostras pertenciam ao mesmo morcego. A diferença entre as taxas de positividade entre o sangue e tecidos como fígado e baço pode ser explicada pela alta ação fagocítica de células mononucleares, presente principalmente em tecidos linfoides que causam uma rápida eliminação do DNA de hemoparasitos após a fagocitose (MILLÁN et al., 2021; IKEDA et al., 2021). Macrófagos intravasculares presentes nos seios do fígado, da medula óssea e baço removem os microrganismos da circulação através da imunidade inata. Entretanto, cabe ao baço gerar uma resposta prolongada e específica, conhecida como imunidade adaptativa, através da produção de anticorpos IgM e IgG pelas células B dias após o início da infecção (MARQUES et al., 2003; KASHIMURA, 2020). Essa atuação do baço como órgão central do sistema de defesa do sangue pode explicar o porquê na maioria dos estudos esse órgão apresenta uma taxa de positividade menor para hemoplasmas do que o sangue e o fígado, especialmente em infecções prolongadas. Um estudo realizado por De Mello et al. (2023) também utilizou apenas o parênquima hepático de morcegos para identificar a presença do DNA de hemoplasmas na PCR e obtiveram uma taxa de positividade de (6,06%, n=12/198), inferior a observada no presente trabalho (21,6%, n= 24/111).

Dentre todos os pequenos mamíferos coletados para esse trabalho a espécie que apresentou a maior positividade para hemoplasmas foi a *Artibeus planirostris* (7/27), resultado equivalente ao encontrado por Ikeda et al. (2022) que avaliou a prevalência de micoplasmas hemotrópicos em morcegos presentes em regiões peri-urbanas de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. O mesmo trabalho observou positividade para as espécies *Artibeus lituratus*, *Glossophaga soricina* e *Carollia brevicauda*, que também se demonstraram positivas para hemoplasmas nesse trabalho.

A respeito dos hábitos alimentares, os morcegos hematófagos são espécies óbvias para constatar a detecção de hemoplasmas e possíveis relações filogenéticas, já que se alimentam de sangue de mamíferos onde já foi descrita a infecção por essas bactérias. Previamente a esse trabalho, Volokhov et al. (2017) detectaram a presença de *Mycoplasma* spp. a partir de amostras de sangue de *Desmodus rotundus* em 67% (n=150/223) dos espécimes capturados em Belize e no Peru, país que faz fronteira com o estado do Acre. A alta prevalência de hemoplasmas encontrada em morcegos hematófagos sugere que este grupo de quirópteros apresenta um alto potencial para propagar infecções por essas bactérias. Tal fato pode estar relacionado com a sua grande e expansiva população amplamente distribuída, além dos seus hábitos de partilha de sangue, higiene

social e coexistência com outras espécies de morcegos (BAI et al., 2011). Das três espécies de morcegos hematófagos conhecidas por habitarem habitats sul-americanos (*Desmodus rotundus*, *Diphylla ecaudata* e *Diaemus youngi*) apenas a espécie *Desmodus rotundus* foi coletada para esse estudo, sendo possível a amplificação de DNA de hemoplasmas em 33,3% dos espécimes coletados (n=1/3). Ainda que o resultado para essa espécie não seja expressivo devido ao número de indivíduos coletados, foi possível constatar que possivelmente há a circulação de micoplasmas hemotrópicos nessa espécie nas regiões periurbanas de Rio Branco.

Dentre os pequenos mamíferos silvestres avaliados nesse trabalho dois gêneros da ordem Chiroptera apresentaram as maiores frequências de amostras positivas na PCR para hemoplasmas. Animais que apresentam o hábito de viver em sociedade apresentam maiores chance de infecção por hemoplasmas (ALTRINGHAM et al., 2005; DE SOUZA et al., 2017). Dessa forma, a alta positividade observada em morcegos dos gêneros *Artibeus* e *Carollia* pode estar associada aos seus padrões sociais, uma vez que as espécies desses gêneros apresentam uma alta tendência a viver em comunidade, seja em haréns, compostos por apenas um macho e várias fêmeas ou em poleiros habitados por machos que não possuem harém e fêmeas sazonalmente (MORRISON, 1980; CLOUTIER & THOMAS, 1992). O hábito de viver em comunidade faz com que esses animais possam possivelmente transmitir hemoplasmas por meio da saliva, já que a alimentação de morcegos não-hematófagos, ocorre de forma simultânea por todos os membros do harém ou poleiro para evitar o risco de predação (OPREA et al., 2007). Volokhov et al. (2017) sugeriram que a transmissão de hemoplasmas possa ocorrer entre morcegos através desse tipo de fluido ao identificarem sequências apresentando uma alta taxa de similaridade com micoplasmas hemotrópicos em *swabs* orais de morcegos infectados por micoplasmas hemotrópicos. Embora as rotas de transmissão de hemoplasmas entre morcegos ainda não sejam elucidadas, ectoparasitos associados a morcegos, como ácaros, carrapatos, moscas, percevejos e pulgas, que podem ser encontrados tanto em morcegos quanto em locais habitados por esses animais, já foram incriminados como potenciais vetores de patógenos (GRACIOLLI et al., 2010; MUHLDOERFER, 2013).

Três sequências de hemoplasmas obtidos a partir de amostras de fígado de morcegos das espécies *Artibeus lituratus*, *Glossophaga soricina* e *Carollia brevicauda* estavam intimamente relacionadas com outros genótipos detectados anteriormente em morcegos hematófagos e não-hematófagos do Brasil, Costa Rica, Peru e Belize, corroborando com estudos anteriores (IKEDA et al., 2022; DE MELLO et al., 2023). Os resultados de filogenia sugerem que hemoplasmas de morcegos não-hematófagos descritos nesse trabalho estejam filogeneticamente associados aos descritos em morcegos não-hematófagos e morcegos hematófagos de Belize, Peru, Costa Rica e Brasil. A similaridade genética de hemoplasmas encontrada em morcegos hematófagos e não-hematófagos pode estar associada ao fato desses animais coabitarem as mesmas áreas e, consequentemente, compartilharem os mesmos vetores que podem estar associados a transmissão de hemoplasmas em morcegos.

As bactérias simbióticas do gênero *Wolbachia* são amplamente encontradas em muitos artrópodes e nematóides filariais (WERREN, 1998). A detecção molecular dessas bactérias já foi observada em dípteros das famílias Nycteribiidae e Streblidae e ácaros do gênero *Spinturnix* parasitando espécies de morcego (LEE et al., 2021; OLANRATMANEE et al., 2021). Embora o presente trabalho não tenha utilizado os ectoparasitos dos morcegos coletados como fonte para o diagnóstico molecular de bactérias da família Anaplasmataceae, foram observadas filárias durante as análises citológicas das lâminas de esfregaço sanguíneo de quirópteros, podendo esses filarídeos

estarem associados ao sequenciamento dos produtos de PCR de *16SrDNA* que resultaram em similaridade com *Wolbachia* sp. Todavia, tais parasitos não eram alvos de estudo desse trabalho.

Nesse estudo foram observadas diferenças estatísticas significativas entre regiões que apresentam graus de antropização maior comparadas a regiões menos antropizadas. A região de São Raimundo, que corresponde a área de coleta com o maior grau de modificação sobre a sua paisagem natural, apresentou uma prevalência de positividade maior para micoplasmas hemotrópicos do que áreas que mantêm sua paisagem mais conservada. Sabe-se que tipos de habitat, influenciam diretamente nas chances de um animal se encontrar parasitado, sendo maiores para animais que habitam ambientes mais urbanizados do que ambientes não antropizados (GONÇALVES et al., 2020; SACRISTÁN et al. 2019; VOLOKHOV et al., 2017).

A positividade para micoplasmas hemotrópicos observada neste trabalho sugere que possa haver a circulação de espécies de hemoplasmas em quirópteros que habitam áreas periurbanas de Rio Branco e salienta a necessidade de que mais estudos sejam realizados para compreender o papel de morcegos hematófagos e não-hematófagos na transmissão de hemoplasmas, sobretudo em São Raimundo, devido à alta prevalência encontrada nos espécimes coletados nessa região e a sua proximidade com o centro urbano.

6 CONCLUSÕES

Para concluir, a considerável taxa de positividade de hemoplasmas em quirópteros sugere que micoplasmas hemotrópicos estejam circulando entre morcegos que habitam o estado do Acre. Os resultados de filogenia indicaram que hemoplasmas de morcegos não-hematófagos aqui descritos estão filogeneticamente associados aos referidos em diferentes espécies de morcegos que habitam biomas da América Latina. A maior frequência de amostras positivas para hemoplasmas em São Raimundo pode indicar que a infecção por hemoplasmas em morcegos esteja diretamente relacionada ao grau de antropização, sendo necessário mais estudos que associem a presença desses hemoparasitos aos diferentes graus de fitofisionomias na região de Rio Branco. Por fim, embora não tenham sido detectadas na PCR, a presença de inclusões plaquetárias e leucocitárias observadas no exame citológico sugerem que bactérias pertencentes a família Anaplasmataceae possam estar circulando entre espécies de pequenos mamíferos nas regiões periurbanas de Rio Branco.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora a circulação de micoplasmas hemotrópicos seja bem demonstrada em pequenos mamíferos silvestres que habitam os diferentes biomas brasileiros, o presente estudo foi o primeiro a evidenciar a presença de hemoplasmas em morcegos que vivem em regiões de floresta amazônica do Acre e um dos primeiros a ilustrar a presença de cocos parasitando hemácias de morcegos em lâminas de esfregaço sanguíneo. A baixa parasitemia observada no exame citológico indica que quirópteros possam manter infecções por hemoplasmas a níveis subclínicos, assim como é observado em infecções por agentes virais. Estudos que busquem elucidar a transmissão de micoplasmas hemotrópicos em morcegos são necessários, assim como o papel de ectoparasitos na perpetuação desses agentes nas regiões periurbanas de Rio Branco. A associação filogenética de

amostras oriundas desse trabalho com morcegos hematófagos sugere que a coabitação de diferentes grupos de morcegos possa ser um fator significativo para transmissão de hemoplasmas entre diferentes espécies, salientando dessa forma, para que estudos futuros associem variáveis ecológicas e comportamentais a infecção por essas bactérias.

Apesar da filogenia das amostras positivas na PCR para a família Anaplasmataceae terem resultado em similaridade com espécies de *Wolbachia*, as inclusões observadas no exame citológico levam a acreditar que os primers disponíveis para o diagnóstico de espécies dos gêneros *Anaplasma* e *Ehrlichia* não apresentem a especificidade necessária para a amplificação do DNA de espécies que possivelmente estejam circulando em pequenos mamíferos silvestres no Acre, sendo a padronização de reações de PCR para a família Anaplasmataceae a partir da extração de DNA do parênquima hepático ou diretamente das lâminas de esfregaço sanguíneo desses hospedeiros um dos objetivos futuros desse trabalho.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARDEMA, M. L.; BATES, N. V.; ARCHER, Q. E.; VON LOEWENICH, F. D. Demographic Expansions and the Emergence of Host Specialization in Genetically Distinct Ecotypes of the Tick-Transmitted Bacterium *Anaplasma phagocytophilum*. **ASM Journals, Applied and Environmental Microbiology**, v. 88. n. 14. 2022.

AFONSO, E.; GOYDADIN, A. Molecular detection of *Anaplasma phagocytophilum* DNA in the lesser horseshoe bat (*Rhinolophus hipposideros*) guano. **Epidemiology & Infection**, v. 146, n. 10, p.1253-1258, 2018.

ALABÍ, A. S.; MONTI, G.; OTTH, C.; SEPULVEDA-GARCÍA, P.; PERLES, L.; MACHADO, R.Z.; ANDRÉ, M. R.; BITTENCOURT, P.; MÜLLER, A. Genetic diversity of *Hepatozoon* spp. in rodents from Chile. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 30, n. 4, p. 1-15, 2021.

ALCANTARA, A.; THOMAS, H.; CAMPOS, S.; TEIXEIRA, R.; LIMA, H.; PIRES, J.; MORAES, R.; SOUZA, A. Molecular evidence of *Bartonella* spp. in free-living opossums (Didelphimorphia: Didelphidae) from peri-urban Atlantic Forest fragments of Brazil." **Authorea Preprints**, 2020.

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

ALTAY, K.; EROL, U.; SAHIN, O. F.; AYTAMIRZAKIZI, A. First molecular detection of *Anaplasma* species in cattle from Kyrgyzstan; molecular identification of human pathogenic novel genotype *Anaplasma capra* and *Anaplasma phagocytophilum* related strain. **Ticks Tick Borne Dis**, v. 1, p. 101-861, 2022.

ALTRINGHAM, J. D.; SENIOR, P.; RUCKSTUHL, K. E.; NEUHAUS, P. Social systems

and ecology of bats. **Sexual segregation in vertebrates**, p.280-302, 2005.

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **J Mol Biol**, v. 215, n. 3, p. 403-10, 1990.

ALVES, T. B.; FAGGION, S. A.; SANTOS, E. V.; ROBERTO, P. G.; FRANÇA, S. C.; FACHIN, A. L.; MARINS, M. Real-time PCR-based study of haemotrophic mycoplasmas in dogs from Ribeirão Preto, Brazil. **Archivos de Medicina Veterinaria**, v. 46, n. 2, p. 333-336, 2014.

ANDRÉ, M. R.; ADANIA, C. H.; MACHADO, R.Z.; ALLEGRETTI, S. M., FELIPPE, P. A. N; SILVA, K.F. et al. Molecular and serologic detection of *Ehrlichia* spp. in endangered Brazilian wild captive felids. **J Wildl Dis**, v. 46, n. 3, p. 1017-1023, 2010.

ANDRÉ, M. R.; DENARDI, N. C. B.; SOUSA, K. C. M.; GONÇALVES, L. R.; HENRIQUE, P. C.; ONTIVERO, C. R. G. R.; GONZALEZ, I. H. L.; NERY, C. V. C.; CHAGAS, C. R. F.; MONTICELLI, C.; SANTIS, A. C. G. A.; MACHADO, R. Z. Arthropod-borne pathogens circulating in free-roaming domestic cats in a zoo environment in Brazil. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 5, n. 5, p. 545-551, 2014.

ANDRÉ, M. R.; GUTIERREZ, R.; IKEDA, P.; DO AMARAL, R. B.; DE SOUSA, K. C. M.; BIALA, Y.; LIMA, L.; TEIXEIRA, M. M. G.; MACHADO, R. Z.; HARRUS, S. Genetic diversity of *Bartonella* spp. in vampire bats from Brazil. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 66, n. 6, p.2329-2341, 2019.

ANDRÉ, M. R.; CALCHI, A. C.; FURQUIM, M. E. C.; DE ANDRADE, I.; ARANTES, P. V. C.; DEMELO; LOPES, L. C.; DEMARCHI, I. K. L. D. N.; FIGUEIREDO, M. A. P.; DE PAULA-LIMA, C.; MACHADO, R. Z. Molecular Detection of Tick-Borne Agents in Cats from Southeastern and Northern Brazil. **Pathogens**, v. 11, p. 106. 2022.

ANDRÉ, M. R.; CALCHI, A. C.; PERLES, L.; GONÇALVES, L. R.; UCCELLA, L.; LEMES, J. R.; NANTES, W. A. G.; SANTOS, F. M.; OLIVEIRA, G. E. P.; BARROS- BATTESTI, D. M.; HERRERA, H. M.; MACHADO, R. Z. Novel *Ehrlichia* and *Hepatozoon* genotypes in white-eared opossums (*Didelphis albiventris*) and associated ticks from Brazil. **Ticks Tick-borne Dis**, v. 13, n. 6, p. 102022, 2022.

ANIS, E.; HAWKINS, I.; ILHA, M.; WOLDEMESKEL, M.; SALIKI, J.; WILKES, R.; Evaluation of targeted next generation sequencing for detection of bovine pathogens in clinical samples. **J. Clin. Microbiol**, v. 56, p. 00399-18, 2018.

ARAI, S.; YANAGIHARA, R. Genetic Diversity and Geographic Distribution of Bat-Borne Hantaviruses. **Current Issues in Molecular Biology**, v. 39, p. 1-28, 2020.

ARAUJO, D. B.; MARTORELLI, L. A.; KATAOKA, A. P. G.; CAMPOS, A. C.; RODRIGUES, C. S.; SANFILIPPO, L. F.; CUNHA, E. S.; DURIGON, E. L.; FAVORETTO, S. R. Antibodies to rabies virus in terrestrial wild mammals in native rainforest on the north coast of São Paulo State, Brazil. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 50, p.469–477, 2014.

ASIF, M.; PARVEEN, A.; ASHARAF, S. et al. First Report Regarding the Simultaneous Molecular Detection of *Anaplasma marginale* and *Theileria annulata* in Equine Blood Samples Collected from Southern Punjab in Pakistan. **Acta Parasit**, v. 65, p. 259–263, 2020.

AYRES, M., AYRES, J. M.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. D. A. Aplicações estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas. **Instituto Mamirauá**, Belém, v. 364, 2007.

BAI, Y.; KOSOY, M.; RECUENCO, S.; ALVAREZ, D.; MORAN, D.; TURMELLE, A.; ELLISON, J.; GARCIA, D. L.; ESTEVEZ, A.; LINDBLADE, K.; RUPPRECHT, C. *Bartonella* spp. in Bats, Guatemala. **Emerg Infect Dis**, v. 17, n. 7, p. 1269-72, 2011.

BANERJEE, A.; KULCSAR, K.; MISRA, V.; FRIEMAN, M.; MOSSMAN, K. Bats and Coronaviruses. **Viruses**, v. 11, n. 1, p. 41, 2019.

BANKS-LEITE, C.; PARDINI, R.; TAMBOSI, L. R.; PEARSE, W. D.; BUENO, A. A.; BRUSCAGIN, R. T.; CONDEZ, T. H.; DIXO, M.; IGARI, A. T.; MARTENSEN, A. C.; METZGER, J. P. Using ecological thresholds to evaluate the costs and benefits of set-asides in a biodiversity hotspot. **Science**, v. 345, n. 6200, p. 1041-1045, 2014.

BARBIERI, A. R. M. **Ecologia de carrapatos e riquetsias transmitidas por carrapatos em uma reserva natural do cerrado brasileiro**. PhD thesis. São Paulo, Brazil: Universidade de São Paulo, 2016. BAYNES, J.; DOMINICZAK, M. H. Medical biochemistry. **Elsevier Health Sciences**; 2009. BERNAL, M. K. M.; CHIANG, J. O.; MENDES, F. F.; ANDRADE, S. L. D. S.; SILVA, S. K. S. M. D.; PEREIRA, W. L. A. Study of Arboviruses in *Philander opossum*, *Didelphis marsupialis* and *Nectomys rattus* captured from forest fragments in the municipality of Belém, Pará, Brazil. **Ciência Rural**, v. 51, p. 1-8, 2021.

BERNARD, E.; FENTON, M. B. Species diversity of bats (Mammalia: Chiroptera) in forest fragments, primary forests, and savannas in central Amazonia, Brazil. **Canadian Journal of Zoology**, v. 80, n. 6, p. 1124-1140, 2002.

BECKER, D.; CZIRJÁK, G.; VOLOKHOV, D.; BENTZ, A.; CARRERA, J.; CAMUS, M.; NAVARA, K.; CHIZHIKOV, V.; FENTON, M.; SIMMONS, N.; RECUENCO, S.; GILBERT, S.; ALTIZE, S.; STREICKER, D. Livestock abundance predicts vampire bat demography, immune profiles and bacterial infection risk. **Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.** v. 373, p. 20170089, 2018.

BECKER, D.; SPEER, K.; BROWN, A.; FENTON, B.; WASHBURNE, A.; ALTIZER, S.; STREICKER, D.; PLOWRIGHT, R.; CHIZHIKOV, V.; SIMMONS, N.; VOLOKHOV, D. Ecological and evolutionary drivers of haemoplasma infection and bacterial genotype sharing in a Neotropical bat community. **Mol. Ecol**, v. 29, p. 972–995, 2020.

BENEVUTE, J. L.; DUMLER, J. S.; OGRZEWSKA, M.; ROQUE, A. L. R.; MELLO, V. V. C.; DE SOUSA, K. C. M.; GONÇALVES, L. R.; D'ANDREA, P. S.; DE SAMPAIO-LEMO, E. R.; MACHADO, R. Z.; ANDRÉ, M. R. Assessment of a quantitative 5' nuclease real-time

polymerase chain reaction using *groEL* gene for *Ehrlichia* and *Anaplasma* species in rodents in Brazil. **Ticks TickBorne Dis**, v. 8, n. 4, p. 646-656, 2017.

BERENT, L. M.; MESSICK, J. B. Physical map and genome sequencing survey of *Mycoplasma haemofelis* (*Haemobartonella felis*). **Infect Immun**, v. 71, n. 6, p. 3657-62, 2003.

BERTÃO-SANTOS, A.; CALDART, E. T.; MATOS, A. M. R. N.; PASCHOAL, A. T. P.; PINTO-FERREIRA, F.; SOARES, J. F.; GONÇALVES, D. D.; MITSUKA-BREGANÓ, R.; NAVARRO, I. T. Investigação de patógenos transmitidos por carrapatos por detecção molecular em *Didelphis albiventris* atropelados no norte do Paraná, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 44, n. 1, p. 451– 460, 2023.

BITENCOURT, M. M.; BEZERRA, A. M. R. Infection agents of Didelphidae (Didelphimorphia) of Brazil: an underestimated matter in zoonoses research. **Mammalia**, v. 86, n. 2, p. 105-122, 2022.

BRAGA, M. S. C. O.; PEREIRA, J. G.; FERNANDES, S. J.; MARQUES, I. C. L.; JESUS, R. P.; FERREIRA, G. S.; XAVIER, D. R.; BENEVENUTE, J. L.; MACHADO, R. Z.; ANDRÉ, M. R. Molecular detection os Anaplasmataceae in *Dasyprocta azarae* in northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v.27, n.1, p.98-104, 2018.

BRAGA, M. S. C. O.; COSTA, F. B.; CALCHI, A. C.; MELLO, V. V. C.; MONGRUEL, A. C. B.; DIAS, C. M.; BASSINI-SILVA, R.; SILVA, E. M. C.; PEREIRA, J. G.; RIBEIRO, L. S. S.; COSTA, A. P.; ANDRADE, F. H. E.; SILVA, A. L. A.; MACHADO, R. Z.; ANDRÉ, M. R. Molecular detectionand characterization of vector-borne agents in common opossums (*Didelphis marsupialis*) from northeastern Brazil. **Acta Tropica**, v. 244, 2023.

BRANDÃO, V. M. D.; BARROZO, P. H. M.; SOUSA, L. O.; DOS SANTOS, R. C.; SCHWANKE,K.; SAMPAIO, J. F. D.; PRADO, W. S.; AMARAL, A. S.; CAVALVCANTE, G. G. Molecular detection of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* in dogs from municipality of Belém, State of Pará,Brazil. **Ciência Rural**, v. 49, n. 12, p. 20190414, 2019.

BREITSCHWERDT, E. B.; MAGGI, R. G.; CHOMEL, B. B.; LAPPIN, M. R. Bartonellosis: anemerging infectious disease of zoonotic importance to animals and human beings. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 20, p. 8–30, 2010.

BRITO JUNIOR, P. D. A.; ROCHA, J. M.; SILVA, C. A. D.; OLIVEIRA, P. M. V.; CORREIA, J. E.; CRUZ, L. A. D.; SEVÁ, A. P.; OLIVEIRA, T. V.; SILVA, A. V.; ALVAREZ, M. R. V.; ALBUQUERQUE, G. R. Survey of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in wild mammals captured from Atlantic Forest fragments in Bahia, northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 29, p.1-13, 2020.

BROOK, C. E.; DOBSON, A. P. Bats as ‘special’ reservoirs for emerging zoonoticpathogens. **Trends in Microbiology**, v. 23, p. 172–180, 2015.

CAO, W. C.; GAO, Y. M.; ZHANG, P. H.; ZHANG, X. T.; DAI, Q. H.; DUMLER, J. S.; FANG, L. Q.; YANG, H. Identification of *Ehrlichia chaffeensis* by nested PCR in ticks from Southern

China. **JClin Microbiol**, v. 38, n. 7, p. 2778-80, 2000.

CÂNDIDO, S. L.; PEREIRA, N. A.; FONSECA, M. J. O. R.; PACHECO, R. C.; MORGADO, T. O.; COLODEL, E. M.; NAKAZATO, L.; DUTRA, V.; VIEIRA, T. S. W. J.; AGUIAR, D. M. Molecular detection and genetic characterization of *Ehrlichia canis* and *Ehrlichia* sp. in neotropical primates from Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 14, I. 4, 2023.

CAPIZZI, D.; BERTOLINO, S.; MORTELLITI, A. Rating the rat: Global patterns and research priorities in impacts and management of rodent pests. **Mammal Review**, v. 44, p. 148–162, 2014.

CARINI, A. **Sur unegrandee´pizootie de rage**. Instituto Pasteur (Paris), v. 25, p. 843–846, 1911.
CASTELO-BRANCO, D. S. C. M.; NOBRE, J. A.; SOUZA, P. R. H.; DIÓGENES, E. M.; GUEDES, G. M. M.; MESQUITA, F. P.; SOUZA, P. F. N.; ROCHA, M. F. G.; SIDRIM, J. J. C.; CORDEIRO, R. A.; MONTENEGRO, R. C. Role of Brazilian bats in the epidemiological cycle of potentially zoonotic pathogens. **Microbial Pathogenesis**, v. 77, p. 106032. 2023.

COLLE, A. C.; MENDONÇA, R. F. B.; MAIA, M. O.; FREITAS, L. C.; WITTER, R.; MARCILI, A.; AGUIAR D. M.; MUÑOZ-LEAL, S.; LABRUNA, M. B.; ROSSI, R. V.; PACHECO R. C. Molecular survey of tick-borne pathogens in small mammals from Brazilian Amazonia. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 28, p. 592-604, 2019.

COLLIERE, F. C. M.; FERRARI, L. D. R.; DROZINO, R. N.; VALENTE, J. D. M.; MASSINI, P. F.; OTOMURA, F. H.; DE ORNELAS TOLEDO, M. J.; VIEIRA, T. S. W. J.; DA COSTA VIEIRA, R. F. Hemotropic mycoplasmas in bats from forest fragments, state of Paraná, southern Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 43, n. 1, p.431-440, 2022.

ÇETINKAYA, H.; MATUR, E.; AKYAZI, İ.; EKİZ, E. E.; AYDIN, L.; TOPARLAK, M. Serological and molecular investigation of *Ehrlichia* spp. and *Anaplasma* spp. in ticks and blood of dogs, in the Thrace Region of Turkey. **Ticks Tick Borne Dis**, v. 7, n. 5, p. 706-714, 2016.

CHAE, J. S.; YU DO, H.; SHRINGI, S.; KLEIN, T. A.; KIM, H. C.; CHONG, S. T.; LEE, I. Y.; FOLEY, J. Microbial pathogens in ticks, rodents and a shrew in northern Gyeonggi-do near the DMZ. **Korean J. Vet. Sci**, v. 9, p. 285–293, 2008.

COHEN, C.; SHEMESH, M.; GARRIDO, M.; MESSIKA, I.; EINAV, M.; KHOKHLOVA, I.; TASKER, S.; HAWLENA, H. Haemoplasmas in wild rodents: Routes of transmission and infection dynamics. **Molecular Ecology**, v. 27, p. 3714–3726, 2018.

CONRADO, F. D. O.; DO NASCIMENTO, N. C.; DOS SANTOS, A. P.; ZIMPEL, C. K.; MESSICK, J. B.; BIONDO, A. W. Occurrence and identification of hemotropic mycoplasmas (Hemoplasmas) in free ranging and laboratory rats (*Rattus norvegicus*) from two Brazilian zoos. **BMC Veterinary Research**, v. 11, n. 1, p. 1-10, 2015.

CLOUTIER, D.; THOMAS, D. W. *Carollia perspicillata*. **Mammalian species**, v. 417, p. 1-9, 1992. DAHMANA, H.; GRANJON, L.; DIAGNE, C.; DAVOUST, B.; FENOLLAR, F.;

MEDIANNIKOV, O. Rodents as hosts of pathogens and related zoonotic disease risk. **Pathogens**, v. 9, n.3, p.202, 2020.

DALAPICOLLA, J.; PERCEQUILLO, A. R. Species concepts and taxonomic practice in the integrative taxonomy era: an example using South American rodents. **Boletim da Sociedade Brasileira de Mastozoologia**, v. 88, p. 36-54, 2020.

DARRIBA, D.; TABOADA, G.; DOALLO, R. *et al.* jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nat Methods** 9, p. 772, 2012.

DAWSON, J. E., K. L.; BIGGIE, C. K.; WARNER, K.; COOKSON, S.; JENKINS, J. LEVINE, J. G. O. Polymerase chain reaction evidence of *Ehrlichia chaffeensis*, etiologic agent of human ehrlichiosis, in dogs from southeast Virginia. **Am. J. Vet. Res**, v. 57, p. 1175-1179, 1996.

DE OLIVEIRA, M. M.; FERRANDO, C. P. R.; GÓMEZ-HERNÁNDEZ, C.; DE OLIVEIRA, K. R.; ARAÚJO, I. A. C.; RIBEIRO, P. V. A.; MINEO, T. W. P.; LEINER, N. O.; MINEO, J. R.; DA SILVA, S. M. Prevalence of *Trypanosoma lainsoni* and its effects of parasitism on the health of non-volant small mammals from the Brazilian Cerrado. **Parasitology Research**, v. 122, n. 7, p. 1509-1518, 2023.

DE MELLO, V. V. C.; RAMOS, I. A. S.; HERRERA, H. M.; MENDES, N. S.; CALCHI, A. C.; CAMPOS, J. B.; MACEDO, G. C.; ALVES, J. V. A.; MACHADO, R. Z.; ANDRÉ, M. R. Occurrence and genetic diversity of hemoplasmas in beef cattle from the Brazilian Pantanal, an endemic area for bovine trypanosomiasis in South America. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 66, p. 101337, 2019.

DE MELLO, V. V. C.; PLACA, A. J. V.; LEE, D. A. B.; FRANCO, E. O.; LIMA, L.; TEIXEIRA, M. M.; HEMSLEY, C.; TITBALL, R. W.; MACHADO, R. Z.; ANDRÉ, M. R. Molecular detection of blood-borne agents in vampire bats from Brazil, with the first molecular evidence of *Neorickettsia* sp. in *Desmodus rotundus* and *Diphylla ecaudata*. **Acta Tropica**, v. 244, p. 106945, 2023.

DE SOUSA, K. C. M.; HERRERA, H. M.; SECATO, C. T.; OLIVEIRA, A. V.; SANTOS, F. L. M.; ROCHA, F. L.; BARRETO, W. T. G.; MACEDO, G. C.; PINTO, P. C. E. A.; MACHADO, R. Z.; COSTA, M. T.; ANDRÉ, M. R. Occurrence and molecular characterization of hemoplasmas in domestic dogs and wild mammals in a Brazilian wetland. **Acta tropica**, v. 171, p. 172-181, 2017.

DE SOUSA, K. C. M.; CALCHI, A. C.; HERRERA, H. M.; DUMLER, J. S.; BARROS-BATTESTI, D. M.; MACHADO, R. Z.; ANDRÉ, M. R. Anaplasmataceae agents among wild mammals and ectoparasites in Brazil. **Epidemiology and Infection**, v. 145, n. 16, p. 3424-3437, 2017.

DIMKIĆ, I.; FIRA, D.; JANAKIEV, T.; KABIĆ, J.; STUPAR, M.; NENADIĆ, M.; UNKOVIĆ, N.; GRBIĆ, M. L. The microbiome of bat guano: for what is this knowledge important? **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 105, p. 1407–1419, 2021.

DIARRA, A. Z.; KONE, A. K.; DOUMBO, NIARE, S.; LAROCHE, M.; DIATTA, G.;

ATTEYNINE, S. A.; COULIBALY, M.; SANGARE, A. K.; KOURIBA, B.; DJIMDE, A.; DABO, A.; SAGARA, I.; DAVOUST, B.; RANQUE, S.; THERA, M. A.; RAULT, D.; DOUMBO, O. K.; PAROLA, P. Molecular Detection of Microorganisms Associated with Small Mammals and Their Ectoparasites in Mali. **Am J Trop Med Hyg**, v. 103, n. 6, p. 2542-2551, 2020.

DI CATALDO, S.; KAMMANI, J.; CEVIDANES, A.; MSHELIZA, E. G.; MILLÁN, J. Hemotropic mycoplasmas in bats captured near human settlements in Nigeria. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis**, v. 70, p. 101448, 2020.

DOS SANTOS, L. C.; VIDOTTO, O.; DOS SANTO, N. J. R.; RIBEIRO, J.; PELLIZZARO, M.; DOSSANTOS, A. P.; HAISI, A.; VIEIRA, T. S. W. J.; DE BARROS FILHO, I. R.; CUBILLA, M. P.; JUNIOR, J. P. A. Hemotropic mycoplasmas (hemoplasmas) in free-ranging bats from Southern Brazil. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 69, p. 101416, 2020.

DOUDIER B.; OLANO, J.; PAROLA, P.; BROUQUI, P. Factors contributing to emergence of *Ehrlichia* and *Anaplasma* spp. as human pathogens. **Vet Parasitol**, v. 167, n. 2, p. 149-54, 2010.

DUMLER, J. S.; BARBET, A. F.; BEKKER, C. P. J.; DASCH, G. A.; PALMER, G. H.; RAY, S. C.; RIKIHISA, Y.; RURANGIRWA, F. R. "Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, description of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*." **Int. J. Syst. Evol. Microbiol**, v. 51, p. 2145-2165, 2001.

EDWARD, D. G.; FREUNDT, E. A. "Proposal for Mollicutes as name of the class established for the order Mycoplasmatales." **Int. J. Syst. Bacteriol**, v. 17, p. 267-268, 1967.

EDWARD, D. G.; FREUNDT, E. A. In: SKERMAN, V. B. D., MCGOWAN, V.; SNEATH, P. H. A. "Approved Lists of Bacterial Names." **Intl. J. Syst. Bacteriol**. v. 30, n. 1, p. 225-420, 1980.

ETTINGER, S. J., FELDMAN, E. C. Obligate Intracellular Bacterial Pathogens. In: Textbook of Veterinary Internal Medicine (6th ed.). **Elsevier Saunders**, p. 631-636, 2005.

FACURE, K. G.; MONTEIRO-FILHO, E. L. A. Feeding habits of the crab-eating fox *Cerdocyon thous* (Carnivora, Canidae) in a suburban area of southeastern Brazil. **Mammalia**, v. 60, n. 1, p. 147-149, 1996.

FERNANDES, J. J.; PEIXOTO, A. L.; DE FARIAS, A. S. S.; PINHEIRO, T. J.; DA COSTA, D. F.; SILVA, M. L. C. R.; JÚNIOR, J. P. A.; MALOSSI, C. D.; ULLMANN, L. S.; DE AZEVEDO, S. S.; ALVES, C. J.; HIGINO, S. S. S. *Didelphis albiventris* as a carrier of *Leptospira* sp. in the central nervous tissue in the semiarid region of Northeast, Brazil. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v. 73, n. 58, p. 101560, 2020.

FLECK, D. W., & HARDER, J. D. Ecology of Marsupials in Two Amazonian Rain Forests

in Northeastern Peru. **Journal of Mammalogy**, v. 76, n. 3, p. 809–818, 1995. doi: 10.2307/1382749.

FREUNDT, E. A. "The classification of the pleuropneumonia group of organisms (Borrelomycetales)." **Int. Bull. Bacteriol. Nomencl. Taxon**, v. 5, p. 67-78, 1955.

FRITSCHI J.; MARTI, H.; SETH-SMITH, H. M. B.; AEBY, S.; GREUB, G.; MELI, M. L.; HOFMANN-LEHMANN, R.; MUHLDOERFER, K.; STOKAR-REGENSCHEIT, N.; WIEDERKEHR, D.; PILO, P.; VAN DEN BROEK, P.R.; BOREL, N. Prevalence and phylogeny of Chlamydiae and hemotropic mycoplasma species in captive and free-living bats. **BMC Microbiol**, v.20, n. 1, p. 182, 2020.

GARDNER, A. L. **Mammals of South America, Volume 1, Marsupials, Xenarthrans, Shrews, and Bats**. Chicago and London: The University of Chicago Press, p. 669, 2007.

GARRITY, G. M.; BELL, J. A.; LILBURN, T. "Class I. Alphaproteobacteria class. nov." In: D.J. BRENNER, N. R. KRIEG, J. T. STALEY; G. M. GARRITY (eds), *Bergeys Manual of Systematic Bacteriology*, second edition, vol. 2 (The Proteobacteria), part C (The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria), **Springer, New York**, p. 1, 2005.

GIBBONS, N. E.; MURRAY, R. G. E. In: OREN, A.; GARRITY, G. M. "Valid publication of the names of forty-two phyla of prokaryotes." **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** v. 71, n. 10, p. 50-56, 2021.

GIROTTI, A.; ZANGIRÓLAMO, A. F.; BOGADO, A. L. G.; SOUZA, A. S. L.; SILVA, G. C. F.; GARCIA, J. L.; BOAS, L. A. V.; BIONDO, A. W.; VIDOTTO, O. Molecular detection and occurrence of '*Candidatus Mycoplasma haemobos*' in dairy cattle of Southern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, p. 342-344, 2012.

GIESZCZKIEWICZ, M. "Zagadnienie systematiki w bakteriologii - Zur Frage der Bakterien-Systematic." **Bulletin de l'Academie Polonaise des Sciences Serie des Sciences Biologiques**, v. 1, n. 9, p. 27, 1939.

GOETHERT, H. K. What *Babesia microti* is now. **Pathogens**, v. 10, n. 9, p. 1168, 2021.
GONÇALVES, L. R.; ROQUE, A. L. R.; MATOS, C. A.; FERNANDES, S. D. J.; OLMOS, I. D. F.; MACHADO, R. Z.; ANDRÉ, M. R. Diversidade e caracterização molecular de novos hemoplasmas infectando roedores silvestres de diferentes biomas brasileiros. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v. 43, p. 50-56, 2015.

GONÇALVES, L. R.; HERRERA, H. M.; NANTES, W. A. G.; SANTOS, F. M.; PORFÍRIO, G.; BARRETO, W. T. G.; DE MACEDO, G. C.; ASSIS, W. D. O.; CAMPOS, J. B. V.; DASILVA, T. M. V Genetic diversity and lack of molecular evidence for hemoplasma cross-species transmission between wild and synanthropic mammals from Central-Western Brazil. **Acta tropica**, v. 203, p. 1053-03, 2020.

GONÇALVES-OLIVEIRA, J.; GUTIERREZ, R.; SCHLESNER, C. L.; JAFFE, D. A.;

AGUILAR-SETIÉN, A.; BOULOUIS, H. J.; NACHUM-BIALA Y.; HUANG, B. C.; WEIMER, B. C.; CHOMEL, B. B.; HARRUS, S. Genomic Characterization of Three Novel *Bartonella* Strains in a Rodent and Two Bat Species from Mexico. **Microorganisms**, v. 11, n. 2, p. 340, 2023.

GRACIOLLI, G.; ZORTÉA, M.; CARVALHO, L. F. A. C. Bat flies (Diptera, Streblidae and Nycteriidae) in a Cerrado area of Goiás state, Brazil. **Rev Bras entomol**, v. 54, n. 3, p. 511-4, 2010.

GREIMAN, S. E.; TKACH, M.; VAUGHAN, J. A.; TKACH, V. V. Laboratory maintenance of the bacterial endosymbiont, *Neorickettsia* sp., through the life cycle of a digenean, *Plagiorchis elegans*. **Exp. Parasitol**, v. 157, p. 78–83, 2015.

GU, W.; MILLER, S.; CHIU, C. Clinical metagenomic next-generation sequencing for pathogen detection. **Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis**, v. 14, p. 319–338, 2019.

GUIMARÃES, A.; RAIMUNDO, J. M.; SILVA, A. T.; CARPINTERO, F. M.; PIRES, J. R.; BENEVENUTE, J. L.; MACHADO, R. Z.; ANDRÉ, M. R.; BALDANI, C. D. Detection of a putative novel genotype of *Ehrlichia* sp. from opossums (*Didelphis aurita*) from Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v.28, n.1, p.140-144, 2019.

HAN, B. A.; KRAMER, A. M.; DRAKE, J. M. Global Patterns of Zoonotic Disease in Mammals. **Trends in Parasitology**, v. 32, p. 565–577, 2016.

HORTA, M. C.; RAGOZO, A. M. A.; CASAGRANDE, R. A.; REIKO, E.; GENNARI, S. M. Occurrence of anti-*Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Leptospira* spp. antibodies in opossums (*Didelphis* spp.) in São Paulo State, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 53, n. 3, p. 1–9, 2016.

HATTORI, N.; KURODA, M.; KATANO, H.; TAKUMA, T.; ITO, T.; ARAI, N.; YANAI, R.; SEKIZUKA, T.; ISHII, S.; MIURA, Y.; TOKUNAGA, T.; WATANABE, H.; NOMURA, N.; EGUCHI, J.; HASEGAWA, H.; NAKAMAKI, T.; WAKITA, T.; NIKI, Y. *Candidatus Mycoplasma haemohominis* in human, Japan. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 26, p. 11–19, 2020.

HERTIG, M. "The rickettsia, *Wolbachia pipientis* (gen. et sp. n.) and associated inclusions of the mosquito, *Culex pipiens*." **Parasitol**, v. 28, p. 453-486, 1936.

HIDALGO-HERMOSO, CABELLO, J.; NOVOA-LAZANO, I.; CELIS, S.; ORTIZ, C.; KEMEC, I.; LAGOS, R.; VERASAY, J.; MANSELL-VENEGAS, M.; MOREIRA-ARCE, D.; VERGARA, P. M.; MILLÁN, J.; ESPERON, F. Molecular detection and characterization of hemoplasmas in the Pudu (*Pudu puda*), a native cervid from Chile. **Journal of wildlife diseases**, v. 58, n.1, p. 8-14, 2022.

HORNOK, S.; FOLDVARI, G.; RIGO, K.; MELI, M. L.; GONCZI, E.; RÉPÁSI, A.; FARKAS, R. PAPP, I.; KONTSCHÁN, J.; HOFMANN-LEHMANN, R. Synanthropic rodents and their ectoparasites as carriers of a novel haemoplasma and vector-borne, zoonotic pathogens indoors. **Parasites & vectors**, v. 8, n. 1, p. 1-6, 2015.

IANNINO, F.; SALUCCI, S.; DI PROVVIDO, A.; PAOLINI, A.; RUGGIERI, E. Bartonella infections in humans, dogs and cats. **Veterinaria Italiana**, v. 54, n.1, p. 63-72, 2018.

IKEDA, P.; SEIKI, M.; CARRASCO, A.; RUDIAK, L.; MIRANDA, J.; GONÇALVES, S.; WERTHER, K. Evidence and molecular characterization of *Bartonella* spp. and hemoplasmas in neotropical bats in Brazil. **Epidemiology Infect**, v. 145, p. 2038–2052, 2017.

IKEDA, P.; TORRES, J. M.; PLACA, A. J. V.; MELLO, V. V. C. D.; LOURENÇO, E. C.; HERRERA, H. M.; OLIVEIRA, C. E. D.; HEMSLEY, C.; TITBALL, R.W.; MACHADO, R. Z.; ANDRÉ, M. R. Molecular Survey of Anaplasmataceae Agents and Coxiellaceae in Non-Hematophagous Bats and Associated Ectoparasites from Brazil. **Parasitologia**, v. 1, p. 197–209, 2021.

IKEDA, P.; TORRES, J. M.; LOURENÇO, E. C.; ALBERY, G. F., HERRERA, H. M.; DE OLIVEIRA, C. E., MACHADO, R. Z.; ANDRÉ, M. R. Molecular detection and genotype diversity of hemoplasmas in non-hematophagous bats and associated ectoparasites sampled in peri-urban areas from Brazil. **Acta Tropica**, v. 225, p. 106203, 2022.

IRVING, A. T.; AHN, M.; GOH, G.; ANDERSON, D. E.; WANG, L. Lessons from the host defenses of bats, a unique viral reservoir. **Nature**, v. 589, n. 7842, p. 363-370, 2021.

ISMAIL, N.; BLOCH, K. C.; MCBRIDE, J. W. Human Ehrlichiosis and Anaplasmosis. *Clinics in Laboratory Medicine*, v. 30, n. 1, p. 261–292, 2010.

JALALI, M.; ZABOROWSKA, J.; JALALI, M. The Polymerase Chain Reaction. **Basic Science Methods for Clinical Researchers**, p. 1–18, 2017.

JONES, K. E.; PATEL, N. G.; LEVY, M. A.; STOREYGARD, A.; BALK, D.; GITTLEMAN, J. L.; DASZAK, P. Global trends in emerging infectious diseases. **Nature**, v. 451, p. 990–993, 2008.

KASHIMURA, M. The human spleen as the center of the blood defense system. **Int J Hematol**, v.112, n. 2, p. 147-158, 2020.

KERSTERS, K.; DE VOS, P.; GILLIS, M.; SWINGS, J.; VANDAMME, P.; STACKERBRANDT, E. Introduction to the proteobacteria. In: DWORKIN, M.; FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K. H.; STACKERBRANDT, E. (Eds.), **The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria**, vol 5: Proteobacteria: Alpha and Beta Subclasses, p. 68-122, 2006.

KESSING, F.; HERSH, M. H.; TIBBETTS, M.; MCHENRY, D. J.; DUERR, S.; BRUNNER, J.; KILLILEA, M.; LO GIUDICE, K.; SCHMIDT, K. A.; OSTFELD, R. S. Reservoir competence of vertebrate hosts for *Anaplasma phagocytophilum*. **Emerg Infect Dis**, v. 18, n. 12, p. 2013-6, 2012.

KREIER, J.; HALL, L. The relationship of parasitaemia to the lifespan of erythrocytes of rats

- infected with *Haemobartonella muris*. **Journal of Infectious Diseases**, v.118, p. 443–448, 1968.
- KRUGEL, M.; KRÓL, N.; VOLKHARD, A.J.K.; PFEFFER, M.; OBIEGALA, A. Emerging rodent-associated Bartonella: a threat for human health? **Parasites & Vectors**, v. 15, n. 1, p. 113, 2022.
- KUMAR, A.; BIRNBAUM, M. D.; PATEL, D. M.; MORGAN, W. M.; SINGH J.; BARRIENTOS, A.; ZHANG, F. Posttranslational arginylation enzyme Ate1 affects DNA mutagenesis by regulating stress response. **Cell Death Dis**, v. 7, n. 9, p. 2378, 2016.
- KUNZ, TH. ‘**Ecology of Bats**’, Plenum Press, New York. ISBN 13: 978-1-4613-3423-1:P.1-305, 2003.
- LABRUNA, M. B.; MCBRIDE, J. W.; CAMARGO, L. M.; AGUIAR, D. M.; YABSLEY, M. J.; DAVIDSON, W. R.; STROMDAHL, E. Y.; WILLIAMSON, P. C.; STICH, R. W.; LONG, S. W.; CAMARGO, E. P.; WALKER, D. H. A preliminary investigation of *Ehrlichia* species in ticks, humans, dogs, and capybaras from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 143, n. 2, p. 189-195, 2007.
- LABRUNA, M. B. Ecology of rickettsia in South America. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1166, n. 1, p. 156-166, 2009.
- LEE, H.; SEO, M. G.; LEE, S. H.; OEM, J. K.; KIM, S. H.; JEONG, H.; KIM, Y.; JHEONG, W. H.; KWON, O. D.; KWAK, D. Relationship among bats, parasitic bat flies, and associated pathogens in Korea. **Parasites & Vectors**, v. 14, p. 1-11, 2021.
- LI, S.; ZHANG, L.; LI, Z.; SONG, H.; QUE, Z.; ZHAO, S.; LI, Y.; GUO, Y.; WU, J. Distribution and Molecular Epidemiology of *Anaplasma ovis* in *Melophagus ovinus* and Small Ruminants in Border Regions of South Xinjiang, China. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, p. 1-8, 2023.
- LIMA, M. L.; SOARES, P. T.; RAMOS, C. A.; ARAÚJO, F. R.; RAMOS, R. A.; SOUZA, I. I.; FAUSTINO, M. A.; ALVES, L. C. Molecular detection of *Anaplasma platys* in a naturally-infected cat in Brazil. **Braz J Microbiol**, v. 41, n. 2, p. 381-5, 2010.
- LINDSEY, J. R.; BOORMAN, G. A.; COLLINS, M. J. J.; HSU, C. K.; VAN, HOOSIER, G. L. J.; WAGNER, J. E.; Infectious diseases of mice and rats. **National Academy Press**, Washington DC, 1991.
- LÓPEZ-BAUCCELLS, A.; ROCHA, R.; BOBROWIEC, P.; BERNARD, E.; PALMEIRIM, J.; MEYER, C. Field Guide to Amazonian Bats. **INPA**, Manaus, Ed. 1, vol. 1, 2016.
- LOPES, M.G.; MUÑOZ-LEAL, S.; DE LIMA, J. T. R.; FOURNIER, G. F. D. S. R.; ACOSTA, I. D. C. L.; MARTINS, T. F.; RAMIREZ, D. G.; GENNARI, S. M.; LABRUNA, M. B. Ticks, rickettsial and erlichial infection in small mammals from Atlantic forest remnants in northeastern Brazil. **Int J Parasitol Parasites Wildl**, v. 7, n. 3, p. 380-385, 2018.

LOW, B. S. Marsupials: evolutionary ecology of marsupials. **Science**, v. 232, n. 4746, p. 111-2, 1986.

MCBRIDE, J. W.; YU, X. J.; WALKER, D. H. A conserved, transcriptionally active *p28* multigene locus of *Ehrlichia canis*. *Gene*, v. 254, n. 1-2, p. 254-252, 2000.

MACHADO, C. A. L.; VIDOTTO, O.; CONRADO, F. O.; SANTOS, N. J. R.; VALENTE, D. M.; BARBOSA, I. C.; TRINDADE, P. W. S.; GARCIA, J. L.; BIONDO, A. W.; VIEIRA, T. S. W. J.; VIEIRA, R. F. C. *Mycoplasma ovis* infection in goat farms from northeastern Brazil. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 55, p. 1-5, 2017.

MAEDA, K.; MARKOWITZ, N.; HAWLEY, R. C.; RISTIC, M.; COX, D.; MCDADE, J. E. Human infection with *Ehrlichia canis*, a leukocytic rickettsia. **New Engl. J. Med**, v. 316, n. 14, p. 853-856, 1987.

MAGGI, R. G.; COMPTON, S. M.; MASCARELLI, P. E.; MOZAYENI, B. R.; BREITSCHWERDT, E. B. Infection with hemotropic *Mycoplasma* species in patients with or without extensive arthropod or animals contact. **Journal of Clinical Microbiology, Washington**, v. 51, n. 10, p. 3237-3241, 2013.

MARCONDES, M.; HIRATA, K. Y.; VIDES, J. P.; SOBRINHO, L. S.; AZEVEDO, J. S.; VIEIRA, T. S.; VIEIRA, R. F. Infection by *Mycoplasma* spp., feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus in cats from an area endemic for visceral leishmaniasis. **Parasites & vectors**, v. 11, p. 1-8, 2018.

MARQUES, R. G.; PETROIANU, A.; DE OLIVEIRA, M. B. N.; BERNARDO FILHO, M. Importância da preservação de tecido esplênico para a fagocitose bacteriana. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 17, n. 6, p. 388-393, 2002.

MEERBURG, B. G.; SINGLETON, G. R.; KIJLSTRA, A. Rodent-borne diseases and their risks for public health. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 35, n. 3, p. 221-270, 2009.

MESSICK, J. B.; WALKER, P. G.; RAPHAEL, W.; BERENT, L.; SHIN, X. “*Candidatus mycoplasma haemodidelphidis*” sp. nov., “*Candidatus mycoplasma haemolamae*” sp. nov. and *Mycoplasma haemocanis* comb. nov., haemotrophic parasites from a naturally infected opossum (*Didelphis virginiana*), alpaca (*Lama pacos*) and dog (*Canis familiaris*): phylogenetic and secondary structural relatedness of their *16S rRNA* genes to other mycoplasmas. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, p. 693–698, 2002.

MESSICK, J. B. Hemotrophic mycoplasmas (hemoplasmas): a review and new insights into pathogenic potential. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 33, p. 2-13, 2004.

MICELI, N. G.; GAVIOLI, F. A.; GONÇALVES, L. R.; ANDRÉ, M. R.; SOUSA, V. R. F.; SOUSA, K. C. M. D.; MACHADO, R. Z. Molecular detection of feline arthropod-borne pathogens in cats in Cuiabá, state of Mato Grosso, central-western region of Brazil. **Revista Brasileira de**

Parasitologia Veterinária, v. 22, p. 385-390, 2013.

MILLÁN, J.; LÓPEZ-ROIG, M.; DELICADO, V.; SERRA-COBO, J.; ESPERÓN, F. Widespread infection with chemotropic mycoplasmas in bats in Spain, including a hemoplasma closely related to “*Candidatus Mycoplasma hemohominis*.” **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis**, v. 39, p. 9–12, 2015.

MILLÁN, J.; CEVIDANES, A.; SACRISTÁN, I.; ALVARADO, M.; SEPÚLVEDA, G.; RAMOS-MELLA, C.A.; LISÓN, F. Detection and Characterization of Hemotropic Mycoplasmas in Bats in Chile. **J. Wildl. Dis**, v. 55, n. 4, p. 977-981, 2019.

MILLÁN, J.; DI CATALDO, S.; VOLOKHOV, D. V.; BECKER, D. J. Worldwide occurrence of haemoplasmas in wildlife: Insights into the patterns of infection, transmission, pathology and zoonotic potential. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 68, n. 6, p. 3236-3256, 2021.

MONGRUEL, A. C. B.; SPANHOL, V.C.; VALENTE, J.D.M.; PORTO, P.P.; OGAWA, L.; OTOMURA, F.H.; MARQUEZ, E.S.; ANDRÉ, M.R.; VIEIRA, T.S.W.J.; VIEIRA, R.F.D.C. Survey of vector-borne and nematode parasites involved in the etiology of anemic syndrome in sheep from Southern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 29, n. 3, 2020.

MORRISON, D. Foraging and Day-Roosting Dynamics of Canopy Fruit Bats in Panama. **Journal of Mammology**, v. 61 n. 1, p. 20-29, 1980.

MUHLDOERFER, K. Bats and bacterial pathogens: a review. **Zoonoses and public health**, v. 60, n. 1, p. 93-103, 2013.

MULL, N.; SCHEXNAYDER, A.; STOLT, A.; SIRONEN, T.; FORBES, K. M. Effects of habitat management on rodent diversity, abundance, and virus infection dynamics. **Ecology and Evolution**, v. 13, n. 4, p. 1-12, 2023.

MUÑOZ-LEAL, S.; LOPES, M. G.; MARCILI, A.; MARTINS, T.; GONZÁLEZ-ACUÑA, D.; LABRUNA, M. B. Anaplasmatidae, Borrelia and Hepatozoon agents in ticks (Acari: Argasidae, Ixodidae) from Chile. **Acta Tropica**, v. 192, p. 91-103, 2019.

MURRAY, K. A.; DASZA, P. Human ecology in pathogenic landscapes: two hypotheses on how land use change drives viral emergence. **Current Opinion in Virology**, v. 3, n. 1, p. 79-83, 2013.

MUSSER, G. G.; CARLETON, M. D. Superfamily Muroidea. In: WILSON, D. E.; REEDER, D. M. **Mammals species of the world**. 3ed. The Johns Hopkins University Press, p. 9955-1186, 2005.

MUSSER, G. "Rodent". **Encyclopedia Britannica**, Disponível em: <https://www.britannica.com/animal/rodent>. Acesso em 11 julho de 2023.

NEIMARK, H.; JOHANSSON, K. E.; RIKIHISA, Y.; TULLY, J. G. Proposta de transferência de alguns membros dos gêneros Haemobartonella e Eperythrozoon para o gênero Mycoplasma com

as descrições de '*Candidatus Mycoplasma haemofelis*', '*Candidatus Mycoplasma haemomuris*', '*Candidatus Mycoplasma haemosuis*' e '*Candidatus Mycoplasma wenyonii*'. **Jornal internacional de microbiologia sistemática e evolutiva**, v. 51, n.3, p. 891-899, 2001.

NICHOLSON, W. L. Epidemiology of human granulocytic ehrlichiosis, with special reference to the role of wild rodents and Ixodid ticks as natural hosts of *Ehrlichia phagocytophila* sensu lato. PhD thesis, **Johns Hopkins School of Hygiene and Public Health**, Baltimore, MD, USA, 1998.

NIETO N. C.; FOLEY, J. E. Reservoir competence of the redwood chipmunk (*Tamias ochrogenys*) for *Anaplasma phagocytophilum*. **Vector Borne Zoonotic Dis**, v. 9, n. 6, p. 573-577, 2009.

NOVACCO, M.; RIOND, B.; MELI, M. L.; GREST, P.; HOFMANN-LEHMANN, R. Tissue sequestration of '*Candidatus Mycoplasma turicensis*'. **Veterinary microbiology**, v. 167, n. 3-4, p. 403-409, 2013.

OLANRATMANEE, P.; BAIMAI, V.; AHANTARIG, A.; TRINACHARTVANIT, W. Novel supergroup *U Wolbachia* in bat mites of Thailand. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 52, n. 1, p. 48-55, 2021.

OLIVEIRA, G. M. B.; SILVA, I. W. G.; EVARISTO, A. M. C. F.; SERPA, M. C. A.; CAMPOS, A. N. S.; DUTRA, V.; NAKAZATO, L.; AGUIAR, D. M.; LABRUNA, M. B.; HORTA, M. C. Tick-borne pathogens in dogs, wild small mammals and their ectoparasites in the semi-arid Caatinga biome, northeastern Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 11, I. 4, 2020.

OLIVEIRA, C. E. D.; HEMSLEY, C.; TITBALL, R. W.; MACHADO, R. Z. et al. Molecular Survey of Anaplasmataceae Agents and Coxiellaceae in Non-Hematophagous Bats and Associated Ectoparasites from Brazil. **Parasitologia**, v. 1, p. 197-209, 2021.

OPREA, M. D.; BRITO, P.; MENDES, S.; LOPES, R.; FONSECA. A note on the diet and foraging behavior of *Artibeus lituratus* (Chiroptera, Phyllostomidae) in an urban park in southeastern Brazil. **Biota Neotropica**, v. 7 n. 2, 2007.

OREN, A.; GARRITY, G.; PARKER, C.; CHUYOCHINA, M.; TRUJILLO, M. Lists of names of prokaryotic Candidatus taxa. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol**, v. 70, n. 7, p. 3956-4042, 2020.

OREN, A.; GARRITY, G. M. "Valid publication of the names of forty-two phyla of prokaryotes." **Int. J. Syst. Evol. Microbiol**, v. 71, n. 10, p. 5056, 2021.

O'SHEA T. J.; CRYAN, P. M.; CUNNINGHAM, A. A.; FOOKS, A. R.; HAYMAN, D. T.; LUIS, A. D.; PEEL, A. J.; PLOWRIGHT, R. K.; WOOD, J.L. Bat flight and zoonotic viruses. **Emerg InfectDis**, v. 20 p. 741-5, 2014.

PAGLIA, A. P.; FONSECA, G. A. B. D.; RYLANDS, A. B.; HERRMANN, G.; AGUIAR, L. M. S.; CHIARELLO, A. G.; LEITE, Y. L. R.; COSTA, L. P.; SICILIANO, S.; KIERULFF, M. C. M.; MENDES, S. L.; TAVARES, V. C.; MITTERMEIER, R. A.; PATTON, J. L. **Lista anotada dos mamíferos do Brasil/Annotated checklist of Brazilian mammals** (2. Ed). Arlington,

Conservation International, p. 9-82, 2012.

PAROLA, P., V.; ROUX, J. L.; CAMICAS, I.; BARADII, P.; BROUQUI, P.; RAOULT, D. Detection of *ehrlichiae* in African ticks by PCR. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** v. 94, p. 707–708, 2000.

PAROLIN, L. C. Frugivorous bats as facilitators of natural regeneration in degraded habitats: A potential global tool. **Acta Oecologica**, v. 111, p. 103748, 2021.

PATTON, J. L.; PARDINÁS, U. F. J.; D'ELÍA, G. **Mammals of South America, Volume 2, Rodents**. Chicago and London: The University of Chicago Press, p. 1363, 2015.

PAVLOVICH, S. S.; LOVETT, S. P.; KOROLEVA, G.; GUITO, J. C.; ARNOLD, C. E.; NAGLE, E. R.; KULCSAR K.; LEE, A.; THIBAUD-NISSEN, F.; HUME, A. J.; MÜHLBERGER, E.; UEBELHOER, L. S.; TOWNER, J. S.; RABADAN, R.; SANCHEZ-LOCKHART, M.; KEPLER, T. B.; PALACIOS, G. The Egyptian rousette genome reveals unexpected features of bat antiviral immunity. **Cell**, v. 173, n. 5, p. 1098-1110, 2018.

PERLES, L.; IKEDA, P.; FRANCISCO, G. V.; TORRES, J. M.; OLIVEIRA, C. E.; LOURENÇO, E. C.; HERRERA, H. M.; MACHADO, R. Z.; ANDRÉ, M. R. Molecular detection of *Hepatozoon* spp. in non-hematophagous bats in Brazil." **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 11, n. 3, p. 101401, 2020.

PERLES, L.; ROQUE, A. L. R.; D'ANDREA, P. S.; LEMOS, E. R. S.; SANTOS, A. F.; MORALES, A. C.; MACHADO, R. Z.; ANDRÉ, M. R. Genetic diversity of *Hepatozoon* spp. in rodents from Brazil. **Scientific Reports**, v. 9, p. 10122, 2019.

PETER, S. G.; ABOGE, G. O.; KARIUKI, H. W.; KANDUMA, E. G.; GAKUYA, D. W.; MAINGI, N.; MULEI C. M.; MAINGA, A. O. Molecular prevalence of emerging *Anaplasma* and *Ehrlichia* pathogens in apparently healthy dairy cattle in peri-urban Nairobi, Kenya. **BMC Vet Res**, v. 16, p. 364, 2020.

PHILIP, C. B. "Tribe II. Ehrlichieae Philip, Trib. Nov." In: R. S. Breed, E. G. D. MURRAY; N. R. SMITH (eds.), *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 7th edition. **The Williams & Wilkins Co**, p. 948-949, 1957.

PITTERMANNOVÁ, P., ŽÁKOVSKÁ, A.; VÁŇA, P.; MARKOVÁ, J.; TREML, F.; ČERNÍKOVÁ, L.; BUDÍKOVÁ, M.; BÁRTOVÁ, E. Wild Small Mammals and Ticks in Zoos-Reservoir of Agent with Zoonotic Potential. **Pathogens**, v. 10, n. 6, p. 777, 2021.

PONTAROLO, G. H.; KUHLMANN, L. F.; PEDRASSANI, D.; CAMPOS, M.; FIGUEIREDO, F. B.; VALENTE, J. D. M.; GONCALVES, L. R.; ANDRÉ, M. R.; VIEIRA, T. S. W. J.; VIEIRA, R. F. C.; BARROS-FILHO, I. R. '*Candidatus Mycoplasma haemoalbiventris*', a novel hemoplasma species in White-eared opossums (*Didelphis albiventris*) from Brazil. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 68, n. 2, p. 565-572, 2021.

POPOV, V. L.; HAN, V. C.; CHEN, S. M.; DUMLER, J. S.; FENG, H. M.; ANDREADIS, T. G.; TESH, R. B.; WALKER, D. H. Ultrastructural differentiation of the genogroups in the genus *Ehrlichia*. **J Med Microbiol**, v. 47, p. 235–251, 1998.

POVILL, C.; LAZAR, A.; BONVICINO, C. R. Levantamento de agentes zoonóticos encontrados em pequenos marsupiais da América do Sul. **Heringeriana**, v. 11, p. 13–32, 2018.

PUSTERLA, N.; LEUTENEGGER, C.M.; HUDER, J.B.; WEBER, R.; BRAUN, U., LUTZ, H. Evidence of the human granulocytic ehrlichiosis agent in Ixodes ricinus ticks in Switzerland. **J Clin Microbiol**, v. 37, n. 5, p. 1332-4, 1999.

RAMOS, E. D. S. F.; ABREU, W. U.; RODRIGUES, L. R. R.; MARINHO, L. F.; MORAIS, V. D. S.; VILLANOVA, F.; PANDEY, R. P.; ARAÚJO, E. L. L.; DENG, X.; DELWART, E.; DA COSTA, A. C.; LEAL, E. Novel *Chaphamaparvovirus* in Insectivorous *Molossus molossus* Bats, from the Brazilian Amazon Region. **Viruses**, v. 15, n.3, p. 606, 2023.

RAR, V.; YAKIMENKO, V.; TIKUNOV, A.; TANCEV, A.; EPIKHINA, T.; TIKUNOVA, N. Long-term persistence of *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia muris* in wild rodents. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 11, I. 4, 2020.

RASKIN R. E.; MEYER D. J. **Canine and feline cytology: A color atlas and interpretation guide**. 2nd ed. W. B. Saunders, Philadelphia, 2009.

RAZIN, S.; JACOBS, E. *Mycoplasma* adhesion. **Journal of general microbiology**, v. 138, n. 3, p. 407-422, 1992.

REIS, N. R.; FREGONEZI, M. N.; PERACCHI, A. L.; SHIBATTA, O. A. Morcegos do Brasil: guia de campo. **Cadernos Técnicos Editora**, p. 252, 2013.

RODRIGUES, M. S.; LIMA, I.; XAVIER, S. C. D. C.; HERRERA, H. M.; ROCHA, F. L., ROQUE, A. L. R.; TEIXEIRA, M. M. G.; JANSEN, A. M. Uncovering Trypanosoma spp. diversity of wild mammals by the use of DNA from blood clots. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 8, p. 171-181, 2019.

ROJERO-VÁSQUEZ, E.; GORDILLO-PÉREZ, G.; WEBER, M. Infection of *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia* spp. in Opossums and Dogs in Campeche, Mexico: The Role of Tick Infestation, **Frontiers in Ecology and Evolution**, v.5, 2017.

ROSÁRIO, I. N.; ANDRADE, A. J. D.; LIGEIRO, R.; ISHAK, R.; SILVA, I. M. Evaluating the adaptation process of sandfly fauna to anthropized environments in a leishmaniasis transmission area in the Brazilian Amazon. **Journal of medical entomology**, v. 54, n. 2, p. 450-459, 2017.

ROSSO, F.; TAGLIAPIETRA, V.; BARAKOVA, I.; DERDAKOVA, M.; KONECNY, A.; HAUFFE, H. C.; RIZZOLI, A. Prevalence and genetic variability of *Anaplasma phagocytophilum*

in wild rodents from the Italian alps. **Parasit. Vectors**, v. 10, p. 293. 2017.

ROQUE, A. L. R.; JANSEN, A. M. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 3, n. 3, p. 251-262, 2014.

SACRISTÁN, I.; ACUÑA, F.; AGUILAR, E.; GARCÍA, S.; LÓPEZ, M. J.; CEVIDANES, A.; CABELLO, J.; HIDALGO-HERMOSO, E.; JOHNSON, W. E.; POULIN, E.; MILLÁN, J.; NAPOLITANO, C., Assessing cross-species transmission of hemoplasmas at the wild-domestic felid interface in Chile using genetic and landscape variables analysis. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1- 14, 2019.

SCHOEB, T. R.; DAVIS, J. K.; LINDSEY, J. R. Murine respiratory mycoplasmosis, rat and mouse, in JONES, T. C.; DUNGWORTH, D. L.; MOHR, U. Monographs on the Pathology of Laboratory Animals. Respiratory System (Second edition). New York, NY, **Springer-Verlag**, p. 117-131, 1996.

SALAKIJ, C.; LERTWATCHARASARAKUL, P., SALAKIJ, J. et al. Molecular characterization of *Anaplasma platys* in a domestic cat from Thailand. **Comp Clin Pathol**, v. 21, p. 345–348, 2012.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the national academy of sciences**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

SANTOS, H. R. M.; ARGÔLO-FILHO, R. C.; LOGUERCIO, L. L. A *16S rDNA* PCR-based theoretical to actual delta approach on culturable mock communities revealed severe losses of diversity information. **BMC microbiology**, v. 19, n. 1, p. 1-14, 2019.

SANTODOMINGO, A. M.; THOMAS, R. S.; QUINTERO-GALVIS, J. F.; ECHEVERRY-BERRIO, D. M.; LA FUENTE, M. C. S.; MORENO-SALAS, L.; MUÑOZ-LEAL, S. Apicomplexans in small mammals from Chile, with the first report of the *Babesia microti* group in South American rodents. **Parasitology Research**, v. 121, n. 3, p. 1009-1020, 2022.

SANTOS, E. C. F.; MOURA-MARTINIANO, N. O.; VILELA, R. V.; LUCIO, C. S.; SILVA, A. F.; OLIVEIRA, S. V.; GAZETA, G. S. *Hepatozoon* infecting bats in the Southeastern Brazilian rainforest. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 56, n. 3, p. 693-697, 2020.

SANTOS, F.; MAGALHAES-JUNIOR, J. T.; CARNEIRO, I. O.; LAMBERT, S. M.; SOUZA, B. M. P. S.; PAUDA, A. D.; FREITAS, M. P.; FRANKE, C. R. Wild mammals involved in the transmission of *Trypanosoma cruzi* and food sources of *Triatoma sherlocki* in an endemic region of northeastern Brazil." **Medical and Veterinary Entomology**, v. 37, n. 2, p. 396-406, 2023.

SACRISTÁN, I.; ACUÑA, F.; AGUILAR, E.; GARCÍA, S.; LÓPEZ, M. J.; CEVIDANES, A.; CABELLO, J.; HIDALGO-HERMOSO, E.; JOHNSON, W. E.; POULIN, E.; MILLÁN, J.; NAPOLITANO, C., Assessing cross-species transmission of hemoplasmas at the wild-domestic felid interface in Chile using genetic and landscape variables analysis. **Scientific Reports**, v. 9, n.

1, p. 1- 14, 2019.

SASHIDA, H.; SASAOKA, F.; SUZUKI, J.; WATANABE, Y.; FUJIHARA, M.; NAGAO, K.; KOBAYASHI, S.; FURUHAMA, K.; HARASAWA, R. Detection of hemotropic mycoplasmas in free-living brown sewer rats (*Rattus norvegicus*). **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 75, n. 7, p. 979-983, 2013.

SEBASTIAN, P. S., MERA-SIERRA, R.; NEIRA, G. et al. Epidemiological link between canine monocytic ehrlichiosis caused by *Ehrlichia canis* and the presence of *Rhipicephalus sanguineus sensu stricto* in Argentina. **Parasitol Res**, v. 120, p. 725–729, 2021.

SIKES, R. S., GANNON, W. H., AND THE ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE OF THE AMERICAN SOCIETY OF MAMMALOGISTS. Guidelines of the American Society of Mammalogists for the use of wild mammals in research. **Journal of Mammalogy**, v. 92, p. 235-253, 2011.

SILVA-SANTOS, M.; MATOS, P.; LIMA, V. F.; MEIRA-SANTOS, P.; ROCHA, L. Micoplasmoses em cães - relato de 4 casos. **Enciclopédia Biosfera**, v. 10, n. 19, 2014.

SOARES, R. L.; ECHEVERRIA, J. T.; PAZZUTI, G.; CLEVELAND, H. P. K.; BABO-TERRA, V. J.; FRIOZI, E.; RAMOS, C. A. D. N. Occurrence of *Mycoplasma haemocanis* in dogs infested by ticks in Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 25, p. 360-363, 2016.

SOUZA, U. A.; OBERRATHER, K.; FAGUNDES-MOREIRA, R.; ALMEIDA, B. A. D.; VALLE, S. D. F.; GIROTTO-SOARES, A.; SOARES, J. F. First molecular detection of *Mycoplasma ovis* (Hemotropic mycoplasmas) from Sheep in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 28, p. 360-366, 2019.

STALHEIM, O. H. V. Mycoplasmas of Animals In: Diagnostic Procedure in Veterinary Bacteriology and Mycology (Fifth Edition). **Academic Press**, cap. 27, p. 343-370, 1990.

STOCKHAM, S. L.; SCOTT, M. A. **Fundamentos de patologia clínica veterinária 2ª edição**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, Cap.3, p.119-120, 2011.

STUEN, S.; GRANQUIST, E. G.; SILAGHI, C. Anaplasma phagocytophilum—a widespread multi-host pathogen with highly adaptive strategies. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 3, p. 31, 2013.

SU, Q.; CHEN, Y.; WANG, B.; HUANG, C.; HAN, S.; YUAN, G.; ZHANG, Q.; HE, H. Epidemiology and genetic diversity of zoonotic pathogens in urban rats (*Rattus* spp.) from a subtropical city, Guangzhou, southern China. **Zoonoses and Public Health**, v. 67, p. 534–545, 2020.

SYKES, J. E.; TASKER, S. **Hemoplasma infections. Canine and Feline Infectious Diseases, 1st ed.**; Elsevier Health Sciences: Amsterdam, The Netherlands, p. 390-398, 2013.

TAMURA K.; NEI M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 10, p. 512- 526, 1993.

TANAKA, H.; HALL, W. T.; SHEFFIELD, J. B.; MOORE, D. H. Fine structure of *Haemobartonellamuris* as compared with *Eperythrozoon coccoides* and *Mycoplasma pulmonis*. **Journal of Bacteriology**, v. 90, n. 6, p. 1735-1749, 1965.

TARRAGONA, E. L.; FLORES, F. S.; LAMATTINA, D.; TORRENTS, J.; SEBASTIAN, P. S.; NAVA, S. Two novel *Ehrlichia* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) strains detected in ticks (Ixodida, Ixodidae) and opossums (*Didelphimorphia: Didelphidae*) in Argentina. **Ticks Tick Borne Dis**, v. 13,n. 6, p. 102043, 2022.

TAYLOR, M. J.; BANDI. C.; HOERAUF, A. W. *pipientis* bacterial endosymbionts of filarial nematodes. **Adv Parasitol**, v. 60, p. 245–284, 2005.

THOMPSON, A.; KUTZ, S. Introduction to the Special Issue on ‘Emerging Zoonoses and Wildlife’. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 9, p. 322, 2019.

THRALL, M. A. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. 2. ed. São Paulo: Rocca, 2015.

THURSTON, J. Anaemia in mice caused by *Eperythrozoon coccoides* (Schilling, 1928). **Parasitology**, v. 44, p. 81–98, 1954.

TRUEB, I.; PORTELA, R. D.; FRANKE, C. R.; CARNEIRO, I. O.; RIBEIRO, G. J. J. R.; SOARES, R.; P.; BARROUIN-MELO, S. M. *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* sp. infection in wildlife from urban rainforest fragments in Northeast Brazil. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 54, p. 76–84, 2018.

UENO, T. E. H.; CUTOLO, A. A.; MARTINS, T. F.; MORAES-FILHO, J.; AZEVEDO, S. S. D.; LABRUNA, M. B. Rickettsial infection in equids, opossums and ticks in the municipality of Monte Mor, state of São Paulo, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 29, p. 1–9, 2020.

VALENTE, J. D.; SALDANHA, A.; MARTINI, R.; LANGE, R. R., Baggio, R. A., Martins, T. F., VIEIRA, R. F. ‘*Candidatus Mycoplasma haemosphiggurus*’ a novel haemoplasma species in orange-spined hairy dwarf porcupines (*Sphiggurus villosus*) from Southern Brazil. **Transbound. Emerg. Dis**,v. 68, n. 3, p. 1054-1061, 2021.

VAN BRUSSEL, K.; HOLMES, E. C. Zoonotic disease and virome diversity in bats. **Current Opinion in Virology**, v. 52, p.192-202, 2022.

VARANAT, M.; MAGGI, R. G.; LINDER, K. E.; BREITSCHWERDT, E. B. Molecular prevalence of *Bartonella*, *Babesia*, and hemotropic *Mycoplasma* sp. in dogs with splenic disease.

Journal of Veterinary Internal Medicine, v. 25, n. 6, p. 1284-1291, 2011.

VIECHTBAUER, W. Conducting meta-analyses in R with the metafor package. **J. Stat. Softw.**, v. 36, p. 1–48, 2010.

VIDAL, R. A. C. **Rastreo de agentes de doenças caninas de transmissão vectorial numa população de cães com funções militares policiais**. 94f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Técnica de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária, Lisboa, 2013.

VIEIRA, M. F.; DE CARVALHO-OKANO, R. M.; SAZIMA, M. The common opossum, *Didelphismarsupialis*, as a pollinator of *Mabea fistulifera* (Euphorbiaceae). **Ciência e Cultura**, v. 43, n. 5, p. 390-393, 1991.

VIEIRA, R.; MOLENTO, M.; DOS SANTOS, L.; MORAES, W.; CUBAS, Z.; DOS SANTOS, A.; GUIMARAES, A.; MOHAMED, A.; BARROS-FILHO, I.; BIONDO, A.; MESSICK, J. Detection of a novel hemoplasma based on *16S rRNA* gene DNA in captive and free-ranging capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*). **Vet. Microbiol.** v. 139, p. 410–413, 2009.

VIEIRA, T. S. W. J.; COLLERE, F. C. M.; FERRARI, L. D. R.; BAGGIO, R. A.; LANGE, R. R.; FERRARI, M. V.; DUQUE, J. C. M.; SANCHES, G. S.; PEREIRA, N. A.; AGUIAR, D. M.; LABRUNA, M. B.; VIEIRA, R. F. C. Novel Anaplasmataceae agents ‘*Candidatus* Ehrlichia hydrochoerus’ and *Anaplasma* spp. Infecting Capybaras, Brazil. **Emerg Infect Dis**, v. 28, n. 2, p. 480-482, 2022.

VILLAR, D.; BELTRAN, D. G.; SCHWARTZ, K.; MAGSTADT, D.; BREWER, M. Diagnosis of *Anaplasma marginale* in cattle at Iowa State University veterinary diagnostic laboratory 2003-2021. **Veterinary Parasitology: Regional Studies Reports**, v.39, 2023.

VILLALBA-ALEMÁN, E.; BUSTOS, X.; CRISANTE, G.; DE JESÚS, R.; MATA, J.; PEREIRA, F.; ROMO, M. M. Hematological characterization of common bats in urban areas from Merida (Venezuela), and observations on possible hemopathogens. **Acta Chiropterologica**, v. 22, n. 2, p. 449-459, 2020.

VOLOKHOV, D.; SIMONYAN, V.; DAVIDSON, M.; CHIZHIKOV, V. RNA polymerase beta subunit (*rpoB*) gene and the *16S-23S rRNA* intergenic transcribed spacer region (ITS) as complementary molecular markers in addition to the *16S rRNA* gene for phylogenetic analysis and identification of the species of the family Mycoplasmaceae. **Mol. Phylogenet. Evol.** v. 62, p. 515–528, 2012.

VOLOKHOV, D., HWANG, J., CHIZHIKOV, V., DANACEAU, H., GOTTDENKER, N. Prevalence, genotype richness, and coinfection patterns of hemotropic mycoplasmas in raccoons (*Procyon lotor*) on environmentally protected and urbanized barrier islands. **Applied and environmental microbiology**, v. 83, n. 9, p. 1-15, 2017.

VOLOKHOV, D. V.; BECKER, D. J.; BERGNER, L. M.; CAMUS, M. S.; ORTON, R. J.; CHIZHIKOV, V. E.; ALTIZER, S. M.; STREICKER, D. G. Novel hemotropic mycoplasmas

are widespread and genetically diverse in vampire bats. **Epidemiology Infect.**, v. 145, p. 3154–3167, 2017. VOTÝPKA, J.; MODRÝ, D.; OBORNÍK, M.; et al. **Apicomplexa. Handbook of the Protists.** Springer International Publishing, Cham, p. 567–624, 2017.

YANG, L.; ZHOU, S.; UPADHYAY, A.; ZHAO, J.; LIAO, C.; GUAN, Q.; WANG, J.; HAN, Q. "Molecular Detection and Phylogenetic Characterization of *Anaplasma* spp. in Dogs from Hainan Province/Island, China". **Veterinary Sciences**, v. 10, n. 5: p. 339, 2023.

WANG, R.; LI, Z. M.; PENG, Q. M.; GU, X. L.; ZHOU, C. M.; XIAO, X.; HAN, H.J.; YU, X. J. High prevalence and genetic diversity of hemoplasmas in bats and bats ectoparasites from China. **OneHealth**, v. 16, p. 100-498.

WECK, B. C.; SERPA, M. C. A.; RAMOS, V. N.; LUZ, H. R.; COSTA, F. B.; RAMIREZ, D. G.; BENATTI, H. R.; PIOVEZAN, U.; SZABÓ, M. P.; MARCILI, A.; KRAWCZAK, F. S. Novel genotypes of *Hepatozoon* spp. in small mammals, Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 15, n. 1, p. 87, 2022.

WERREN, J. H. *Wolbachia* and speciation. **Endless forms: species and speciation**, p.245-260, 1998. WILLI, B.; BORETTI, F. S.; TASKER, S.; MELI, M. L.; WENGI, N.; REUSCH, C. E.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R. From *Haemobartonella* to hemoplasma: Molecular methods provide new insights. **Vet. Microbiol.**, v. 125, p.197–209, 2007.

WOLF, R. W.; ARAGONA, M.; MUÑOZ-LEAL, D. S.; PINTO, L. B.; MELO, A. L. T.; BRAGA, I. A.; COSTA, J. S.; MARTINS, T. F.; MARCILI, A.; PACHECO, R. C.; LABRUNA, M. B.; AGUIAR, D. M. Novel *Babesia* and *Hepatozoon* agents infecting non-volant small mammals in the Brazilian Pantanal, with the first record of the tick *Ornithodoros guaporensis* in Brazil. **Ticks and Tick-Borne Diseases** v. 7, p. 449- 453, 2016.

WOODS, J. E.; BREWER, M. M.; HAWLEY, J. R.; WISNEWSKI, N.; LAPPIN, M. R. Evaluation of experimental transmission of '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*' and *Mycoplasma haemofelis* by *Ctenocephalides felis* to cats. **American Journal of Veterinary Research**, v. 66, n. 6, p. 1008-1012, 2005.

WILLI, B.; FILONI, C.; CATÃO-DIAS, J.; CATTORI, V.; MELI, M.; VARGAS, A.; LUTZ, H. Worldwide occurrence of feline hemoplasma infections in wild felid species. **J. Clin. Microbiol.**, v. 45, p. 1159–1166, 2007.

WOESE, C. R.; KANDLER, O.; WHEELIS, M. L. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, p. 4576-4579, 1990.

WOESE, C. R.; KANDLER, O.; WHEELIS, M. L. "Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya." **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 87, p. 4576-4579, 1990.

WOLF-JACKEL, G. A, JACKEL, C.; MUSEUX, K.; HOELZLE, K; TASKER, S.; LUTZ; H.; HOFMANN-LEHMANN, R. Identification, characterization, and application of a recombinant antigen for the serological investigation of feline hemotropic Mycoplasma infections. **Clin Vaccine Immunol**, v. 17, n. 12, p. 1917-25, 2010.

ZABASHTA, M. V.; ORLOVA, M. V.; PICHURINA, N. L.; KHAMETOVA, A. P.; ROMANOVA, L. V.; BORODINA, T. N.; ZABASHTA, A. V. Participation of Bats (Chiroptera, Mammalia) and Their Ectoparasites in Circulation of Pathogens of Natural Focal Infections in the South of Russia. **Entmol. Rev**, v. 99, p. 513–521, 2019.

ZHAO, Q. M.; WU, X. M.; ZHANG, P. H.; LI, J. M.; YANG, H.; WEI, M. T.; ZHANG, X. T.; CAO, W. C. Study on the coinfection of three tick-borne infectious diseases in China using polymerase chainreaction method. **Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi**, v. 26, n. 1, p. 9-13, 2005.

ZHENG, W.; LIU, Y.; TAO, H.; LI, Z.; XUAN, X.; LIU, X.; MOUMOUNI, P. F. A., WU, Y.; LIU, W.; CHEN, H. First molecular evidence of *Anaplasma phagocytophilum* in rodent populations of Nanchang, China. **Jap. J. Infec. Dis**, v. 71, p. 129–133, 2018.

ZITELLI, L. C.; WEBSTER, A.; MOREL, A. P.; UMENO, K. A.; PADILHA, T. C.; ROCHA, M. A.; DALL'AGNOL, B.; MEDEIROS, U.; ANICET M. Z.; BANDARRA, P. M.; MARSICANO, G.; RECK, J. Serological investigation of protozoan pathogens (*Trypanosoma cruzi*, *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*) in opossums from southern Brazil. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 24, p. 100546, 2021.

ANEXOS

Anexo A - Número de pequenos mamíferos silvestres amostrados por localidade e espécie, e frequência de positividade para *Mycoplasma* através de análise citológica e PCR baseada no 16S rDNA

Espécies por localidade	N	Positivos por PCR	Positivos por citologia
APA do Amapá			
<i>Artibeus lituratus</i>	1	0	0
<i>Carollia perspicillata</i>	5	1 (20,0%)	0
<i>Glossophaga soricina</i>	3	1 (33,3%)	1 (33,3%)
<i>Hsunycteris pattoni</i>	2	0	0
<i>Marmosops ocellatus</i>	3	0	0
<i>Philander canus</i>	10	0	0
<i>Phyllostomus elongatus</i>	1	0	0
<i>Platyrrhinus brachycephalus</i>	1	0	0
<i>Rhinophylla pumilio</i>	1	0	0
<i>Sturnira giannae</i>	1	0	0
<i>Uroderma bilobatum</i>	2	0	0
<i>Uroderma magirostrum</i>	1	0	
Colégio Agrícola			
<i>Artibeus planirostris</i>	6	0	0
<i>Caluromys lanatus</i>	1	0	0
<i>Carollia perspicillata</i>	3	0	0
<i>Desmodus rotundus</i>	3	1 (33,3%)	0
<i>Didelphis marsupialis</i>	1	0	0
<i>Marmosa constantiae</i>	1	0	0
<i>Monodelphis glirina</i>	2	0	0
<i>Monodelphis peruviana</i>	1	0	0
<i>Neacomys spinosus</i>	1	0	0
<i>Oecomys bicolor</i>	1	0	0
<i>Philander canus</i>	3	0	0
<i>Proechimys simonsi</i>	2	0	0
<i>Rhinophylla pumilio</i>	1	0	0
<i>Sturnira tildae</i>	1	0	0
<i>Sturnira giannae</i>	4	1 (25,0%)	0
<i>Uroderma bilobatum</i>	1	0	0

EMBRAPA

<i>Artibeus lituratus</i>	4	1 (25,0%)	0
<i>Artibeus obscurus</i>	1	0	0
<i>Artibeus planirostris</i>	12	2 (16,7%)	1 (8,3%)
<i>Carollia brevicauda</i>	3	1 (33,3%)	0
<i>Carollia perspicillata</i>	4	1 (25,0%)	0
<i>Didelphis marsupialis</i>	1	0	0
<i>Lophostoma brasiliense</i>	1	0	0
<i>Marmosa constantiae</i>	1	0	0
<i>Marmosops noctivagus</i>	1	0	0
<i>Monodelphis glirina</i>	1	0	0
<i>Monodelphis peruviana</i>	1	0	0
<i>Proechimys brevicauda</i>	1	0	0
<i>Proechimys gardneri</i>	4	0	0
<i>Proechimys simonsi</i>	4	1 (25,0%)	0
<i>Uroderma bilobatum</i>	1	0	0
<i>Uroderma magnirostrum</i>	2	0	0

Floresta Piracema

<i>Artibeus anderseni</i>	1	1 (100,0%)	0
<i>Artibeus planirostris</i>	6	2 (33,3%)	0
<i>Carollia brevicauda</i>	1	0	0
<i>Carollia perspicillata</i>	2	0	0
<i>Didelphis marsupialis</i>	1	0	0
<i>Gardnerycteris crenulatum</i>	2	0	0
<i>Hsunycteris pattoni</i>	2	0	0
<i>Marmosa constantiae</i>	2	0	0
<i>Neacomys spinosus</i>	2	0	0
<i>Sturnira giannae</i>	1	1 (100,0%)	0

Santa Cecília

<i>Artibeus lituratus</i>	4	1 (25,0%)	0
<i>Artibeus obscurus</i>	2	1 (50,0%)	0
<i>Artibeus planirostris</i>	4	1 (25,0%)	0
<i>Carollia perspicillata</i>	1	0	0
<i>Lophostoma brasiliense</i>	1	0	0
<i>Lophostoma silvicola</i>	4	1 (25,0%)	0
<i>Mesomys hispidus</i>	3	0	0
<i>Monodelphis glirina</i>	1	0	0
<i>Philander canus</i>	1	1 (100,0%)	0
<i>Phyllostomus elongatus</i>	1	0	0

<i>Phyllostomus hastatus</i>	1	1 (100,0%)	0
<i>Proechimys brevicauda</i>	4	1 (25,0%)	0
<i>Proechimys gardneri</i>	19	0	0
<i>Sturnira tildae</i>	1	0	0
<i>Uroderma magnirostrum</i>	1	0	0
São Raimundo			
<i>Artibeus lituratus</i>	1	0	0
<i>Artibeus planirostris</i>	3	2 (66,6%)	0
<i>Carollia brevicauda</i>	3	2 (66,6%)	0
<i>Carollia perspicillata</i>	4	2 (50,0%)	1 (25,0%)
<i>Oligoryzomys microtis</i>	1	0	0
<i>Proechimys longicaudatus</i>	1	0	0
TOTAL	186	27	3

Anexo B - Número de pequenos mamíferos silvestres amostrados por localidade e espécie, e frequência de positividade para Anaplasmataceae através de análise citológica e PCR baseada no 16S rDNA

Espécies por localidade	N	Positivos por PCR	Positivos por citologia
APA do Amapá			
<i>Artibeus lituratus</i>	1	0	0
<i>Carollia perspicillata</i>	5	2 (40,0%)	1 (20,0%)
<i>Glossophaga soricina</i>	3	0	0
<i>Hsunycteris pattoni</i>	2	0	0
<i>Marmosops ocellatus</i>	3	0	0
<i>Philander canus</i>	10	0	1 (10,0%)
<i>Phyllostomus elongatus</i>	1	0	0
<i>Platyrrhinus brachycephalus</i>	1	0	0
<i>Rhinophylla pumilio</i>	1	0	1 (100,0%)
<i>Sturnira giannae</i>	1	0	0
<i>Uroderma bilobatum</i>	2	0	0
<i>Uroderma magnirostrum</i>	1	0	0
Colégio Agrícola			
<i>Artibeus planirostris</i>	6	0	1 (16,7%)
<i>Caluromys lanatus</i>	1	0	0
<i>Carollia perspicillata</i>	3	0	0
<i>Desmodus rotundus</i>	3	0	0

<i>Didelphis marsupialis</i>	1	0	0
<i>Marmosa constantiae</i>	1	0	0
<i>Monodelphis glirina</i>	2	0	1 (50,0%)
<i>Monodelphis peruviana</i>	1	0	0
<i>Neacomys spinosus</i>	1	0	0
<i>Oecomys bicolor</i>	1	0	0
<i>Philander canus</i>	3	0	0
<i>Proechimys simonsi</i>	2	0	1 (50,0%)
<i>Rhinophylla pumilio</i>	1	0	0
<i>Sturnira tildae</i>	1	0	1 (100,0%)
<i>Sturnira giannae</i>	4	2 (50,0%)	0
<i>Udoderma bilobatum</i>	1	1 (100,0%)	0

EMBRAPA

<i>Artibeus lituratus</i>	4	0	0
<i>Artibeus obscurus</i>	1	0	0
<i>Artibeus planirostris</i>	12	3 (25,0%)	0
<i>Carollia brevicauda</i>	3	0	0
<i>Carollia perspicillata</i>	4	0	0
<i>Didelphis marsupialis</i>	1	0	0
<i>Lophostoma brasiliense</i>	1	0	0
<i>Marmosa constantiae</i>	1	0	0
<i>Marmosops noctivagus</i>	1	0	0
<i>Monodelphis glirina</i>	1	0	0
<i>Monodelphis peruviana</i>	1	0	0
<i>Proechimys brevicauda</i>	1	1 (100,0%)	0
<i>Proechimys gardneri</i>	4	0	2 (50,0%)
<i>Proechimys simonsi</i>	4	0	0
<i>Uroderma bilobatum</i>	1	0	0
<i>Uroderma magnirostrum</i>	2	0	0

Floresta Piracema

<i>Artibeus anderseni</i>	1	0	0
<i>Artibeus planirostris</i>	6	0	1 (16,7%)
<i>Carollia brevicauda</i>	1	0	0
<i>Carollia perspicillata</i>	2	0	0
<i>Didelphis marsupialis</i>	1	0	0
<i>Gardnerycteris crenulatum</i>	2	0	0
<i>Hsundaycteris pattoni</i>	2	0	0
<i>Marmosa constantiae</i>	2	0	0
<i>Neacomys spinosus</i>	2	0	0
<i>Sturnira giannae</i>	1	0	0

Santa Cecília

<i>Artibeus lituratus</i>	4	0	0
<i>Artibeus obscurus</i>	2	0	0
<i>Artibeus planirostris</i>	4	1 (25,0%)	0
<i>Carollia perspicillata</i>	1	0	0
<i>Lophostoma brasiliense</i>	1	0	0
<i>Lophostoma silvicola</i>	4	0	0
<i>Mesomys hispidus</i>	3	0	0
<i>Monodelphis glirina</i>	1	0	0
<i>Philander canus</i>	1	0	0
<i>Phyllostomus elongatus</i>	1	0	0
<i>Phyllostomus hastatus</i>	1	0	0
<i>Proechimys brevicauda</i>	4	1 (25,0%)	1 (25,0%)
<i>Proechimys gardneri</i>	19	0	2 (10,5%)
<i>Sturnira tildae</i>	1	0	0
<i>Uroderma magnirostrum</i>	1	0	0

São Raimundo

<i>Artibeus lituratus</i>	1	0	0
<i>Artibeus planirostris</i>	3	0	0
<i>Carollia brevicauda</i>	3	0	0
<i>Carollia perspicillata</i>	4	0	0
<i>Oligoryzomys microtis</i>	1	0	0
<i>Proechimys longicaudatus</i>	1	0	0
TOTAL	186	11	13
