

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**OCORRÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
Bartonella spp. E *Mycoplasma* spp. EM QUIRÓPTEROS
AMOSTRADOS NO BRASIL**

**Priscila Ikeda
Médica Veterinária**

2017

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**OCORRÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
Bartonella spp. E *Mycoplasma* spp. EM QUIRÓPTEROS
AMOSTRADOS NO BRASIL**

Priscila Ikeda

Orientador: Prof. Dr. Marcos Rogério André

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária, área: Medicina Veterinária Preventiva.

2017

I26o Ikeda, Priscila
Ocorrência e caracterização molecular de *Bartonella* spp. e
Mycoplasma spp. em quirópteros amostrados no Brasil / Priscila Ikeda.
-- Jaboticabal, 2017
xxvi, 90 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2017
Orientador: Marcos Rogério André
Banca examinadora: Paulo Eduardo Neves Ferreira Velho,
Rosangela Zacarias Machado
Bibliografia

1. Análise filogenética. 2. *Bartonella*. 3. *Mycoplasma*. 4. Quirópteros.
I. Título II. Jaboticabal – Faculdade de Ciências Agrárias e
Veterinárias

CDU 619:616.993:599.4

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: OCORRÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Bartonella* spp. E
Mycoplasma spp. EM QUIRÓPTEROS AMOSTRADOS NO BRASIL

AUTORA: PRISCILA IKEDA

ORIENTADOR: MARCOS ROGÉRIO ANDRÉ

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em MEDICINA
VETERINÁRIA, área: MEDICINA VETERINARIA PREVENTIVA pela Comissão Examinadora:

Marcos R. André

Prof. Dr. MARCOS ROGÉRIO ANDRÉ
Departamento de Patologia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Rosângela Zacarias Machado

Profa. Dra. ROSANGELA ZACARIAS MACHADO
Departamento de Patologia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

[Signature]
Prof. Dr. PAULO EDUARDO NEVES FERREIRA VELHO
Departamento de Clínica Médica / UNICAMP - Campinas, SP

Jaboticabal, 15 de fevereiro de 2017.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Priscila Ikeda, nascida em 21 de fevereiro de 1992 na cidade de Guarapuava, Paraná. Formada em Medicina Veterinária pela Universidade Estadual do Centro-Oeste (Unicentro), Guarapuava, Paraná (2013). Possui Aprimoramento na área de Medicina e Manejo de Animais Selvagens pela mesma universidade (2015). Ingressou no Mestrado em Medicina Veterinária (área de concentração de Medicina Veterinária Preventiva) na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho, Campus Jaboticabal, no ano de 2015, como bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por quatro meses e, posteriormente, bolsista FAPESP (2015/04773-0) por 20 meses, sob orientação do Prof. Dr. Marcos Rogério André.

ΕΠΙΓΡΑΦΕ

“I may not change the world, but I’m gonna leave a scar”
Blackberry Smoke – Leave a Scar (The Whippoorwill Album)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Oscar Kunio Ikeda e Silvana Aparecida Ikeda, e às minhas irmãs Angela Cristina Ikeda e Mônica Ikeda por me trazerem até aqui.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa concedida (Processo n. 2015/04773-0) e pelo Projeto auxílio pesquisa concedido (Processo n. 2015/14896-1) sem os quais não seria possível desenvolver tal trabalho.

À Deus por me guiar em meu caminho e me proporcionar tantas conquistas.

Aos meus pais, Silvana Aparecida Ikeda e Oscar Kunio Ikeda, pelo apoio e por nunca desistirem de dar às suas filhas o melhor para seguirmos nossos sonhos. Às minhas irmãs, Mônica Ikeda e Angela Cristina Ikeda que sempre estão dispostas a me auxiliar. E ao meu namorado Emanuel Vicente Chimanski por sempre me lembrar de que eu consigo ser cada vez melhor e sempre estar comigo apesar da distância.

Agradeço imensamente ao meu orientador, Prof. Dr. Marcos Rogério André. Primeiramente por ter acreditado no meu potencial e também por toda a paciência e dedicação nesse processo.

Aos componentes da banca de qualificação de mestrado, Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte e Profa. Dra. Rosângela Zacarias Machado pelas considerações e auxílio no desenvolvimento final do trabalho.

Aos participantes da banca de defesa de mestrado, Prof. Dr. Paulo Eduardo Neves Ferreira Velho e Profa. Dra. Rosângela Zacarias Machado pela disponibilidade e por compartilhar seus conhecimentos conosco.

Aos professores da Universidade Estadual do Centro Oeste (Unicentro): Prof. Dra. Meire Christina Seki, Prof. Dr. Adriano de Oliveira Torres Carrasco, Prof. Dr. João Marcelo Deliberador Miranda e seus orientados Sabrina Maria Marchioro Gonçalves, Lucinéia Vitchemech, Samara de Oliveira Freitas, Elisa Dobrowolski, Gilson Pedro Amaral Filho, Renan Vailati, Yohhane Hofmann, Guilherme Mulinari, João Gustavo Simão, Marcos Moraes, Andressa Hiromi Sagae, Jaqueline Camargo e Maria Eduarda Galvan por todo o auxílio nos trabalhos de campo realizados no estado do Paraná. Agradeço aos demais estagiários dos laboratórios de Doenças Infecciosas e Parasitárias e de Biodiversidade de Mamíferos do Sul do Brasil por estarem sempre dispostos a emprestar e ajudar a separar todo o material necessário para as capturas.

À Profa. Dra. Marta Maria Geraldês Teixeira, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (USP-SP) por ceder as amostras colhidas nos estados de Mato Grosso e Tocantins.

Ao Prof. Dr. Estevam Guilherme Lux Hoppe e sua orientada Ana Cláudia Alexandre de Albuquerque (FCAV-UNESP) por cederem as amostras colhidas no estado do Pará.

À Profa. Dra Karin Werther e suas orientadas Juliana Oliveira de Paula e Mariele de Santi (FCAV-UNESP) por cederem as amostras colhidas no estado de São Paulo e pelo auxílio e disponibilidade sempre que precisávamos.

À todos meus colegas do Laboratório de Imunoparasitologia: Keyla Carstens de Sousa, Jyan Lucas Benevenuto, Renan Bressianini do Amaral, Priscila Preve Pereira, Marcia Mariza Gomes Jusi, Carla Freschi, Pamela Rodrigues Reina Moreira, Paulo Henrique Leal Bertolo, Otávio Luiz Fidelis Junior, Paulo Henrique Sampaio, Carlos Matos, Luiz Ricardo Gonçalves, Inalda Ramos, Simone Fernandes e Kayo Castilho Neto pelo apoio e pelos ensinamentos técnicos. À todos estagiários tanto curriculares como extracurriculares que passaram ou continuaram no laboratório por todo o auxílio necessário para manter tudo em ordem. Aos alunos de iniciação científica pelo completo comprometimento ao seu trabalho e por toda ajuda fornecida nesses dois anos.

À Rafaela Beraldo principalmente pela amizade, mas também por sempre estar disposta a nos ajudar e nunca deixar o café faltar. À Mabel Mastro Custódio por toda ajuda administrativa. Ao Arvelino no auxílio da limpeza do laboratório e dos serviços do dia-a-dia.

Finalmente, minha imensa gratidão a todos meus amigos, colegas e conhecidos por terem cruzado meu caminho e que me auxiliaram e me ajudam a crescer cada vez mais tanto espiritualmente como profissionalmente.

SUMÁRIO	Página
Certificado de Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA).....	xii
Autorização para atividades com finalidade científica (Ministério do Meio Ambiente – ICMBio/SISBIO).....	xiii
RESUMO.....	xviii
ABSTRACT.....	xix
LISTA DE QUADROS.....	xx
LISTA DE TABELAS.....	xxi
LISTA DE FIGURAS.....	xxii
LISTA DE ANEXOS.....	xxvi
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	02
2.1 Quirópteros Brasileiros.....	02
2.2 <i>Bartonella</i> spp.	05
2.2.1 Agente etiológico.....	05
2.2.2 <i>Bartonella</i> spp. em quirópteros.....	06
2.2.3 Bartoneloses em humanos.....	11
2.2.4 Transmissão de <i>Bartonella</i> spp.	14
2.2.5 Diagnóstico de <i>Bartonella</i> spp.	16
2.3 <i>Mycoplasmas hemotróficos</i> (hemoplasmas).....	18
2.3.1 Agente etiológico.....	18
2.3.2 Hemoplasmas em quirópteros.....	19
2.3.3 Hemoplasmoses em humanos.....	19
2.3.4 Transmissão de hemoplasmas.....	21
2.3.5 Diagnóstico de hemoplasmas.....	21
3. OBJETIVOS.....	22
3.1 Objetivo Geral.....	22
3.2. Objetivos específicos.....	22
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
4.1 Capturas e colheitas de amostras.....	24
4.1.1 Estado do Paraná.....	24
4.1.2 Estado do Pará.....	29

4.1.3 Estado de São Paulo.....	29
4.1.4 Estados de Mato Grosso e Tocantins.....	30
4.2 Extração de DNA.....	30
4.3 PCR convencional (cPCR) para o gene endógeno gliceraldeído-3- fosfato desidrogenase (GAPDH).....	30
4.4 Eletroforese em gel de agarose.....	31
4.5 PCR em tempo real quantitativa (qPCR) para <i>Bartonella</i> spp. baseada no gene <i>nuoG</i>	31
4.6 PCR convencional (cPCR) para <i>Bartonella</i> spp.	32
4.7 PCR convencional (cPCR) para <i>Mycoplasma</i> spp.	34
4.8 Sequenciamento.....	35
4.9 Análise Filogenética.....	35
5. RESULTADOS.....	36
5.1 Capturas de quirópteros e colheitas de amostras.....	36
5.2 Extrações de DNA.....	41
5.3 PCR convencional (cPCR) para o gene endógeno GAPDH.....	41
5.4 PCR em tempo real (qPCR) para <i>Bartonella</i> spp. baseada no gene <i>nuoG</i>	42
5.5 cPCR para <i>Bartonella</i> spp.	45
5.6 cPCR para <i>Mycoplasma</i> spp.	46
5.7 Copositividade por <i>Bartonella</i> spp. e hemoplasmas.....	47
5.8 Análise Filogenética.....	48
5.8.1 Análise pelo BLASTn.....	48
5.8.2 Árvores filogenéticas.....	50
6. DISCUSSÃO.....	63
7. CONCLUSÃO.....	67
8. REFERENCIAS.....	68
ANEXOS.....	82



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 8189/15 do trabalho de pesquisa intitulado "**Detecção e caracterização molecular de *Bartonella spp.* em Quirópteros amostrados nos Estados do Pará e Paraná, Brasil**", sob a responsabilidade do Prof. Dr. Marcos Rogério André está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 11 de maio de 2015.

Jaboticabal, 11 de maio de 2015.

Prof.ª Dr.ª Paola Castro Moraes
Coordenadora – CEUA



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 48306-1	Data da Emissão: 24/04/2015 16:33	Data para Revalidação*: 23/05/2016
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Marcos Rogério André	CPF: 302.435.148-59
Título do Projeto: DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE Bartonella spp. EM QUIRÓPTEROS AMOSTRADOS NOS ESTADOS DO PARÁ E PARANÁ, BRASIL	
Nome da Instituição : UNESP JABOTICABAL	CNPJ: 48.031.918/0012-87

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Extração de DNA das amostras de baço e fígado de quirópteros	07/2015	07/2016
2	Captura e colheita de amostras biológicas de quirópteros	07/2015	07/2016
3	qPCR para o gene nuoG para Bartonella spp.	07/2015	07/2016
4	Caracterização molecular por PCR convencional	01/2016	07/2016
5	Sequenciamento	01/2016	07/2016
6	Análise Filogenética	08/2016	12/2016
7	Relatório e discussão dos resultados obtidos	12/2016	02/2017

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exige o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que específica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospeção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

Outras ressalvas

1	As redes de neblinas deverão ser verificadas no mínimo de 30 em 30 minutos. Não está autorizada a coleta, transporte de fêmeas grávidas ou em processo de amamentação. Somente está autorizada a captura e coleta de amostras da espécie <i>Eptesicus tadeii</i> .
2	1 - A regularização fundiária da UC é incipiente, sendo sua área ainda constituída por propriedades particulares. Orientamos o contato prévio com os proprietários de áreas de interesse para coleta, visando evitar conflitos no acesso em algumas áreas.

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
---	------	--------	-----	-----------------	---------------

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 83594295





Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 48306-1	Data da Emissão: 24/04/2015 16:33	Data para Revalidação*: 23/05/2016
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Marcos Rogério André	CPF: 302.435.148-59
Título do Projeto: DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE Bartonella spp. EM QUIRÓPTEROS AMOSTRADOS NOS ESTADOS DO PARÁ E PARANÁ, BRASIL	
Nome da Instituição : UNESP JABOTICABAL	CNPJ: 48.031.918/0012-87

1	Meire Christina Seki	Captura de quirópteros	218.740.398-01	25188501x SSP-SP	Brasileira
2	Priscila Ikeda	Captura de quirópteros, colheita e processamento das amostra	078.839.189-58	80538928 SSP-PR	Brasileira
3	João Marcelo Deliberador Miranda	Captura e identificação de quirópteros	025.857.259-01	61613366 SESP-PR	Brasileira
4	Adriano de Oliveira Torres Carrasco	Captura de quirópteros	020.075.229-42	2/C 3359606 SSP-SC	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	GUARAPUAVA	PR	Guarapuava	Fora de UC Federal
2		PR	RESERVA BIOLÓGICA DAS ARAUCÁRIAS	UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Captura de animais silvestres in situ	Artibeus cinereus, Glossophaga soricina, Promops nasutus, Myotis riparius, Glyphonycteris sylvestris, Chiroderma villosum, Myotis albescens, Noctilio albigentris, Mimon bennettii, Pygoderma bilabiatum, Lasiurus blossevillii, Eumops bonariensis, Trachops cirrhosus, Phyllostomus discolor, Anoura geoffroyi, Eumops glaucinus, Phyllostomus hastatus, Nyctinomops laticaudatus, Platyrhinus lineatus, Molossops neglectus, Artibeus fimbriatus, Eumops auripendulus, Lasiurus ega, Rhogeessa hussoni, Desmodus rotundus, Eumops perotis, Uroderma bilobatum, Macrophyllum macrophyllum, Myotis nigricans, Anoura caudifera, Tonatia bidens, Eptesicus brasiliensis, Thyroptera tricolor, Tadarida brasiliensis, Chiroderma doriae, Histiotus montanus, Eptesicus taddeii, Artibeus lituratus, Cynomops planirostris, Vampyressa pusilla, Platyrhinus recifinus, Peropteryx macrotis, Myotis ruber, Carollia perspicillata, Artibeus obscurus, Molossops temminckii, Histiotus velatus, Cynomops abrasus, Sturnira lilium, Diphylla ecaudata, Eptesicus furiensis, Diaemus youngi, Noctilio leporinus, Molossus molossus, Eumops hansae, Micronycteris megalotis, Nyctinomops macrotis, Artibeus planirostris, Molossus rufus, Chrotopterus auritus, Sturnira tildae, Eptesicus diminutus, Lasiurus cinereus, Myotis levis
2	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Eptesicus brasiliensis, Chiroderma doriae, Myotis levis, Macrophyllum macrophyllum, Artibeus obscurus, Sturnira lilium, Eptesicus diminutus, Rhogeessa hussoni, Histiotus montanus, Molossops temminckii, Thyroptera tricolor, Artibeus fimbriatus, Myotis riparius, Noctilio albigentris, Tonatia bidens, Pygoderma bilabiatum, Vampyressa pusilla, Eptesicus taddeii, Nyctinomops laticaudatus, Eumops glaucinus, Nyctinomops macrotis, Eumops hansae, Glossophaga soricina, Diaemus youngi, Histiotus velatus, Micronycteris megalotis, Myotis nigricans, Molossops neglectus, Cynomops planirostris, Myotis albescens, Eumops bonariensis, Anoura geoffroyi, Trachops cirrhosus, Lasiurus cinereus, Uroderma bilobatum, Phyllostomus hastatus, Noctilio leporinus, Artibeus lituratus, Platyrhinus lineatus, Promops nasutus, Eumops perotis, Carollia perspicillata, Artibeus planirostris, Desmodus rotundus, Myotis ruber, Molossus rufus, Sturnira tildae, Chiroderma villosum, Cynomops abrasus, Artibeus cinereus, Eumops auripendulus, Mimon bennettii, Phyllostomus discolor, Lasiurus ega, Platyrhinus recifinus, Lasiurus blossevillii, Diphylla ecaudata, Eptesicus furiensis, Peropteryx macrotis, Molossus molossus, Glyphonycteris sylvestris, Chrotopterus auritus, Anoura caudifera, Tadarida brasiliensis

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 83594295





Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 48306-1	Data da Emissão: 24/04/2015 16:33	Data para Revalidação*: 23/05/2016
-----------------	-----------------------------------	------------------------------------

* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.

Dados do titular

Nome: Marcos Rogério André	CPF: 302.435.148-59
Título do Projeto: DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE Bartonella spp. EM QUIRÓPTEROS AMOSTRADOS NOS ESTADOS DO PARÁ E PARANÁ, BRASIL	
Nome da Instituição : UNESP JABOTICABAL	CNPJ: 48.031.918/0012-87

3	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Phyllostomus hastatus (*Qtde: 10), Eumops perotis (*Qtde: 10), Myotis riparius (*Qtde: 10), Eumops hansae (*Qtde: 10), Lasiurus ega (*Qtde: 10), Artibeus lituratus (*Qtde: 10), Nyctinomops laticaudatus (*Qtde: 10), Sturnira liliium (*Qtde: 10), Molossus molossus (*Qtde: 10), Phyllostomus discolor (*Qtde: 10), Anoura caudifera (*Qtde: 10), Lasiurus blossevillii (*Qtde: 10), Tadarida brasiliensis (*Qtde: 10), Molossops neglectus (*Qtde: 10), Glyphonycteris sylvestris (*Qtde: 10), Artibeus obscurus (*Qtde: 10), Mimon bennettii (*Qtde: 10), Eptesicus brasiliensis (*Qtde: 10), Eumops bonariensis (*Qtde: 10), Artibeus cinereus (*Qtde: 10), Macrophyllum macrophyllum (*Qtde: 10), Micronycteris megalotis (*Qtde: 10), Anoura geoffroyi (*Qtde: 10), Cynomops planirostris (*Qtde: 10), Eumops glaucinus (*Qtde: 10), Artibeus planirostris (*Qtde: 10), Sturnira tildae (*Qtde: 10), Desmodus rotundus (*Qtde: 10), Pygoderma bilabiatum (*Qtde: 10), Myotis albescens (*Qtde: 10), Noctilio albiventris (*Qtde: 10), Noctilio leporinus (*Qtde: 10), Molossops temminckii (*Qtde: 10), Diaemus youngi (*Qtde: 10), Trachops cirrhosus (*Qtde: 10), Chrotopterus auritus (*Qtde: 10), Peropteryx macrotis (*Qtde: 10), Histiotus montanus (*Qtde: 10), Promops nasutus (*Qtde: 10), Myotis nigricans (*Qtde: 10), Glossophaga soricina (*Qtde: 10), Platyrhinus lineatus (*Qtde: 10), Myotis levis (*Qtde: 10), Molossus rufus (*Qtde: 10), Artibeus fimbriatus (*Qtde: 10), Eptesicus furinalis (*Qtde: 10), Tonatia bidens (*Qtde: 10), Lasiurus cinereus (*Qtde: 10), Eptesicus diminutus (*Qtde: 10), Rhogeessa hussoni (*Qtde: 10), Carollia perspicillata (*Qtde: 10), Nyctinomops macrotis (*Qtde: 10), Diphylla ecaudata (*Qtde: 10), Platyrhinus recifinus (*Qtde: 10), Histiotus velatus (*Qtde: 10), Chiroderma villosum (*Qtde: 10), Chiroderma doriae (*Qtde: 10), Uroderma bilobatum (*Qtde: 10), Cynomops abrasus (*Qtde: 10), Thyroptera tricolor (*Qtde: 10), Vampyressa pusilla (*Qtde: 10), Eumops auripendulus (*Qtde: 10)
---	---	--

* Quantidade de indivíduos por espécie, por localidade ou unidade de conservação, a serem coletados durante um ano.

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Outros mamíferos)	Sangue, Fragmento de tecido/órgão, Ectoparasita
2	Método de captura/coleta (Outros mamíferos)	Rede de neblina

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	UNESP JABOTICABAL	

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 83594295



Página 3/5



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 48306-1	Data da Emissão: 24/04/2015 16:33	Data para Revalidação*: 23/05/2016
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Marcos Rogério André	CPF: 302.435.148-59
Título do Projeto: DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE Bartonella spp. EM QUIRÓPTEROS AMOSTRADOS NOS ESTADOS DO PARÁ E PARANÁ, BRASIL	
Nome da Instituição : UNESP JABOTICABAL	CNPJ: 48.031.918/0012-87

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 83594295



Página 5/5

OCORRÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Bartonella* spp. E *Mycoplasma* spp. EM QUIRÓPTEROS AMOSTRADOS NO BRASIL

RESUMO – Doenças transmitidas por vetores artrópodes tem se tornado cada vez mais importantes para a saúde humana e animal. Neste sentido, o papel dos animais selvagens como reservatórios na transmissão destas enfermidades vem sendo investigado. A ordem Chiroptera é considerada o segundo maior grupo de mamíferos no mundo, hospedando importantes patógenos zoonóticos, tais como vírus e bactérias. *Bartonella* spp. e *Mycoplasma* spp. são bactérias que parasitam eritrócitos de diferentes espécies de mamíferos, incluindo humanos, podendo causar manifestações clínicas diversas. O presente estudo objetivou pesquisar a ocorrência e analisar filogeneticamente *Bartonella* spp. e *Mycoplasma* spp. em quirópteros amostrados no Brasil. Para tal, foram colhidas 325 amostras de sangue e/ou tecidos (fígado, coração e baço) de 162 quirópteros pertencentes a 19 espécies distribuídas em quatro famílias distintas de cinco estados: Mato Grosso, Pará, Paraná, São Paulo e Tocantins. Destas, três amostras mostraram-se negativas para o gene endógeno de referência (GAPDH), sendo excluídas das análises. Portanto, do total de 322 amostras, 17 (5,28%) mostraram-se positivas para *Bartonella* spp. por meio da PCR em tempo real baseada no gene *nuoG*. A quantificação de um fragmento do gene *nuoG* de *Bartonella* spp. por microlitro variou de $4,4 \times 10^0$ a $6,95 \times 10^3$ cópias/ μ L nas amostras de sangue e teciduais dos quirópteros. Ainda, 45 amostras (13,97%) mostraram-se positivas para hemoplasmas por meio da PCR convencional baseada no gene 16S rRNA. Destas amostras foram obtidas sete sequências para *Bartonella* (*nuoG* [n=3], *gltA* [n=2], *rpoB* [n=1], *ftsZ* [n=1]), e cinco sequências de um fragmento do gene 16S rRNA de *Mycoplasma* spp. Nas análises filogenéticas, as sequências de *Bartonella* spp. posicionaram-se proximamente a genótipos de *Bartonella* spp. detectados em quirópteros amostrados em países da América Latina. Todas as cinco sequências de hemoplasmas formaram um grupo monofilético, tanto pela análise de Máxima Verossimilhança quanto pela Inferência Bayesiana, mostrando-se filogeneticamente relacionadas a *Mycoplasma coccoides*. As amostras positivas para *Bartonella* spp. foram provenientes das espécies *Phyllostomus hastatus*, *Carollia perspicillata*, *Sturnira lilium*, *Glossophaga soricina* e *Natalus espirosantensis*. Trata-se da primeira descrição de *Bartonella* spp. na última espécie de quiróptero elencada. Os quirópteros positivos para hemoplasmas pertenciam às espécies *Artibeus planirostris*, *Eptesicus* sp., *Eumops auripendulus*, *Glossophaga soricina*, *Molossus molossus*, *Molossus rufus*, *Myotis nigricans* e *Sturnira lilium*, sendo a primeira evidência da circulação deste patógeno nestas espécies. Os genótipos de *Bartonella* spp. obtidos mostraram-se filogeneticamente próximos a genótipos detectados em quirópteros amostrados em outras regiões do mundo. Ainda, evidenciou-se a presença de genótipos filogeneticamente díspares entre si em diferentes regiões do Brasil. Já os genótipos de *Mycoplasma* spp. obtidos mostraram-se próximos entre si como um grupo monofilético, mas distantes dos previamente detectados em quirópteros dos Estados Unidos da América e Espanha. Portanto, o presente trabalho evidenciou, pela primeira vez, a circulação de *Bartonella* spp. e hemoplasmas entre quirópteros amostrados no Brasil e identificou novas espécies de quirópteros como hospedeiros das bactérias estudadas.

Palavras-chave: Análise filogenética, *Bartonella*, *Mycoplasma*, Quirópteros

OCURRENCE AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *Bartonella* spp. AND *Mycoplasma* spp. IN BATS SAMPLED IN BRAZIL

ABSTRACT – Vector-borne diseases have become increasingly important to human and animal health. The role of wild animals as reservoirs in the transmission of these diseases has been investigated. The Chiroptera Order is considered the second largest group of mammals in the world, hosting important zoonotic virus and bacteria. *Bartonella* spp. and *Mycoplasma* spp. are bacteria that parasites different mammals species' erythrocytes, including humans, causing different clinic manifestations. The present work aimed at investigating the occurrence and assessing the phylogenetic positioning of *Bartonella* spp. and *Mycoplasma* spp. in bats sampled in Brazil. A total of 325 blood and/or tissue (liver, spleen and heart) samples were collected from 162 bats belonging to 19 species distributed in four different families from five states: Mato Grosso, Pará, Paraná, São Paulo and Tocantins. Three samples showed negative results in the conventional PCR based on GAPDH gene and excluded from analysis. Seventeen (5,28%) out of 322 bats' samples were positive to qPCR for *Bartonella* spp. based on *nuoG* gene. The quantification of a *Bartonella* spp. *nuoG* gene fragment per microlitro in bats' blood and tissues ranged from $4,4 \times 10^0$ a $6,95 \times 10^3$ copies/ μ L. On the other hand, 45 (13,97%) samples were positive to cPCR assays for hemoplasmas based on 16S rRNA gene. Seven sequences were obtained for *Bartonella* spp. (*nuoG* [n=3], *gltA* [n=2], *rpoB* [n=1], *ftsZ* [n=1]), and five 16S rRNA sequences were obtained for *Mycoplasma* spp. In the phylogenetic analysis, the found *Bartonella* spp. sequences clustered with *Bartonella* spp. genotypes previously detected in bats sampled in Latin America countries. All five hemoplasmas sequences clustered together as a monophyletic group and closely related to *Mycoplasma coccoides*, by Maximum Likelihood and Bayesian Inference analyses. The biological samples positive for *Bartonella* spp. were collected from *Phyllostomus hastatus*, *Carollia perspicillata*, *Sturnira lilium*, *Glossophaga soricina* and *Natalus espirosantensis* bats species. This is the first report of occurrence of *Bartonella* spp. in *Natalus espirosantensis*. The positive biological samples for hemoplasmas were collected from animals belonging to the species *Artibeus planirostris*, *Eptesicus* sp., *Eumops auripendulus*, *Glossophaga soricina*, *Molossus molossus*, *Molossus rufus*, *Myotis nigricans* and *Sturnira lilium*, which represented the first evidence of the circulation of this pathogen in these species. The *Bartonella* spp. genotypes showed a phylogenetic relation with genotypes detected in bats sampled in other regions in the world; additionally, genotypes detected in bats from different regions of Brazil were phylogenetic distant from each other. However, *Mycoplasma* spp. genotypes obtained from bats' biological samples from Brazil showed a closely relation among each other, comprising a monophyletic group, but distant from genotypes obtained in bats from the United States of America and Spain. Therefore, this is the first record of circulation of *Bartonella* spp. and *Mycoplasma* spp. among bats from Brazil, describing new species of bats as hosts of the studied bacteria.

Keywords: Phylogenetic analysis, *Bartonella*, hemotropic micoplasmas, Chiroptera.

LISTA DE QUADROS

	Página
Quadro 1. Classificação taxonômica de organismos do gênero <i>Bartonella</i>	05
Quadro 2. Classificação taxonômica de organismos do gênero <i>Mycoplasma</i>	18

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Principais espécies de <i>Bartonella</i> associadas a enfermidades em seres humanos.....	12
Tabela 2. Protocolos de cPCR utilizados para detecção e caracterização molecular de <i>Bartonella</i> spp. em amostras positivas previamente pela qPCR (gene <i>nuoG</i>).....	33
Tabela 3. Modelos evolutivos utilizados para análise filogenética seguindo o “Akaike Information Criterion” (AIC) e “Bayesian Information Criterion” (BIC).....	36
Tabela 4. Relação das espécies de quirópteros amostradas e locais de captura no estado do Paraná.....	37
Tabela 5. Relação de amostras teciduais (fígado e baço) de espécies de quirópteros provenientes do estado do Pará.....	38
Tabela 6. Relação dos exemplares de quirópteros encaminhados ao Setor de Animais Selvagens do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da FCAV-UNESP, Jaboticabal, SP.....	40
Tabela 7. Relação das amostras de sangue de quirópteros gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Marta Maria Geraldês Teixeira (Instituto de Ciências Biomédicas, ICB, da Universidade de São Paulo [USP-SP]).....	40
Tabela 8. Amostras positivas na qPCR para <i>Bartonella</i> spp. com suas respectivas quantificações e parâmetros das reações de qPCR.....	43
Tabela 9. Resultado dos ensaios de PCR convencional para <i>Bartonella</i> spp. com indicação das amostras positivas (+), negativas (-) e sequenciadas (+*) para cada gene.....	45
Tabela 10. Relação de animais positivos para <i>Mycoplasma</i> spp. com base em três diferentes protocolos de cPCR.....	47
Tabela 11. Máxima identidade e cobertura de sequências de <i>Bartonella</i> spp. amplificadas a partir de amostras de sangue ou teciduais de quirópteros amostrados no presente estudo comparativamente a sequências nucleotídicas previamente depositadas no GenBank.....	50

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Representação dos países (áreas preenchidas) cuja detecção de <i>Bartonella</i> spp. em quirópteros já foi demonstrada.....	06
Figura 2. Localidades de amostragem de quirópteros do presente trabalho. Cada estado está destacado e o número de animais amostrados está representado por símbolo de losango.....	23
Figura 3. Organograma representativo das principais etapas experimentais realizadas no estudo.....	23
Figura 4. Rede de neblina armada e fechada em trilha no Parque Municipal das Araucárias, Guarapuava-PR.....	22
Figura 5. Exemplar de <i>Sturnira lilium</i> sendo retirado da rede de neblina com auxílio de luvas de raspa de couro.....	26
Figura 6. Contenção física de exemplar de <i>Molossus molossus</i> após retirada da rede de neblina.....	27
Figura 7. Medição de antebraço com animal contido fisicamente.....	27
Figura 8. Aplicação de anestésico por via intramuscular em exemplar de <i>Sturnira lilium</i>	28
Figura 9. Colheita de sangue por meio de punção cardíaca de exemplar de <i>Sturnira lilium</i>	28
Figura 10. Necropsia para retirada de fragmentos de fígado, baço e coração (A) e armazenamento em microtubos livres de DNase e RNase (B)	29
Figura 11. Eletroforese em gel de agarose 1,0% corado com brometo de etídeo para protocolo de PCR convencional baseada no gene endógeno GAPDH. As bandas correspondem à amplificação de 400 pb do referido gene de amostras de DNA extraídas de fragmentos de baço, fígado e coração de quirópteros amostrados no estado do Paraná. Observou-se positividade de todas as amostras testadas referentes a essa imagem e negatividade no último poço do gel (canaleta 29), o qual correspondeu ao controle-negativo (água esterilizada ultra-pura).....	42

Figura 12. Curvas de amplificação **(A)** e padrão **(B)** referentes à qPCR para *Bartonella* spp. baseada no gene *nuoG* de amostras de fígado, baço e coração de quirópteros amostrados no estado do estado do Paraná e recebidos pelo Setor de Animais Selvagens do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da FCAV-UNESP. Em **A**, enquanto as curvas em azul representam a amplificação de plasmídeos (10^0 a 10^7) contendo um fragmento de 83 pb do gene *nuoG* de *Bartonella* sp., as curvas ou linhas em vermelho representam a amplificação de amostras de DNA de tecidos de quirópteros..... 43

Figura 13. Curvas de amplificação **(A)** e padrão **(B)** referentes à qPCR para *Bartonella* spp. baseada no gene *nuoG* de amostras em triplicata que mostraram diferença de Cq maior que 0,5 nos ensaios anteriores. Em **A**, enquanto as curvas em azul representam a amplificação de plasmídeos (10^0 a 10^7) contendo um fragmento de 83 pb do gene *nuoG* de *Bartonella* sp., as curvas ou linhas em vermelho representam a amplificação de amostras de DNA de tecidos de quirópteros..... 43

Figura 14. Eletroforese em gel de agarose 1,0% corado com brometo de etídeo para protocolo de PCR convencional baseado no gene *ribC*. As bandas correspondem à reamplificação de amostras positivas de aproximadamente 400 pb do referido gene. Observou-se positividade com banda forte na amostra em canaleta 01, mas positividade com banda fraca da amostra em canaletas 2 e 3. As três amostras foram excluídas das análises filogenéticas devido à baixa qualidade de picos no eletroferograma de uma delas após sequenciamento, e à baixa intensidade de banda de duas delas, as quais não foram enviadas para o sequenciamento..... 46

Figura 15. Distribuição geográfica de animais positivos para *Bartonella* spp. e/ou *Mycoplasma* spp. representados por cores diferentes em cada município. Os estados onde foram realizadas as amostragens estão destacados..... 48

Figura 16. Análise filogenética concatenada dos genes *nuoG* e *gltA* para *Bartonella* spp. (3370bp após alinhamento), utilizando o método de máxima verossimilhança (MV) com modelo evolutivo de transição (TIM) com sítios invariáveis e distribuição gamma. As sequências do presente estudo estão destacadas em vermelho. Sequências em azul foram obtidas a partir de amostras provenientes de roedores pelo mesmo grupo de pesquisa. Observa-se formação de dois clados que englobam as sequências do presente estudo. Foi utilizado *bootstrap* de 1000 replicatas, cujos valores acima de 50% estão demonstrados em cada clado. *Brucella abortus* e *Ochrobactrum anthropi* foram utilizados como grupos externos..... 52

- Figura 17.** Análise filogenética concatenada dos genes *nuoG* e *gltA* para *Bartonella* spp. (3370bp após alinhamento) utilizando o método de inferência bayesiana (BI) com modelo evolutivo tempo reversível generalizado (GTR) com sítios invariáveis e distribuição gamma. As sequências do presente estudo estão destacadas em vermelho. Sequências em azul foram obtidas a partir de amostras provenientes de roedores pelo mesmo grupo de pesquisa. Observa-se formação de dois clados que englobam as sequências do presente estudo. Foi utilizada simulação de Cadeias de Markov Monte Carlo (MCMC) com 10^6 gerações para definição da probabilidade posterior, cujos valores acima de 50% estão demonstrados em cada clado. *Brucella abortus* e *Ochrobactrum anthropi* foram utilizados como grupos externos..... 53
- Figura 18.** Análise filogenética de um fragmento de 1500pb do gene *rpoB* para *Bartonella* spp. utilizando o método de máxima verossimilhança (MV) com modelo evolutivo Tamura e Nei (TrN) com sítios invariáveis e distribuição gamma. A sequência do presente estudo está destacada em vermelho. Foi utilizado *bootstrap* de 1000 replicatas, cujos valores acima de 50% estão demonstrados em cada clado. *Brucella abortus* e *Ochrobactrum anthropi* foram utilizados como grupos externos..... 55
- Figura 19.** Análise filogenética de um fragmento de 1500pb do gene *rpoB* para *Bartonella* spp. utilizando o método de inferência bayesiana (BI) com modelo evolutivo Hasegawa, Kishino e Yano (HKY) com sítios invariáveis e distribuição gamma. A sequência do presente estudo está destacada em vermelho. Foi utilizada simulação de Cadeias de Markov Monte Carlo (MCMC) com 10^6 gerações para definição da probabilidade posterior, cujos valores acima de 50% estão demonstrados em cada clado. *Brucella abortus* e *Ochrobactrum anthropi* foram utilizados como grupos externos..... 56
- Figura 20.** Análise filogenética de um fragmento de 790pb do gene *ftsZ* para *Bartonella* spp. utilizando o método de máxima verossimilhança (MV) com modelo evolutivo de transição (TIM1) com sítios invariáveis e distribuição gamma. A sequência do presente estudo está destacada em vermelho. Sequências em azul foram obtidas a partir de amostras provenientes de roedores pelo mesmo grupo de pesquisa. Foi utilizado *bootstrap* de 1000 replicatas, cujos valores acima de 50% estão mostrados em cada clado. *Brucella abortus* e *Ochrobactrum anthropi* foram utilizados como grupos externos..... 58

Figura 21. Análise filogenética de um fragmento de 790pb do gene *ftsZ* para *Bartonella* spp. utilizando o método de inferência bayesiana (BI) com modelo evolutivo de transição (TIM1) com sítios invariáveis e distribuição gamma . A sequência do presente estudo está destacada em vermelho. Sequências em azul foram obtidas a partir de amostras provenientes de roedores pelo mesmo grupo de pesquisa. Foi utilizada simulação de Cadeias de Markov Monte Carlo (MCMC) com 10^6 gerações para definição da probabilidade posterior, cujos valores acima de 50% estão demonstrados em cada clado. *Brucella abortus* e *Ochrobactrum anthropi* foram utilizados como grupos externos..... 59

Figura 22. Análise filogenética de um fragmento de 1770pb do gene *16SrRNA* para *Mycoplasma* spp. utilizando o método de máxima verossimilhança com modelo evolutivo tempo reversível generalizado (GTR) com sítios invariáveis e distribuição gamma As sequências do presente estudo estão destacadas em vermelho formando um grupo monofilético. Foi utilizado *bootstrap* de 1000 replicatas, cujos valores acima de 50% estão mostrados em cada clado. *Mycoplasma pneumoniae* foi utilizado como grupo externo..... 61

Figura 23. Análise filogenética de um fragmento de 1770pb do gene *16SrRNA* para *Mycoplasma* spp. utilizando o método de inferência bayesiana (BI) com modelo evolutivo de transição (TIM1) com sítios invariáveis e distribuição gamma de um fragmento de 1770pb do gene *16SrRNA* para hemoplasmas. As sequências do presente estudo estão destacadas em vermelho formando um grupo monofilético. Foi utilizada simulação de Cadeias de Markov Monte Carlo (MCMC) com 10^6 gerações para definição da probabilidade posterior, cujos valores acima de 50% estão demonstrados em cada clado. *Mycoplasma pneumoniae* foi utilizado como grupo externo..... 62

LISTA DE ANEXOS

	Página
Anexo I. Resultados de quantificação (ng/μL) e relações 260/280 e 260/230 obtidos por meio do aparelho Nanodrop (Thermo Scientific®) das amostras de DNA extraídas de Baço (B) e Fígado (F) dos quirópteros amostrados no estado do Pará.....	82
Anexo II. Resultados de quantificação (ng/μL) e relações 260/280 e 260/230 obtidos por meio do aparelho Nanodrop (Thermo Scientific®) das amostras de DNA extraídas de Baço (B), Fígado (F) e Coração (C) dos quirópteros amostrados no estado do Paraná.....	85
Anexo III. Resultados de quantificação (ng/μL) e relações 260/280 e 260/230 obtidas por meio do aparelho Nanodrop (Thermo Scientific®) das amostras de DNA extraídas de Baço (B), Fígado (F) e Coração (C) de quirópteros recebidos pelo Setor de Animais Selvagens do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da FCAV-UNESP.....	89
Anexo IV. Resultado de quantificação (ng/μL) e relações 260/280 e 260/230 obtidas por meio do aparelho Nanodrop (Thermo Scientific®) das amostras de DNA cedidas pela Profa. Dra. Marta Maria Gerales Teixeira, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (USP-SP).....	90

1. INTRODUÇÃO

No início do século 21, indicou-se a necessidade de colaboração interdisciplinar para prevenir e controlar zoonoses. Foi criado, portanto, o termo “One Health”, o qual compreende a saúde humana, animal e ambiental, levando em consideração aspectos de segurança alimentar, resistência antimicrobiana, mudanças climáticas e ligação humano-animal com a finalidade de identificação, controle e prevenção de enfermidades (GIBBS, 2014).

Estima-se que 75% das doenças emergentes sejam compostas por zoonoses, cuja maioria é originada de animais selvagens (TAYLOR et al., 2001; JONES et al., 2008). Jones et al. (2008) indicam que, dentre as doenças emergentes, aquelas veiculadas por vetores artrópodes compreendem cerca de 22,8%. Na última década, a riqueza de espécies hospedeiras da fauna selvagem se tornou um preditor importante para a ocorrência de doenças emergentes zoonóticas com origem na vida selvagem, sem levar em consideração o crescimento populacional, latitude ou interferências climáticas (JONES et al., 2008). Neste contexto, animais selvagens podem atuar como importantes fontes de infecção para animais domésticos e humanos (HARRUS e BANETH, 2005) e o monitoramento da presença de patógenos naqueles se torna um importante método preventivo de infecções zoonóticas (GALAN et al., 2016).

Aproximadamente 20% dos mamíferos conhecidos são constituídos por indivíduos da Ordem Chiroptera, a qual compreende o segundo maior grupo de mamíferos no mundo, com mais de 1200 espécies distribuídos em todos os continentes, exceto Antártida (SCHIPPER et al., 2008). Estes animais podem atuar como reservatórios, hospedeiros e fontes de infecção para diversos agentes com potencial zoonótico, tais como lyssavirus, hantavírus, *Leptospira* spp., *Pasteurella* spp., entre outros (MÜHLDORFER, 2013). Tal fato se deve à alta mobilidade, ampla distribuição, comportamento social e longevidade deste grupo de mamíferos (BAI et al., 2011).

Com o avanço da biologia molecular nos últimos anos, a detecção e caracterização de novos microorganismos vêm sendo empregadas a fim de se obter

maior conhecimento sobre a circulação de possíveis patógenos em animais selvagens (HARRUS e BANETH, 2005).

Embora *Bartonella* spp. e *Mycoplasma* spp. já tenham sido descritos em quirópteros de diversos países, os relatos no Brasil são inexistentes até o presente momento. Há grande riqueza de espécies pertencentes a esta ordem de mamíferos ocorre no Brasil, com aproximadamente 167 espécies abrangendo todo o território nacional em áreas urbanas e em regiões da Amazônia, Cerrado, Mata Atlântica, Pantanal, no árido nordeste e pampas gaúchos (REIS et al., 2007). Levando em consideração que diversas espécies de quirópteros estão presentes em áreas urbanas e que o turismo ecológico vem crescendo cada vez mais, é importante ressaltar a importância de estudos epidemiológicos para prevenção de possíveis doenças emergentes. Portanto, o presente estudo objetivou investigar a ocorrência de *Bartonella* spp. e *Mycoplasma* spp. em quirópteros amostrados em cinco estados do Brasil.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Quirópteros Brasileiros

O nome Chiroptera origina-se do grego *Cheir*=mão e *pteron*=asas e abrange mamíferos que possuem membros anteriores altamente modificados e especializados para o voo, com alongamento ósseo e presença de membrana elástica denominada patágio. Este grupo de animais lembra roedores alados e a origem ao nome morcego tem origem do latim: *muris*=rato e *coecus*=cego. São animais com grande diversidade de espécies, complexidade biológica e grande importância ecológica. Possuem hábitos noturnos e podem percorrer mais de 80km por noite para alimentação. Apresentam praticamente todos os hábitos alimentares, compreendendo hematofagia, polinivoria, nectarivoria, piscivoria, onivoria, insetivoria, frugivoria e carnivoria, o que remete a grande importância desses animais na dispersão de sementes, polinização e controle de insetos (PERACCHI et al, 2006; REIS et al., 2007). Bernard (2002) analisou 252 amostras fecais de 35 espécies e encontrou sementes, frutas e insetos. Dentre os insetos encontrados,

identificou-se presença de Coleoptera, Diptera, Hymenoptera, Homoptera, Isoptera e Arachnida.

Pouco se sabe a respeito da ancestralidade dessa ordem de animais, embora seja indicada a subdivisão desse grupo em duas subordens bem conhecidas e diferenciadas entre si filogeneticamente: os Megachiroptera e Microchiroptera (MURPHY et al., 2001; JONES et al., 2002; REIS et al., 2007; SONG et al., 2012). Os Megachiroptera, também chamados de “megabats ou “Old World fruit bats”, são representados por uma única família (Pteropodida), conhecidos como raposas voadoras, as quais podem chegar a 1,5kg e 1,7m de envergadura, além de possuírem olhos grandes, uma vez que utilizam a visão para localização. Esses animais ocorrem apenas em regiões tropicais da África, Índia, sudeste da Ásia e Austrália. Os Microchiroptera, também conhecidos como “microbats”, pesam entre 2 a 196g, com tamanho de antebraço variando de 22 a 110mm. Os microquirópteros têm capacidade de ecolocalização, a qual consiste na orientação durante o vôo pela emissão e percepção de som de alta frequência. Ocorrem em toda a extensão territorial brasileira e representam a segunda ordem de maior riqueza em espécies, perdendo somente para os roedores. No Brasil são representados por nove famílias com 167 espécies (PERACCHI et al, 2006).

Por serem animais noturnos, possuem mudança na sua atividade em resposta ao aumento da luminosidade lunar. Breviglieri (2011) inferiu que em locais de cobertura por dossel em áreas de sub-bosque, a luminosidade lunar diminui as atividades de indivíduos, fato observado através de uma menor taxa de captura de espécimes de *Platyrrhinus lineatus*. Já nos fragmentos de área de com maior sombreamento, a atividade dos animais não diminui em relação ao ciclo lunar.

Em relação à ocorrência desses animais no território brasileiro, maior conhecimento de sua distribuição é relatado na Floresta de Mata Atlântica, com 80% do bioma já estudado. Já na Amazônia, menos de 25% da região tem registros de ocorrência de quirópteros. Os locais com menos dados são os Pampas e a Caatinga. Mesmo assim, não se pode considerar que todos os biomas são bem pesquisados, já que se estima que quase 60% do território nacional não tenham relatos da ocorrência de quirópteros (BERNARD, AGUIAR e MACHADO, 2011).

O registro de ocorrência de espécies de morcegos para a Amazônia Brasileira é de aproximadamente 146 espécies, distribuídas em 64 gêneros, compreendendo as nove famílias da região neotropical: Emballonuridae, Phyllostomidae, Mormoopidae, Noctilionidae, Furipteridae, Thyropteridae, Natalidae, Molossidae e Vespertilionidae. O estado do Pará é aquele com maior número de espécies registradas (BERNARD, TAVARES e SAMPAIO, 2011).

Na região sul do Brasil, há relato de ocorrência de um total de 70 espécies distribuídas em sete famílias: Emballonuridae, Noctilionidae, Phyllostomidae, Furipteridae, Thyropteridae, Vespertilionidae e Molossidae. O estado do Paraná é o mais rico, apresentando 64 espécies, seguido por Santa Catarina com 47, e Rio Grande do Sul com 40 (PASSOS et al., 2010).

Bernardi (2015) analisou 83 comunidades de quirópteros da América Latina e encontrou 214 espécies, representando 53% de quirópteros neotropicais. A espécie mais representativa foi *Artibeus lituratus*, que teve ocorrência em 76 comunidades, seguida por *Carollia perspicillata*, *Desmodus rotundus*, *Sturnira liliium*, *Glossophaga soricina*, *Myotis nigricans*, *Artibeus planirostris*, *Phyllostomus hastatus*, *Molossus molossus*, *Chrotopterus auritus* e *Artibeus obscurus*.

Dentre a ocorrência de quirópteros no Brasil, espécimes das famílias Phyllostomidae, Vespertilionidae e Molossidae foram os mais frequentemente encontrados (PASSOS et al., 2010; BERNARD, TAVARES e SAMPAIO, 2011; BERNARDI, 2015).

São animais comumente relacionados às zoonoses, principalmente com a raiva. Entretanto, nas maiores capitais brasileiras, os índices de raiva em morcegos oscilam entre 0,5% e 0,8%, o que corresponde aos padrões normais estabelecidos pela Organização Mundial de Saúde. Entretanto, pouco se sabe no que diz respeito à ocorrência de outros patógenos zoonóticos neste grupo de animais (PACHECO et al., 2010).

Dessa forma, torna-se importante o estudo de patógenos zoonóticos circulantes em quirópteros, os quais representam um grande grupo de animais da fauna brasileira.

2.2 *Bartonella* spp.

2.2.1 Agentes etiológicos

O gênero *Bartonella* engloba alfa-proteobactérias pertencentes à ordem Rhizobiales (MORSE et al., 2012) (**Quadro 1**). São bactérias gram-negativas, intracelulares facultativas, que parasitam principalmente eritrócitos e células endoteliais e que vêm sendo identificadas em uma ampla variedade de mamíferos, inclusive em seres humanos. Sugere-se que a maioria das espécies representantes deste grupo de bactérias tenha se adaptado a seus reservatórios mamíferos de forma única e em faixas restritas de espécies hospedeiras (KOSOY et al., 2010; BAI et al., 2011; VEIKKOLAINEN et al., 2014).

Quadro 1. Classificação taxonômica de organismos do gênero *Bartonella*

Reino	Bacteria
Filo	Proteobacteria
Classe	Alphaproteobacteria
Ordem	Rhizobiales
Família	Bartonellaceae
Gênero	<i>Bartonella</i>

Fonte: Euzéby, 1997.

As doenças causadas por este grupo de bactérias podem se manifestar de forma autolimitante, com febre passageira e até enfermidades sistêmicas potencialmente fatais, sendo que uma mesma espécie pode produzir manifestações clínicas diferentes. Na sua maioria são consideradas como patógenos reemergentes e zoonóticos (KOSOY et al., 2010, PITASSI, 2015; VIEIRA-DAMIANI et al., 2015), compreendendo pelo menos 34 espécies já conhecidas (BREITSCHWERDT, 2015).

Acredita-se que as espécies de *Bartonella* consideradas patogênicas possam estar associadas a uma determinada espécie de hospedeiro vertebrado, correlacionando-se predominantemente a um vetor envolvido, o qual também assume preferência por determinados hospedeiros. Desta forma, em roedores encontraram-se frequentemente as espécies *B. elizabethae*, *B. grahamii*, *B. washoensis* e *B. vinsonii* subsp. *arupensis*; já em gatos, *B. henselae* é a espécie de maior ocorrência; *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii*, por sua vez, está frequentemente associada a cães. Desta forma, considerando-se o grande número de animais

reservatórios e de insetos vetores, a transmissão desse agente do ponto de vista zoonótico mostra-se mais substancial que aquela imaginada outrora, levando a um cenário epidemiológico desafiador (BREITSCHWERDT e KORDICK, 2000; BREITSCHWERDT et al., 2010a).

2.2.2 *Bartonella* spp. em quirópteros

Estudos demonstram que bactérias do gênero *Bartonella* possuem alta prevalência entre comunidades de mamíferos, sendo que quirópteros representam o segundo principal reservatório, perdendo somente para os roedores (LIN et al., 2012).

Já foi demonstrada presença de *Bartonella* spp. em quirópteros amostrados no Reino Unido (CONCANNON et al., 2005), Quênia (KOSOY et al., 2010), Guatemala (BAI et al., 2011, WRAY et al., 2016), Taiwan (LIN et al., 2012), Peru (BAI et al., 2012), Nigéria (KAMANI et al., 2014), Porto Rico (OLIVAL et al., 2015), Finlândia (LILLEY, VEIKKOLAINEN e PULLIAINEN, 2015), Madagascar (BROOK et al., 2015), Costa Rica (JUDSON, FRANK e HADLY, 2015), Guiana Francesa (DAVOUST et al., 2016), Gana (MANNERINGS et al., 2016), Argélia (LEULMI et al., 2016), África do Sul e Suazilândia (DIETRICH et al., 2016) e na China (HAN et al., 2017), conforme representado na **Figura 1**.

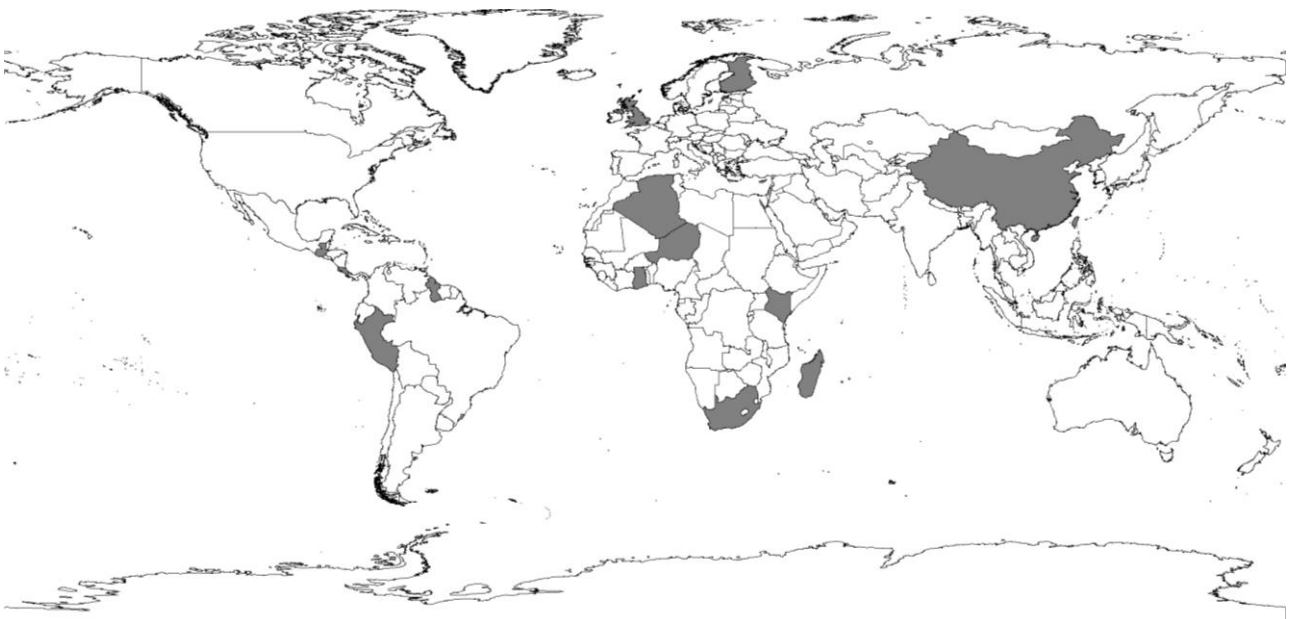


Figura 1. Representação dos países (áreas preenchidas) cuja detecção de *Bartonella* spp. em quirópteros já foi demonstrada.

Na Inglaterra, Concannon et al. (2005) detectaram a presença de DNA de *Bartonella* spp. em tecido cardíaco de cinco morcegos pertencentes à quatro espécies distintas. Por meio da análise filogenética baseada no gene citrato sintase (*gltA*), foram identificados cinco genótipos distintos, provavelmente derivados de duas espécies diferentes de *Bartonella*.

No Quênia, Kosoy e colaboradores (2010) também verificaram a presença destes agentes em morcegos, com uma porcentagem de isolamento dos patógenos de 30,2% (106/331) a partir de cultura de amostras de sangue, as quais foram confirmadas com amplificação e sequenciamento de um fragmento do gene *gltA*. A prevalência encontrada seguiu a seguinte distribuição por espécies de quirópteros: *Eidolon helvum* (23/88 [26,1%]); *Roussetos aegyptiacus* (22/105 [21%]); *Coleura afra* (4/9 [44,4%]); *Triaenops persicus* (7/8 [87,5%]); *Hipposideros commersoni* (1/4 [25%]); e *Miniopterus* spp. (49/87 [56,3%]).

Na Guatemala, dentre uma amostra de 118 morcegos, 41 mostraram-se positivos para o agente em questão por meio da técnica de PCR convencional (BAI et al., 2011). Os autores encontraram 21 variantes pertencentes a 13 filogrupos de *Bartonella* spp. A ocorrência dos patógenos ocorreu de forma significativamente maior em *Phyllostomus discolor* (9/8 [88,8%]), *Phyllostomus davyi*, (7/10 [70%]) e *Desmodus rotundus* (15/31 [48,4%]), quando comparada àquela encontrada em indivíduos das espécies *Sturnira lilium* (1/12 [8,3%]) e *Glossophaga soricina* (2/15 [13,3%]). Mais recentemente, Wray et al. (2016) encontraram positividade de 10,85% (43/396) para *Bartonella* spp. em amostras de sangue (35/89 [39,32%]), soro (3/89 [3,37%]) e swab fecal (5/103 [4,85%]) em exemplares de *Desmodus rotundus*.

Em Taiwan, Lin et al. (2012) investigaram a ocorrência de *Bartonella* spp. em morcegos, roedores e musaranhos. Dentre quatro espécies de quirópteros amostradas, *Bartonella* spp. foram detectadas apenas em morcegos da espécie *Miniopterus schreibersii*, com uma frequência de 6/14 (42,9%).

Nas regiões de Santa Marta e Truenococha, no Peru, uma prevalência de 24,1% de infecção por *Bartonella* spp. foi encontrada em 11 diferentes espécies de morcegos, por meio do isolamento a partir de amostras de sangue: *Artibeus obscurus* (1/10 [10%]); *Artibeus planirostris* (2/16 [12,5%]); *Carollia brevicauda* (2/2

[100%]); *Carollia perspicillata* (4/29 [13,8%]); *Desmodus rotundus* (10/18 [55,6%]); *Glossophaga soricina* (1/2 [50%]); *Myotis* spp. (1/6 [16,7%]); *Phyllostomus discolor* (2/2 [100%]); *Phyllostomus hastatus* (1/2 [50%]); *Sturnira lilium* (1/1 [100%]); e *Vampyriscus bidens* (2/3[66,7%]). Os autores relataram ausência de isolamento de *Bartonella* spp. a partir de amostras de sangue da espécie *Molossus molossus* (0/10) (BAI et al., 2012).

Kamani et al. (2014) coletaram amostras de sangue e ectoparasitas (Nycteribiidae) de 148 quirópteros nas cidades de Bauchi e Gboko, na Nigéria. Os autores encontraram uma ocorrência de 51,4% (76/148) de positividade para *Bartonella* spp. na qPCR baseada na região intergênica ITS e 18,9% (28/148) na qPCR baseada no gene *rpoB* em amostras de sangue dos animais. Na cPCR foi encontrada positividade de 9,5% (14/148) para o gene *gltA*. Dentre as amostras de ectoparasitas, 41,7% (10/24) e 29,2% (7/24) mostraram positividade em ensaios de qPCR baseados na região intergênica ITS e gene *rpoB*, respectivamente. Já no cultivo em placas de ágar chocolate (seladas com “shrink seal”), de 23 amostras de sangue, 45,5% de positividade foi encontrada em quirópteros da espécie *Micropterus* spp., 25% em *Rhinolophus* spp., 15,2% em espécie *Eidolon helvum* e 10% em *Epomophorus* spp. As sequências obtidas pelos autores se posicionaram em três clados diferentes com amostras de *Bartonella* spp. detectadas em morcegos e seus ectoparasitas da região do Quênia e Gana.

Em Porto Rico, Olival et al. (2015) investigaram se morcegos de um mesmo nicho dividem genótipos similares de *Bartonella* spp., correlacionando com possíveis vetores envolvidos. Os animais capturados eram provenientes da região da Mata de Platano Nature Reserve com enfoque na Cueva de los Culebrones. As espécies coletadas com maior frequência foram aquelas pertencentes à família Phyllostomidae, compreendendo as espécies *Artibeus jamaicensis*, *Brachyphylla cavernarum* e *Moniphyllus redmani*. Em morcegos pertencentes à última espécie relatada foram encontrados quatro genótipos distintos de *Bartonella* spp. Além disso, os autores detectaram *Bartonella* spp. em *Trichobius* spp, um ectoparasita comumente encontrado nas espécies de morcegos supracitadas. Os autores sugerem que a carga de ectoparasitas e a especificidade do vetor para um indivíduo

podem explicar as diferenças encontradas tanto na diversidade das bartonelas como na prevalência destas entre as espécies de morcegos.

Lilley, Veikkolainen e Pulliainen (2015) reforçam a importância dos quirópteros como reservatórios de *Bartonella* spp. e sugerem a presença de uma nova espécie, 'Candidatus *B. hemsundetiensis*', filogeneticamente próxima a *B. tamiae* e *B. bacilliformis*, detectada em quirópteros da espécie *Myotis daubentonii* proveniente do sudeste da Finlândia.

Em Madagascar, Brook et al. (2015) investigaram a presença de DNA de *Bartonella* spp. em amostras de sangue de quirópteros das espécies *Eidolon dupreanum* e *Pteropus rufus* e ectoparasitas *Cyclopodia dubia* e *Thaumapsylla* sp., por meio de ensaios de PCR convencional baseadas nos genes *gltA*, *ftsZ*, e *nuoG* para amostras de artrópodes, e *gltA* e ITS para amostras de sangue de morcegos. Amostras de DNA de *Bartonella* spp. foram detectadas somente em exemplares de *Eidolon dupreanum* (44,68% [21/47]) e em seus ectoparasitas da espécie *Cyclopodia dubia* (89,47% [17/19]). Por outro lado, exemplares de *Pteropus rufus*, os quais foram capturados simpatricamente, mostraram-se negativos quanto à presença de *Bartonella* spp. e ectoparasitas. Deste modo, os autores sugeriram que moscas ectoparasitas de quirópteros têm um papel importante na transmissão de *Bartonella* spp.

Por meio da PCR convencional baseada no gene *gltA*, Judson, Frank e Hadly (2015) encontraram ocorrência de 52,7% (29/55) de *Bartonella* spp. em moscas ectoparasitas de quirópteros e 33,3% (21/63) em quirópteros amostrados na Costa Rica. De acordo com os autores supracitados, a mesma variante de *Bartonella* spp. poderia ser compartilhada entre os quirópteros amostrados e os ectoparasitas atuariam como vetores entre estes animais, uma vez que foram encontrados genótipos idênticos de *Bartonella* spp. em diferentes morcegos e seus respectivos ectoparasitas.

Na Guiana Francesa, Davoust et al. (2016) isolaram duas amostras de *Bartonella* spp. a partir de amostra de sangue de *Noctilius albiventris* e *Pteronotus parnellii*. As sequências obtidas mostraram-se diferentes das espécies conhecidas de *Bartonella*, sugerindo a ocorrência de duas novas espécies.

Mannerings et al. (2016) testaram 335 amostras de soro de voluntários da região de Acra, Gana, que tiveram contato com quirópteros da espécie *E. helvum*, e de 70 animais domésticos (cinco gatos, 23 galinhas, sete vacas, seis cães, 21 cabras e oito ovelhas) que habitavam locais próximos às colônias de quirópteros. As amostras foram submetidas à cultura, PCR e Reação de Imunofluorescência Indireta para detecção de anticorpos contra espécies de bartonela que já foram isoladas de *E. helvum*. Os autores encontraram negatividade em todas as culturas. Pela PCR foi encontrada apenas uma amostra de sangue de humano positiva para *B. clarridgeiae* e uma amostra de sangue de gato positiva para *B. henselae*. Nos ensaios de Imunofluorescência três amostras de soro de humanos foram reativas para *B. henselae* e cinco para *B. quintana*. Com base nos resultados, os autores sugeriram baixa taxa de *spillover* da infecção por *Bartonella* spp. em quirópteros para outras espécies animais. Adicionalmente, os autores inferiram que, mesmo se moscas da família Nycteribiidae atuem como vetores para transmissão de *Bartonella* spp., o que não está comprovado, estas podem possuir alta especificidade por hospedeiro, diminuindo a taxa de transmissão de quirópteros para outros animais. Porém, entre quirópteros, Morse et al. (2012) sugerem a possível importância de ectoparasitas como vetores. Os autores identificaram *Bartonella* spp. em dípteros Nycteribiidae e Streblidae coletados em quirópteros em 14 países da Ásia, Américas, Europa e África. No referido estudo, encontraram-se 26 genótipos novos de *Bartonella* spp. em 19 espécies de dípteros coletados de 20 diferentes espécies de morcegos.

Mais recentemente, Leulmi et al. (2016) detectaram *Bartonella* spp. filogeneticamente associada a *B. tamiae* em 26 amostras de ectoparasitas e de baço de morcegos provenientes do nordeste da Argélia. Foi encontrada positividade em 63,2% (12/19) dos exemplares de carrapatos da espécie *Ixodes vespertilionis*, 72,7% (8/11) de moscas da família Nycteribiidae e 60% (6/10) das amostras de baço de morcegos.

Dietrich et al. (2016) pesquisaram a presença de *Bartonella* spp. e *Rickettsia* spp. em amostras de sangue de quirópteros e ectoparasitas na África do Sul e Suazilândia, por meio de PCR convencional com alvo no gene citrato sintase (*glTA*). Foram colhidas 384 amostras de sangue de 29 espécies pertencentes a oito famílias diferentes de quirópteros, e 14 amostras de ectoparasitas hematófagos encontrados

nos animais. Treze amostras de sangue de quatro espécies diferentes (*Miniopterus natalensis*, *Nycteris thebaica*, *Epomophorus wahlbergi* e *Rousettus aegyptiacus*) foram positivas para *Bartonella* spp. e seis para *Rickettsia* spp., sendo que um animal apresentava coinfeção. Cinco moscas da família Nycteribiidae e uma espécie não identificada de ectoparasita também mostraram-se positivas para *Bartonella* spp. As sequências encontradas pelos autores mostraram-se filogeneticamente relacionadas à *B. grahamii* e *B. elizabethae*. Adicionalmente, as sequências de *Bartonella* spp. detectadas em quirópteros e ectoparasitas mostraram-se filogeneticamente associadas, porém distantes daquelas previamente descritas na África. Apesar da falta de evidência, os autores sugeriram o possível papel dos ectoparasitas como vetores de *Bartonella* spp. entre quirópteros.

Recentemente, Han et al. (2017) relataram a ocorrência de possíveis novas espécies de *Bartonella* em quirópteros amostrados na China. Os autores amostraram 107 animais e obtiveram amplificação de DNA por meio de cPCR com alvo no gene *gltA* em 25,2% (27/107) das amostras de sangue colhidas. As amostras de sangue positivas eram provenientes de quirópteros das espécies *Rhinolophus ferrumequinum*, *Rhinolophus pusillus*, *Myotis fimbriatus*, *Myotis ricketti*, e *Myotis pequinus*. Os autores ainda relatam a coinfeção com diferentes genótipos de *Bartonella* spp. em um mesmo animal.

2.2.3 Bartoneloses em humanos

Dentre as várias espécies de *Bartonella* que infectam seres humanos (**Tabela 1**), *Bartonella bacilliformis*, a primeira espécie de *Bartonella* descrita em 1909, é causadora da doença de Carrion, endêmica no Peru, Equador e Colômbia. Há relatos esporádicos da doença na Bolívia, Chile e Guatemala. Tal enfermidade é caracterizada por duas fases distintas: a primeira, de caráter agudo, é conhecida por febre de Oroya e caracterizada por febre, palidez, desconforto e mialgia; já a segunda fase, conhecida como eruptiva ou verruga peruana, apresenta caráter crônico e é caracterizada por lesões cutâneas, sinais neurológicos e cardíacos, e complicações respiratórias em casos graves. Grande parte das mortes ocasionadas por esta doença está associada à infecção secundária face à imunodeficiência (MACO et al., 2004; LAMAS et al., 2008; PITASSI, 2013).

Tabela 1. Principais espécies de *Bartonella* associadas a enfermidades em seres humanos.

ESPÉCIE	POSSÍVEL VETOR	RESERVATÓRIO	DOENÇA	DISTRIBUIÇÃO
<i>B. bacilliformis</i>	<i>Lutzomyia verrucarum</i>	Homem	Doença de Carrión e bacteremia	América do Sul
<i>B. rochalimaea</i>	Desconhecido	Desconhecido	Febre, bacteremia, lesões cutâneas e esplenomegalia	Peru
<i>B. quintana</i>	Piolho humano (<i>Pediculus humanus corporis</i>), <i>Ctenocephalides felis</i> , carrapato (<i>Ixodes pacificus</i>)	Homem	Endocardite, septicemia, febre das trincheiras, doença da arranhadura do gato, angiomatose bacilar, peliose hepática, linfadenopatia crônica, bacteremia	América do Sul, África e EUA
<i>B. henselae</i>	<i>Ctenocephalides felis</i> e carrapatos (<i>Ixodes ricinus</i> , <i>Ixodes pacificus</i> e <i>Rhipicephalus sanguineus</i>)	Gato, cão, homem e outros	Doença da arranhadura do gato, angiomatose bacilar, peliose bacilar hepática, linfadenopatia crônica, bacteremia, endocardite, septicemia, encefalopatia e manifestações oculares	América do Sul, África, EUA e Europa
<i>B. elizabethae</i>	<i>Ctenophtalmus nobilis</i>	Rato	Endocardite e neurorretinite	Europa, EUA e Ásia
<i>B. clarridgeiae</i>	<i>Ctenocephalides felis</i> e <i>Ctenophtalmus nobilis</i>	Gato	Doença da arranhadura do gato, endocardite e septicemia	Europa, EUA e Ásia
<i>B. koehlerae</i>	Pulgas de gatos e roedores	Gato	Endocardite e doença da arranhadura do gato	EUA

Continua...

...continuação

<i>B. vinsonii</i> subsp. <i>berkhoffii</i>	Carrapato (<i>Ixodes pacificus</i>)	Cão	Endocardite, artralgia, mialgia, cefaleia e fadiga	EUA e Europa
<i>B. washoensis</i>	Carrapatos (<i>Ixodes pacificus</i>) e esquilos	Roedores	Miocardite e febre	EUA
<i>B. tamiae</i>	Desconhecida – Rato?	Rato	Febre	Tailândia
<i>B. grahamii</i>	<i>Ctenophthalmus nobilis</i>	Camundongo	Neurorretinite	Europa, Canadá e Ásia
<i>B. doshiae</i>	<i>Xenopsylla cheopis</i>	Roedores	Neurorretinite, doença da arranhadura do gato	Europa
<i>B. taylorii</i>	Pulgas de ratos e gerbils	Desconhecida	Desconhecida	Europa
<i>B. alsatica</i>	Desconhecida – pulgas?	Coelho	Endocardite e linfadenite	Europa
<i>B. bovis</i>	Desconhecida	-	Desconhecida	Europa, África e América do Norte
<i>B. vinsonii</i> subsp. <i>vinsonii</i>	Desconhecida	Roedores	Desconhecida	-
<i>B. vinsonii</i> subsp. <i>arupensis</i>	Carrapato (<i>Ixodes pacificus</i>)	Cão, homem e camundongo	Bacteremia, endocardite, febre, valvulopatia	-
<i>B. chomelii</i>	Desconhecida	Gado	Bacteremia	-
<i>Candidatus B. melophagi</i>	Desconhecida	Ovelha	Bacteremia	-

Adaptado de Pitassi (2013) e Lamas et al (2008).

A Doença da Arranhadura do Gato (DAG) é causada pela *Bartonella henselae*, cujo isolamento e identificação foram realizados em 1992 por Dolan e colaboradores (PITASSI, 2013). A doença ocorre com maior frequência em pacientes imunodeficientes e com histórico de contato com felinos domésticos (VELHO et al., 2003), podendo se manifestar de duas formas em humanos, a típica e atípica. A DAG típica se caracteriza como uma pápula eritematosa no local do

trauma e que se torna vesiculosa e crostosa em até três dias, envolvendo para uma mácula com até três meses de duração. Pode ocorrer linfadenomegalia relacionada ao local do trauma. A doença atípica é caracterizada por febre alta e linfonodos regionais acometidos (VELHO, 2001). Ainda, pode ocorrer a chamada síndrome oculoglandular de Parinaud, reportada inicialmente como conjuntivite ulcerativa crônica associada à linfadenopatia (VELHO, 2001; LAMAS et al., 2008). Outras manifestações são as de caráter neurológico, sendo a encefalite a mais frequente. Há possibilidade de ocorrência de convulsão, status epilético e coma, meningite asséptica, mielite transversa, radiculite, ataxia cerebelar, neurites periféricas, hemiplegia aguda, demência e neurorretinites caracterizadas por perda visual, edema do disco óptico e formação estrelar a partir da mácula (VELHO, 2001; LAMAS et al., 2008).

Bartonella henselae e a *B. quintana* são agentes causadores da angiomatose bacilar, a qual é caracterizada por lesões de proliferação vascular devido à estimulação angiogênica das bartonelas. Embora essas lesões ocorram com maior frequência na pele, vasoproliferação e dilatação capilar no parênquima hepático caracterizam a chamada peliose bacilar (VELHO, 2001). Ainda, *B. quintana*, é agente etiológico da febre das trincheiras. Inicialmente, esta bactéria pertencia ao gênero *Rochalimaea*, em homenagem ao microbiologista brasileiro Enrique de Rocha Lima, sendo depois relocada para o gênero *Bartonella*. A doença é caracterizada por febre alta recorrente, mal estar, calafrios, sudorese, conjuntivite, artralgia, cefaléia e mialgias (VELHO, 2001; PITASSI, 2013).

Já a *B. clarridgeae* é associada a quadros clínicos caracterizados por febre, mal-estar, linfadenopatia e manifestações toracopulmonares em humanos, além de endocardite e hepatopatias em cães, e cegueira e neurite em gatos (VIEIRA-DAMIANI et al., 2015).

2.2.4 Transmissão de *Bartonella* spp.

Embora a transmissão das bartonelas esteja frequentemente associada a vetores artrópodes hematófagos (BAI et al., 2011; MORSE et al., 2012), pouco se sabe sobre o envolvimento de ácaros e moscas nos ciclos de transmissão dos

referidos patógenos. Recentemente, a competência vetorial de carrapatos na transmissão destes agentes tem sido investigada (BILLETER et al., 2008).

É importante enfatizar que a detecção do patógeno em um determinado artrópode não deve ser interpretada como competência vetorial, já que esta deve ser comprovada experimentalmente. A *Bartonella henselae*, por exemplo, é transmitida para humanos principalmente por arranhadura de gato com presença de fezes de pulga. Nesse caso, a presença de pulgas mostra-se importante para a transmissão do agente entre gatos (CHOMEL et al., 1996), embora a transmissão direta para humanos pela *Ctenocephalides felis* não tenha sido comprovada (CHOMEL et al., 2006).

Por outro lado, sabe-se que a transmissão de *Bartonella bacilliformis* ocorre por picadas de *Lutzomyia verrucarum*, *B. quintana* por *Pediculus humanus corporis*, *B. elizabethae* por *Xenopsylla cheopis*, *B. henselae*, *B. clarridgeiae* e *B. koehlerae* por *Ctenocephalides felis*, e *B. grahmi* e *B. taylorii* por *Ctenophtalmus nobilis nobilis* (revisados por CHOMEL et al., 2006; BILLETER et al., 2008).

Ainda, embora espécies de *Bartonella* vêm sendo identificadas em carrapatos dos gêneros *Ixodes* spp., *Dermacentor* spp., *Haemophysalis* spp., *Rhipicephalus* spp. e *Carios* spp. (revisado por BILLETER et al., 2008), a competência vetorial destes artrópodes na transmissão de bartonelas ainda não foi comprovada experimentalmente (TELFORD e WORMSER, 2010).

Além de vetores, outros meios de transmissão de *Bartonella* spp. vêm sendo descritos e mostram-se importantes para a saúde humana. Neste contexto, Pitassi et al. (2015) relataram a detecção molecular de *B. henselae* e *B. clarridgeiae* a partir de cultura de amostra de sangue humano doado. Os autores encontraram 16 amostras positivas de um total de 500 colhidas em banco de sangue, sendo que os doadores apresentavam-se saudáveis. Apesar de ainda não confirmada a transmissão por essa via em humanos, Silva et al. (2016) demonstraram a transmissão de bartonelas por meio de transfusão sanguínea em ratos. De quatro animais transfundidos experimentalmente, dois (50%) apresentaram positividade para *B. henselae* em ensaios de *nested* cPCR a partir de amostras de fragmentos teciduais.

Nos Estados Unidos, *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* e *B. henselae* foram detectadas em amostras de sangue de integrantes de uma família (pai com 47 anos,

mãe com 46 anos e filho com 10 anos de idade). O histórico resume-se ao contato da esposa com felino quando adolescente e ao fato de ter concebido um casal de gêmeos, do qual a filha veio a falecer. Nos testes realizados, os autores encontraram *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* e *B. henselae* em amostras de sangue submetidas à cultura líquida (BAPGM) com posterior confirmação molecular. Estas mesmas espécies foram detectadas molecularmente em tecido cerebral conservado em parafina da filha do casal que veio a óbito nove dias após o nascimento, indicando possível transmissão perinatal ou pelo procedimento de cesárea (BREITSCHWERDT et al., 2010b).

Ainda, Oliveira et al. (2010) relataram possível caso de transmissão de *Bartonella* spp. por acidente com agulha em um profissional veterinário nos Estados Unidos. Ao realizar uma punção aspirativa, o veterinário acidentalmente machucou-se com a agulha utilizada. Sabendo-se que o cão em questão foi soropositivo para *E. canis*, o veterinário foi submetido à sorologia e testes para detecção de *Ehrlichia* spp, porém o mesmo mostrou-se positivo. Após 34 dias do acidente, começou a apresentar dores de cabeça frequentes, fadiga, e parestesia intermitente em áreas focais. O DNA de *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* foi amplificada a partir de amostra de sangue do profissional em questão, sugerindo a possível transmissão pela agulha infectada. Um outro caso reportado por Lin, Chen e Chang (2011) também sugere acidente com agulha contaminada como forma de transmissão de *Bartonella* spp. em veterinário de Taiwan. No caso descrito pelos autores, o profissional apresentou cefaleia, dores nas costas e linfadenopatia um mês após o acidente. O paciente foi testado por meio de imunofluorescência direta, hemocultura para isolamento de bartonela e técnicas moleculares a partir de DNA extraído de amostras de sangue e aspirado de linfonodo. Como resultado obteve-se positividade na sorologia e em teste molecular de hibridização “dot-blot” com identificação de infecção por *Bartonella henselae*.

2.2.5 Diagnóstico de *Bartonella* spp.

As técnicas utilizadas para o diagnóstico das infecções causadas por *Bartonella* spp. englobam a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), ensaio

imunoenzimático ligado à enzima (ELISA), "Western blot", culturas e PCR (reação em cadeia pela polimerase) (MOREIRA, 2011; PITASSI, 2013).

A cultura desses agentes não é realizada rotineiramente nos laboratórios de microbiologia por ser um processo laborioso, já que as bartonelas possuem crescimento lento, levando em média de sete a dez dias para visualização de pequenas colônias. O ambiente controlado de temperatura e atmosfera também é um fator que dificulta seu cultivo (KAWASATO, 2009; MOREIRA, 2011).

Para aumentar a sensibilidade de detecção do agente em amostras de sangue e tecidos, foi desenvolvido um meio de pré-enriquecimento para isolamento de bactérias com base nas espécies *Bartonella clarridgeiae*, *B. doshiae*, *B. elizabethae*, *B. grahamii*, *B. henselae* Houston-1, *B. quintana* e *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii*. O meio líquido *Bartonella – Alphaproteobacteria Growth Medium* (BAPGM) foi formulado a partir de meio de crescimento de inseto para promover crescimento eficaz das bactérias sob estudo (MAGGI et al, 2005). Duncan et al. (2007) compararam a detecção de *Bartonella* spp. em amostras de sangue de cães por meio de semeadura diretamente em placas de ágar sangue, e inoculação no meio BAPGM seguido de semeadura em placa de ágar sangue por três e seis semanas. Após o período de incubação, todas as amostras foram testadas por métodos moleculares. Os autores sugerem que a combinação do meio de pré-enriquecimento BAPGM aumenta o número de bactérias detectado por métodos moleculares quando comparado somente com a inoculação em meio sólido. Adicionalmente, Cadenas et al. (2007) relataram a identificação de outras bactérias utilizando o meio BAPGM, indicando que esse meio possa ser útil para isolamento de diversas bactérias fastidiosas, não somente *Bartonella* spp.

Gutiérrez et al. (2017), por outro lado, recomendam o diagnóstico por métodos moleculares por serem mais práticos e sensíveis. Ainda, indicam realização de triagem por PCR em tempo real e, posteriormente, ensaios de PCR convencional seguidos de sequenciamento para confirmação da identidade molecular ou posicionamento filogenético.

2.3 Micoplasmas hemotróficos (hemoplasmas)

2.3.1 Agentes etiológicos

Os micoplasmas hemotróficos ou hemoplasmas são pequenas bactérias gram-negativas pertencentes à Ordem Mycoplasmatales, família Mycoplasmataceae e gênero *Mycoplasma* (**Quadro 2**). Anteriormente eram conhecidas como *Haemobartonella* e *Eperythrozoon* spp. (MESSICK, 2004). Sua reclassificação foi proposta por Neimark et al. (2001) após análise de sequências obtidas a partir do gene 16SrRNA de quatro espécies: *Haemobartonella felis*, *Haemobartonella muris*, *Eperythrozoon suis* e *Eperythrozoon wenyonii*. A análise filogenética demonstrou que estas bactérias hemotróficas eram mais relacionadas à espécies pertencentes ao gênero *Mycoplasma* da classe Mollicutes.

Quadro 2. Classificação taxonômica de organismos do gênero *Mycoplasma*

Reino	Bacteria
Filo	Tenericutes
Classe	Mollicutes
Ordem	Mycoplasmatales
Família	Mycoplasmataceae
Gênero	<i>Mycoplasma</i>

Fonte: Euzéby, 1997.

Estes agentes vêm sendo identificados em várias espécies animais, inclusive em seres humanos (dos SANTOS et al., 2008, VIEIRA et al., 2009; ANDRÉ et al., 2011; GRAZZIOTIN et al., 2011; SANTOS et al., 2013; MASCARELLI et al., 2014; MILLÁN et al., 2015; BONATO et al., 2015; GONÇALVES et al., 2015), podendo causar sintomatologia variada, desde assintomática e doença crônica até anemia hemolítica severa. Animais infectados podem apresentar anorexia, febre, icterícia e hipoglicemia em quadros agudos (NEIMARK et al., 2001; BIONDO et al., 2009; TASKER, 2010). Já a infecção crônica pode ocorrer em animais aparentemente saudáveis, mas que passaram por procedimento de esplenectomia, ou estão imunocomprometidos. A severidade da doença dependerá da amostra ou espécie de *Mycoplasma* envolvido (MESSICK, 2004).

2.3.2 Hemoplasmas em quirópteros

A ocorrência de *Mycoplasma* spp. em quirópteros é pobremente relatada na literatura. Hemoplasmas já foram detectados em morcegos nos Estados Unidos (MASCARELLI et al., 2014) e Espanha (MILLÁN et al., 2015).

Nos EUA, Mascarelli et al. (2014) avaliaram a presença de *Mycoplasma* spp. em 68 exemplares de *Myotis lucifugus* durante hibernação nos estados da Pensilvânia, Ohio, Kentucky, West Virginia, Tennessee e Carolina do Norte. Foi encontrada positividade de 47% (32/68) por meio de PCR convencional com alvo no gene 16SrRNA. Na análise filogenética, as sequências de hemoplasmas foram filogeneticamente associadas à *Mycoplasma haemomuris*.

No nordeste da Espanha, Millán et al. (2015) encontraram 97% (29/31) de positividade para hemoplasmas pela PCR convencional baseada no gene 16SrRNA em quirópteros das espécies *Miniopterus schreibersii* e *Myotis capaccinii*. Na análise filogenética, os autores encontraram dois grupos distintos: o primeiro englobando sequências próximas a '*Candidatus Mycoplasma hemohominis*', e um segundo grupo composto por sequências com proximidade filogenética com hemoplasmas previamente detectados em quirópteros nos EUA por Mascarelli et al. (2014).

2.3.3 Hemoplasmoses em humanos

A infecção por hemoplasmas ocorre principalmente em animais, sendo raros os relatos em humanos. Quando relatados, as infecções por *Mycoplasma* spp. ocorrem principalmente em humanos imunocomprometidos, embora doenças associadas à infecção latente por hemoplasmas em pacientes saudáveis vêm sendo apontadas (MESSICK, 2004)

No Brasil, a hemoplasmoze em humanos já foi detectada em Porto Alegre, estado do Rio Grande do Sul, em um paciente HIV positivo com sinais de sudorese noturna, perda de apetite, tosse produtiva, dores musculares, e linfadenomegalia cervicais, axilares e inguinais (dos SANTOS et al., 2008). O paciente mostrou-se positivo na PCR convencional para hemoplasmas baseada no gene 16SrRNA. A sequência obtida mostrou 99% de identidade com *M. haemofelis*. Ainda, relatou-se infecção concomitante com *Bartonella henselae*. Neste caso foi sugerida a participação de gatos como possíveis transmissores dos agentes ao paciente, uma

vez que de 5 gatos testados, todos mostraram-se positivos para *Bartonella* spp. e dois para *M. haemofelis*.

Sykes et al. (2010) também relataram a ocorrência de co-infecção de *B. henselae* e hemoplasma filogeneticamente relacionado a *Mycoplasma ovis* em um paciente com sinais de doença neurodegenerativa progressiva. O paciente era médico veterinário e tinha como histórico a ocorrência de mordidas e arranhaduras por gatos, cães, pequenos roedores e já havia trabalhado com animais selvagens e de zoológico.

Já Steer et al. (2011) propuseram uma nova espécie de *Mycoplasma*, a qual foi identificada em paciente com febre, dor abdominal, dor articular, perda de peso e sudorese noturna. O agente foi identificado por meio de PCR convencional com alvo no gene 16SrRNA a partir de amostra de medula óssea. A sequência mostrou identidade com *Mycoplasma haemomuris* e '*Candidatus Mycoplasma turicensis*'. Os autores propuseram, portanto, a ocorrência da espécie *Mycoplasma haemohominis*, hemoplasma distinto daqueles identificados previamente em animais, e associada principalmente com sinais de febre e anemia hemolítica. Ainda, os autores relataram resposta clínica ao tratamento com doxiciclina e enfatizaram a necessidade dessa enfermidade ser considerada como diagnóstico diferencial em pacientes que apresentem anemia hemolítica e pirexia.

Um caso de infecção por hemoplasma em uma veterinária foi relatado por Maggi et al. (2013a). A paciente em questão apresentou sintomas neurológicos, tais como dores de cabeça, desmaios, fotofobia, fasciculações musculares e convulsões tônico-clônicas. Seu histórico incluía contato com pulgas, carrapatos, moscas, mosquitos, aranhas, ácaros, além de arranhaduras ou mordidas por cães, gatos, aves, equinos, répteis, coelhos e roedores. A paciente mostrou-se negativa a testes para Ebolavirus, doença de Lyme (*Borrelia burgdorferi*), rickettsias, Phlebovirus, encefalite viral equina (Arbovirus), doença aficana equina (Orbivirus), e raiva (Lyssavirus). Após aproximadamente dois anos de evolução do quadro sem resolução, foram colhidas amostras de sangue da paciente para um trabalho com objetivo de detecção de *Bartonella* spp. como doença ocupacional. A paciente mostrou-se então soropositiva para *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* e *B. henselae*, porém negativa aos testes moleculares e à cultura. À PCR, foi detectada

positividade para *Anaplasma* spp. e *Mycoplasma* spp. As sequências de hemoplasmas obtidas a partir dos genes 16SrRNA e RNaseP mostraram 99,8% e 100% de identidade, respectivamente, à '*Candidatus M. haematoparvum*'. Após seis meses de ser instituído o tratamento com doxiciclina, não foram detectados molecularmente *Anaplasma* nem hemoplasmas na paciente. Entretanto, a mesma ainda permanecia soropositiva para *Bartonella* spp.

2.3.4 Transmissão de hemoplasmas

Embora a transmissão dos hemoplasmas pareça ocorrer principalmente por artrópodes hematófagos ou interações agressivas entre os animais (NEIMARK et al., 2001; BIONDO et al., 2009), poucos estudos experimentais foram realizados neste sentido, haja vista que tais agentes ainda não foram cultivados *in vitro* (BIONDO et al., 2009).

Embora o carrapato *Rhipicephalus sanguineus* seja incriminado como vetor e reservatório de *M. haemocanis*, tal fato ainda não é bem elucidado (NOVACCO et al., 2010; VIEIRA et al., 2015). Adicionalmente, sugere-se a participação de pulgas *Ctenocephalides felis* na transmissão de *M. haemofelis* e '*Candidatus M. haemominutum*', de piolhos *Polyplax serrata* e *P. spinulosa* na transmissão de *M. coccoides* e de moscas *Stomoxys calcitrans* e *Aedes aegypti* na transmissão de *M. suis* (revisado por BIONDO et al., 2009).

Recentemente, Reagan et al. (2016) investigaram a competência vetorial de mosquitos *Aedes vexans*, *Culex tarsalis* e *Aedes aegypti* na transmissão de *M. haemofelis* e '*Candidatus M. haemominutum*' entre gatos, já que se verifica a ocorrência desses patógenos em animais de áreas não endêmicas para *Ctenocephalides felis*. No entanto, os autores não encontraram provas biológicas suficientes para suportar tal hipótese.

2.3.5 Diagnóstico de hemoplasmas

Ferramentas moleculares auxiliam no diagnóstico da hemoplasmosose, uma vez que tratam-se de bactérias que até o momento não foram mantidas em cultura. O diagnóstico direto por esfregaços sanguíneos corados, por sua vez, não traz

resultados confiáveis, haja vista sua baixa sensibilidade e especificidade (TASKER e LAPPIN, 2001; MESSICK, 2004).

Embora testes sorológicos venham sendo desenvolvidos a partir de antígenos recombinantes (MESSICK e SANTOS, 2011; LIU et al., 2012), é válido enfatizar que anticorpos podem estar presentes tanto em animais assintomáticos quanto em animais anêmicos. Tasker e Lappin (2001) sugerem a padronização de um teste sorológico que identifique a presença de anticorpos apenas contra as amostras patogênicas de hemoplasmas.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O presente estudo tem como objetivo investigar a ocorrência e caracterizar molecularmente a presença de DNA de *Bartonella* spp. e de *Mycoplasma* spp. em amostras de sangue e/ou tecidos de quirópteros amostrados no Brasil.

3.2. Objetivos específicos

- ❖ Investigar a ocorrência de DNA de *Bartonella* spp. e de *Mycoplasma* spp. em amostras de baço, de fígado, de coração e de sangue de quirópteros capturados em cinco estados brasileiros;
- ❖ Quantificar a presença de DNA de *Bartonella* spp. em amostras de baço, de fígado, de coração e de sangue de quirópteros;
- ❖ Posicionar filogeneticamente as sequências de bartonelas e hemoplasmas obtidas a partir de amostras de tecidos de quirópteros.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Entre o período de Dezembro de 2015 a Abril de 2016, foram colhidas amostras de tecido e sangue de 162 quirópteros neotropicais pertencentes à 19 espécies de quatro famílias distintas: Vespertilionidae, Phyllostomidae, Molossidae e Natalidae. Os pontos de amostragem estavam localizados em cinco estados do Brasil: Mato Grosso, Pará, Paraná, São Paulo e Tocantins (**Figura 2**).

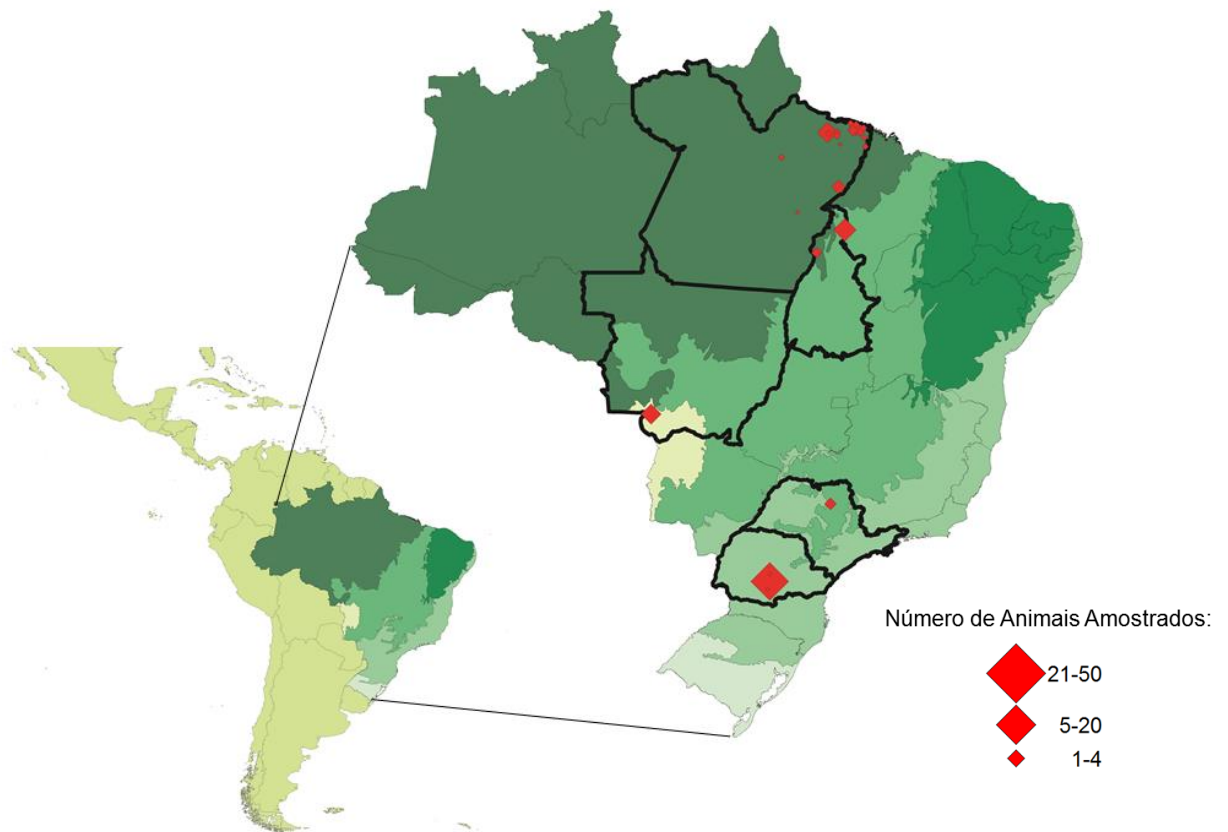


Figura 2. Localidades de amostragem de quirópteros do presente trabalho. Cada estado está destacado e o número de animais amostrados está representado por símbolo de losango.

A **Figura 3** apresenta resumidamente principais etapas apresentadas experimentais desenvolvidas no presente estudo.

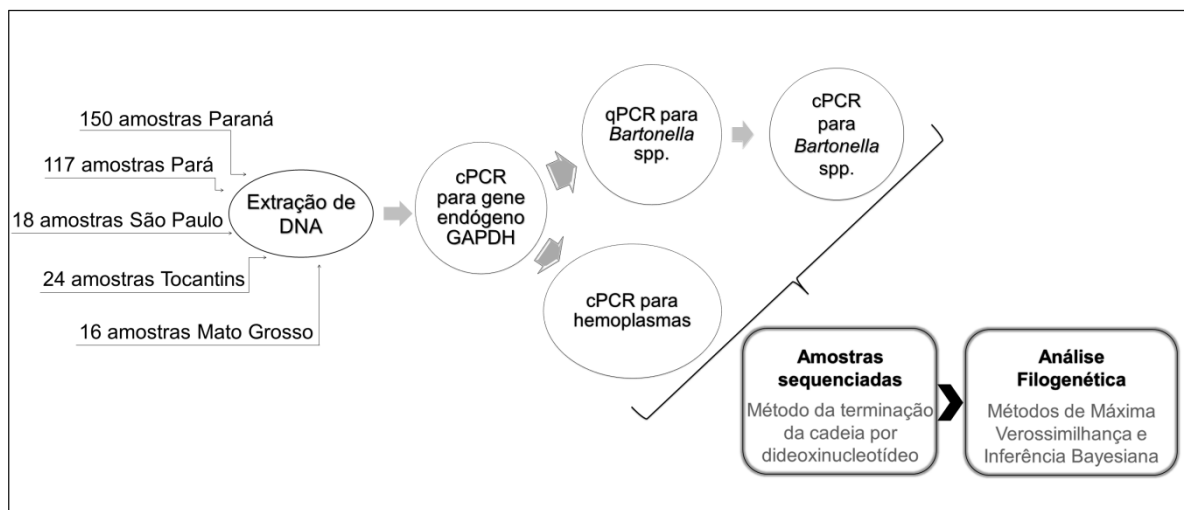


Figura 3. Organograma representativo das principais etapas experimentais realizadas no estudo.

4.1 Capturas e colheitas de amostras

4.1.1 Estado do Paraná

No estado do Paraná, as capturas foram realizadas no Parque Municipal das Araucárias (26°21'9.40"S, 51°21'0.30"W) em Guarapuava, no Jardim Botânico de Faxinal do Céu pertencente ao município de Pinhão (26°54'42.00"S, 51°35'40.80"W), na cachoeira Salto São Francisco em Prudentópolis (26°03'55.6"S, 51°17'44.1"W), e em duas chácaras particulares, uma em Guarapuava (26°21'47.70"S, 51°22'47.70"W) e outra em Turvo (26°6'31.90"S, 51°31'44.00"W). A amostragem no Paraná foi realizada conforme autorização ICMBio - SISBIO n. 48306-1 e Protocolo da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA, FCAV, UNESP nº 8189/15. Para tal, utilizaram-se redes de neblina (Zootech[®]), conforme descrito por Kunz e Kurta (1988) e Peracchi e Nogueira (2010), de tamanhos variados (3x6m, 3x9m, 3x12m), exceto no Parque Municipal das Araucárias, onde foram realizadas capturas utilizando apenas três redes de tamanho 3x9m com 20mm de malha em três pontos da trilha do parque próximo a abrigo. No total, foram realizadas 20 atividades de campo, sendo que em 16 foi possível capturar animais, perfazendo uma média de 2,5 animais por captura. No Parque Municipal das Araucárias, Guarapuava, foram realizadas 13 atividades de campo com sucesso. As redes eram colocadas antes do pôr-do-sol com auxílio de hastes próprias para armá-las e ficavam fechadas até o anoitecer (**Figura 4**). Depois de abertas, eram verificadas a cada 30 minutos até atingir esforço amostral de no máximo oito animais ou até aproximadamente meia-noite.



Figura 4. Rede de neblina armada e fechada em trilha no Parque Municipal das Araucárias, Guarapuava-PR.

Os animais capturados nas redes eram cuidadosamente retirados e contidos com auxílio de luvas de raspa de couro (**Figuras 5 e 6**) e, quando necessário, as redes eram cortadas para retirar o animal que então era colocado em saco de contenção próprio. Após a verificação de todas as redes, os animais eram triados antes de nova ronda. No momento da triagem eram verificados tamanho de antebraço (**Figura 7**), espécie, sexo e idade do animal. Após a captura dos animais, estes eram levados ao laboratório para realização da eutanásia e necropsia. Fêmeas lactantes e/ou prenhes e animais anilhados eram soltos após triagem de campo.

Dos animais capturados no estado do Paraná foram colhidas amostras de sangue e fragmentos de baço, fígado e coração. A colheita de material biológico (fragmentos de baço, fígado e coração conforme Protocolo da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA, FCAV, UNESP nº 8189/15) foi realizada no Laboratório de Doenças Infecciosas e Parasitárias no Campus CEDETEG da Universidade Estadual do Centro-Oeste (Unicentro), em fluxo laminar utilizando instrumental gentilmente cedido pelo Laboratório de Anatomia Veterinária da mesma universidade. Para cada animal eram utilizadas uma tesoura cirúrgica, duas pinças anatômicas (sendo uma para manipular cavidade abdominal e outra para cavidade torácica), e uma lâmina de bisturi para cada órgão (baço, fígado e coração). Anteriormente ao procedimento de colheita dos fragmentos de órgãos, os

instrumentais eram submetidos a tratamento por calor em estufa a 140°C por uma hora e, em seguida, ficavam expostos, juntamente com os demais materiais a serem utilizados, à luz UV do fluxo laminar por 15 minutos. Conforme descrito anteriormente, o animal era sedado (**Figura 8**) com Zoletil® (Virbac®), cuja dose variou de acordo com a espécie, e então era submetido à colheita de sangue por punção cardíaca com agulha e seringa de insulina umedecidas com EDTA 10% (**Figura 9**), com limpeza prévia do tórax com álcool iodado. Do total de 50 animais submetidos a esse procedimento, foram colhidas amostras de sangue de 42 animais. As amostras de sangue foram acondicionadas em criotubos (Corning®) e armazenadas em nitrogênio líquido (-196°C) para uso em experimentos posteriores. Após a colheita de sangue, foram realizadas necropsias para colheita de fragmentos dos órgãos-alvo (fígado, baço e coração). Os órgãos colhidos foram armazenados em microtubos livres de RNase e DNase (Axygen®) com álcool absoluto (Merck®) e então mantidos a -20°C (**Figura 10**).



Figura 5. Exemplar de *Sturnira lilium* sendo retirado da rede de neblina com auxílio de luvas de raspa de couro.



Figura 6. Contenção física de exemplar de *Molossus molossus* após retirada da rede de neblina.

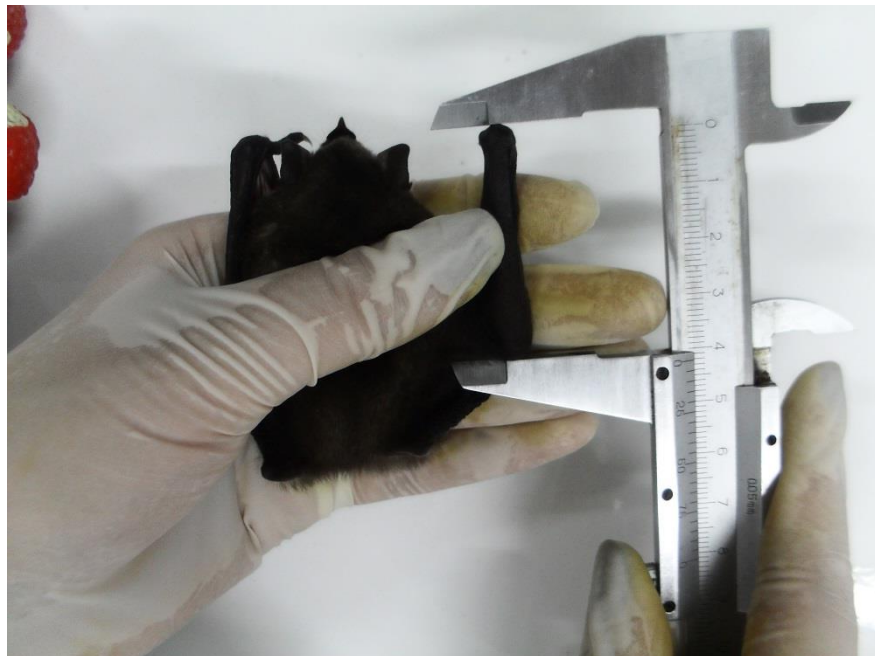


Figura 7. Medição de antebraço com animal contido fisicamente.



Figura 8. Aplicação de anestésico por via intramuscular em exemplar de *Sturnira lilium*.



Figura 9. Colheita de sangue por meio de punção cardíaca de exemplar de *Sturnira lilium*.



Figura 10. Necropsia para retirada de fragmentos de fígado, baço e coração (A) e armazenamento em microtubos livres de DNase e RNase (B).

4.1.2 Estado do Pará

A partir de um total de 117 amostras teciduais de quirópteros capturados no estado do Pará, 51 correspondiam a amostras de baço e 66 de fígado.

As seguintes espécies foram amostradas: *Artibeus cinereus*, *Artibeus lituratus*, *Artibeus planirostris*, *Carollia perspicillata*, *Eumops auripendulos*, *Eumops glaucinus*, *Glossophaga soricina*, *Micronycteris minute*, *Mimon crenulatum*, *Molossus molossus*, *Molossus rufus*, *Myotis nigricans*, *Natalus espiritosantensis*, *Phyllostomus discolor*, *Phyllostomus hastatus*, *Sturnira lilium* e *Uroderma bilobatum*, nas localidades de Ananindeua, Augusto Corrêa, Belém, Belém-Mosqueiro, Belém-Outeiro, Bragança, Cachoeira do Piriá, Castanhal, Capanema, Dom Eliseu, Inhangapi, Marabá, Portel, São Domingos do Capim, São João de Pirabas, Tracuateua e Viseu.

4.1.3 Estado de São Paulo

Além das amostras teciduais de quirópteros recebidas do estado do Pará e colhidas no estado do Paraná, foram incluídas no estudo mais 18 amostras de seis animais (fígado, baço e coração) que foram encaminhados ao Setor de Animais Selvagens do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da FCAV-UNESP e gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Karin Werther (Departamento de Patologia Veterinária, FCAV/UNESP). As amostras teciduais foram colhidas em fluxo laminar e

armazenadas em microtubos RNase e DNase free com álcool absoluto (Merck®) em freezer -20°C até o momento de seu processamento.

4.1.4 Estados de Mato Grosso e Tocantins

Amostras de DNA extraídas de sangue de 40 animais foram gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Marta Maria Geraldes Teixeira, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (USP-SP).

4.2 Extração de DNA

A extração de DNA de tecido esplênico, hepático e cardíaco foi realizada com o DNeasy® Blood & Tissue Kit (Qiagen®), de acordo com as recomendações do fabricante. Após o procedimento de extração, as amostras de DNA foram identificadas, quantificadas e tiveram suas relações 260/280 e 260/230 mensuradas, com auxílio de espectrofotômetro (Nanodrop®, Thermo Scientific). Por fim, alíquotas de DNA foram armazenadas a -20°C e -70°C para posterior realização dos ensaios de PCR.

4.3 PCR convencional (cPCR) para o gene endógeno gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH)

Para verificar a presença de inibidores nas amostras de DNA, foi realizado um protocolo de cPCR para o gene endógeno GAPDH. Para tal, foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores GAPDH-F (5'- CCTTCATTGACCTCAACTACAT-3') e GAPDH-R (5'- CCAAAGTTGTCATGGATGACC -3') (BIRKENHEUER et al., 2003). A reação de amplificação foi realizada utilizando volume total final de 25µL, contendo uma mistura de 5µL do DNA-amostra, 0,2mM de cada deoxinucleotídeo, 0,4µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 3,0mM de Cloreto de Magnésio, 1,25U de Taq Platinum DNA Polimerase (Life Technologies®, Carlsbad, California, Estados Unidos), tampão da PCR e água ultra-pura esterilizada q.s.p. A sequência térmica e de tempo de amplificação foram de desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, 35 ciclos compostos por desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento a 50°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos, e extensão final a 72°C por 5 minutos.

4.4 Eletroforese em gel de agarose

Os produtos amplificados pela cPCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,0% corado com Brometo de Etídeo (0,5 µL/mL) em tampão de corrida TEB pH 8,0 (44,58 M Tris-base; 0,44 M ácido bórico; 12,49 mM EDTA) sob as condições de 100V/150mA durante 50 minutos. Para a determinação dos produtos amplificados foi utilizado um marcador de peso molecular de 100 pares de base (Life Technologies®) e os resultados puderam ser visibilizados e analisados por meio de um transiluminador de luz ultravioleta (ChemiDoc MP Imaging System, Bio Rad®).

4.5 PCR em tempo real quantitativa (qPCR) para *Bartonella* spp. baseada no gene *nuoG*

As amostras positivas na cPCR para o gene endógeno foram submetidas a um protocolo de PCR em tempo real (qPCR) baseado no gene *nuoG* (83pb), utilizando os oligonucleotídeos iniciadores (Integrated DNA Technologies®, Coralville, Iowa, Estados Unidos) F (5'-CAATCTTCTTTTGCTTCACC-3') e R (5'-TCAGGGCTTTATGTGAATAC-3') e a sonda de hidrólise TaqMan TexasRed-5'-TTYGTCATTTGAACACG-3'[BHQ2a-Q]3' (ANDRÉ et al., 2015). A reação de amplificação foi realizada utilizando volume total final de 10µL, contendo uma mistura de 1µL do DNA-amostra, 0,6µM de cada oligonucleotídeo iniciador e sonda de hidrólise, tampão da PCR (GoTaq® qPCR Master Mix, 2x, Promega®, Madison, Wisconsin, Estados Unidos) e água ultra-pura esterilizada (Nuclease-Free Water, Promega®, Madison, Wisconsin, Estados Unidos) q.s.p. 10µL. A sequência térmica e de tempo de amplificação foram de: 95°C por 3 minutos seguidos por 40 ciclos compostos por 95°C por 10 minutos e 52,8°C por 30 segundos. As reações de amplificação foram conduzidas em aparelho termociclador CFX96 Thermal Cycler (BioRad®, Hercules, Califórnia, Estados Unidos). Para realizar as análises de sensibilidade das reações de qPCR, foram utilizadas 10 diluições em série do plasmídeo pIDTSMART (Integrated DNA Technologies, Cedar Rapids, EUA) contendo um inserto de 83 pb do gene *nuoG* de *Bartonella henselae*. O número de cópias do plasmídeo foi determinado de acordo com a fórmula:

$$\left(\frac{x \text{ g}/\mu\text{l DNA}}{\text{comprimento do plasmídeo em pb} \times 660 \text{ g/mol}} \right) \times 6,022 \times 10^{23} \text{ cópias/mol} \\ = Y \text{ cópias}/\mu\text{l}$$

A eficiência de amplificação foi calculada a partir da curva padrão em cada corrida, utilizando a seguinte fórmula ($E = 10^{-1} / \text{inclinação}$). Todas as análises foram realizadas conforme normas estabelecidas pelo MIQE (“Minimum Information for Publication of Quantitative real-time PCR Experiments”) (BUSTIN et al., 2009). Como controle negativo nas reações de qPCR foi utilizada água ultrapura esterilizada (Nuclease-Free Water, Promega[®], Madison, Wisconsin, Estados Unidos).

4.6 PCR convencional (cPCR) para *Bartonella* spp.

As amostras positivas na qPCR para *Bartonella* spp. (*nuoG*) foram submetidas a ensaios de cPCR com alvos nos seguintes genes: subunidade gama da desidrogenase NADH (*nuoG*), riboflavina sintase (*ribC*), citrato sintase (*gltA*), subunidade β da RNA polimerase (*rpoB*), proteína de ligação heme (*pap-31*), proteína de choque térmico (*groEL*), proteína de divisão celular (*ftsZ*), 16SrRNA e na região intergênica do 16S-23S do RNA ribossomal (ITS).

As reações de amplificação realizadas tiveram como volume total 25 μ L, contendo 5 μ L do DNA-amostra, 0,2mM de cada deoxinucleotídeo, 0,5 μ M de cada oligonucleotídeo iniciador, 1,5mM de Cloreto de Magnésio (para reações com alvos nos genes *ftsZ*, *groEL*, *ribC*, *nuoG* e 16SrRNA) ou 2mM de Cloreto de Magnésio (para reações com alvo nos genes *gltA*, *pap-31*, *rpoB* e região intergênica ITS), 0,625U de Taq DNA Polimerase, tampão da PCR e água ultrapura esterilizada q.s.p. 25 μ L.

As condições térmicas e tamanho do amplicon para cada gene alvo estão descritos na **Tabela 2**.

Tabela 2. Protocolos de cPCR utilizados para detecção e caracterização molecular de *Bartonella* spp. em amostras positivas previamente pela qPCR (gene *nuoG*).

Região Gênica	Oligonucleotídeos iniciadores	Condições de ciclos	Tamanho do amplicon (pb)	Referência
(<i>nuoG</i>) subunidade gama da desidrogenase NADH	F (5'-GGCGTGATTGTTCTCGTTA-3') R (5'-CACGACCACGGCTATCAAT-3')	94°C por 5 minutos. 35 ciclos de: 94°C por 30 seg., 53°C por 30 seg., 72°C por 5 min., 72°C por 5 min.	400	Colborn et al. (2010)
(ITS) região intergênica do 16S-23S do RNA ribossomal	325s (5'-CTT CAG ATG ATG ATC CCAAGC CTT YTG GCG -3') 1100as (5'-GAA CCG ACG ACC CCC TGC TTGCAA AGC A-3')	95°C por 5 min. 55 ciclos de: 94°C por 15 seg., 66°C por 15 seg., 72°C por 15 seg. e 72°C por 1min	453-717	Maggi e Breitschwerdt (2005a)
(<i>ribC</i>) riboflavina sintase	Bart-1 (5'-TAACCGATATTGGTTGTGTTGAA G-3') Bart-2 (5'-TAA AGCTAGAAAGTCTGGCAACATA ACG-3')	95°C por 10 min. 37 ciclos de: 95°C por 1 min., 51°C por 1 min., 72°C por 1 min. e 72°C por 3min	420	Johnson et al. (2003)
(<i>gltA</i>) citrato sintase	BhCS781.p (5' -GGGGACCAGCTCATGGTGG-3') BhCS.1137n (5'-AATGCAAAAAGAACAGTAAACA-3')	95°C por 5 min. 35 ciclos de: 95°C por 1 min., 56°C por 1 min., 72°C por 1 min. e 72°C por 5min	750	Norman et al. (1995)
(<i>rpoB</i>) subunidade β da RNA polimerase	F (5'-GCACGATTYGCATCATCATTTTC C-3') R (5'-CGCATTATGGTCGTATTTGTCC-3')	95°C por 5 min. 40 ciclos de: 94°C por 45 seg., 52°C por 45 seg., 72°C por 45 seg. e 72°C por 7min	800	Paziewska et al. (2011)
(<i>pap-31</i>) proteína de ligação heme	1s (5'-ACTTCTGTTATCGCTTTGATTC RRCT-3') 688as (5'-CACCACCAGCAA AATAAGGCATMAY-3')	95°C por 2 min. 55 ciclos de: 94°C por 15 seg., 58°C por 15 seg., 72°C por 15 seg. e 72°C por 5min	564	Maggi e Breitschwerdt (2005b)
(<i>groEL</i>) proteína de choque térmico	HSP1- (5'-GGAAAAAGTNGGCAATGAA G-3') HSP2- (5'-TCCTTTAACGGTCAACGCAT T-3')	95°C por 5 min. 40 ciclos de: 94°C por 45 seg., 47°C por 45 seg., 72°C por 45 seg. e 72°C por 7min	752	Zeaiter et al. (2002) e Paziewska et al. (2011)

Continua...

...continuação

(<i>fstZ</i>) proteína de divisão celular	F- (5'- CATATGGTTTTTCATTA CTGCTGCGTA TGG-3')	R- (5'- TTCTTCGCGAATACG ATTAGCAGC TTC-3')	95°C por 5 min. 40 ciclos de: 94°C por 45 seg., 61°C por 45 seg., 72°C por 45 seg. e 72°C por 7min	600	Paziewska et al. (2011)
16SrRNA	F- (5'-TCAGAACGAACGCTGG CGGC- 3')	R- (5' -CGTCATTATCTTCACCGG-3')	94°C por 5 min. 35 ciclos de : 94°C por 30 seg., 54°C por 30 seg., 72°C por 5 min. e 72°C por 5 min.	400	Paziewska et al. (2011),

4.7 PCR convencional (cPCR) para *Mycoplasma* spp.

Para detecção de *Mycoplasma* spp. foram realizados dois ensaios de cPCR descritos por Maggi et al. (2013b), baseados no gene 16SrRNA usando os oligonucleotídeos iniciadores HemMycop16S-41s (5'-GYATGCMATAAYACATGCAAGTCGARCG-3') e HemMyco16S-938as (5'-CTCCACCACTTGTTTCAGGTCCCCGTC-3') (fragmento de ~800pb) para uma das reações e HemMycop16S-322s (5'-GCCCATATTCCTACGGGAAGCAGCAGT-3') e HemMycop16S-1420as (5'-GTTTGACGGGCGGTGTGTACAAGACC-3') (fragmento de ~800pb) para a outra reação. Para cada reação foram utilizados 25µL contendo 5µL de DNA-amostra, 10x PCR buffer, 0,3µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 1,0mM de Cloreto de Magnésio, 0,8mM de deoxinucleotídeo, 1,5U de Taq Platinum DNA Polymerase (Life Technologies®) e água esterilizada ultrapura q.s.p. 25µL. As condições térmicas utilizadas foram 94°C por 2 min, seguido de 55 ciclos de 94°C por 15 seg, 68°C por 15 seg e 72°C por 18 seg, com extensão final de 72°C por 1 min. As amostras positivas para pelo menos uma das reações com alvo no gene 16S rRNA foram submetidas a outra cPCR com alvo no gene RNaseP (165pb) utilizando os oligonucleotídeos iniciadores HemoMyco RNaseP30s (5'-GATKGTGYGAGYATATAAAAAATAAARCTCRAC-3') e HemoMyco RNaseP200as (5'-GMGGRGTTTACCGCGTTTTCAC-3'). As condições de amplificação foram as mesmas descritas anteriormente exceto pela temperatura de anelamento de 59°C (MAGGI et al., 2013b).

4.8 Sequenciamento

Após os ensaios de cPCR, os produtos amplificados foram purificados utilizando-se o kit “Silica Bead DNA Gel Extraction Kit” (Fermentas, São Paulo-SP), de acordo com as recomendações do fabricante. A quantificação de material genômico total do produto purificado foi realizada em aparelho Nanodrop (Thermo Scientific®).

O sequenciamento dos produtos amplificados foi realizado pelo método da terminação da cadeia por dideoxinucleotídeo (SANGER et al., 1977), o qual foi conduzido no sequenciador ABI PRISM 3700 DNA Analyzer (Applied Biosystems®). O sequenciamento foi realizado no Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica (CREBIO - FCAV - UNESP).

4.9 Análise Filogenética

Posteriormente, foi realizada a análise dos eletroferogramas gerados nos sequenciamentos, observando-se a qualidade dos picos correspondentes a cada base sequenciada utilizando o software Bioedit v. 7.0.5.3 (HALL, 1999). O programa Phred-Phrap versão 23 (EWING e GREEN, 1998; EWING et al., 1998) foi utilizado para construir sequências-consenso, utilizando ambas as fitas “forward” e “reverse” sequenciadas da mesma amostra. Para tal, respeitou-se o valor mínimo de 20 de qualidade de cada nucleotídeo para determinar a sequência de nucleotídeos. Após construir a sequência consenso de cada amostra, esta foi submetida à análise pelo programa BLAST (ALTSCHUL et al., 1990), a fim de comparar as sequências obtidas com aquelas depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>). As sequências salvas em modo “FASTA” foram então alinhadas com outras sequências homólogas do mesmo gene sequenciado retiradas do banco de dados (Genbank), utilizando o software Clustal/W (THOMPSON et al., 1994) via Bioedit v. 7.0.5.3 (HALL, 1999). Os alinhamentos salvos em modo “FASTA” foram transformados em modo Nexus e Phylip pelo site “Alignment Transformation Environment” (GLEZ-PEÑA et al., 2010). Os métodos de análises utilizados para filogenia foram de Máxima Verossimilhança utilizando o software W-IQ-Tree (disponível *online*: <http://iqtree.cibiv.univie.ac.at/>) (NGUYEN et al., 2015; TRIFINOPOULOS et al., 2016) e de Inferência Bayesiana

utilizando o software MrBayes 3.2.2 on XSEDE (RONQUIST e HUELSENBECK, 2003) via portal CIPRES (MILLER et al., 2010). A análise Bayesiana foi realizada com 10^6 gerações e números de classes de substituição variando conforme o modelo evolutivo encontrado para cada conjunto de dados (**Tabela 3**). O modelo evolutivo foi encontrado utilizando o software jModelTest 2 (GUINDON e GASCUEL, 2003; DARRIBA et al., 2012) utilizando critérios de seleção AIC e BIC (POSADA e BUCKLEY, 2004). Os suportes dos cladogramas para as análises de Máxima Verossimilhança foram avaliados por meio de análises de “bootstrap” (FELSENSTEIN, 1985) de 1000 repetições. A edição das árvores filogenéticas assim como o enraizamento (via grupo externo) foi realizada utilizando o software Treegraph 2.0.56-381 beta (STOVER e MULLER, 2010).

Tabela 3. Modelos evolutivos utilizados para análise filogenética seguindo o “Akaike Information Criterion” (AIC) e “Bayesian Information Criterion” (BIC).

Gene	AIC	BIC	Referência
<i>ftsZ</i> (<i>Bartonella</i> spp.)	TIM1+I+G	TIM1+I+G	Posada, 2003
<i>gltA / nuoG</i> concatenados (<i>Bartonella</i> spp.)	TIM+I+G	GTR+I+G	Tavaré, 1986
<i>rpoB</i> (<i>Bartonella</i> spp.)	TrN+I+G	HKY+I+G	Tamura e Nei, 1993 Hasegawa, Kishino e Yano, 1985
<i>16SrRNA</i> (<i>Mycoplasma</i> spp.)	GTR+I+G	TIM2+I+G	Posada, 2003

TIM = modelo de transição, GTR = Tempo reversível generalizado, TrN = Tamura e Nei, HKY = Hasegawa, Kishino e Yano.

5. RESULTADOS

5.1 Capturas de quirópteros e colheitas de amostras

Foi colhido um total de 325 amostras, sendo que destas, 122 amostras foram provenientes de tecido hepático, 107 de tecido esplênico, 56 amostras de tecido cardíaco e 40 amostras de sangue. As amostras de fígado, baço e coração foram colhidas de um total de 50 animais capturados no estado do Paraná (**Tabela 4**) e de

18 animais (**Tabela 5**) encaminhados ao Setor de Animais Selvagens do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da FCAV-UNESP, e gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Karin Werther (Departamento de Patologia Veterinária, FCAV/UNESP) no estado de São Paulo. No estado do Pará, foram colhidas amostras de fígado e baço de 66 quirópteros (**Tabela 6**). Já nos estados de Tocantins e Mato Grosso, as amostras de DNA já extraídas de sangue de 40 animais (**Tabela 7**) foram gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Marta Maria Geraldês Teixeira, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (USP-SP). Destas 40 amostras, 16 foram provenientes de quirópteros capturados no estado de Mato Grosso e 24 no estado de Tocantins.

Tabela 4. Relação das espécies de quirópteros amostradas e locais de captura no estado do Paraná.

Amostra	Espécie	Sexo	Local
MGPA 01	<i>Eptesicus</i> spp	F	Parque das Araucárias
MGPA 02	<i>M. molossus</i>	M	Parque das Araucárias
MGPA 03	<i>Eptesicus</i> sp	F	Parque das Araucárias
MGPA 04	<i>M. molossus</i>	M	Parque das Araucárias
MGPA 05	<i>M. molossus</i>	M	Parque das Araucárias
MGPA 06	<i>M. molossus</i>	F	Parque das Araucárias
MGPA 07	<i>Eptesicus</i> sp	M	Parque das Araucárias
MGPA 08	<i>M. molossus</i>	M	Parque das Araucárias
MGPA 09	<i>M. molossus</i>	M	Parque das Araucárias
MGPA 10	<i>M. molossus</i>	F	Parque das Araucárias
MGPA 11	<i>M. molossus</i>	M	Parque das Araucárias
MGPA 12	<i>M. molossus</i>	M	Parque das Araucárias
MGPA 13	<i>M. molossus</i>	M	Parque das Araucárias
MGPA 15	<i>Eptesicus</i> sp	M	Parque das Araucárias
MGPA 16	<i>M. molossus</i>	M	Parque das Araucárias
MGPA 17	<i>M. molossus</i>	M	Parque das Araucárias
MGPA 18	<i>M. molossus</i>	M	Parque das Araucárias
MGPA 14	<i>M. molossus</i>	M	Parque das Araucárias
MGPA 19	<i>M. molossus</i>	F	Parque das Araucárias
MGCE 20	<i>Sturnira lilium</i>	F	Chácara particular – Turvo
MGFC 21	<i>Sturnira tildae</i>	M	Faxinal do Céu – Pinhão
MGPA 22	<i>M. molossus</i>	F	Parque das Araucárias
MGPA 23	<i>Sturnira lilium</i>	M	Parque das Araucárias
MGPA 24	<i>Sturnira lilium</i>	F	Parque das Araucárias
MGPA 25	<i>Sturnira lilium</i>	F	Parque das Araucárias
MGPA 26	<i>Sturnira lilium</i>	F	Parque das Araucárias
MGPA 27	<i>Sturnira lilium</i>	M	Parque das Araucárias
MGPA 28	<i>Sturnira lilium</i>	M	Parque das Araucárias
MGPA 29	<i>M. molossus</i>	M	Parque das Araucárias

Continua...

...continuação

MGPA 30	<i>Sturnira lilium</i>	M	Parque das Araucárias
MGPA 31	<i>Sturnira lilium</i>	M	Parque das Araucárias
MGPA 32	<i>Sturnira lilium</i>	M	Parque das Araucárias
MGPA 33	<i>M. molossus</i>	M	Parque das Araucárias
MGPA 34	<i>Sturnira lilium</i>	M	Parque das Araucárias
MGPA 35	<i>Sturnira lilium</i>	M	Parque das Araucárias
MGPA 36	<i>Sturnira lilium</i>	M	Parque das Araucárias
MGPA 37	<i>Sturnira lilium</i>	M	Parque das Araucárias
MGPA 38	<i>Sturnira lilium</i>	M	Parque das Araucárias
MGPA 39	<i>Sturnira lilium</i>	M	Parque das Araucárias
MGPA 40	<i>Sturnira lilium</i>	F	Parque das Araucárias
MGCG 41	<i>Eptesicus</i> sp	M	Chácara particular – Guarapuava
MGPA 42	<i>M. molossus</i>	F	Parque das Araucárias
MGPA 43	<i>M. molossus</i>	M	Parque das Araucárias
MGPA 44	<i>Sturnira lilium</i>	M	Parque das Araucárias
MGPA 45	<i>Sturnira lilium</i>	F	Parque das Araucárias
MGPA 46	<i>Sturnira lilium</i>	M	Parque das Araucárias
MGPA 47	<i>Sturnira lilium</i>	M	Parque das Araucárias
MGPA 48	<i>Sturnira lilium</i>	F	Parque das Araucárias
MGPA 49	<i>Sturnira lilium</i>	M	Parque das Araucárias
MGPA 50	<i>Sturnira lilium</i>	M	Parque das Araucárias

Tabela 5. Relação de amostras teciduais (fígado e baço) de espécies de quirópteros provenientes do estado do Pará.

Amostra	Sexo	Espécie	Local
37605	F	<i>Artibeus cinereus</i>	Tracuateua
37632	M	<i>Artibeus planirostris</i>	Tracuateua
37665	M	<i>Artibeus planirostris</i>	Tracuateua
37666	F	<i>Artibeus planirostris</i>	Tracuateua
37667	F	<i>Carollia perspicillata</i>	Tracuateua
37689	F	<i>Artibeus lituratus</i>	Belém
37835	M	<i>Carollia perspicillata</i>	Bragança
37836	M	<i>Molossus rufus</i>	Tracuateua
37841	M	<i>Phyllostomus discolor</i>	Tracuateua
37889	F	<i>Carollia perspicillata</i>	Augusto Correa
37890	M	<i>Artibeus planirostris</i>	Augusto Correa
37891	M	<i>Myotis nigricans</i>	São João de Pirabas
37892	F	<i>Artibeus planirostris</i>	São João de Pirabas
37893	M	<i>Artibeus planirostris</i>	Ananindeua
37914	F	<i>Eumops laucinus</i>	Belém
37928	M	<i>Glossophaga soricina</i>	Bragança
37933	M	<i>Carollia perspicillata</i>	Portel
37936	M	<i>Carollia perspicillata</i>	Portel
37937	M	<i>Artibeus planirostris</i>	Bragança
37987	M	<i>Natalus espirosantensis</i>	Belém-Outeiro
38017	M	<i>Molossus rufus</i>	Ananindeua
38019	M	<i>Phyllostomus hastatus</i>	Viseu

Continua...

...continuação

38020	M	<i>Uroderma bilobatum</i>	Viseu
38197	M	<i>Carollia perspicillata</i>	Castanhal
38198	F	<i>Carollia perspicillata</i>	Castanhal
38199	M	<i>Carollia perspicillata</i>	Castanhal
38226	F	<i>Molossus rufus</i>	Bragança
38278	F	<i>Artibeus planirostris</i>	Capanema
38281	M	<i>Carollia perspicillata</i>	Capanema
38282	F	<i>Glossophaga soricina</i>	Capanema
38283	M	<i>Artibeus lituratus</i>	Capanema
38284	F	<i>Micronycteris minuta</i>	Capanema
38292	F	<i>Carollia perspicillata</i>	Belém-Mosqueiro
38293	F	<i>Carollia perspicillata</i>	Belém-Mosqueiro
38295	M	<i>Carollia perspicillata</i>	Belém-Mosqueiro
38296	M	<i>Carollia perspicillata</i>	Belém-Mosqueiro
38297	M	<i>Carollia perspicillata</i>	Belém-Mosqueiro
38298	M	<i>Glossophaga soricina</i>	Belém-Mosqueiro
38299	M	<i>Carollia perspicillata</i>	Belém-Mosqueiro
38300	F	<i>Glossophaga soricina</i>	Belém-Mosqueiro
38301	F	<i>Carollia perspicillata</i>	Belém-Mosqueiro
38302	M	<i>Glossophaga soricina</i>	Belém-Mosqueiro
38303	M	<i>Glossophaga soricina</i>	Belém-Mosqueiro
38315	M	<i>Molossus molossus</i>	São Domingos do Capim
38323	F	<i>Sturnira lilium</i>	Bragança
38339	M	<i>Carollia perspicillata</i>	Tracuateua
38340	F	<i>Carollia perspicillata</i>	Tracuateua
38436	M	<i>Carollia perspicillata</i>	Augusto Correa
38438	M	<i>Molossus molossus</i>	Belém
38504	M	<i>Eumops auripendulos</i>	Dom Eliseu
38505	F	<i>Eumops glaucinus</i>	Dom Eliseu
38508	M	<i>Molossus molossus</i>	Belém
38562	M	<i>Molossus molossus</i>	Ananindeua
38564	F	<i>Mimon crenulatum</i>	Bragança
38596	F	<i>Molossus molossus</i>	Inhangapi
38597	M	<i>Molossus molossus</i>	Inhangapi
38598	F	<i>Molossus molossus</i>	Inhangapi
38705	F	<i>Sturnira lilium</i>	Cachoeira do piriá
38706	M	<i>Carollia perspicillata</i>	Cachoeira do piriá
38737	F	<i>Artibeus lituratus</i>	Marabá
38794	F	<i>Carollia perspicillata</i>	Dom Eliseu
38795	F	<i>Carollia perspicillata</i>	Dom Eliseu
38796	M	<i>Carollia perspicillata</i>	Dom Eliseu
38797	M	<i>Carollia perspicillata</i>	Dom Eliseu
38798	F	<i>Carollia perspicillata</i>	Dom Eliseu
38799	F	<i>Carollia perspicillata</i>	Dom Eliseu

Tabela 6. Relação dos exemplares de quirópteros encaminhados ao Setor de Animais Selvagens do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da FCAV-UNESP, Jaboticabal, SP.

Amostra	Espécie	Local	Estado
Unesp 1	<i>M. molossus</i>	Jaboticabal	SP
Unesp 2	<i>Myotis</i> sp.	Jaboticabal	SP
Unesp 3	<i>Artibeus</i> sp.	Jaboticabal	SP
Unesp 4	<i>Artibeus</i> sp.	Jaboticabal	SP
Unesp 5	<i>M. molossus</i>	Jaboticabal	SP
Unesp 6	<i>Molossus</i> sp.	Jaboticabal	SP

Tabela 7. Relação das amostras de sangue de quirópteros gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Marta Maria Geraldine Teixeira (Instituto de Ciências Biomédicas, ICB, da Universidade de São Paulo [USP-SP]).

Amostra	Espécie	Local	Estado
MTMO19	<i>Molossus rufus</i>	Cáceres	MT
MTMO20	<i>Molossus rufus</i>	Cáceres	MT
MTMO21	<i>Molossus rufus</i>	Cáceres	MT
MTMO22	<i>Molossus rufus</i>	Cáceres	MT
MTMO23	<i>Molossus rufus</i>	Cáceres	MT
MTMO24	<i>Molossus rufus</i>	Cáceres	MT
MTMO25	<i>Molossus rufus</i>	Cáceres	MT
MTMO26	<i>Molossus rufus</i>	Cáceres	MT
MTMO28	<i>Molossus rufus</i>	Cáceres	MT
MTMO29	<i>Molossus rufus</i>	Cáceres	MT
MTMO31	<i>Glossophaga soricina</i>	Cáceres	MT
MTMO32	<i>Molossus rufus</i>	Cáceres	MT
MTMO33	<i>Molossus rufus</i>	Cáceres	MT
MTMO34	<i>Molossus rufus</i>	Cáceres	MT
MTMO35	<i>Molossus rufus</i>	Cáceres	MT
MTMO36	<i>Molossus rufus</i>	Cáceres	MT
M2	<i>Glossophaga soricina</i>	Aguiarnópolis	TO
M4	<i>Glossophaga soricina</i>	Aguiarnópolis	TO
M5	<i>Glossophaga soricina</i>	Aguiarnópolis	TO
M6	<i>Glossophaga soricina</i>	Aguiarnópolis	TO
M7	<i>Glossophaga soricina</i>	Aguiarnópolis	TO
M8	<i>Glossophaga soricina</i>	Aguiarnópolis	TO
M9	<i>Glossophaga soricina</i>	Aguiarnópolis	TO
M12	<i>Glossophaga soricina</i>	Aguiarnópolis	TO
M15	<i>Glossophaga soricina</i>	Aguiarnópolis	TO
M16	<i>Glossophaga soricina</i>	Aguiarnópolis	TO
M17	<i>Glossophaga soricina</i>	Aguiarnópolis	TO
M21	<i>Glossophaga soricina</i>	Aguiarnópolis	TO
M23	<i>Glossophaga soricina</i>	Aguiarnópolis	TO
M24	<i>Glossophaga soricina</i>	Aguiarnópolis	TO

Continua...

...continuação

M38	<i>Glossophaga soricina</i>	Aguiarnópolis	TO
M39	<i>Glossophaga soricina</i>	Aguiarnópolis	TO
M40	<i>Glossophaga soricina</i>	Aguiarnópolis	TO
M41	<i>Glossophaga soricina</i>	Aguiarnópolis	TO
M42	<i>Glossophaga soricina</i>	Aguiarnópolis	TO
BATTO28	<i>Carollia perspicillata</i>	Arapoema	TO
BATTO29	<i>Carollia perspicillata</i>	Arapoema	TO
BATTO30	<i>Carollia perspicillata</i>	Arapoema	TO
BATTO41	<i>Carollia perspicillata</i>	Arapoema	TO
BATTO42	<i>Carollia perspicillata</i>	Arapoema	TO

5.2 Extrações de DNA

Foram extraídas 285 amostras teciduais de quirópteros. Após a realização do protocolo de cPCR para o gene endógeno GAPDH, as amostras que se mostraram negativas em duas repetições foram submetidas novamente à extração de DNA. Duas amostras de fígado e uma amostra de baço de animais oriundos do estado do Pará foram excluídas por falta de tecido suficiente para nova extração. Os **Anexos I** a **IV** mostram os resultados da quantificação (ng/ μ L) e das relações 260/280 e 260/230 de cada amostra de DNA obtidos pelo aparelho Nanodrop (Thermo Scientific®).

5.3 PCR convencional (cPCR) para o gene endógeno GAPDH

Portanto, do total de 285 amostras, 15 mostraram-se negativas em duas repetições da PCR convencional para o gene endógeno GAPDH. Destas, foi possível repetir a extração de DNA de 12 amostras. Portanto, obteve-se um total de 282 amostras que mostraram-se positivas para o gene endógeno GAPDH (fragmento de 400pb), indicando ausência de inibidores. A **Figura 11** mostra o resultado da eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídeo de amostras positivas na PCR para o gene endógeno GAPDH.

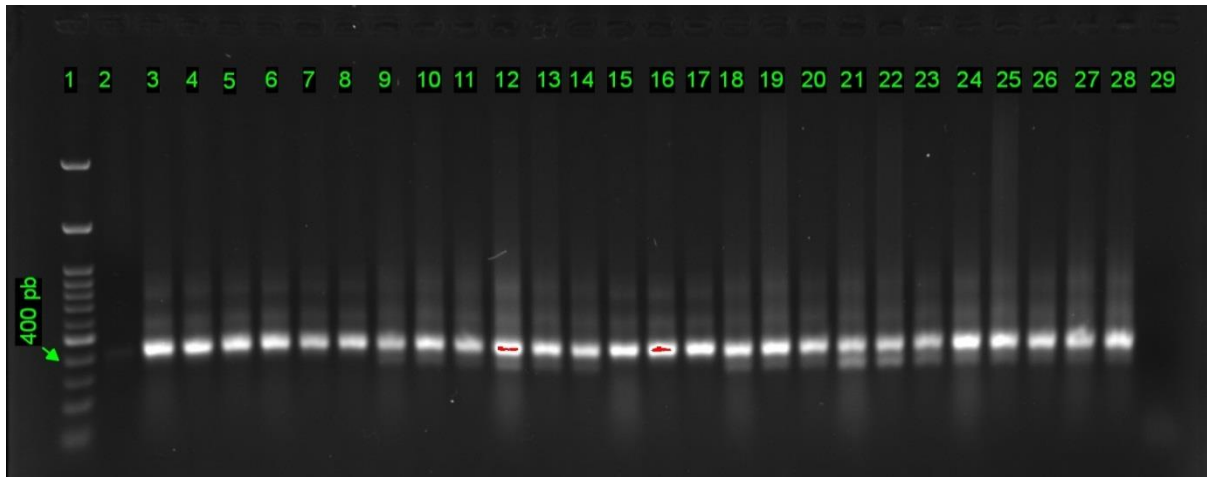


Figura 11. Eletroforese em gel de agarose 1,0% corado com brometo de etídeo para protocolo de PCR convencional baseada no gene endógeno GAPDH. As bandas correspondem à amplificação de 400 pb do referido gene de amostras de DNA extraídas de fragmentos de baço, fígado e coração de quirópteros amostrados no estado do Paraná. Observou-se positividade de todas as amostras testadas referentes a essa imagem e negatividade no último poço do gel (canaleta 29), o qual correspondeu ao controle-negativo (água esterilizada ultra-pura).

5.4 qPCR para *Bartonella* spp. baseada no gene *nuoG*

Um total de 322 amostras foram submetidas à qPCR para *Bartonella* spp. baseada no gene *nuoG*. Destas, 17 (5,28%) mostraram-se positivas para *Bartonella* spp. pela qPCR baseada no gene *nuoG*. Destas 17 amostras positivas, seis (1,86%) amostras foram provenientes de animais capturados no estado do Pará, sendo que um animal mostrou positividade para amostras de baço e de fígado. Já no estado do Paraná, quatro (1,24%) amostras mostraram-se positivas, das quais duas (baço e fígado) pertenciam a um mesmo animal. As sete (2,17%) amostras restantes positivas foram provenientes de animais amostrados no estado de Tocantins. A **Figura 12** mostra as curvas de amplificação e padrão de um ensaio de qPCR para *Bartonella* spp. mostrando as amostras positivas que apresentaram diferença de Cq menor que 0,5. Amostras que apresentaram Cq com diferença maior que 0,5 quando testadas em duplicata, foram repetidas em triplicata (**Figura 13**). A eficiência das reações variou de 90,8% a 98,6%; já o coeficiente de correlação variou de 0,987 a 1 (**Tabela 8**). Todas as análises foram realizadas obedecendo às normas estabelecidas pelo MIQE (“Minimum Information for Publication of Quantitative real-time PCR Experiments”) (BUSTIN et al., 2009). Em suma, três animais capturados no estado do Paraná (pertencentes à espécie *Sturnira liliium*), seis animais

capturados no estado do Pará (pertencentes às espécies *Phyllostomus hastatus* [n=1], *Carollia perspicillata* [n=4] e *Natalus espirosantensis* [n=1]) e sete animais capturados no estado de Tocantins (pertencentes às espécies *Carollia perspicillata* [n=2] e *Glossophaga soricina* [n=5]) mostraram-se positivos na qPCR para *Bartonella* spp. baseada no gene *nuoG*.

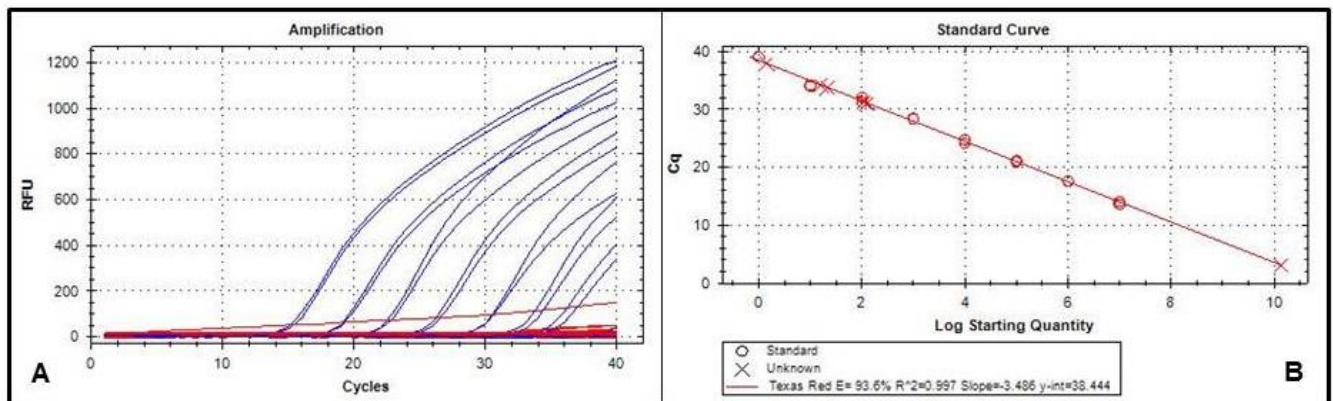


Figura 12. Curvas de amplificação (A) e padrão (B) referentes à qPCR para *Bartonella* spp. baseada no gene *nuoG* de amostras de fígado, baço e coração de quirópteros amostrados no estado do estado do Paraná e recebidos pelo Setor de Animais Selvagens do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da FCAV-UNESP. Em A, enquanto as curvas em azul representam a amplificação de plasmídeos (10^0 a 10^7) contendo um fragmento de 83 pb do gene *nuoG* de *Bartonela* sp., as curvas ou linhas em vermelho representam a amplificação de amostras de DNA de tecidos de quirópteros.

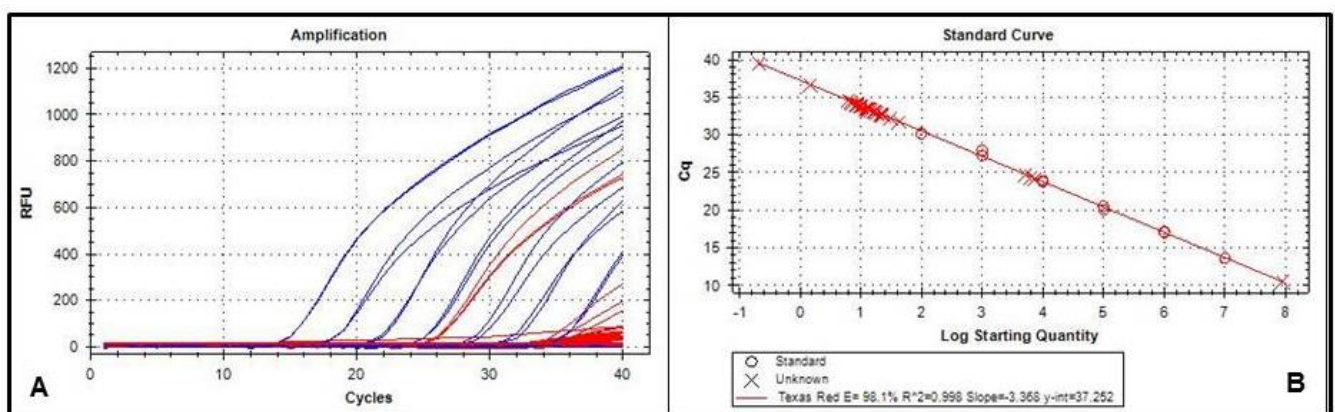


Figura 13. Curvas de amplificação (A) e padrão (B) referentes à qPCR para *Bartonella* spp. baseada no gene *nuoG* de amostras em triplicata que mostraram diferença de Cq maior que 0,5 nos ensaios anteriores. Em A, enquanto as curvas em azul representam a amplificação de plasmídeos (10^0 a 10^7) contendo um fragmento de 83 pb do gene *nuoG* de *Bartonela* sp., as curvas ou linhas em vermelho representam a amplificação de amostras de DNA de tecidos de quirópteros.

Tabela 8. Amostras positivas na qPCR para *Bartonella* spp. com suas respectivas quantificações e parâmetros das reações de qPCR.

Amostra	Espécie	Material biológico	Local	Cq (média)	Nº de cópias/ μ L	Eficiência (%)	R ²	Slope	Y-int
38019 B	<i>Phyllostomus hastatus</i>	Baço	Viseu, Pará	34,23	8,208X10 ⁰	98,1	0,998	-3,368	37,252
38197 B	<i>Carollia perspicillata</i>	Baço	Castanhal, Pará	33,05	1,8035X10 ¹	98,1	0,998	-3,368	37,252
38295 B	<i>Carollia perspicillata</i>	Baço	Belém-Mosqueiro, Pará	33,9	9,33X10 ⁰	98,1	0,998	-3,368	37,252
38296 F	<i>Carollia perspicillata</i>	Fígado	Belém-Mosqueiro, Pará	28,97	4,3945X10 ²	93,7	1,000	-3,482	38,482
38706 F	<i>Carollia perspicillata</i>	Fígado	Cachoeira do Piriá, Pará	32,69	2,2575X10 ¹	98,1	0,998	-3,368	37,252
37987 F	<i>Natalus espirosantensis</i>	Fígado	Belém-Outeiro, Pará	33,51	1,292X10 ¹	98,1	0,998	-3,368	37,252
MGPA 45 B	<i>Sturnira lilium</i>	Baço	Parque das Araucárias, Guarapuava, Paraná	32,69	2,22615X10 ¹	98,1	0,998	-3,368	37,252
MGPA 48 B	<i>Sturnira lilium</i>	Baço	Parque das Araucárias, Guarapuava, Paraná	34,02	1,876X10 ²	93,6	0,997	-3,486	38,444
MGPA 49 B	<i>Sturnira lilium</i>	Baço	Parque das Araucárias, Guarapuava, Paraná	31,21	1,1875X10 ²	93,6	0,997	-3,486	38,444
MGPA 49 F		Fígado		34,30	7,623X10 ⁰	98,1	0,998	-3,368	37,252
BATTO 30	<i>Carollia perspicillata</i>	Sangue	Arapoema, Tocantins	24,31	6,9575X10 ³	98,1	0,998	-3,368	37,252
BATTO 42	<i>Carollia perspicillata</i>	Sangue	Arapoema, Tocantins	30,67	2,1435X10 ²	92,5	0,997	-3,515	38,871
M5	<i>Glossophaga soricina</i>	Sangue	Aguiarnópolis, Tocantins	36,65	4,4065X10 ⁰	92,5	0,997	-3,515	38,871
M16	<i>Glossophaga soricina</i>	Sangue	Aguiarnópolis, Tocantins	33,07	1,9385X10 ¹	98,6	0,988	-3,555	37,389
M21	<i>Glossophaga soricina</i>	Sangue	Aguiarnópolis, Tocantins	32,66	2,6425X10 ¹	98,6	0,988	-3,555	37,389
M23	<i>Glossophaga soricina</i>	Sangue	Aguiarnópolis, Tocantins	33,40	1,3905X10 ¹	98,1	0,998	-3,368	37,252
M41	<i>Glossophaga soricina</i>	Sangue	Aguiarnópolis, Tocantins	35,12	4,7855X10 ⁰	98,6	0,988	-3,555	37,389

5.5 cPCR para *Bartonella* spp.

Das 17 amostras positivas para *Bartonella* spp. pela qPCR baseada no gene *nuoG*, 13 (76,47%) mostraram-se positivas nos ensaios de cPCR convencional, sendo quatro (30,77%) positivas para o gene *ftsZ*, três (23,07%) para o gene *nuoG*, três (23,07%) para o gene *ribC*, duas (15,38%) para o gene *groEL*, e uma (7,69%) para o gene *rpoB*. Todas as 17 amostras mostraram-se negativas para os ensaios de cPCR baseados nos genes *pap-31*, 16SrRNA e região intergênica 16S-23S rRNA (ITS). De todas as amostras positivas citadas, foram obtidas sequências de sete amostras, sendo três fragmentos do gene *nuoG*, dois do gene *gltA*, um do gene *rpoB*, e um fragmento do gene *ftsZ*, conforme mostrado na **Tabela 9**.

Tabela 9. Resultado dos ensaios de PCR convencional para *Bartonella* spp. com indicação das amostras positivas (+), negativas (-) e sequenciadas (+*) para cada gene.

Amostra	<i>nuoG</i>	<i>ribC</i>	<i>rpoB</i>	<i>ftsZ</i>	<i>gltA</i>	<i>Pap-31</i>	<i>groEL</i>	16S rRNA	ITS
38019 B	-	-	-	-	-	-	-	-	-
38197 B	-	-	-	-	-	-	-	-	-
38295 B	-	-	-	+	-	-	-	-	-
38296 F	-	-	-	+	-	-	-	-	-
38706 F	-	-	-	+*	-	-	-	-	-
38295 F	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37987 F	-	-	-	-	-	-	+	-	-
MGPA 45 B	-	+	-	-	-	-	-	-	-
MGPA 48 B	-	+	+*	-	-	-	+	-	-
MGPA 49 F	+*	+	-	-	-	-	-	-	-
MGPA 49 B	+*	-	-	-	+*	-	-	-	-
BATTO 30	+*	-	-	-	-	-	-	-	-
BATTO 42	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M16	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M21	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M23	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M41	-	-	-	+	+*	-	-	-	-

Não foi realizado o sequenciamento das demais amostras devido ao aparecimento de banda de baixa intensidade em gel de agarose mesmo após reamplificação (**Figura 14**). Três amostras (duas pelo gene *ribC* e uma pelo gene *ftsZ*) embora sequenciadas, mostraram picos no eletroferograma de baixa qualidade, impedindo a formação de uma sequência confiável para as análises filogenéticas. Desta forma estas sequências foram excluídas.

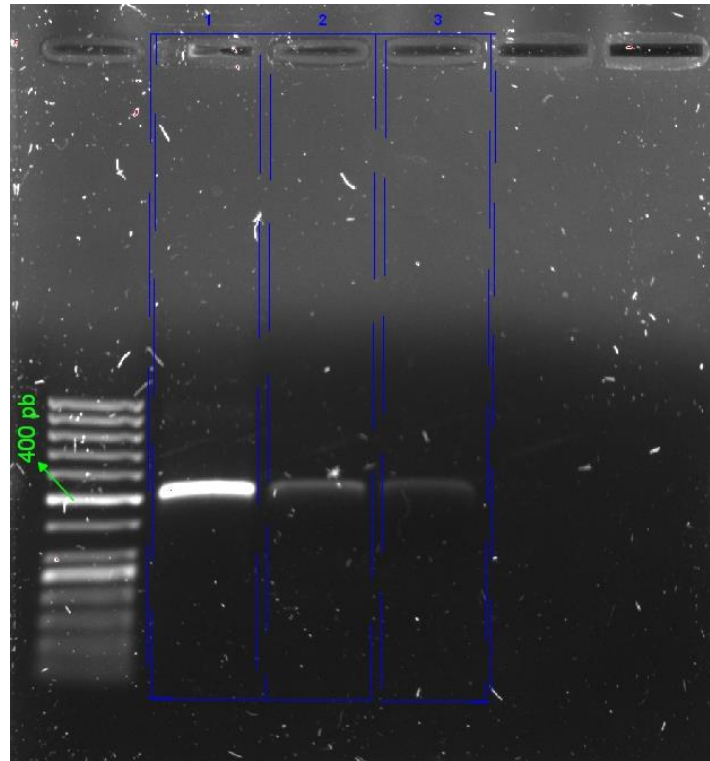


Figura 14. Eletroforese em gel de agarose 1,0% corado com brometo de etídeo para protocolo de PCR convencional baseado no gene *ribC*. As bandas correspondem à reamplificação de amostras positivas de aproximadamente 400 pb do referido gene. Observou-se positividade com banda forte na amostra em canaleta 01, mas positividade com banda fraca da amostra em canaletas 2 e 3. As três amostras foram excluídas das análises filogenéticas devido à baixa qualidade de picos no eletroferograma de uma delas após sequenciamento, e à baixa intensidade de banda de duas delas, as quais não foram enviadas para o sequenciamento.

5.6 cPCR para *Mycoplasma* spp.

Das 322 amostras, 45 (13,97%) mostraram-se positivas na cPCR para hemoplasmas baseada no gene 16SrRNA, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores HemMycop16S-41s e HemMyco16S-938as. Por outro lado, 14 (4,34%) amostras mostraram-se positivas na cPCR para hemoplasmas baseada no gene 16SrRNA, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores HemMycop16S-322s e HemMycop16S-1420as. Catorze (4,34%) amostras mostraram-se positivas para ambos os protocolos de PCR supracitados. Ainda, 12 (26,66%) das 44 amostras positivas para o protocolo baseado no gene 16S rRNA também mostraram-se positivas na cPCR baseada no gene RNAaseP (**Tabela 10**). Cinco (1,55%) amostras foram positivas para os três protocolos realizados. Do total das 44 amostras positivas, 33 amostras foram colhidas de 19 quirópteros no estado do Paraná (*Molossus molossus* [n=10], *Sturnira lilium*

[n=8], *Eptesicus* spp. [n=1]); sete amostras foram colhidas de quirópteros do estado do Pará (*Artibeus planirostris* [n=3], *Molossus molossus* [n=2], *Eumops auripendulos* [n=1], *Myotis nigricans* [n=1]); quatro amostras foram colhidas no estado de Tocantins (*Glossophaga soricina* [n=4]), e uma no estado de Mato Grosso (*Molossus rufus*). Entretanto, devido à baixa intensidade dos produtos amplificados, somente cinco sequências de fragmentos do gene 16S rRNA de hemoplasmas foram obtidas (Paraná [n=4], Pará [n=1]), sendo todas detectadas na espécie *Molossus molossus*.

Tabela 10. Relação de animais positivos para *Mycoplasma* spp. com base em três diferentes protocolos de cPCR.

Espécie de quiróptero/nº amostras positivas (Protocolo 16S rRNA com os oligonucleotídeos HemMycop16S-41s e HemMyco16S-938as)	Espécie de quiróptero/nº amostras positivas (Protocolo 16S rRNA com os oligonucleotídeos HemMycop16S-322s e HemMycop16S-1420as)	Espécie de quiróptero/nº amostras positivas (Protocolo RaAse P)
<i>Molossus molossus</i> / 20	<i>Molossus molossus</i> / 10	<i>Molossus molossus</i> / 9
<i>Sturnira lilium</i> / 13	<i>Molossus rufus</i> / 1	<i>Sturnira lilium</i> / 3
<i>Glossophaga soricina</i> / 4	<i>Eptesicus</i> sp. / 1	
<i>Artibeus planirostris</i> / 3	<i>Myotis nigricans</i> / 1	
<i>Eptesicus</i> sp. / 2	<i>Artibeus planirostris</i> / 1	
<i>Eumops auripendulus</i> / 1		
<i>Myotis nigricans</i> / 1		
<i>Molossus rufus</i> / 1		
Total: 45	Total: 14	Total: 12

5.7 Copositividade por *Bartonella* spp. e hemoplasmas

Embora tenha sido identificada positividade para *Bartonella* spp. e hemoplasmas (**Figura 15**) nas localidades de Aguiarnópolis em Tocantins, e de Guarapuava no Paraná, somente um animal da espécie *Glossophaga soricina*, amostrado no estado de Tocantins, apresentou copositividade para ambos os patógenos.

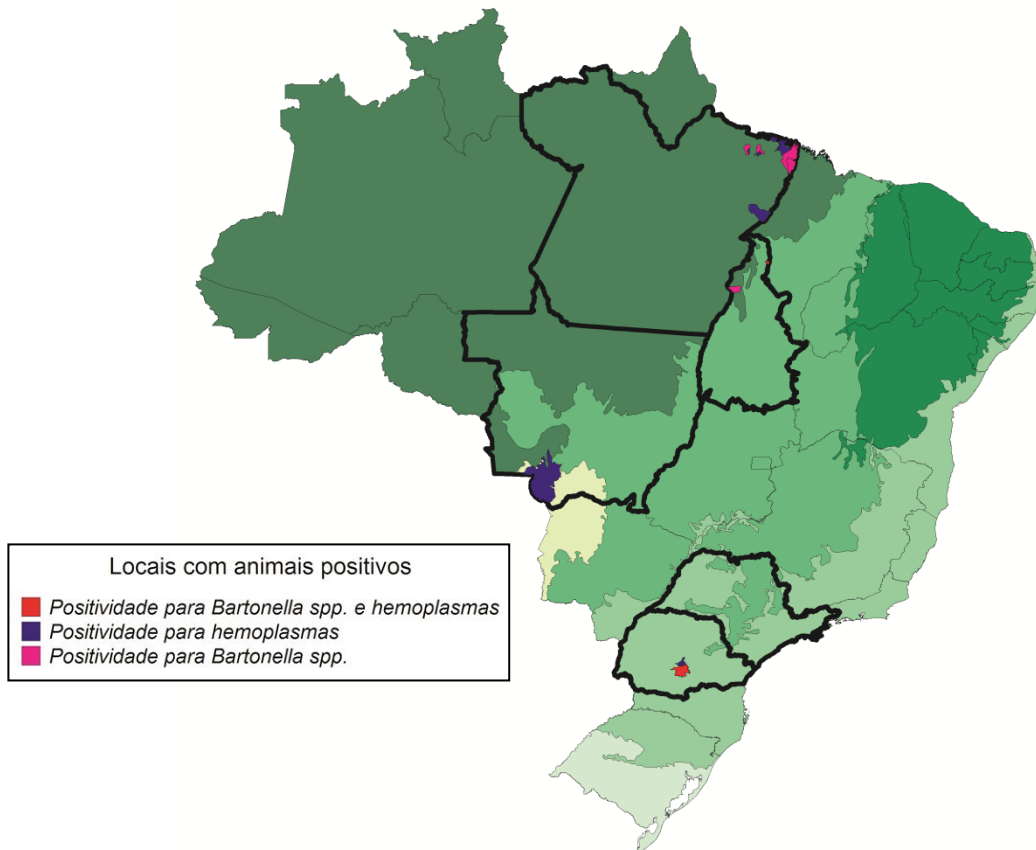


Figura 15. Distribuição geográfica de animais positivos para *Bartonella* spp. e/ou *Mycoplasma* spp. representados por cores diferentes em cada município. Os estados onde foram realizadas as amostragens estão destacados.

5.8 Análise Filogenética

5.8.1 Análise pelo BLASTn

Todas as sequências obtidas utilizadas para análise filogenética foram submetidas à análise pelo BLASTn para a determinação da porcentagem de identidade com sequências já depositadas no banco de dados GenBank (**Tabela 11**). As sequências utilizadas foram obtidas de sete amostras, sendo três fragmentos do gene *nuoG* das espécies *Sturnira lilium* (Paraná [n=2]) e *Carollia perspicillata* (Tocantins [n=1]), dois fragmentos do gene *gltA* das espécies *Sturnira lilium* (Paraná [n=1]) e *Glossophaga soricina* (Tocantins [n=1]), fragmento do gene *rpoB* da espécie *Sturnira lilium* (Paraná [n=1]) e um fragmento do gene *ftsZ* da espécie *Carollia perspicillata* (Pará [n=1]).

As amostras correspondentes a fragmentos do gene *nuoG* mostraram máxima identidade (89-90%) com *Bartonella taylorii* (EF659943.1), correspondendo a amostras provenientes de fígado e baço (representadas como 49F e 49B), respectivamente, do mesmo animal da espécie *Sturnira lilium* amostrado no estado do Paraná. A amostra de fígado (49F) desse mesmo animal também mostrou 89% de identidade com *Bartonella elizabethae* (EF659940.1) e 88% de identidade com *Bartonella washoensis* (EF659945.1) e *Bartonella vinsonii* subsp. *vinsonii* (EF659944.1). Já a amostra sequenciada pelo mesmo gene, mas proveniente de sangue de animal da espécie *Carollia perspicillata* amostrado no estado de Tocantins (representada como #30), mostrou 92% de identidade com *Bartonella koelerae* (EF659942.1) e *Bartonella washoensis* (EF659945.1), e 91% de identidade com *Bartonella vinsonii* subsp. *arupensis* (EF659936.1).

Para os fragmentos do gene *gltA* amplificados e sequenciados, foram encontradas porcentagens de identidade de 90-100% com *Bartonella* spp. (KJ816674.1) na análise da amostra proveniente de tecido esplênico (representada como 49B) de um exemplar de *Sturnira lilium* amostrado no estado do Paraná. Ainda pelo mesmo gene, 98% de identidade com *Bartonella* spp. (KJ816690.1) e 87% de identidade com *Bartonella schoenbuchensis* (HG977196.1) foram encontradas na análise da amostra de sangue de *Glossophaga soricina* amostrado em Tocantins (representada como M41). O fragmento sequenciado do gene *rpoB* proveniente de tecido esplênico de *Sturnira lilium* amostrado no estado do Paraná (representado como 48B) mostrou 89% de identidade com *Bartonella* spp. (AB779537.1) Já a amostra de DNA de número 38706, proveniente de fígado de exemplar de *Carollia perspicillata* amostrado no estado do Pará, mostrou 98% de identidade com *Bartonella* spp. (AB703117.1) e 97% de identidade com *Bartonella chomelii* (KM215689.1) a partir de sequenciamento de um fragmento do gene *ftsZ*.

Tabela 11. Máxima identidade e cobertura de sequências de *Bartonella* spp. amplificadas a partir de amostras de sangue ou teciduais de quirópteros amostrados no presente estudo comparativamente a sequências nucleotídicas previamente depositadas no GenBank.

Espécie de hospedeiro	Amostra	Gene-alvo	Cobertura (%)	Máxima Identidade pelo BLASTn® (%)
<i>Sturnira lilium</i>	49 B	<i>nuoG</i>	97%	90% <i>Bartonella taylorii</i> (EF659943.1)
	49F		100%	89% <i>Bartonella taylorii</i> (EF659943.1)
<i>Carollia perspicillata</i>	#30	<i>nuoG</i>	100%	92% <i>Bartonella koehlerae</i> (EF659942.1)
<i>Sturnira lilium</i>	49B	<i>gltA</i>	99%	100% Uncultured <i>Bartonella</i> spp. (KJ816674.1)
<i>Glossophaga soricina</i>	M41	<i>gltA</i>	96%	98% Uncultured <i>Bartonella</i> spp. (KJ816690.1)
<i>Sturnira lilium</i>	48B	<i>rpoB</i>	100%	89% <i>Bartonella</i> spp. Khabarovsk-17 (AB779537.1)
<i>Carollia perspicillata</i>	38706F	<i>ftsZ</i>	100%	98% <i>Bartonella</i> spp. Honshu-9.3 (AB703117.1)

Todas as cinco sequências de um fragmento do gene 16S rRNA de hemoplasmas detectadas em quirópteros da espécie *Molossus molossus* amostrados nos estados de Paraná e Pará, mostraram identidade de 93% a 96% com *Mycoplasma coccoides* (AY171918), com cobertura de 87% a 100%. Ainda mostraram identidade variando de 92% a 96% com 'Uncultured' *Mycoplasma* spp. detectado em um roedor (*Akodon* sp.) capturado no Brasil (KT215636), com cobertura de 87% a 99%.

5.8.2 Árvores filogenéticas

A partir do alinhamento das sequências obtidas com aquelas previamente depositadas no banco de dados GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) foram realizadas análises de Máxima Verossimilhança (MV) e Inferência Bayesiana (BI) para os fragmentos gênicos

da subunidade gama da desidrogenase NADH (*nuoG*), citrato sintase (*gltA*), subunidade β da RNA polimerase (*rpoB*) e proteína de divisão celular (*fstZ*).

Foi realizada análise concatenada das amostras positivas para os genes *nuoG* (400pb) e *gltA* (750pb). Ambas as análises de inferência bayesiana e máxima verossimilhança mostraram topologias muito similares (**Figuras 16 e 17**). As sequências detectadas em quirópteros da espécie *Sturnira liliium* (números de acesso no GenBank: KY356756 [gene *nuoG* da amostra 49F]; KY356753 [gene *gltA* da amostra 49B] e KY356755 [gene *nuoG* da amostra 49B]) capturados no estado de Paraná mostraram proximidade filogenética com sequências de *Bartonella* spp. detectadas em uma mosca ectoparasita de morcego amostrado na Costa Rica (Hippoboscidae – *Aspidoptera delatorrei*), e com uma sequência detectada em um espécime de *Carollia perspicillata* amostrada na Guatemala, com suporte de clado de 100% em ambas as análises. Já o genótipo de *Bartonella* spp. detectado em espécime de *Carollia perspicillata* amostrado em Tocantins (número de acesso no GenBank: KY356757 [gene *nuoG*]) ficou posicionado no mesmo clado que genótipos detectados em quirópteros amostrados no Peru e Guatemala, e de roedores amostrados no Brasil e nos Estados Unidos, incluindo um ectoparasita de roedor (*Polygenis gwyni*) também amostrado nos Estados Unidos. Ainda, uma sequência de *Bartonella* spp. obtida a partir de amostra de *Glossophaga soricina* (número de acesso no GenBank: KY356754) capturado em Tocantins posicionou-se em clado mais basal, juntamente com genótipo de *Bartonella* spp. detectado em espécime de *Carollia sowellii* e seu ectoparasita Streblidae (*Strebla guajiro*) amostrado na Costa Rica, com suporte de clado de 100%, e com outros genótipos de *Bartonella* spp. detectados em quirópteros do Peru e Guatemala, com 66% de suporte de clado nas duas análises.

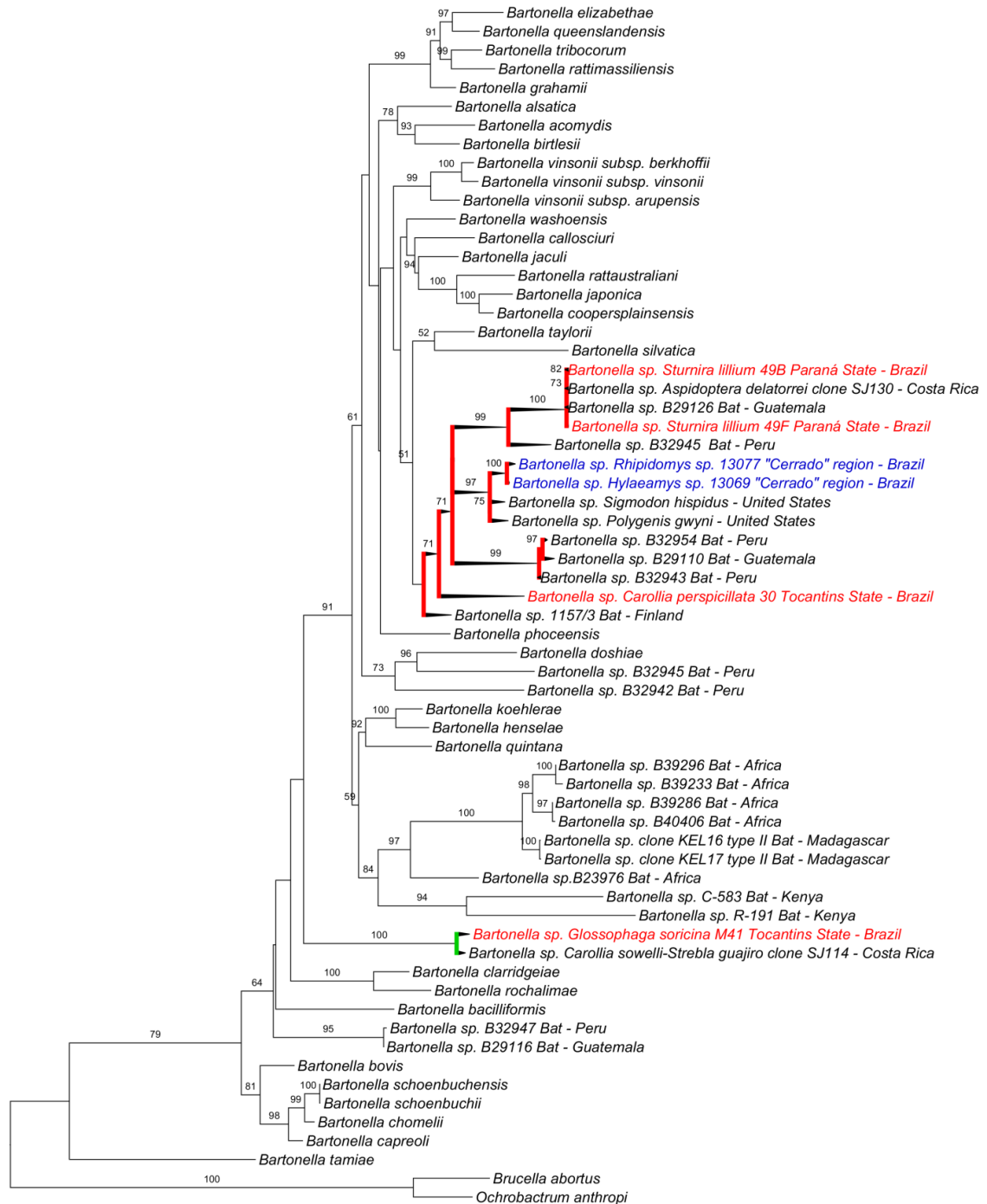


Figura 16. Análise filogenética concatenada dos genes *nuoG* e *gltA* para *Bartonella* spp. (3370bp após alinhamento), utilizando o método de máxima verossimilhança (MV) com modelo evolutivo de transição (TIM) com sítios invariáveis e distribuição gamma. As sequências do presente estudo estão destacadas em vermelho. Sequências em azul foram obtidas a partir de amostras provenientes de roedores pelo mesmo grupo de pesquisa. Observa-se formação de dois clados que englobam as sequências do presente estudo. Foi utilizado *bootstrap* de 1000 replicatas, cujos valores acima de 50% estão demonstrados em cada clado. *Brucella abortus* e *Ochrobactrum anthropi* foram utilizados como grupos externos.

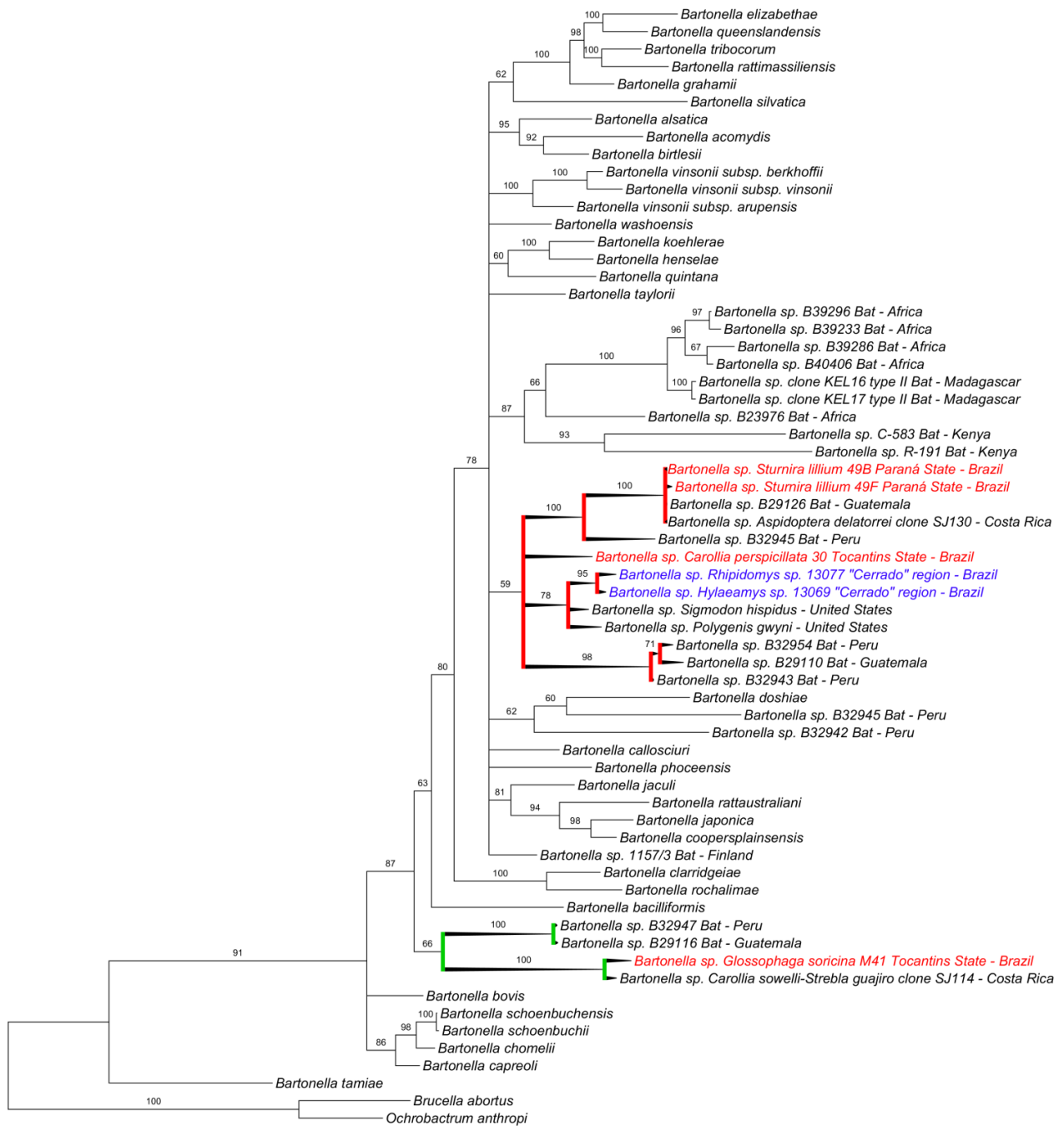


Figura 17. Análise filogenética concatenada dos genes *nuoG* e *gltA* para *Bartonella* spp. (3370bp após alinhamento) utilizando o método de inferência bayesiana (BI) com modelo evolutivo tempo reversível generalizado (GTR) com sítios invariáveis e distribuição gamma. As sequências do presente estudo estão destacadas em vermelho. Sequências em azul foram obtidas a partir de amostras provenientes de roedores pelo mesmo grupo de pesquisa. Observa-se formação de dois clados que englobam as sequências do presente estudo. Foi utilizada simulação de Cadeias de Markov Monte Carlo (MCMC) com 10^6 gerações para definição da probabilidade posterior, cujos valores acima de 50% estão demonstrados em cada clado. *Brucella abortus* e *Ochrobactrum anthropi* foram utilizados como grupos externos.

As análises de MV (**Figura 18**) e BI (**Figura 19**) de um fragmento de 1500 pb do gene *rpoB* mostraram topologias parecidas, nas quais a amostra de *Bartonella* spp. em questão (48B), amplificada a partir de amostra tecidual de exemplar de *Sturnira lilium* (número de acesso no GenBank: KY356758), amostrado no estado do Paraná, mostrou-se relacionada à *Bartonella* spp. identificada em pequenos mamíferos selvagens na Ásia (AB779537) e em roedores selvagens no Japão (AB290276). Adicionalmente, relacionou-se com *Bartonella taylorii*, com suportes de clado de 85% na MV, e de 94% na BI.

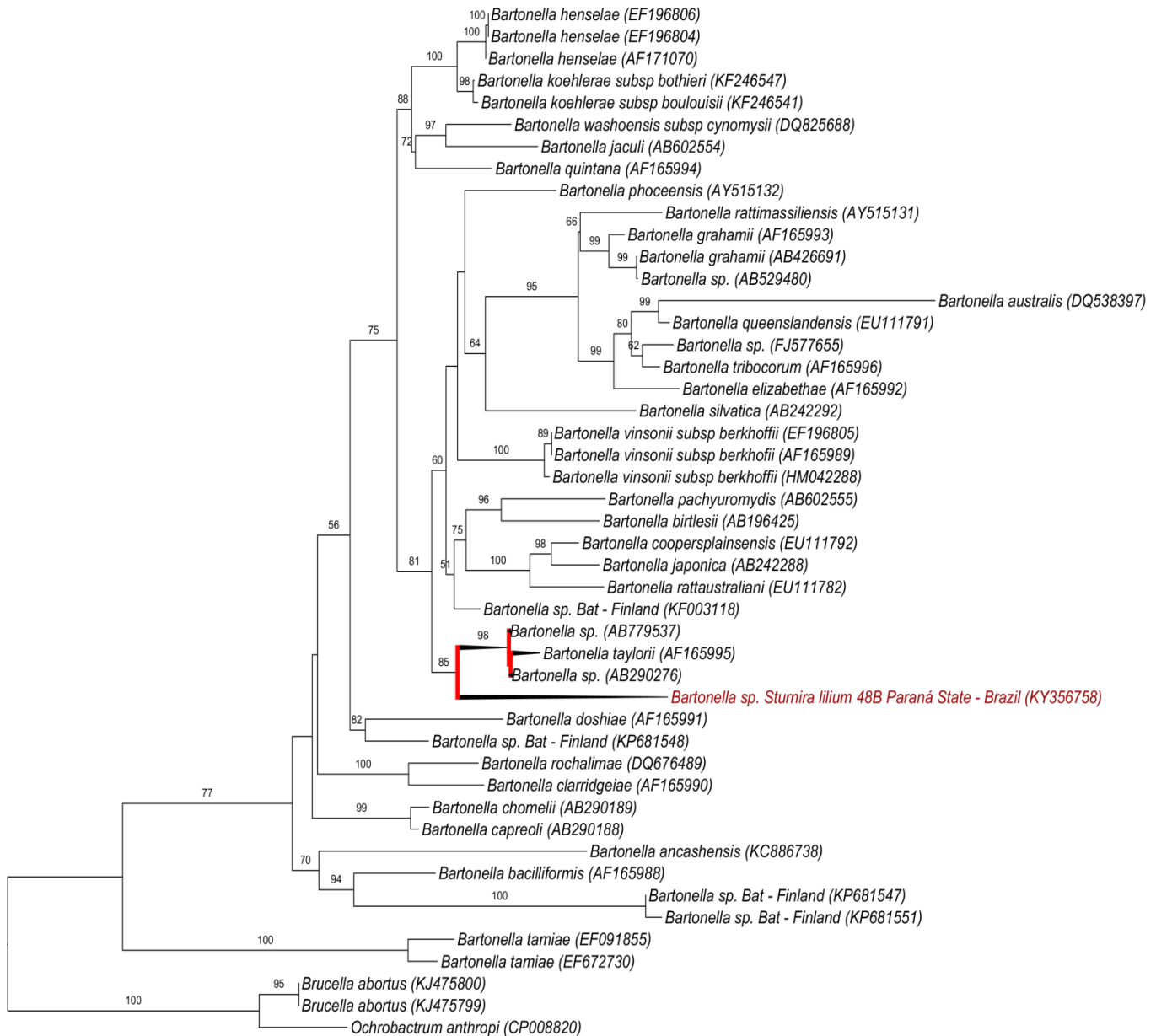


Figura 18. Análise filogenética de um fragmento de 1500pb do gene *rpoB* para *Bartonella* spp. utilizando o método de máxima verossimilhança (MV) com modelo evolutivo Tamura e Nei (TrN) com sítios invariáveis e distribuição gamma. A sequência do presente estudo está destacada em vermelho. Foi utilizado *bootstrap* de 1000 replicatas, cujos valores acima de 50% estão demonstrados em cada clado. *Brucella abortus* e *Ochrobactrum anthropi* foram utilizados como grupos externos.

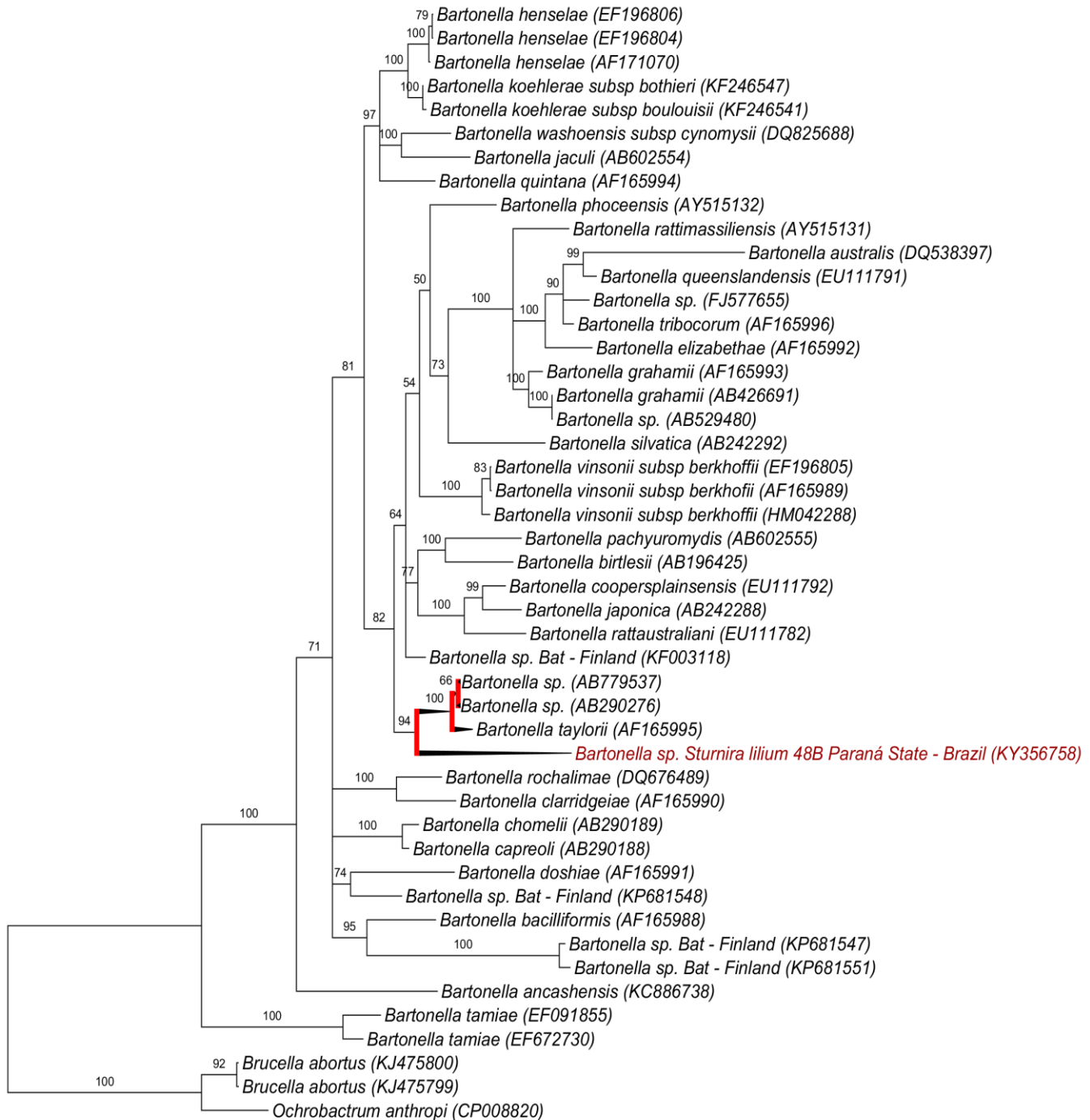


Figura 19. Análise filogenética de um fragmento de 1500pb do gene *rpoB* para *Bartonella* spp. utilizando o método de inferência bayesiana (BI) com modelo evolutivo Hasegawa, Kishino e Yano (HKY) com sítios invariáveis e distribuição gamma. A sequência do presente estudo está destacada em vermelho. Foi utilizada simulação de Cadeias de Markov Monte Carlo (MCMC) com 10^6 gerações para definição da probabilidade posterior, cujos valores acima de 50% estão demonstrados em cada clado. *Brucella abortus* e *Ochrobactrum anthropi* foram utilizados como grupos externos.

Já nas análises baseadas em um fragmento de 790 pb do gene *ftsZ*, a amostra de *Bartonella* spp. (30706F) proveniente de exemplar de *Carollia perspicillata* (número de acesso GenBank: KY356752) amostrado no Pará, relacionou-se com *B. schonbuensis* (AF467765), *B. chomelii* (AB290193) e *Bartonella* spp. detectada em cervo no Japão (AB703117), com valores de suportes de clado de 100%, tanto na análise de MV (**Figura 20**) como na análise BI (**Figura 21**). Na análise de MV, a amostra foi posicionada num mesmo grande clado (ramos verdes) com 75% de suporte com *B. rochalimae*, *B. clarridgeiae*, *B. bacilliformis* e com uma sequência de *Bartonella* spp. obtida por meio de isolamento em cultura a partir de amostras de sangue periférico de quirópteros amostrados na Finlândia (KF003135). Essa relação também foi observada na análise BI, na qual verificou-se a posição em mesmo clado maior (ramos verdes), com suporte de 100%.

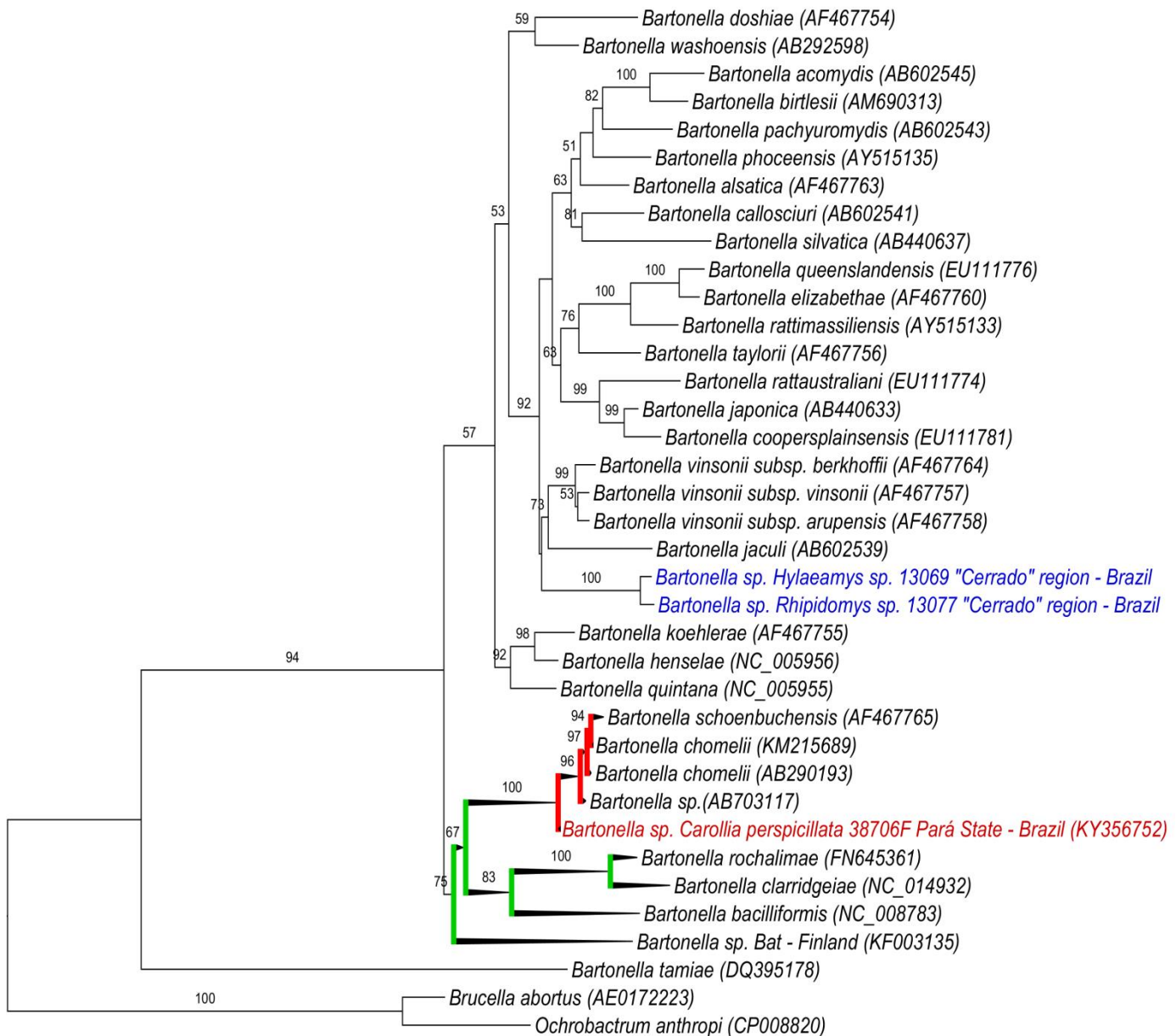


Figura 20. Análise filogenética de um fragmento de 790pb do gene *ftsZ* para *Bartonella* spp. utilizando o método de máxima verossimilhança (MV) com modelo evolutivo de transição (TIM1) com sítios invariáveis e distribuição gamma. A sequência do presente estudo está destacada em vermelho. Sequências em azul foram obtidas a partir de amostras provenientes de roedores pelo mesmo grupo de pesquisa. Foi utilizado *bootstrap* de 1000 replicatas, cujos valores acima de 50% estão mostrados em cada clado. *Brucella abortus* e *Ochrobactrum anthropi* foram utilizados como grupos externos.

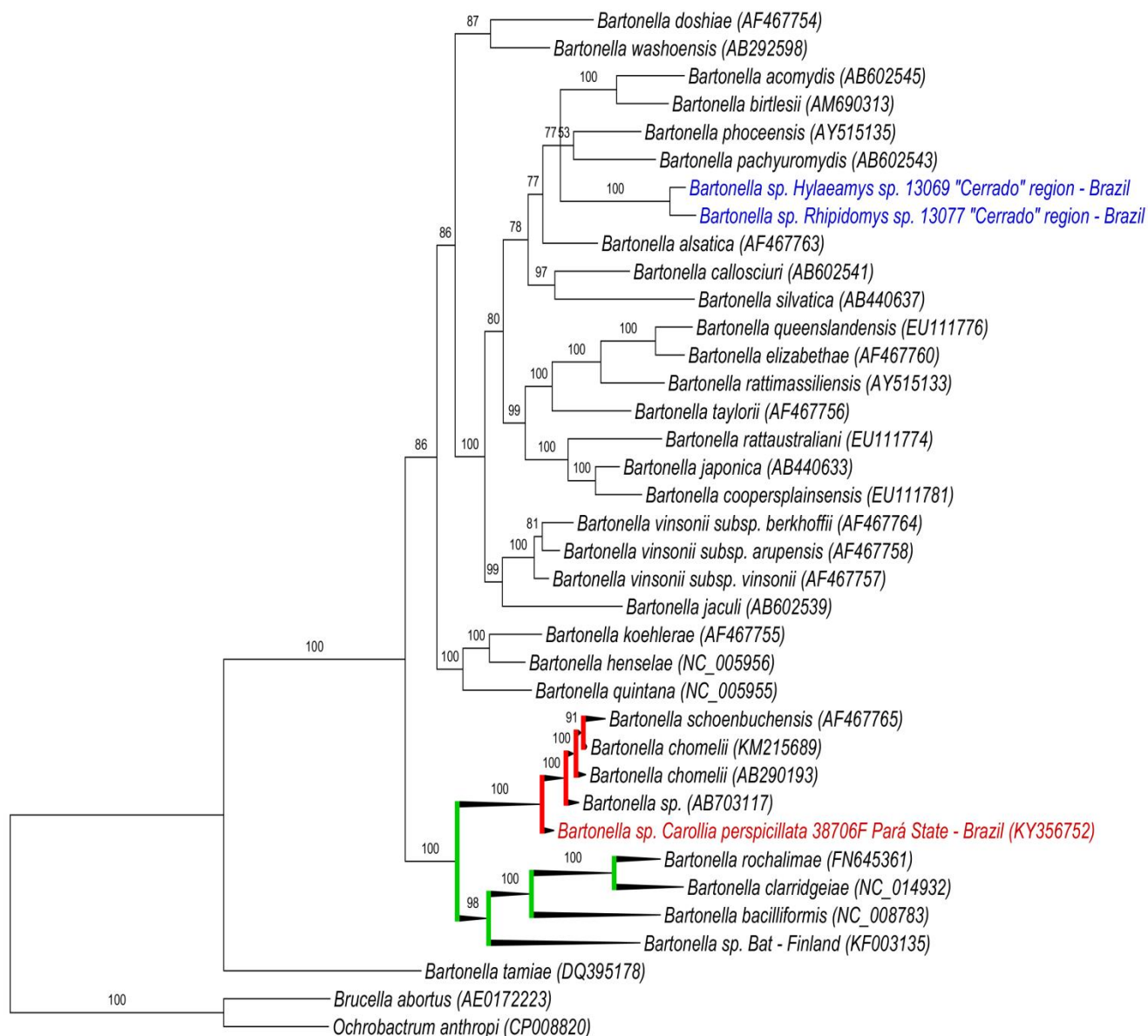


Figura 21. Análise filogenética de um fragmento de 790pb do gene *ftsZ* para *Bartonella* spp. utilizando o método de inferência bayesiana (BI) com modelo evolutivo de transição (TIM1) com sítios invariáveis e distribuição gamma. A sequência do presente estudo está destacada em vermelho. Sequências em azul foram obtidas a partir de amostras provenientes de roedores pelo mesmo grupo de pesquisa. Foi utilizada simulação de Cadeias de Markov Monte Carlo (MCMC) com 10^6 gerações para definição da probabilidade posterior, cujos valores acima de 50% estão demonstrados em cada clado. *Brucella abortus* e *Ochrobactrum anthropi* foram utilizados como grupos externos.

As sequências de hemoplasmas obtidas no presente estudo (números de acesso GenBank: KY356747 - KY356751) posicionaram-se num mesmo clado como um grupo monofilético, com suporte de 95% e 100% nas análises de MV e BI respectivamente. O grupo ficou posicionado entre clados com *Mycoplasma coccoides* (AY171918) e genótipos de hemoplasmas detectados em roedores do Brasil (KM203857; KT215636), sendo que todos foram posicionados no grupo de *Mycoplasma haemofelis* (**Figuras 22 e 23**).

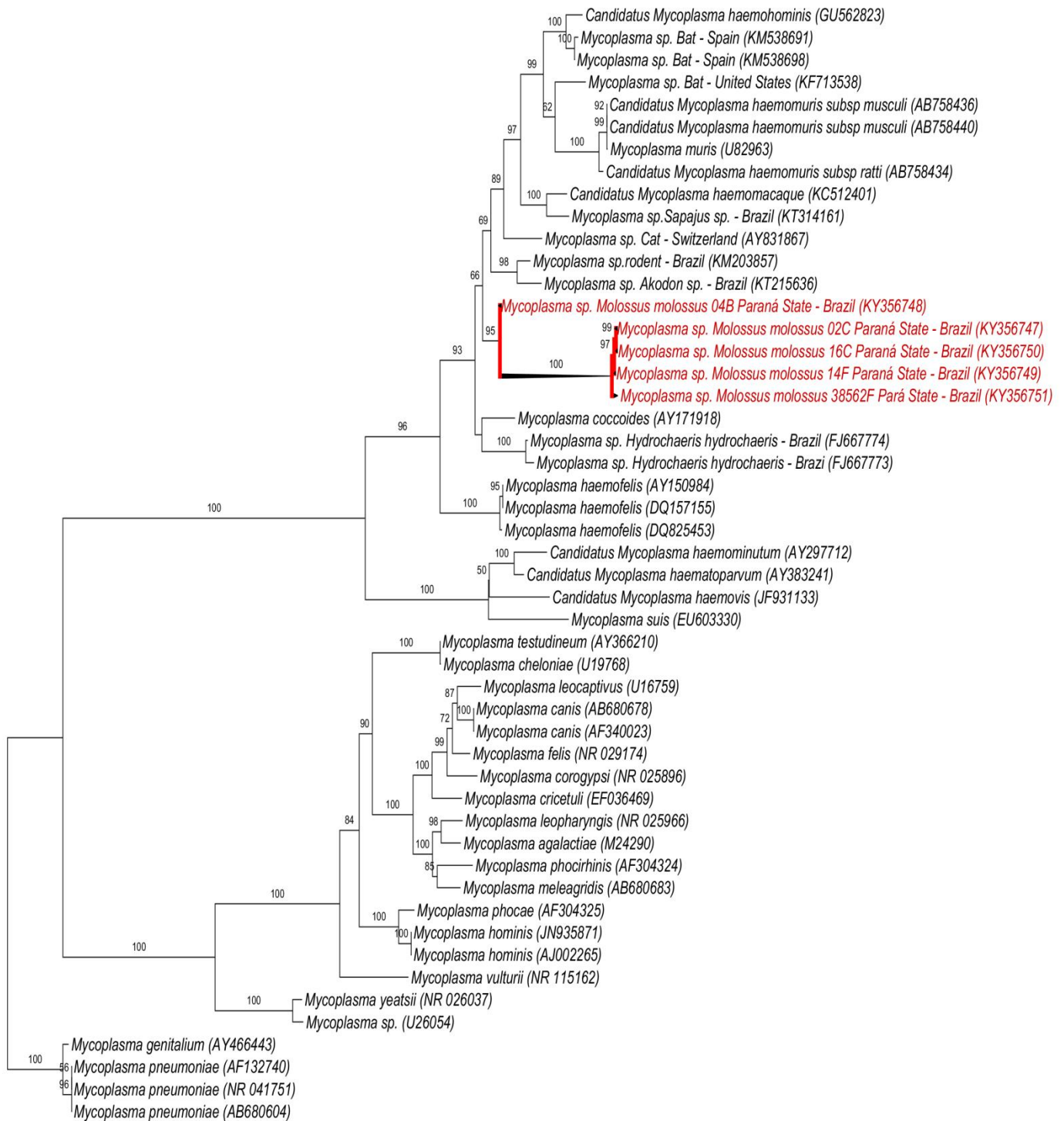


Figura 22. Análise filogenética de um fragmento de 1770pb do gene *16SrRNA* para *Mycoplasma* spp. utilizando o método de máxima verossimilhança com modelo evolutivo tempo reversível generalizado (GTR) com sítios invariáveis e distribuição gamma As sequências do presente estudo estão destacadas em vermelho formando um grupo monofilético. Foi utilizado *bootstrap* de 1000 replicatas, cujos valores acima de 50% estão mostrados em cada clado. *Mycoplasma pneumoniae* foi utilizado como grupo externo.

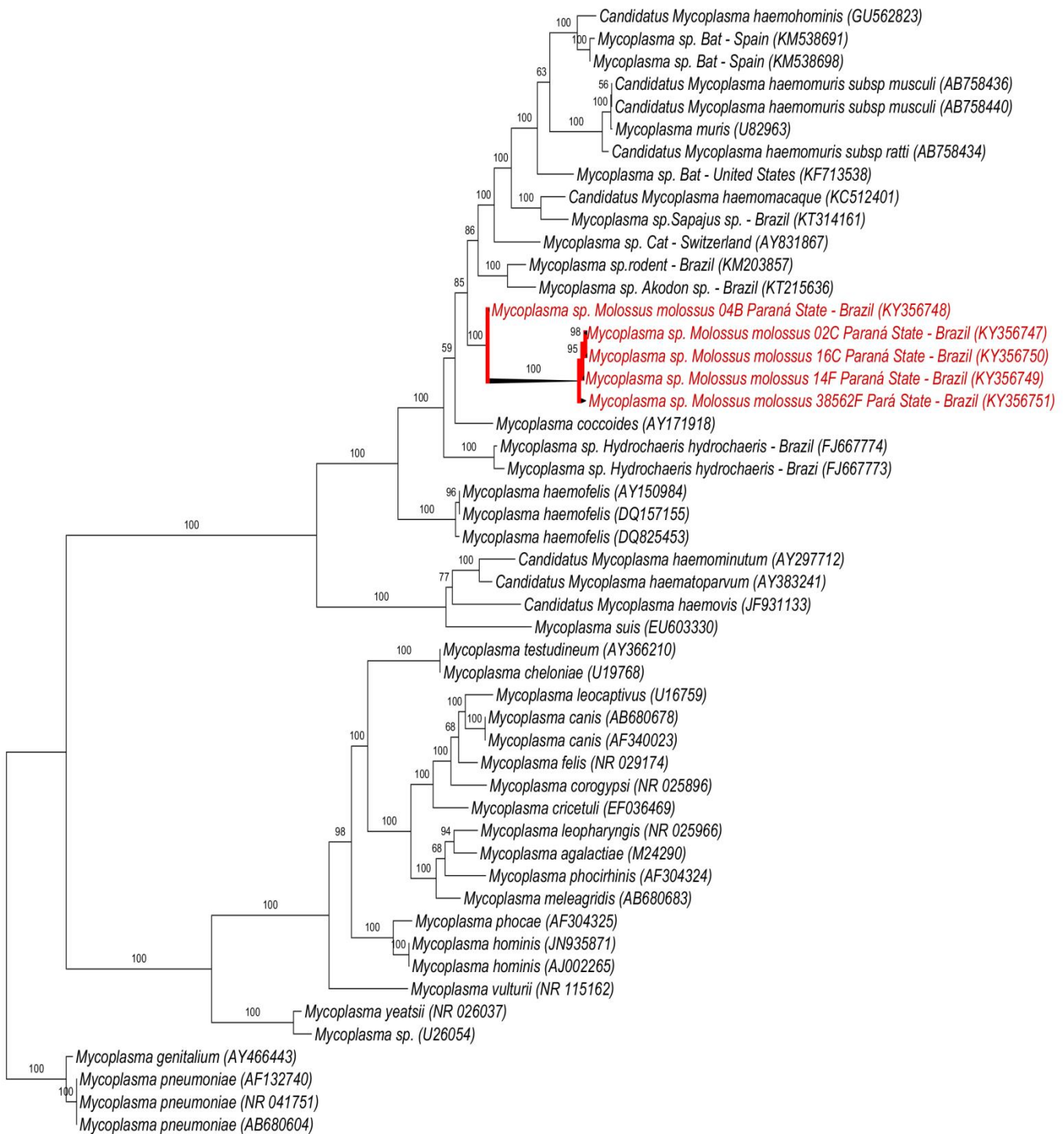


Figura 23. Análise filogenética de um fragmento de 1770pb do gene *16SrRNA* para *Mycoplasma* spp. utilizando o método de inferência bayesiana (BI) com modelo evolutivo de transição (TIM1) com sítios invariáveis e distribuição gamma de um fragmento de 1770pb do gene *16SrRNA* para hemoplasmas. As sequências do presente estudo estão destacadas em vermelho formando um grupo monofilético. Foi utilizada simulação de Cadeias de Markov Monte Carlo (MCMC) com 10^6 gerações para definição da probabilidade posterior, cujos valores acima de 50% estão demonstrados em cada clado. *Mycoplasma pneumoniae* foi utilizado como grupo externo.

6. DISCUSSÃO

O presente trabalho relata a ocorrência de *Bartonella* spp. em quirópteros amostrados nos estados do Paraná, Pará e Tocantins, e de hemoplasmas em animais dessas mesmas localidades e também no estado do Mato Grosso. Apesar das diferenças climáticas e diferentes biomas, observou-se uma relação filogenética entre a maioria das sequências dos patógenos sob estudo.

A ocorrência de *Bartonella* spp. encontrada no presente estudo em quirópteros neotropicais mostrou-se baixa (5,28%), similar à descrita em quirópteros de Velho Mundo (3,38% [13/384]) amostrados em Suazilândia e África do Sul (África) por Dietrich et al. (2016). De uma maneira geral, a ocorrência de *Bartonella* spp. mostra-se relativamente alta em quirópteros do Velho Mundo, tais como naqueles amostrados na Nigéria (51,35% [76/148] por qPCR e 15,54% [23/148] por cultura) (KAMANI et al., 2014), Quênia (32,02% [106/331] por cultura) (KOSOY et al., 2010), e Madagascar (44,68% [21/47] por PCR) (BROOK et al., 2015). Por outro lado, tal ocorrência mostra-se baixa em quirópteros neotropicais, tais como naqueles amostrados na Guatemala (33,1% [39/118]), Peru (24,1% [27/112]), Costa Rica (33,3% [21/63]) e Porto Rico (18% [09/68]), com detecção por meio de cultura sólida seguida por PCR convencional ou somente por métodos moleculares (BAI et al., 2011; BAI et al., 2012; JUDSON, FRANK e HADLY, 2015; OLIVAL et al., 2015).

Embora tenha sido relatada baixa ocorrência de *Bartonella* spp. entre quirópteros das espécies *Sturnira lilium* e *Glossophaga soricina* (BAI et al., 2011), estas, juntamente com *Carollia perspicillata*, foram as espécies de morcegos que mostraram maior positividade para *Bartonella* spp. no presente estudo. Apesar do grande número de indivíduos do gênero *Molossus* spp. (29,01% [47/162]) amostrados, nenhum mostrou positividade para *Bartonella* spp., corroborando com os resultados encontrados por Bai et al. (2012) no Peru. Ainda, o presente estudo traz a primeira descrição de *Bartonella* sp. na espécie *Natalus espiritosantensis*.

Embora Gutiérrez et al. (2017) sugiram que o baço seja o órgão de eleição para detecção de *Bartonella* spp., tal diferença não foi observada no

presente estudo, haja vista que, dentre as amostras positivas, sete foram provenientes de sangue, seis de tecido esplênico e quatro de tecido hepático.

No que diz respeito ao posicionamento filogenético das sequências de *Bartonella* spp. obtidas de quirópteros do Brasil, as mesmas foram alocadas em clados dos quais faziam parte genótipos de *Bartonella* spp. detectados em quirópteros amostrados em países da América Latina e quando sequências de *Bartonella* spp. detectadas em quirópteros amostrados na África e Europa estavam presentes nas análises, estas formaram outro grupo e foram posicionadas distantes das sequências obtidas no presente estudo.

Hipótese de diferentes pressões coevolucionárias entre hospedeiros quirópteros do Novo e Velho Mundo fora levantada, uma vez que espécies do Velho Mundo parecem ser mais rústicas e demonstrar tempo de evolução maior para o estabelecimento da relação parasita x hospedeiro (LEI e OLIVAL, 2014). Desta forma, espécies de quirópteros do Velho Mundo poderiam albergar genótipos diferentes e distantes filogeneticamente de patógenos encontrados em quirópteros neotropicais. Tal hipótese poderia explicar o posicionamento dos genótipos de *Bartonella* spp. detectados em quirópteros neotropicais em relação àqueles pertencentes à Subordem Megachiroptera/Yangpteroptera.

Adicionalmente, verificou-se que genótipos de *Bartonella* spp. detectados no presente estudo foram posicionados próximos àqueles encontrados em mamíferos selvagens da Ásia, tais como roedores e cervídeos, com base nas análises filogenéticas baseadas nos genes *ftsZ* e *rpoB*. Neste sentido, a possibilidade de transmissão intra e interespecífica de *Bartonella* spp. já foi sugerida por Bai et al. (2011), já que um único hospedeiro pode albergar mais de uma espécie/genótipo do patógeno sob estudo. Neste contexto, o papel de vetores torna-se importante na transmissão de *Bartonella* spp. de uma espécie de hospedeiro para outra.

Com base na análise filogenética concatenada dos genes *gltA* e *nuoG*, os genótipos de *Bartonella* spp. detectados em um espécime de *Sturnira liliium* amostrado no estado do Paraná e *Carollia perspicillata* amostrado em Tocantins, mostraram-se filogeneticamente relacionados a genótipos de *Bartonella* spp. detectados em quirópteros da espécie *Carollia perspicillata* da Guatemala, em um ectoparasita de morcego Hippoboscidae (*Aspidoptera*

delatorrei) da Costa Rica e com um genótipo de *Bartonella* spp. detectado em um exemplar de *Desmodus rotundus* amostrado no Peru. Interessantemente, genótipos de *Bartonella* spp. detectados em roedores do Brasil por Gonçalves et al. (2016) posicionaram-se no mesmo grande clado. Entretanto, genótipo de *Bartonella* spp. detectado em um exemplar da espécie *Glossophaga soricina* amostrado no estado de Tocantins posicionou-se distante do outro genótipo de *Bartonella* spp. detectado em quiróptero do presente estudo, alocando-se próximo de um genótipo de *Bartonella* spp. detectado em indivíduo da espécie *Carollia sowelli* e seu ectoparasita *Strebula guajiro* da Costa Rica. Esses achados sugerem que diferentes genótipos de *Bartonella* spp. circulam em quirópteros amostrados no Brasil.

Ainda, nota-se que a positividade de *Bartonella* spp. ocorreu principalmente em espécies da família Phyllostomidae, sendo que as sequências obtidas ficaram próximas à sequências detectadas em quirópteros desta mesma família. Supõe-se que a transição de *Bartonella* spp. entre hospedeiros ocorrem com mais frequência em quirópteros na mesma família, mas as transições entre famílias, superfamílias ou subordens distintas é infrequente (MCKEE et al., 2016). A maioria dos animais amostrados pertencia à família Phyllostomidae (63,58% [103/163]), a qual apresentou maior representatividade.

Em relação à ocorrência de hemoplasmas em quirópteros, *Mycoplasma* spp. é pobremente descrito neste grupo de mamíferos. Hemoplasmas já foram detectados molecularmente em amostras de tecido esplênico da espécie *Myotis lucifugus* e em amostras de sangue de *Myotis capaccinii* e *Miniopterus schreibersii* (MASCARELLI et al., 2014; MILLÁN et al., 2015). O presente estudo traz a primeira detecção de hemoplasmas em oito espécies de quirópteros: *Artibeus planirostris*, *Eptesicus* sp., *Eumops auripendulus*, *Glossophaga soricina*, *Molossus molossus*, *Molossus rufus*, *Myotis nigricans* e *Sturnira liliium*. Destas espécies, *Molossus* spp. foi o principal grupo de quirópteros que apresentou positividade para hemoplasmas.

A ocorrência de hemoplasmas mostrou-se alta em pequenas populações de quirópteros amostrados nos Estados Unidos da América (47% [32/68]) (MASCARELLI et al., 2014) e Espanha (41,93% [13/31]) (MILLÁN et al., 2015). Interessantemente, embora genótipos de hemoplasmas detectados em ambos

os estudos mostraram proximidade filogenética entre si, posicionaram-se separadamente dos genótipos de *Mycoplasma* spp. detectados nos quirópteros do Brasil. Os genótipos de hemoplasmas detectados em exemplares da espécie *Molossus molossus* amostrados nos estados do Pará e Paraná alocaram-se como um grupo monofilético, suportado com alto valores de *bootstrap* e probabilidade posterior.

Enquanto os genótipos de hemoplasmas detectados no presente estudo relacionaram-se filogeneticamente à *Mycoplasma coccoides*, aqueles obtidos de quirópteros amostrados nos Estados Unidos da América e na Espanha se posicionaram no mesmo clado de '*Candidatus Mycoplasma haemohominis*', o qual foi detectado em um paciente humano na Inglaterra (STEER et al., 2011). Neste mesmo clado foi posicionada uma sequência de *Mycoplasma haemomuris* detectada em roedores domésticos, de laboratório e selvagens (NEIMARK et al., 2001). Baseado no seu posicionamento filogenético, os genótipos de hemoplasmas detectados em quirópteros no presente estudo mostram-se diferentes daqueles detectados anteriormente em quirópteros dos EUA e Espanha.

Apesar da maior positividade encontrada para hemoplasmas do que para *Bartonella* spp., apenas um animal da espécie *Glossophaga soricina*, amostrado no estado de Tocantins, mostrou-se coinfectado para ambos os patógenos estudados. O potencial patogênico destas bactérias para espécies de quirópteros necessita de mais estudos.

É importante ressaltar que tanto genótipos de *Bartonella* spp. como de *Mycoplasma* spp. detectados em quirópteros do presente estudo relacionaram-se filogeneticamente com aqueles previamente detectados em roedores. Partindo do aspecto evolutivo, quirópteros e roedores são grupos antigos de mamíferos e demonstram uma alta adaptação a diferentes grupos de patógenos (LEI e OLIVAL, 2014).

Finalmente e de modo geral, diversos fatores, tais como mudanças climáticas, poluição, urbanização, entre outros influenciam no carreamento e transmissão de patógenos (HARRUS e BANETH, 2005), sendo que estudos epidemiológicos, principalmente aqueles envolvendo animais selvagens, vêm se mostrando cada vez mais importantes na saúde humana e animal.

7. CONCLUSÕES

- ❖ *Bartonella* spp. e hemoplasmas circulam em quirópteros no Brasil;
- ❖ Detectou-se molecularmente pela primeira vez a infecção por *Bartonella* spp. em quiróptero da espécie *Natalus espirosantensis* e por hemoplasmas em oito espécies de quirópteros (*Artibeus planirostris*, *Eptesicus* sp., *Eumops auripendulus*, *Glossophaga soricina*, *Molossus molossus*, *Molossus rufus*, *Myotis nigricans* e *Sturnira lilium*);
- ❖ Os genótipos de *Bartonella* spp. detectados em morcegos amostrados no presente estudo mostraram-se filogeneticamente associados a genótipos de *Bartonella* spp. previamente detectados em outros quirópteros em outras regiões do mundo;
- ❖ Diferentes genótipos de *Bartonella* spp. ocorrem em quirópteros de diferentes regiões do Brasil,
- ❖ Os genótipos de hemoplasmas detectados em quirópteros formaram um grupo monofilético e distintos daqueles previamente descritos em morcegos amostrados nos Estados Unidos e Espanha.

8. REFERÊNCIAS

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, pp. 403-410, 1990. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2).

ANDRÉ, M. R.; DUMLER, J. S.; HERRERA, H. M.; GONCALVES, L. R.; DE SOUSA, K. C.; SCORPIO, D. G.; DE SANTIS, A. C. G. A.; DOMINGOS, I. H.; DE MACEDO, G. C.; Machado, R. Z. Assessment of a quantitative 5' nuclease real-time polymerase chain reaction using the nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase gamma subunit (*nuoG*) for *Bartonella* species in domiciled and stray cats in Brazil. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v.8, n.10, pp. 783-90. 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1177/1098612X15593787>.

ANDRÉ, M.R.; ADANIA, C.H.; ALLEGRETTI, S.M.; MACHADO, R.Z. Hemoplasmas in wild canids and felids in Brazil. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v.42, n.2, pp.42:342–347, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1638/2010-0198.1>.

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. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 7, pp. 1269-1272, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3201/eid1707.101867>

BAI, Y.; RECUENCO, S.; GILBERT, A. T.; OSIKOWICZ, L. M.; GO, J.; RUPPRECHT, C.; KOSOY, M. Y. Prevalence and diversity of *Bartonella* spp. in bats in Peru. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 87, n. 3, pp. 518–523, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.2012.12-0097>.

BERNARD, E. Diet, activity and reproduction of bat species (Mammalia, Chiroptera) in Central Amazonia, Brazil. *Revista Brasileira de Zoologia*, v.19, n. 1, pp. 173-188, 2002.

BERNARD, E.; AGUIAR, L. M. S.; MACHADO, R. B. Discovering the Brazilian bat fauna: a task for two centuries? **Mammal Review**, v. 41, n. 1, pp. 23-39, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2907.2010.00164.x>.

BERNARD, E.; TAVARES, V. C.; SAMPAIO, E. Updated compilation of bat species (Chiroptera) for the Brazilian Amazonia. **Biota Neotropical**, v. 11, n. 1, pp. 35-46, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S1676-06032011000100003>.

BERNARDI, I. P. **Morcegos Neotropicais: Padrões de Riqueza, Coocorrência e Aninhamento**. 2015. Tese (Doutorado em Ecologia e Conservação) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, 2015.

BILLETER, S. A.; LEVY, M. G.; CHOMEL, B. B.; BREITSCHWERDT, E. B. Vector transmission of *Bartonella* species on the potential for tick transmission. **Medical and Veterinary Entomology**, v.22, n.1, pp.1-15, 2008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2915.2008.00713.x>.

BIONDO, A.W.; DOS SANTOS, A.P.; GUIMARÃES, A.M.; VIEIRA, R.F.; VIDOTTO, O.; MACIEIRA, D.DEB.; ALMOSNY, N.R.; MOLENTO, M.B.; TIMENETSKY, J.; DE MORAIS, H.A.; GONZÁLEZ, F.H.; MESSICK, J.B. A review of the occurrence of hemoplasmas (hemotrophic mycoplasmas) in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária** (Online), v.18, n.3, pp.1-7, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.4322/rbpv.01803001>.

BIRKENHEUER, A. J.; LEVY, M. G.; BREITSCHWERDT, E. B. Development and evaluation of a seminested PCR for detection and differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) and *B. canis* DNA in canine blood samples. **Journal of clinical microbiology**, v. 41, n. 9, pp. 4172-4177, 2003. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.41.9.4172-4177.2003>.

BONATO, L.; FIGUEIREDO, M.A.; GONÇALVES, L.R.; MACHADO, R.Z.; ANDRÉ, M.R. Occurrence and molecular characterization of *Bartonella* spp. and hemoplasmas in neotropical primates from Brazilian Amazon. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v.42, pp. 15-20, 2015, 42:15–20. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cimid.2015.09.001>

BREITSCHWERDT, E. B.; KORDICK, D. L. *Bartonella* infection in animals: carriership, reservoir potential, pathogenicity, and zoonotic potential for human infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, n. 3, pp. 428–438, 2000.

BREITSCHWERDT, E. B.; MAGGI, R. G.; CHOMEL, B. B.; LAPPIN, M. R. Bartonellosis: an emerging infectious disease of zoonotic importance to animals and human beings. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 20, n. 1, pp. 8–30, 2010a. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1476-4431.2009.00496.x>.

BREITSCHWERDT, E.B. Did *Bartonella henselae* contribute to the deaths of two veterinarians? **Parasites and Vectors**, v.8, p.317, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-015-0920-4>.

BREITSCHWERDT, E.B.; MAGGI, R.G.; FARMER, P.; MASCARELLI, P.E. Molecular evidence of perinatal transmission of *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* and *Bartonella henselae* to a child. **Journal of Clinical Microbiology**, v.48, n.6, pp.2289-2293, 2010b. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00326-10>.

BREVIGLIERI, C. P. B. Influência do dossel na atividade de morcegos (Chiroptera: Phyllostomidae) em três fragmentos no estado de São Paulo. **Chiroptera Neotropical**, v. 17, n. 1, 2011. Disponível em: <http://189.126.110.61/chiroptera/article/view/12104/12822>.

BROOK, C.E.; BAI, Y.; DOBSON, A.P.; OSIKOWICZ, L.M.; RANAIVOSON, H.C.; ZHU, Q.; KOSOY, M.Y.; DITTMAR, K. *Bartonella* spp. in fruit bats and blood-feeding ectoparasites in Madagascar. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v.9, n.2, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0003532>.

BUSTIN, S.A., BENES, V., GARSON, J.A., HELLEMANS, J., HUGGETT, J., KUBISTA, M., MUELLER, R., NOLAN, T., PFAFFL, M.W., SHIPLEY, G.L., VANDESOMPELE, J., WITTEWER, C.T. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **American Association of Clinical Chemists**, v. 55, n. 4, pp. 611-622, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>.

CADENAS, M.B.; MAGGI, R.G.; DINIZ, P.P.; BREITSCHWERDT, K.T.; SONTAKKE, S.; BREITHSCHWERDT, E.B. Identification of bacteria from clinical samples using *Bartonella* alpha-Proteobacteria growth medium. **Journal of Microbiological Methods**, v.71, n.2, pp.147-155, 2007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2007.08.006>.

CHOMEL, B. B.; KASTEN, R. W.; HAWKINS, F.; CHI, B.; YAMAMOTO, K.; ROBERTS-WILSON, J.; GURFIELD, A. N.; ABBOTT, R. C.; PEDERSEN, N. C.; KOEHLER, J. E. Experimental transmission of *Bartonella henselae* by the cat flea. **Journal Clinical Microbiology**, Washington, v. 34, n. 8, p. 1952-1956, 1996.

CHOMEL, B.B.; BOULOUIS, H.J.; MARUYAMA, S.; BREITSCHWERDT, E.B. *Bartonella* spp. in pets and effect on human health. **Emerging Infectious Diseases**, v.12, n.3, pp.389-394, 2006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3201/eid1205.050931>.

COLBORN, J.M., KOSOY, M.Y., MOTIN, V.L., TELEPNEV, M.V., VALBUENA, G., MYINT, K.S., FOFANOV, Y., PUTONTI, C., FENG, C., PERUSKI L. Improved detection of *Bartonella* DNA in mammalian hosts and arthropod vectors by real-time PCR using the NADH dehydrogenase gamma subunit (*nuoG*). **American Society for Microbiology**, v. 48, n.12, pp. 4630- 4633, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00470-10>.

CONCANNON, R.; WYNN-OWEN, K.; SIMPSON, V. R.; BIRTLES, R. J. Molecular characterization of haemoparasites infecting bats (Microchiroptera) in Cornwall, UK. **Parasitology**, v. 131, pp. 489–496, 2005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1017/S0031182005008097>.

DARRIBA, D.; TABOADA, G. L.; DOALLO, R.; POSADA, D. ModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nature Methods**, v. 9, n. 8, pp. 772, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.2109>.

DAVOUST, B.; MARIÉ, J.L.; DAHMANI, M.; BERENGER, J.M.; BOMPAR, J.M.; BLANCHET, D.; CHEURET, M.; RAOULT, D.; MEDIANNIKOV, O. Evidence of *Bartonella* spp. in blood and ticks (*Ornithodoros hasei*) of Bats, in French Guiana. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 16, n. 8, pp. 516-519, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1089/vbz.2015>.

DIETRICH, M.; TJALE, M. A.; WEYER, J.; KEARNEY, T.; SEAMARK, E. C. J.; NEL, L. H.; MONADJEM, A.; MARKOTTER, W. Diversity of *Bartonella* and *Rickettsia* spp. in Bats and Their Blood-Feeding Ectoparasites from South Africa and Swaziland. **PLoS ONE**, v. 11, n. 3, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0152077>.

DOS SANTOS, A.P.; DOS SANTOS, R.P.; BIONDO, A.W.; DORA, J.M.; GOLDANI, L.Z.; DE OLIVEIRA, S.T.; DE SÁ GUIMARÃES, A.M.; TIMENETSKY, J.; DE MORAIS, H.A.; GONZÁLEZ, F.H.; MESSICK, J.B. Hemoplasma infection in HIV-positive patient, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v.14, n.12, pp.1922-1924, 2008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3201/eid1412.080964>.

DUNCAN, A.W.; MAGGI, R.G.; BREITSCHWERDT, E.B. A combined approach for the enhanced detection and isolation of *Bartonella* species in dog blood samples: pre-enrichment liquid culture followed by PCR and subculture onto agar plates. **Journal of Microbiological Methods**, v.62, n.2, pp. 273-281, 2007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2007.01.010>.

EUZÉBY, J.P. List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the Internet (List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. <http://www.bacterio.net>). **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.47, pp. 590-592, 1997. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1099/00207713-47-2-590>

EWING, B.; GREEN, P. Basecalling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Research**, v. 8, pp.186-194, 1998. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1101/gr.8.3.186>.

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M.; GREEN, P. Basecalling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, v. 8, pp. 175-185, 1998. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1101/gr.8.3.175>.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, v. 39, n. 4, pp. 783-791, 1985.

GALAN, M.; RAZZAUTI, M.; BARD, E.; BERNARD, M.; BROUAT, C.; CHARBONNEL, N.; DEHNE-GARCIA, A.; LOISEAU, A.; TATARD, C.; TAMISIER, L.; VAYSSIER-TAUSSAT, M.; VIGNES, H.; COSSON, J.F. 16S rRNA Amplicon Sequencing for Epidemiological Surveys of Bacteria in Wildlife. **mSystems**, v.1, n.4., 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1128/mSystems.00032-16>.

GIBBS, E. P. The evolution of One Health: a decade of progress and challenges for the future. **Veterinary Record**, n. 174, pp. 85-91, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1136/vr.g143>.

GLEZ-PEÑA, D.; GÓMEZ-BLANCO, D.; REBOIRO-JATO, M.; FDEZ-RIVEROLA, F.; POSADA D. ALTER: program-oriented conversion of DNA and protein alignments. **Nucleic Acids Research**, v. 38 (Web Server issue): pp.14-18, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkq321>.

GONÇALVES, L. R.; FAVACHO, A. R. M.; ROQUE, A. L.; MENDES, N. S.; JUNIOR, O. L. F.; BENEVENUTE, J. L.; HERRERA, H. M.; D'ANDREA, P. S.; LEMOS, E. R. S.; MACHADO, R. Z.; ANDRÉ, M. R. Association of *Bartonella* Species with Wild and Synanthropic Rodents in Different Brazilian Biomes. **Applied Environmental and Microbiology**, v. 82, pp.7154–7164, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.02447-16>.

GONÇALVES, L.R.; ROQUE, A.L.; MATOS, C.A.; FERNANDES, S.DEJ.; OLMOS, I.D.; MACHADO, R.Z.; ANDRÉ, M.R. Diversity and molecular characterization of novel hemoplasmas infecting wild rodents from different Brazilian biomes. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v.43, pp.50–56, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cimid.2015.10.006>.

GRAZZIOTIN, A.L.; DUARTE, J.M.; SZABÓ, M.P.; SANTOS, A.P.; GUIMARÃES, A.M.; MOHAMED, A.; VIEIRA, R.F.; DE BARROS FILHO, I.R.; BIONDO, A.W.; MESSICK, J.B. Prevalence and molecular characterization of *Mycoplasma ovis* in selected free-ranging brazilian deer populations. **Journal of Wildlife Diseases**, v.47, n.4, pp.1005–1011, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.7589/0090-3558-47.4.1005>.

GUINDON, S.; GASCUEL, O. A simple, fast and accurate method to estimate large phylogenies by maximum-likelihood. **Systematic Biology**, v. 52, pp. 696-704, 2003.

GUTIÉRREZ, R.; VAYSSIER-TAUSSAT, M.; BUFFET, J.P.; HARRUS, S. Guidelines for the Isolation, Molecular Detection, and Characterization of *Bartonella* Species. **Vector Borne Zoonotic Diseases**, v.17, n.1, pp.42-50, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1089/vbz.2016.1956>.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, pp. 95–98, 1999.

HAN, H.J.; WEN, H.L.; ZHAO, L.; LIU, J.W.; LUO, L.M.; ZHOU, C.M.; QIN, X.R.; ZHU, Y.L.; ZHENG, X.X.; YU, X.J. Novel *Bartonella* Species in Insectivorous Bats, Northern China. **PLoS One**, v.12, n.1, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0167915>.

HARRUS, S.; BANETH, G. Drivers for the emergence and re-emergence of vector-borne protozoal and bacterial diseases. **International Journal for Parasitology**, v.35, pp.1309–1318, 2005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2005.06.005>

HASEGAWA, M.; KISHINO, H.; YANO, T. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. **Journal of Molecular Evolution**, v. 22, n. 2, pp. 160-174, 1985.

JOHNSON, G.; AYERS, M.; MCCLURE, S. C. C.; RICHARDSON, S. E.; TELLIE, R. Detection and identification of *Bartonella* Species pathogenic for humans by PCR amplification targeting the riboflavin synthase gene (*ribC*). **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.41, n.3, pp.1069-1072, 2003. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.41.3.1069-1072.2003>.

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, pp. 990-993, 2008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nature06536>

JONES, K. E.; PURVIS, A.; MacLARNON, A.; BININDA-EMONDS, O. R. P.; SIMMONS, N. B. A phylogenetic supertree of the bats (Mammalia: Chiroptera). **Biological Reviews**, v. 77, pp. 223-259, 2002. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1017/S1464793101005899>.

JUDSON, S.D.; FRANK, H.K.; HADLY, E.A. Bartonellae are Prevalent and Diverse in Costa Rican Bats and Bat Flies. **Zoonoses Public Health**, v. 62, n. 8, pp. 609-617, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/zph.12188>.

KAMANI, J.; BANETH, G.; MITCHELL, M.; MUMCUOGLU, K.Y.; GUTIÉRREZ, R.; HARRUS, S. *Bartonella* species in bats (Chiroptera) and bat flies (Nycteribiidae) from Nigeria, West Africa. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 14, n. 1, pp. 625-632, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1089/vbz.2013.1541>.

KAWASATO, K. H. **Padronização de sistemas de dupla amplificação para detecção de DNA de *Bartonella henselae* em casos suspeitos de bartonelose humana**. 2009. (Mestrado em Medicina) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, 2009.

KOSOY, M.; BAI, Y.; LYNCH, T.; KUZMIN, I. V.; NIEZGODA, M.; FRANKA, R.; AGWANDA, B.; BREIMAN, R. F.; RUPPRECHT, C. E. *Bartonella* spp. in bats, Kenya. **Emerging Infectious Diseases**, v.16, n.12, pp. 1875-1881, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3201/eid1612.100601>.

KUNZ, T. H.; KURTA, A. Capture Methods and holding devices. In: Kunz, T. H. (eds.) **Ecological and behavioural methods for the study of bats**. Washington/London: Smithsonian Institution Press, 1988, p. 1-29.

LAMAS, C.; CURI, A.; Bóia, M. N.; LEMOS, E. R. S. Human Bartonellosis: seroepidemiological and clinical features with an emphasis on data from Brazil – A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.103, n.3, pp.221-235, 2008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762008000300001>.

LEI, B.R.; OLIVAL, K.J. Contrasting Patterns in Mammal–Bacteria Coevolution: *Bartonella* and *Leptospira* in Bats and Rodents. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v.8, n.3, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0002738>.

LEULMI, H.; AOUADI, A.; BITAM, I.; BESSAS, A.; BENAKHLA, A.; RAOULT, D.; PAROLA, P. Detection of *Bartonella tami*, *Coxiella burnetii* and rickettsiae in arthropods and tissues from wild and domestic animals in northeastern Algeria. **Parasites & Vectors**, v. 9, n.27, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-016-1316-9>.

LILLEY, T. M.; VEIKKOLAINEN, V.; PULLIAINEN, A. T. Molecular Detection of *Candidatus Bartonella hemsundetiensis* in Bats. **Vector-borne and Zoonotic Disease**, v. 15, n. 11, pp. 706-708, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1089/vbz.2015.1783>.

LIN, J. W.; CHEN, C. M.; CHANG, C. C. Unknown Fever and Back Pain Caused by *Bartonella henselae* in a Veterinarian After a Needle Puncture: A Case Report and Literature Review. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 11, n. 5, pp. 589-591, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1089/vbz.2009.0217>.

LIN, J. W.; HSU, Y. M.; CHOMEL, B. B.; LIN, L. K.; PEI, J. C. WU, S. H.; CHANG, C. C. Identification of novel *Bartonella* spp. in bats and evidence of Asian gray shrew as a new potential reservoir of *Bartonella*. **Veterinary Microbiology**, v.156, pp. 119–126, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.09.031>.

LIU, J.; ZHOU, D.; CHENG, Z.; WANG, Z.; WANG, L.; WANG, S.; YANG, D.; CHAI, T. Development and evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay based on recombinant inorganic pyrophosphatase gene antigen for the detection of *Mycoplasma suis* antibodies. **Research in Veterinary Science**, v.93, n.1, pp.48-50, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2011.08.016>.

MACO, V.; MAGUIÑA, C.; TIRADO, A.; MACO C., V. & VIDAL, J.E. Carrion's disease (*Bartonellosis bacilliformis*) confirmed by histopathology in the High Forest of Peru. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 46, n. 3, pp.171-174, 2004. Disponível em: <http://dx.doi.org/S0036-46652004000300010>

MAGGI, R.G.; BREITSCHWERDT, E.B. Isolation of bacteriophages from *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* and the characterization of *pap-31* gene sequences from bacterial and phage DNA. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v.9, n.1, pp.44–51, 2005b. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1159/000088145>

MAGGI, R.G.; BREITSCHWERDT, E.B. Potential limitations of the 16S-23S rRNA intergenic region for molecular detection of *Bartonella* species. **Journal of clinical microbiology**, v. 43, n.3, pp.1171-1176, 2005a. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.43.3.1171-1176.2005>.

MAGGI, R.G.; CHITWOOD, M.C.; KENNEDY-STOSKOPF, S.; DEPERNO, C.S. Novel hemotropic Mycoplasma species in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v.36, pp.607-611, 2013b. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cimid.2013.08.001>.

MAGGI, R.G.; COMPTON, S.M.; TRULL, C.L.; MASCARELLI, P.E.; MOZAYENI, B.R.; BREITSCHWERDT, E.B. Infection with Hemotropic Mycoplasma Species in Patients with or without Extensive Arthropod or Animal Contact. *Journal of Clinical Microbiology*, v.51, n.10, pp. 3237–2324, 2013a. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01125-13>.

MAGGI, R.G.; DUNCAN, A.W.; BREITSCHWERDT, E.B. Novel chemically modified liquid medium that will support the growth of seven *bartonella* species. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n.6, pp. 2651-2655, 2005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.43.6.2651-2655.2005>.

MANNERINGS, A. O.; OSIKOWICZ, L. M.; RESTIF, O.; NYARKO, E.; SUIRE, R.; CUNNINGHAM, A. A.; WOOD, J. L. N.; KOSOY, M. Y. Exposure to Bat-Associated *Bartonella* spp. among Humans and Other Animals, Ghana. **Emerging Infectious Diseases**, v.22, n.5, p. 922-924, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3201/eid2205.151908>.

MASCARELLI, P.E.; KEEL, M.K.; YABSLEY, M.; LAST, L.A.; BREITSCHWERDT, E.B.; MAGGI, R.G. Hemotropic mycoplasmas in little brown bats (*Myotis lucifugus*). **Parasites & Vectors**, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/1756-3305-7-117>.

MCKEE, C.D.; HAYMAN, D.T.S.; KOSOY, M.Y.; WEBB, C.T. Phylogenetic and geographic patterns of *bartonella* host shifts among bat species. **Infection, Genetics and Evolution**, v.44, pp.382–394, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2016.07.033>

MESSICK, J.B. Hemotropic mycoplasmas (hemoplasmas): a review and new insights into pathogenic potential. **Veterinary Clinical Pathology**, v.33, n.1, pp.2-13, 2004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1939-165X.2004.tb00342.x>.

MESSICK, J.B.; SANTOS, A.P. Identification, bioinformatics analyses, and expression of immunoreactive antigens of *Mycoplasma haemofelis*. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.18, n.8, pp.1275-1281, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1128/CVI.05060-11>.

MILLÁN, J.; LÓPEZ-ROIG, M.; DELICADO, V.; SERRA-COBO, J.; ESPERÓN, F. Widespread infection with hemotropic mycoplasmas in bats in Spain, including a hemoplasma closely related to “*Candidatus* Mycoplasma hemohominis”. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v.39, pp.9-12, 2015, 39:9-12. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cimid.2015.01.002>.

MILLER, M. A.; PFEIFFER, W.; SCHWARTZ, T. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees In **Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE)**, pp. 01-08, 2010

MOREIRA, N. S. ***Bartonella, Ehrlichia e Rickettsias do Grupo da Febre Maculosa em Cães e em Artrópodes: Um Estudo na Região do Médio Paraíba, Estado do Rio de Janeiro.*** 2011. 82 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense, Niterói, Rio de Janeiro, 2011.

MORSE, S. F.; OLIVAL, K. J.; KOSOY, M.; BILLETER, S.; PATTERSON, B. D.; DICK, C. W.; DITTMAR, K. Global distribution and genetic diversity of *Bartonella* in bat flies (Hippoboscoidea, Streblidae, Nycteribiidae). **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, pp. 1717–1723, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2012.06.009>.

MÜHLDORFER K. Bats and Bacterial Pathogens: A Review. **Zoonoses and Public Health**, v. 60, n.1, pp. 93–103, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1863-2378.2012.01536.x>.

MURPHY, W. J.; EIZIRIK, E.; O'BRIEN, S. J.; MADSEN, O.; SCALLY, M.; DOUADY, C. J.; TEELING, E.; RYDER, O. A.; STANHOPE, M. J.; JONG, W. W.; SPRINGER, M. S. Resolution of the Early Placental Mammal Radiation Using Bayesian Phylogenetics. **Science**, v. 294, pp. 2348-2350, 2001. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1126/science.1067179>.

NEIMARK, H.; JOHANSSON, K.E.; RIKIHISA, Y.; TULLY, J.G. Proposal to transfer some members of the genera *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* to the genus *Mycoplasma* with descriptions of '*Candidatus Mycoplasma haemofelis*', '*Candidatus Mycoplasma haemomuris*', '*Candidatus Mycoplasma haemosuis*' and '*Candidatus Mycoplasma wenyonii*'. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.51, pp.891-899, 2001. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1099/00207713-51-3-891>.

NGUYEN, L. T.; SCHMIDT, H. A.; VON HAESELER, A.; MINH, B. Q. IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum likelihood phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**, n. 32, pp. 268-274, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msu300>.

NORMAN, A.F.; REGNERY, R.; JAMENSON, P.; GREENE, C.; KRAUSE, D.C. Differentiation of *Bartonella*-like isolates at the species level by PCR restriction fragment length polymorphism in the citrate synthase gene. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.33, n.7, pp.1797-1803, 1995.

NOVACCO, M.; MELI, M.L.; GENTILINI, F.; MARSILIO, F.; CECI, C.; PENNISI, M.G.; LOMBARDO, G.; LLORET, A.; SANTOS, L.; CARRAPIÇO, T.; WILLI, B.; WOLF, G.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R. Prevalence and geographical distribution of canine hemotropic mycoplasma infections in Mediterranean countries and analysis of risk factors for infection. **Veterinary Microbiology**, v.142, pp.276–284, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.09.069>.

OLIVAL K. J.; DITTMAR, K.; BAI, Y.; ROSTAL, M. K.; LEI, B. R.; DASZAK, P.; KOSOY, M. *Bartonella* spp. in a Puerto Rican Bat Community. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 51, n. 1, pp. 274-278, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.7589/2014-04-113>.

OLIVEIRA, A.M.; MAGGI, R.G.; WOODS, C.W.; BREITSCHWERDT, E.B. Suspected needle stick transmission of *Bartonella vinsonii* subspecies *berkhoffii* to a veterinarian. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.24, n.5, pp.1229-1232, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1939-1676.2010.0563.x>.

PACHECO, S. M.; SODRÉ, M.; GAMA, A.R; BREDT, A.; SANCHES, E. M. C.; ROSANE V. MARQUES, R. V.; GUIMARÃES, M. M.; BIANCONI, G. Morcegos Urbanos: Status do Conhecimento e Plano de Ação para a Conservação no Brasil. **Chiroptera Neotropical**, v. 16, n. 1, 2010. Disponível em: <http://chiropteraneotropical.net/index.php/cn/article/view/248>.

PASSOS, F. C.; MIRANDA, J. M. D.; BERNARDI, I. P.; OLIVEIRA, N. Y. K.; MUNSTER, L. C. Morcegos da Região Sul do Brasil: análise comparativa da riqueza de espécies, novos registros e atualizações nomenclaturais (Mammalia, Chiroptera) **Iheringia. Série Zoologia**, v. 100, n. 1, pp. 25-34, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0073-47212010000100004>.

PAZIEWSKA, A., HARRIS, P.D., ZWOLIŃSKA, L., BAJER, A., SIŃSKI, E. Recombination within and between species of the alpha proteobacterium *Bartonella* infecting rodents. **International Society for Microbial Ecology**, v.61, n.1, pp.134-145, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00248-010-9735-1>.

PERACCHI, A. L.; LIMA, I. P.; REIS, N. R.; NOGUEIRA, M. R.; FILHO, H. O. Capítulo 07: Ordem Chiroptera. In: REIS, N. R.; PERACCHI, A. L.; PEDRO, W. A.; LIMA, I. P. (eds) Mamíferos do Brasil. Londrina: UEL, 2006. Cap. 07, p.153-155.

PERACCHI, A. L.; NOGUEIRA, M. R. Lista anotada dos morcegos do Estado do Rio de Janeiro, sudeste do Brasil. **Chiroptera Neotropical**, v. 16, n. 1, p. 508-519, 2010.

PITASSI, L. H. U. ***Bartonella* spp. and the Potencial Risk of Transmission by Blood Transfusion**. 2013. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) – Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, 2013.

PITASSI, L. H.; DINIZ, P. P. V. P.; SCORPIO, D. G.; DRUMMOND, M. R.; LANIA, B. G.; CASTRO, M. L. B.; GILIOLI, R.; COLOMBO, S.; SOWY, S.; BREITSCHWERDT, E. B.; NICHOLSON, W. L.; VELHO, P. E. N. F. *Bartonella* spp. bacteremia in blood donors from Campinas, Brazil. **Neglected Tropical Disease**, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0003467>.

POSADA, D. Chapter 6: Unit6.15 Using Modeltest and PAUP* to select a model of nucleotide substitution. In: BAXEVANIS, A.D.; DAVISON, D.B.; PAGE, R.D.M.; PETSKO, G.A.; STEIN, L.D.; STORMO, G.D. (eds.) **Current Protocols in Bioinformatics**. New York: John Wiley & Sons, 2003.

POSADA, D.; BUCKLEY, T.R. Model Selection and Model Averaging in Phylogenetics: Advantages of Akaike Information Criterion and Bayesian Approaches Over Likelihood Ratio Tests. **Systematic Biology**, v. 53, pp. 793–808, 2004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/10635150490522304>.

REAGAN, K.L.; CLARKE, L.L.; HAWLEY, J.R.; LIN, P.; LAPPIN, M.R. Assessment of the ability of *Aedes* species mosquitoes to transmit feline *Mycoplasma haemofelis* and 'Candidatus *Mycoplasma haemominutum*'. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1177/1098612X16658317>.

REIS, N.R.; SHIBATTA, O.A.; PERACCHI, A.L.; PEDRO, W.A.; LIMA, I.P. Capítulo 01: Sobre os Morcegos Brasileiros. In: _____ (Eds) **Morcegos do Brasil**. Londrina: UEL, 2007. Cap. 01, p.17-24.

RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, v. 19, n. 12, pp. 1572-1574, 2003. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btg180>.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, n. 12, pp. 5463-5467, 1977.

SANTOS, L.C.; CUBILLA, M.P.; DE MORAES, W.; CUBAS, Z.S.; OLIVEIRA, M.J.; ESTRADA, M.; LEUTENEGGER, C.M.; SYKES, J.E.; LINDSAY, L.L.; MARCONDES, M.; BARROS FILHO, I.R.; BIONDO, A.W. Hemotropic mycoplasma in a free-ranging black howler monkey (*Alouatta caraya*) in Brazil. **Journal of Wildlife Diseases**, v.49, n.3, pp. 728-731, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.7589/2012-06-159>.

SCHIPPER, J.; CHANSON, J.S.; CHIOZZA, F.; *et al.* The Status of the World's Land and Marine Mammals: Diversity, Threat, and Knowledge. **Science**, v. 322, n. 5899, pp. 225-230, 2008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1126/science.1165115>.

SILVA, M.N.; VIEIRA-DAMIANI, G.; ERICSON, M.E.; GUPTA, K.; GILIOLI, R.; DE ALMEIDA, A.R.; DRUMMOND, M.R.; LANIA, B.G.; DE ALMEIDA LINS K.; SOARES, T.C.; VELHO, P.E. *Bartonella henselae* transmission by blood transfusion in mice. **Transfusion**, v.56, n.6 pt 2, pp.1556-1559, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/trf.13545>.

SONG, S.; LIU, L.; EDWARDS, S. V.; WU, S. Resolving conflict in eutherian mammal phylogeny using phylogenomics and the multispecies coalescent model. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 37, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/doi/10.1073/pnas.1211733109>.

STEER, J.A.; TASKER, S.; BARKER, E.N.; JENSEN, J.; MITCHELL, J.; STOCKI, T.; CHALKER, V.J.; HAMON, M. A novel hemotropic *Mycoplasma* (hemoplasma) in a patient with hemolytic anemia and pyrexia. **Clinical Infectious Diseases**, v.53, n.11, pp. 147-151, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1093/cid/cir666>.

STOVER, B. C.; MULLER, K. F. TreeGraph 2: Combining and visualizing evidence from different phylogenetic analyses. **BMC Bioinformatics**, v. 11, n. 7, pp. 01-09, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2105-11-7>

SYKES, J.E.; LINDSAY, L.L.; MAGGI, R.G.; BREITSCHWERDT, E.B. Human Coinfection with *Bartonella henselae* and Two Hemotropic Mycoplasma Variants Resembling *Mycoplasma ovis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.48, n.10, pp. 3782-3785, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01029-10>.

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, n. 3, pp. 12-526, 1993.

TASKER S. Clinical Review: Haemotropic Mycoplasmas What's their real significance in cats? **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v.12, pp.369-381, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfms.2010.03.011>.

TASKER, S.; LAPPIN, M.R. *Haemobartonella felis*: recent developments in diagnosis and treatment. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v.4, pp.3-11, 2002. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1053/jfms.2001.0155>.

TAVARÉ, S. Some Probabilistic and Statistical Problems in the Analysis of DNA Sequences. **Lectures on Mathematics in the Life Sciences**, v. 17, 1986.

TAYLOR, L.H.; LATHAM, S.M.; WOOLHOUSE, M.E. Risk factors for human disease emergence. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v.356, n.1411, pp.983-989, 2001. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2001.0888>.

TELFORD III, S.R.; WORMSER, G.P. *Bartonella* spp. transmission by ticks not established. **Emerging Infectious Diseases**, v.16, n.3, pp.379-384, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3201/eid1603.090443>.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, n. 22 pp. 1673-4680, 1994.

TRIFINOPOULOS, J.; NGUYEN, L.T.; VON HAESLER, A.; MINH, B.Q. W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. **Nucleic Acids Research**, n. 44, pp. 232-235, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkw256>.

VEIKKOLAINEN, V.; VESTERINEN, V. J.; LELLEY, T. M.; PULLIAINEN, A. T. Bats as reservoir hosts of human bacterial pathogen, *Bartonella mayotimonensis*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 20, n. 6, pp. 960-967, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3201/eid2006.130956>

VELHO, P. E. N. F. **Estudo das bartoneloses humanas e da *Bartonella henselae*: infecção experimental, microbiologia, microscopia de luz e eletrônica de transmissão**. 2001. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) – Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, 2001.

VELHO, P. E. N. F.; MARIOTTO, A.; SOUZA, E. M.; MORAES, A. M.; CINTRA, M. L. Angiomatose bacilar: revisão da literatura e documentação iconográfica. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 78, n. 5, pp. 601-609, 2003.

VIEIRA, R.F.; MOLENTO, M.B.; DOS SANTOS, L.C.; MORAES, W.; CUBAS, Z.S.; SANTOS, A.P.; GUIMARAES, A.M.; MOHAMED, A.; BARROS FILHO, I.R.; BIONDO, A.W.; MESSICK, J.B. Detection of a novel hemoplasma based on 16S rRNA gene DNA in captive and free-ranging capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*). **Veterinary Microbiology**, v.139, n.3-4, pp.410-413, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.06.018>.

VIEIRA, R.F.C.; VIDOTTO, O.; VIEIRA, T.S.W.J.; GUIMARAES, A.M.S.; SANTOS A.P.; NASCIMENTO, N.C.; SANTOS N.J.; MARTINS T.F.; LABRUNA M.B.; MARCONDES M.; BIONDO, A.W.; MESSICK, J.B. Molecular Investigation of Hemotropic Mycoplasmas in Human Beings, Dogs and Horses in a Rural Settlement in Southern Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v.57, n.4, pp.353–357, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0036-46652015000400014>.

VIEIRA-DAMIANI, G. V.; DINIZ, P. P. V. P.; PITASSI, L. H. U.; SOWY, S. SCORPIO, D.G.; LANIA, B. G.; DRUMMOND, M. R.; SOARES, T. C. B.; CASTRO, M. L. B.; BREITSCHWERDT, E. B.; NICHOLSON, W. L.; VELHO, P. E. N. F. *Bartonella clarridgeiae* bacteremia detected in an asymptomatic blood donor. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, n.1, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00934-14>.

WRAY, A.K.; OLIVAL, K.J.; MORÁN, D.; LOPEZ, M.R.; ALVAREZ, D.; NAVARRETE-MACIAS, I.; LIANG, E.; SIMMONS, N.B.; LIPKIN, W.I.; DASZAK, P.; ANTHONY, S.J. Viral Diversity, Prey Preference, and Bartonella Prevalence in *Desmodus rotundus* in Guatemala. **EcoHealth**, v.13, n. 4, pp. 761-774, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s10393-016-1183-z>.

ZEAITER, Z.; FOURNIER, P-E.; OGATA, H.; RAOULT, D. Phylogenetic classification of *Bartonella* species by comparing *groEL* sequences. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, n., pp.165-171, 2002. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1099/00207713-52-1-165>.

ANEXOS

Anexo I. Resultados de quantificação (ng/ μ L) e relações 260/280 e 260/230 obtidos por meio do aparelho Nanodrop (Thermo Scientific®) das amostras de DNA extraídas de Baço (B) e Fígado (F) dos quirópteros amostrados no estado do Pará.

Amostra	Concentração (ng/μL)	260/280	260/230
38505 B	63,4	1,89	2,99
38598 B	165,5	1,90	2,59
38706 B	111,8	1,89	2,43
37914 B	55,0	1,95	3,20
38798 B	28,7	2,18	8,19
38597 B	473,8	1,88	2,44
38438 B	31,4	2,16	7,32
38564 B	27,7	2,08	7,90
38596 B	136,7	1,91	2,73
38294 B	136,8	1,91	2,39
38293 B	38,5	1,98	2,29
38794 B	22,9	2,57	-21,32
38297 B	230,2	1,89	2,39
37936 B	136,7	1,92	2,63
38705 B	304,1	1,90	2,43
37928 B	613,4	1,86	2,30
38281 B	64,8	1,97	3,03
37689 B	399,6	1,88	3,45
37632 B	2,7	-7,47	-0,30
38019 B	32,9	2,00	5,15
37836 B	136,8	1,91	2,90
38799 B	95,0	1,98	2,79
38292 B	42,3	2,04	2,24
38278 B	726,2	1,84	2,39
37665 B	2,3	-2,91	0,28
38797 B	46,6	2,01	3,77
37605 B	725,0	1,83	2,36
38323 B	619,2	1,84	2,32
38199 B	19,9	2,36	2,91
38198 B	130,7	1,89	2,56
38283 B	389,3	1,88	2,47
37555 B	6,7	4,80	-1,21
38197 B	8,8	3,03	-1,73
37891 B	7,2	4,54	-1,91
38020 B	25,5	2,09	13,12
38505 B	506,5	1,87	2,42
37937 B	75,5	1,92	3,06
38017 B	256,3	1,88	2,55

Continua...

...continuação

38299 B	43,7	1,95	2,57
37892 B	579,6	1,85	2,35
38301 B	30,7	2,06	6,46
38430 B	85,6	1,93	2,90
38796 B	29,7	2,20	8,10
38340 B	29,2	2,18	4,21
37893 B	495,3	1,87	2,41
38295 B	84,0	1,89	3,15
37890 B	349,6	1,89	2,49
39226 B	80,9	1,87	2,17
38737 B	871,9	1,83	2,32
37841 B	39,9	1,93	1,63
38226 F	363,2	1,91	1,93
38299 F	103,7	1,89	2,03
37928 F	254,2	2,03	2,11
38197 F	139,5	2,03	2,08
38300 F	117,2	1,95	1,96
37937 F	169,5	1,94	2,13
38339 F	187,2	2,06	2,05
38562 F	157,9	1,86	1,75
38019 F	21,4	2,09	2,48
38504 F	358,4	1,99	2,17
38323 F	645,2	1,94	2,01
37632 F	83,8	0,73	0,96
38020 F	348,9	1,98	1,94
38292 F	142,2	2,06	2,12
38284 F	103,1	0,77	1,01
37892 F	315,8	1,97	2,19
38564 F	98,6	1,77	1,66
38303 F	31,8	1,43	1,47
38598 F	120,4	1,94	2,07
37884 F	28,4	1,68	0,96
37841 F	12,6	1,86	0,70
38706 F	79,5	2,06	2,15
37914 F	527,9	1,89	2,01
38198 F	167,1	1,99	2,00
37893 F	348,1	2,04	1,88
37836 F	117,1	1,90	2,25
37987 F	136,5	1,85	1,52
38281 F	95,4	1,08	1,25
38295 F	48,8	1,94	1,90
38796 F	237,7	2,05	1,94
38297 F	201,2	2,01	1,82

Continua...

...continuação

38315 F	147,2	0,75	0,92
38294 F	102,8	1,96	1,69
38296 F	141,6	1,95	2,12
38797 F	259,4	2,04	1,96
38798 F	409,5	2,05	1,93
38505 F	406,9	1,94	2,12
38293 F	857,0	1,94	1,88
38301 F	214,9	1,91	1,99
37555 F	88,6	1,86	1,99
37890 F	584,5	1,98	2,02
38596 F	199,7	1,91	2,15
38438 F	385,1	1,87	1,55
38283 F	24,3	1,93	1,41
38705 F	212,6	2,03	2,10
37685 F	6,2	1,92	1,09
37930 F	290,4	2,03	2,08
38017 F	391,0	1,88	2,18
38199 F	304,0	2,04	2,04
38799 F	442,5	2,05	2,07
37891 F	128,3	1,71	1,95
37005 F	274,8	1,98	2,08
38794 F	285,1	2,05	2,50
38278 F	41,2	1,83	1,35
38340 F	381,7	2,06	2,06
38436 F	38,8	2,00	1,87
38795 F	308,6	2,05	2,14
38597 F	151,7	1,96	2,01
37667 F	52,6	0,78	1,04
37666 F	3,0	2,12	0,88
38298 F	154,6	1,98	2,02
37665 F	2,6	3,30	1,15
38302 F	66,2	1,99	1,76
38737 F	311,8	1,94	2,16
Média	202,17	1,85	2,15

Anexo II. Resultados de quantificação (ng/ μ L) e relações 260/280 e 260/230 obtidos por meio do aparelho Nanodrop (Thermo Scientific®) das amostras de DNA extraídas de Baço (B), Fígado (F) e Coração (C) dos quirópteros amostrados no estado do Paraná.

Amostra		Concentração (ng/ μ L)	260/280	260/230
MGPA 01	B	53,2	1,84	1,99
	F	125,3	2,01	1,92
	C	63,0	1,89	1,94
MGPA 02	B	88,9	1,87	1,66
	F	157,4	2,03	1,93
	C	48,0	1,97	1,25
MGPA 03	B	92,8	1,87	2,16
	F	102,8	1,95	1,55
	C	44,7	2,00	1,85
MGPA 04	B	94,9	1,87	2,06
	F	181,4	2,03	2,00
	C	30,3	2,01	1,25
MGPA 05	B	23,8	2,08	1,57
	F	162,7	2,03	2,06
	C	29,0	2,12	2,01
MGPA 06	B	70,8	1,90	1,98
	F	92,0	2,04	1,82
	C	46,2	2,04	1,52
MGPA 07	B	93,6	1,89	2,27
	F	115,5	1,96	1,80
	C	30,5	2,00	1,79
MGPA 08	B	34,3	2,03	2,09
	F	124,1	2,04	1,86
	C	47,1	1,93	1,20
MGPA 09	B	28,2	1,97	2,03
	F	84,2	1,99	1,90
	C	33,3	2,03	1,47
MGPA 10	B	55,0	1,91	2,17
	F	124,8	2,02	1,94
	C	43,7	1,94	1,49
MGPA 11	B	49,9	1,94	1,90
	F	102,6	2,01	1,79
	C	42,0	1,99	1,05
MGPA 12	B	76,1	1,93	1,75
	F	234,8	1,92	1,19
	C	52,1	1,99	1,68

Continua...

...continuação

MGPA 13	B	36,4	1,95	1,71
	F	221,2	1,99	1,72
	C	71,4	2,01	1,79
MGPA 14	F	185,4	1,91	1,17
	B	54,9	1,87	1,87
	C	50,2	2,00	1,45
MGPA 15	F	66,7	1,95	1,87
	B	59,3	1,89	2,17
	C	46,4	1,91	1,01
MGPA 16	F	169,9	1,88	1,20
	B	61,9	1,93	2,16
	C	52,6	1,97	1,76
MGPA 17	F	163,7	2,02	1,82
	B	45,9	1,97	1,85
	C	69,5	1,99	1,82
MGPA 18	F	146,9	1,85	1,06
	B	52,0	2,02	2,50
	C	26,9	2,07	1,38
MGPA 19	F	109,7	1,85	0,99
	B	52,0	1,81	1,30
	C	45,4	1,82	1,00
MGCE 20	F	164,5	1,96	1,42
	B	72,7	1,86	1,98
	C	27,3	1,85	1,09
MGFC 21	F	347,,4	1,85	0,99
	B	94,1	1,90	2,11
	C	48,5	1,91	1,98
MGPA 22	F	230,1	2,02	1,62
	B	78,4	1,95	2,13
	C	28,9	1,91	1,46
MGPA 23	F	226,4	1,96	1,69
	B	146,7	1,88	2,18
	C	73,3	1,95	1,82
MGPA 24	F	362,1	1,90	1,17
	B	147,5	1,91	2,21
	C	56,0	1,94	1,66
MGPA 25	F	271,9	1,96	1,30
	B	235,7	1,92	2,18
	C	69,3	1,91	1,38
MGPA 26	F	254,5	1,94	1,26
	B	121,9	2,00	2,02
	C	54,8	2,09	1,70

Continua...

...continuação

MGPA 27	F	128,6	2,04	1,92
	B	87,5	1,91	2,11
	C	40,2	2,09	1,70
MGPA 28	F	286,5	1,88	1,05
	B	69,0	1,90	2,16
	C	52,9	2,05	1,75
MGPA 29	F	161,2	2,00	1,56
	B	25,7	1,97	1,88
	C	66,8	1,99	1,77
MGPA 30	F	154,6	1,85	0,99
	B	148,8	1,94	2,16
	C	48,2	2,10	1,76
MGPA 31	F	224,1	1,88	0,91
	B	60,8	1,94	2,10
	C	38,8	2,13	1,14
MGPA 32	F	219,2	1,87	1,06
	B	153,1	1,90	2,25
	C	64,8	2,01	1,88
MGPA 33	F	143,5	1,86	0,82
	B	74,2	1,86	2,22
	C	88,1	2,00	1,86
MGPA 34	F	228,9	1,81	0,89
	B	88,7	1,89	1,72
	C	53,9	2,05	1,22
MGPA 35	F	217,2	1,91	1,17
	B	175,9	1,92	2,13
	C	63,8	2,04	1,56
MGPA 36	F	286,7	1,93	1,53
	B	124,6	1,91	2,29
	C	56,9	2,06	1,84
MGPA 37	F	182,1	2,02	2,05
	B	167,3	1,90	2,21
	C	46,2	2,06	1,34
MGPA 38	F	327,9	2,00	1,99
	B	137,4	1,89	2,29
	C	48,0	2,06	1,69
MGPA 39	F	167,0	2,02	1,85
	B	99,2	1,87	2,18
	C	26,2	1,91	1,36
MGPA 40	F	162,5	1,97	1,80
	B	48,0	1,93	1,80
	C	74,8	1,97	2,09

Continua...

...continuação

MGCG 41	F	79,2	1,93	1,58
	B	81,9	1,85	2,21
	C	42,0	1,99	2,05
MGPA 42	F	188,7	1,85	1,00
	B	42,8	2,04	2,39
	C	26,6	2,09	1,43
MGPA 43	F	63,4	1,96	1,03
	B	56,5	2,07	2,17
	C	52,7	2,05	0,99
MGPA 44	F	335,5	1,84	0,97
	B	119,4	1,93	1,95
	C	27,7	2,07	0,38
MGPA 45	F	526,4	1,88	1,19
	B	134,7	1,97	2,10
	C	20,1	2,31	1,55
MGPA 46	F	214,1	2,03	1,96
	B	152,7	1,92	2,26
	C	57,1	2,01	1,57
MGPA 47	F	344,7	1,87	0,90
	B	157,4	1,94	2,22
	C	61,6	1,99	2,09
MGPA 48	F	314,0	1,87	0,75
	B	154,1	1,95	2,10
	C	158,6	1,94	2,10
MGPA 49	F	214,4	2,02	2,00
	B	201,3	1,96	2,23
	C	48,7	2,08	2,19
MGPA 50	F	244,0	1,96	1,81
	B	124,9	1,94	1,97
	C	78,0	2,04	1,72
Média		117,92	1,95	1,72

Anexo III. Resultados de quantificação (ng/ μ L) e relações 260/280 e 260/230 obtidas por meio do aparelho Nanodrop (Thermo Scientific®) das amostras de DNA extraídas de Baço (B), Fígado (F) e Coração (C) de quirópteros recebidos pelo Setor de Animais Selvagens do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da FCAV-UNESP.

Amostra	Concentração (ng/μL)	260/280	260/230
unesp 01 F	282,5	2,05	2,08
unesp 01 B	58,9	1,92	1,60
unesp 01 C	97,1	1,98	2,03
unesp 02 F	198,3	1,94	2,09
unesp 02 B	91,4	1,84	2,42
unesp 02 C	93,6	1,92	2,05
unesp 03 F	128,6	2,03	2,22
unesp 03 B	59,1	1,81	1,88
unesp 03 C	59,9	1,93	2,36
unesp 04 F	210,3	2,01	2,15
unesp 04 B	88,5	1,91	2,23
uneso 04 C	125,3	1,98	2,24
unesp 05 F	333,9	1,94	1,17
unesp 05 B	98,1	1,94	2,28
unesp 05 C	53,7	2,06	2,18
unesp 06 F	385,2	2,03	2,16
unesp 06 B	87,5	1,93	2,53
unesp 06 C	68,0	2,11	2,03
Média	139,99	1,96	2,09

Anexo IV. Resultado de quantificação (ng/ μ L) e relações 260/280 e 260/230 obtidas por meio do aparelho Nanodrop (Thermo Scientific®) das amostras de DNA cedidas pela Profa. Dra. Marta Maria Geraldine Teixeira, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (USP-SP).

Amostra	Concentração (ng/μL)	260/280	260/230
MTMO19	3,9	1,85	0,55
MTMO20	3,9	2,18	0,65
MTMO21	1,9	1,72	0,37
MTMO22	3,8	1,15	0,22
MTMO23	2,3	1,71	0,42
MTMO24	2,4	1,99	0,3
MTMO25	3,0	2,27	0,4
MTMO26	3,6	1,79	0,41
MTMO28	2,8	1,34	0,2
MTMO29	2,8	1,4	0,42
MTMO31	5,1	1,65	0,52
MTMO32	5,4	1,42	0,55
MTMO33	4,4	1,33	0,42
MTMO34	4,0	1,48	0,31
MTMO35	3,0	1,44	0,45
MTMO36	1,7	1,3	0,52
M2	2,2	2,09	0,39
M4	3,0	2,55	0,36
M5	1,1	5,31	0,67
M6	3,8	1,34	0,32
M7	2,9	3,8	0,83
M8	1,6	11,86	0,19
M9	2,2	2,46	0,38
M12	4,3	1,9	0,35
M15	2,1	2,82	0,35
M16	5,1	1,39	0,52
M17	3,7	1,86	0,43
M21	2,1	3,72	0,82
M23	3,7	2,62	0,55
M24	3,2	1,36	0,41
M38	7,8	1,76	0,45
M39	3,5	1,38	0,51
M40	1,5	12,12	0,66
M41	4,4	1,78	0,6
M42	2,2	3,0	0,29
BATTO28	20,2	1,82	0,91
BATTO29	7,0	1,62	0,84
BATTO30	12,0	1,58	0,66
BATTO41	26,0	1,72	1,32
BATTO42	21,6	1,9	1,32
Média	5,03	2,49	0,52