

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 13/06/2024.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS (FCAV)
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE AGENTES
ANAPLASMATACEAE, HEMOPLASMAS, PIROPLASMÍDEOS,
HEMOSPORÍDEOS E *Coxiella burnetii* EM QUIRÓPTEROS
HEMATÓFAGOS AMOSTRADOS EM DIVERSAS REGIÕES DO
BRASIL**

Victória Valente Calfre de Mello

Bióloga

2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS (FCAV)
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE AGENTES
ANAPLASMATACEAE, HEMOPLASMAS, PIROPLASMÍDEOS,
HEMOSPORÍDEOS E *Coxiella burnetii* EM QUIRÓPTEROS
HEMATÓFAGOS AMOSTRADOS EM DIVERSAS REGIÕES DO
BRASIL**

Victória Valente Califre de Mello

Orientador: Prof. Dr. Marcos Rogério André

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Doutora em Microbiologia Agropecuária

2023

M527d

Mello, Victória Valente Califre de

Detecção e caracterização molecular de agentes Anaplasmataceae, hemoplasmas, piroplasmídeos, hemosporídeos e Coxiella burnetii em quirópteros hematófagos amostrados em diversas regiões do Brasil / Victória Valente Califre de Mello. -- Jaboticabal, 2024

168 p. : il., tabs., mapas

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientador: Marcos Rogério André

1. Morcegos hematófagos. 2. Hemoplasmas. 3. Piroplasmídeos. 4. Anaplasmataceae. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

IMPACTO ESPERADO DA TESE NA SOCIEDADE

Morcegos hematófagos (Chiroptera: Mammalia, Desmodontinae) são restritos ao Novo Mundo e estão amplamente distribuídos no Brasil. O crescimento da população humana, bem como das atividades antrópicas, tem reduzido drasticamente o habitat da fauna selvagem. Os morcegos se adaptam facilmente a ambientes antropizados, tornando possível um contato próximo com animais domésticos e humanos, favorecendo a disseminação de vetores artrópodes (ex. carrapatos, ácaros, pulgas e moscas) e de patógenos com potencial zoonótico. A investigação de agentes transmitidos por vetores em animais selvagens que são encontrados em áreas urbanas e periurbanas é crucial para a compreensão da epidemiologia de doenças emergentes. O presente estudo investigou a presença e diversidade genética de agentes com potencial zoonótico transmitidos por vetores em morcegos hematófagos de diferentes estados brasileiros. Foi detectada a presença de DNA de agentes bacterianos das famílias Anaplasmataceae, Mycoplasmataceae e protozoários da Ordem Piroplasmida nos animais amostrados. O potencial zoonótico dos agentes detectados ainda é desconhecido.

EXPECTED IMPACT OF THE THESIS ON SOCIETY

Blood-sucking bats (Chiroptera: Mammalia, Desmodontinae) are restricted to the New World and are widely distributed in Brazil. The growth of the human population, as well as human activities, has drastically reduced the habitat of wildlife. Bats adapt easily to anthropic environments, making close contact with domestic animals and humans possible, favoring the spread of arthropod vectors (e.g. ticks, mites, fleas and flies) and pathogens with potential zoonotic. The investigation of vector-borne agents in wild animals that are found in urban and peri-urban areas is crucial to understanding the epidemiology of emerging diseases. The present study investigated the presence and genetic diversity of agents with zoonotic potential transmitted by vectors in vampire bats from different Brazilian states. The presence of DNA from bacterial agents from the families Anaplasmataceae, Mycoplasmataceae and protozoa from the Order Piroplasmida was detected in the sampled animals. The zoonotic potential of the detected agents is still unknown.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE AGENTES ANAPLASMATACEAE, HEMOPLASMAS, PIROPLASMÍDEOS, HEMOSPORÍDEOS E *Coxiella burnetii* EM QUIRÓPTEROS HEMATÓFAGOS AMOSTRADOS EM DIVERSAS REGIÕES DO BRASIL

AUTORA: VICTÓRIA VALENTE CALIFRE DE MELLO

ORIENTADOR: MARCOS ROGÉRIO ANDRÉ

COORDINADORA: ROSANGELA ZACARIAS MACHADO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Microbiologia Agropecuária, pela Comissão Examinadora:



Documento assinado digitalmente

MARCOS ROGÉRIO ANDRÉ

Data: 16/01/2024 13:52:19-0300

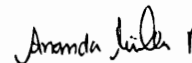
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof. Dr. MARCOS ROGÉRIO ANDRÉ (Participação Virtual)

Departamento de Patologia Reprodução e Saúde Única / FCAV UNESP Jaboticabal

Profa. Dra. ANANDA MÜLLER PEREIRA (Participação Virtual)

Department of Biomedical Sciences / Ross University School of Veterinary Medicine - Basseterre/Ilha de São Cristóvão/Caribe



Documento assinado digitalmente



JOÃO FABIO SOARES

Data: 16/01/2024 12:26:02-0300

Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof. Dr. JOÃO FABIO SOARES (Participação Virtual)

Laboratório de Protozoologia e Rickettsioses Veterinárias / Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) - Porto Alegre/RS

Documento assinado digitalmente



ESTEVAM GUILHERME LUX HOPPE

Data: 16/01/2024 16:17:54-0300

Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof. Dr. ESTEVAM GUILHERME LUX HOPPE (Participação Virtual)

Departamento de Patologia Reprodução e Saúde Única / FCAV UNESP Jaboticabal

Profa. Dra. ANA CLÁUDIA ALEXANDRE DE ALBUQUERQUE (Participação Virtual)

Departamento de Patologia, Reprodução e Saúde Única / FCAV UNESP Jaboticabal

Documento assinado digitalmente



ANA CLÁUDIA ALEXANDRE DE ALBUQUERQUE

Data: 16/01/2024 14:32:47-0300

Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Jaboticabal, 13 de dezembro de 2023

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Victória Valente Calfre de Mello – Filha de Wanilton Isaias Calfre e Carla Valente Calfre, casada com Felipe Gurgel Candido de Mello, nasceu em 9 de janeiro de 1995, na cidade de Jaboticabal/SP. Em 2013 ingressou na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Câmpus Jaboticabal, onde em janeiro 2016 se formou Bióloga. Realizou durante a graduação uma iniciação científica sob orientação do Prof. Dr. Marcos Rogério André no VBBL (Vector-Borne Bioagents Laboratory). Em março de 2017 ingressou no curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agropecuária, sob orientação do Prof. Dr. Marcos Rogério André, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Campus Jaboticabal, com bolsa de estudo da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Em 2019, ingressou no curso de Doutorado do Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agropecuária sob orientação do Prof. Dr. Marcos Rogério André e na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Câmpus Jaboticabal, com bolsa de estudo da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

"Nada do que vivemos tem sentido, se não tocarmos o coração das pessoas."

Cora Coralina

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela dádiva da vida, generosidade e amor incondicional.

Aos meus pais Waniton Isaías Califre e Carla Valente Califre, cujo esforço incansável e amor inabalável moldaram a pessoa que sou hoje. Suas lições e apoio são tesouros que levo em minha jornada.

A minha irmã Maríssa Valente Califre, pela nossa conexão, minha confidente nos momentos de angústia e incertezas, melhor amiga e o meu coração fora do peito.

Ao meu marido Felipe Gurgel Candido de Mello, por todo amor, paciência, apoio e companheirismo, transformando os desafios e as dificuldades em crescimento.

Aos meus filhos de quatro patas Gaia, Kiara, Oreó, Kira, Cherrie, Layla e Mike, por alegrar os meus dias.

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agropecuária (Unesp, Universidade de São Paulo, Unesp, Campus Jaboticabal).

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcos Rogério André por me orientar desde a Iniciação Científica. Agradeço por todos os conselhos, pela paciência, por todo apoio e convivência ao longo desses anos.

À Profa. Dra. Rosângela Zacarias Machado, pelos ensinamentos dispensados.

À Profa. Dra. Darci, pelos conhecimentos compartilhados.

À Profa. Dra. Marta Maria Geraldete Teixeira, do Laboratório de Taxonomia e Filogenia de Tripanossomatídeos, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, pelo fornecimento das amostras de fígado dos morcegos hematófagos.

À Dra. Taciana Fernandes Souza Barbosa Coelho, da Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas, Coordenadora do Laboratório de Diagnóstico da Raiva do Instituto Evandro Chagas, Ananindeua, Pará, pelo fornecimento das amostras de baço dos morcegos hematófagos.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, pelo suporte oferecido para o desenvolvimento do trabalho.

As minhas amigas, Caroline Secato, Eliz Oliveira, Lorena Neves e Clara Morato, por tornarem meus dias mais leves e por compartilharem a vida comigo, além da pós-graduação.

Ao meu antigo trio, Maria Eduarda Furquim e Amanda Barbosa, guardo as boas memórias e a saudade.

Aos amigos da Pós-graduação, membros da “salinha”, os que se encontram presentes e os que já terminaram suas atividades, agradeço por ter conhecido cada um de vocês e pelos bons momentos vividos: Daniel Lee, Paulo Arantes, Amir Alabí, Dália Monique, Jovêncio Sada, Jaqueline Camargo, Laryssa Borges, Natalia Serra e Matheus Santana.

À Ana Cláudia Calchi e ao Daniel Lee, em especial, agradeço por toda ajuda dispensada nessa reta final.

Aos colegas de laboratório, pela boa convivência e conversas trocadas, Ana Cláudia Calchi, Ricardo Bassini, Ana Carolina Santiago, Anna Cláudia Mongruel, Renan Amaral, Priscila Ikeda, Livia Perles, Gustavo Seron, Gabrielly Lopes, João Vitor Santos e Luiz Ricardo Gonçalves.

Aos funcionários do departamento de Patologia Veterinária, em especial à Rafaela Beraldo e a Mabel Aparecida Custódio, e aos demais funcionários da pós-graduação da Unesp Jaboticabal.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP Processos números 2020/12037-0 e 2022/08543-2) pelo auxílio financeiro que permitiu a realização deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

SUMÁRIO

DETECTION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF ANAPLASMATACEAE, HEMOPLASMAS, PYROPLASMIDS, HAEMOSPORIDIANS AND <i>Coxiella burnetii</i> AGENTS IN VAMPIRE BATS SAMPLED IN DIFFERENT REGIONS OF BRAZIL.....	v
CAPÍTULO 1 – Considerações gerais.....	1
1. Ordem Chiroptera.....	1
2. Hemoparasitos em Quirópteros.....	4
2.1 Agentes Anaplasmataceae.....	4
2.2 Piroplasmídeos.....	11
2.3 Hemoplasmas.....	17
2.4. Hemosporídeos.....	23
2.5. <i>Coxiella burnetii</i>	27
3. Objetivos.....	33
3.1. Objetivos gerais.....	33
3.2 Objetivos específicos.....	33
4. Referências.....	34
CAPÍTULO 2 - Molecular detection of blood-borne agents in vampire bats from Brazil, with the first molecular evidence of <i>Neorickettsia</i> sp. in <i>Desmodus rotundus</i> and <i>Diphylla ecaudata</i> ¹	61
1. Introduction.....	62
2. Material and Methods.....	64
3. Results.....	68
5. Conclusions.....	78
6. References.....	79
CAPÍTULO 3 - Molecular Survey of Piroplasmids and Hemosporidians in Vampire Bats, with Evidence of Distinct Piroplasmida Lineages Parasitizing <i>Desmodus rotundus</i> from the Brazilian Amazon ¹	89
1. Introduction.....	90
2. Material and Methods.....	91
3. Results.....	94
4. Discussion.....	98
5. Conclusions.....	101
6. References.....	102
CAPÍTULO 4 - Molecular survey of hemoplasmas and <i>Coxiella burnetii</i> in vampire bats from northern Brazil ¹	110
1. Introduction.....	111

2. Material and methods	113
2.2. DNA extraction	114
2.3. Molecular assays	115
2.3.1. PCR assay for endogenous mammalian gene	115
2.3.2. PCR assays for hemoplasmas	115
2.3.3. Quantitative real-time PCR for <i>C. burnetii</i>	116
2.3.4. Purification, sequencing and phylogenetic analysis	116
2.3.5. Assesment of genotypic diversity	117
3. Results	117
4. Discussion	124
5. Conclusion	128
CAPÍTULO 5 - Molecular detection of Anaplasmataceae agents in vampire bats in the Brazilian Amazon¹	137
1. Introduction	138
2. Material and methods	140
2.1. Ethics statement	140
2.2. Sample collection	140
2.3. DNA extraction	141
2.4. PCR for endogenous mammalian gene	141
2.5. Molecular creening and characterization for Anaplasmataceae agents	142
2.5.1. Molecular screening and characterization for <i>Ehrlichia</i> spp.	142
2.5.2. Molecular screening and characterization for <i>Anaplasma</i> spp.	142
2.5.3. Molecular ccreening and characterization for <i>Neorickettsia</i> spp.	143
2.5.4. Sequencing and phylogenetic analyzes	143
3. Results	144
3.1. DNA quality	144
3.2. <i>Ehrlichia</i> spp.	144
3.3. <i>Anaplasma</i> spp.	150
3.4. <i>Neorickettsia</i> spp.	152
4. Discussion	153
5. Conclusion	157
References	158
CAPÍTULO 6 – Considerações Finais	166

DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE AGENTES ANAPLASMATACEAE, HEMOPLASMAS, PIROPLASMÍDEOS, HEMOSPORÍDEOS E *Coxiella burnetii* EM QUIRÓPTEROS HEMATÓFAGOS AMOSTRADOS EM DIVERSAS REGIÕES DO BRASIL

Resumo - A ordem Chiroptera (do grego *Cheir*=mão e *pteron*=asas) representa o grupo mais particular da Classe Mammalia. A capacidade de voo associada ao sistema de ecolocalização permitiu a colonização de diversos nichos e sua ampla distribuição geográfica, vivendo em contato próximo com animais domésticos e humanos. A subfamília Desmodontinae, pertencente à família Phyllostomidae, é composta por três espécies de morcegos hematófagos: *Desmodus rotundus*, *Diphylla ecaudata* e *Diaemus youngii*. O presente estudo teve como objetivo investigar a ocorrência de agentes transmitidos por vetores (agentes Anaplasmataceae, hemoplasmas, piroplasmídeos, hemosporídeos e *Coxiella burnetii*) em morcegos hematófagos amostrados em diferentes estados brasileiros. O trabalho foi realizado em duas partes: a primeira incluiu 198 amostras de fígado de morcegos hematófagos pertencentes às espécies *Desmodus rotundus* (n = 159), *Diphylla ecaudata* (n = 31) e *Diaemus youngii* (n = 8), provenientes de 15 diferentes estados brasileiros e gentilmente cedidas ao nosso grupo de pesquisa pelo Laboratório de Biologia Evolutiva e Conservação, Instituto de Biologia (IB), USP (São Paulo, SP, Brasil). Das 198 amostras de fígado dos morcegos hematófagos amostrados, 1,5% mostraram-se positivas para *Neorickettsia* sp. (nested[n] PCR 16S rRNA) e 6,06% para hemoplasmas (PCR 16S rRNA). Nenhuma amostra de fígado mostrou-se positiva para piroplasmídeos, hemosporídeos, *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp. e *C. burnetii*. Análises filogenéticas baseadas no gene 16S rRNA posicionaram as sequências de hemoplasmas detectadas no presente estudo dentro do grande “grupo *haemofelis*”, compartilhando um subclado com hemoplasmas previamente detectados em morcegos hematófagos (*D. rotundus*, *D. ecaudata*) e morcegos não-hematófagos (*Carollia sowelli* e *C. perspicillata*) de Belize, Peru e Brasil. Alta diversidade genotípica foi identificada entre as sequências do gene 16S rRNA de micoplasmas hemotrópicos detectadas entre os morcegos analisados. Sequências 16S rRNA de *Neorickettsia* spp. detectadas nas amostras de fígado apresentaram alta identidade com *Neorickettsia* sp. previamente identificada em morcegos não-hematófagos do Brasil. Este é o primeiro estudo a relatar *Neorickettsia* sp. em morcegos hematófagos. Na segunda parte da tese, foram utilizadas 229 amostras de baço de morcegos hematófagos pertencentes às espécies *D. rotundus* (n = 228) e *D. youngii* (n = 1), gentilmente cedidas ao nosso grupo de pesquisa pelo Laboratório de Diagnóstico de Raiva do Instituto Evandro Chagas, São Brás, Belém, Pará, coletadas entre os anos de 2017 e 2019, nos estados do Pará (206 *D. rotundus* e 1 *D. youngii*), Roraima (18 *D. rotundus*), Amapá (3 *D. rotundus*) e Amazonas (1 *D. rotundus*). Dentre as 229 amostras de baço testadas, 10,04% mostraram-se positivas para hemoplasmas (PCR 16S rRNA), 18,77% para piroplasmídeos (nPCR 18S rRNA), 3% para *Ehrlichia* spp. (PCR *dsb*), 5,2% para *Anaplasma* spp. (nPCR 16S rRNA) e 10,9% para *Neorickettsia* spp. (nPCR 16S rRNA). Nenhuma amostra de baço mostrou-se positiva para hemosporídeos (nPCR 18S rRNA) e *C. burnetii* (qPCR IS1111). Análises filogenéticas baseadas no gene 16S rRNA de hemoplasmas posicionaram as sequências obtidas no presente estudo dentro do grande “grupo *haemofelis*”, em três clados distintos, com

hemoplasmas previamente detectados em morcegos hematófagos e não-hematófagos do Brasil, Peru, Belize, Costa Rica e Alemanha. A análise filogenética baseada no gene 23S rRNA de hemoplasmas posicionou a sequência obtida no presente trabalho próxima àquelas previamente detectadas em morcegos não-hematófagos do Brasil e de Belize. Alta diversidade genotípica foi verificada entre hemoplasmas associados a morcegos hematófagos e não-hematófagos no Brasil e no mundo. Análise filogenética baseada no gene 18S rRNA quase completo de piroplasmídeos, por sua vez, posicionou as sequências obtidas de três *D. rotundus* em clados distintos (*Theileria* sensu stricto, *Tapirus terrestris* e “South America Marsupialia”), demonstrando a ocorrência de diferentes espécies de piroplasmídeos em morcegos hematófagos. O presente trabalho relatou, pela primeira vez, a ocorrência de *Babesia* spp. e *Theileria* spp. em *D. rotundus*. As análises filogenéticas baseadas nos genes *dsb* e *ftsZ* de *Ehrlichia* e 16S rRNA de *Anaplasma* spp. revelaram proximidade filogenética dos genótipos detectados em morcegos hematófagos com agentes Anaplasmataceae associados a ruminantes domésticos, enquanto as inferências filogenéticas baseadas nos genes *gltA* e *groEL* revelaram a ocorrência de genótipos potencialmente exclusivos de quirópteros. *Neorickettsia* sp. filogeneticamente associada a *N. risticii* foi detectada em morcegos hematófagos amostrados do Norte brasileiro. Co-positividade para os diversos agentes pesquisados foi identificada em amostras de fígado e baço de morcegos hematófagos no Brasil, demonstrando que tais mamíferos podem albergar uma gama de agentes transmitidos por vetores.

Palavras-chave: Morcegos hematófagos, hemoplasmas, *Babesia* spp., *Theileria* spp., *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp., *Neorickettsia* spp., Haemosporida, Febre Q

DETECTION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF ANAPLASMATACEAE, HEMOPLASMAS, PYROPLASMIDS, HAEMOSPORIDIANS AND *Coxiella burnetii* AGENTS IN VAMPIRE BATS SAMPLED IN DIFFERENT REGIONS OF BRAZIL

Abstract – The order Chiroptera (from the Greek Cheir = hand and pteron = wings) represents the most particular group of the Class Mammalia. The flight capacity associated with the echolocation system allowed the colonization of different niches and its wide geographic distribution, living in close contact with domestic animals and humans. The subfamily Desmodontinae, belonging to the family Phyllostomidae, comprises three species of vampire bats: *Desmodus rotundus*, *Diphylla ecaudata* and *Diaemus youngii*. The present study aimed to investigate the occurrence of vector-borne agents (Anaplasmataceae agents, hemoplasmas, piroplasmids, hemosporidians and *Coxiella burnetii*) in vampire bats sampled in different Brazilian states. This work was carried out in two parts: the first included 198 liver samples from vampire bats belonging to the species *Desmodus rotundus* (n = 159), *Diphylla ecaudata* (n = 31) and *Diaemus youngii* (n = 8), from 15 different states Brazilians and kindly provided to our research group by the Laboratory of Evolutionary Biology and Conservation, Institute of Biology (IB), USP (São Paulo, SP, Brazil). Of the 198 liver samples from vampire bats sampled, 1.5% were positive for *Neorickettsia* sp. (nested[n] PCR 16S rRNA gene) and 6.06% for hemoplasmas (PCR 16S rRNA gene). No liver samples were positive for piroplasmids, haemosporidians, *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp., and *C. burnetii*. Phylogenetic analyzes based on the 16S rRNA gene positioned the hemoplasma sequences detected in the present study within the large “*haemofelis* group”, sharing a subclade with hemoplasmas previously detected in vampire bats (*D. rotundus*, *D. ecaudata*) and non-hematophagous bats (*Carollia sowelli*, *C. perspicillata*) from Belize, Peru and Brazil. High genotypic diversity was identified among the 16S rRNA gene sequences of haemotropic mycoplasmas detected among the bats analyzed. The *Neorickettsia* 16S rRNA sequences detected in liver samples showed high identity with *Neorickettsia* sp. previously identified in non-hematophagous bats from Brazil. This is the first study to report *Neorickettsia* sp. in vampire bats. In the second part of the thesis, 229 spleen samples from vampire bats belonging to the species *D. rotundus* (n = 228) and *D. youngii* (n = 1), kindly provided to our research group by the Rabies Diagnostic Laboratory from the Evandro Chagas Institute, São Brás, Belém, Pará, were collected between 2017 and 2019, in the states of Pará (206 *D. rotundus* and 1 *D. youngii*), Roraima (18 *D. rotundus*), Amapá (3 *D. rotundus*) and Amazonas (1 *D. rotundus*). Among the 229 spleen samples tested, 10.04% were positive for hemoplasmas (PCR 16S rRNA), 18.77% for piroplasmids (nPCR 18S rRNA), 3% for *Ehrlichia* spp. (PCR *dsb*), 5.2% for *Anaplasma* spp. (nPCR 16S rRNA) and 10.9% for *Neorickettsia* spp. (nPCR 16S rRNA). No spleen samples were positive for haemosporidians (nPCR 18S rRNA) and *C. burnetii* (qPCR *IS1111*).

Phylogenetic analyzes based on the 16S rRNA gene of hemoplasmas positioned the sequences obtained in the present study within the large “*haemofelis* group”, in three distinct clades, with hemoplasmas previously detected in hematophagous and non-hematophagous bats from Brazil, Peru, Belize, Costa Rica and Germany. Phylogenetic analysis based on the hemoplasma 23S rRNA gene positioned the sequence obtained in the present work close to those previously detected in non-hematophagous bats from Brazil and Belize. Furthermore, high genotypic diversity was observed between hemoplasmas associated with hematophagous and non-hematophagous bats in Brazil and around the world. Phylogenetic analysis based on the near-complete 18S rRNA gene of Piroplasmida positioned the sequences obtained from three *D. rotundus* into distinct clades (*Theileria* sensu stricto, *Tapirus terrestris* and “South America Marsupialia”), demonstrating the occurrence of different species of piroplasmids in vampire bats. The present work reported, for the first time, the occurrence of *Babesia* sp. and *Theileria* sp. in *D. rotundus*. Phylogenetic analyzes based on the *dsb* and *ftsZ* genes of *Ehrlichia* and 16S rRNA of *Anaplasma* spp. revealed phylogenetic proximity of the genotypes detected in vampire bats to those associated with domestic ruminants, while phylogenetic inferences based on the *gltA* and *groEL* genes revealed the occurrence of genotypes potentially exclusive to bats. *Neorickettsia* sp. phylogenetically associated with *N. risticii* was detected in vampire bats sampled from northern Brazil. Co-positivity for the various agents studied was identified in liver and spleen samples from vampire bats in Brazil, demonstrating that such mammals can harbor a range of vector-transmitted agents.

Key-Words: Vampire bats, hemoplasmas, *Babesia* spp., *Theileria* spp., *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp., *Neorickettsia* spp., Haemosporida, Q fever



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



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado **"Detecção e caracterização molecular de agentes Anaplasmataceae, hemoplasmas, hemosporídeos, piroplasmídeos e Coxiella burnetii em quirópteros hematófagos amostrados em diversas regiões do Brasil"**, protocolo nº: 003892/23, sob a responsabilidade do Prof. Dr. MARCOS ROGÉRIO ANDRÉ, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP.

Vigência do Projeto	10/08/2023 a 10/08/2026
Espécie / Linhagem	Amostras de baço/fígado de mamíferos pertencentes a Ordem Chiroptera: Desmodus rotundus (n=387) e Diaemus youngii (n=9) e Diphylla ecaudata (n=31)
Nº de animais	427
Peso / Idade	Não se aplica
Sexo	Não se aplica
Origem	Regiões urbanas e periurbanas dos estados do Pará, Roraima, Amapá, Tocantins, Minas Gerais, Bahia, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, São Paulo, Santa Catarina, Espírito Santo, Rio Grande do Sul, Paraná, Maranhão, Piauí e Amazonas

Jaboticabal, 16 de maio de 2023.

Profa. Dra. Paola Castro Moraes
Vice-coordenadora em exercício – CEUA FCAV

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n CEP 14884-900 - Jaboticabal - SP - Brasil
Tel. 16 3209-7100 - www.fcav.unesp.br



**Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO**

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso

Cadastro nº A434E64

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **A434E64**
 Usuário: **Marcos Rogério André**
 CPF/CNPJ: **302.435.148-59**
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
 Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

Espécie

Desmodus rotundus

Diaemus youngii

Diphylla ecaudata

Título da Atividade: **Deteção e caracterização molecular de agentes Anaplasmataceae, Hemoplasmas, Piroplasmídeos, Hemosporídeos e Coxiella burnetii em quirópteros hematófagos amostrados em diversas regiões do Brasil**

Equipe

Marcos Rogério André	Campus de Jaboticabal
Victória Valente Calfre de Mello	Universidade Estadual Paulista - UNESP / FCAV Campus
Eliz Oliveira Franco	Universidade Estadual Paulista - UNESP / FCAV Campus
Laryssa Borges De Oliveira	Universidade Federal do Paraná
Ana Julia Vidal Placa	Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho"

Parceiras Nacionais

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

1. Ordem Chiroptera

A ordem Chiroptera (do grego Cheir=mão e pteron=asas) representa o grupo mais particular da Classe Mammalia. Ao longo de milhões de anos de evolução, acredita-se que os morcegos evoluíram a partir de pequenos mamíferos insetívoros não-voadores que viviam na copa das árvores, os quais desenvolveram adaptações que os permitiram voar (Perachi et al., 2011; Laurindo e Novaes, 2015). Dentre as adaptações adquiridas, observa-se o alongamento ósseo e a presença de uma membrana elástica, denominada patágio, nos membros anteriores, modificados em asas. Além disso, na extremidade do braço e antebraço, encontra-se a membrana propatágio e, em muitas espécies, o uropatágio, uma membrana localizada entre os membros posteriores, que se estende ou não ao longo da cauda (Perachi et al., 2011). A capacidade de voo associada ao sistema de ecolocalização permitiu a colonização de diversos nichos e sua ampla distribuição geográfica (Simmons e Conway, 2003). Altamente diversificado, compreende o segundo maior grupo de mamíferos no mundo, com mais de 1400 espécies distribuídas em todos os continentes, com exceção de regiões muito frias como as calotas polares, algumas ilhas do Pacífico ou regiões de altitude extrema (Hill & Smith 1988; Schipper et al., 2008; Muhldorfer, 2013; Laurindo e Novaes, 2015). No Brasil, 181 espécies de morcegos estão oficialmente registradas e distribuídas em 68 gêneros e 9 famílias (Garbino et al., 2020). O bioma amazônico é o bioma que abriga a maior parte desta riqueza de espécies, e o estado do Pará apresenta o maior número de espécies registradas (Bernard, Aguiar e Machado, 2011).

São animais com grande complexidade biológica, importância ecológica e diferentes hábitos alimentares que compreendem hematofagia, polinivoria, nectarivoria, piscivoria, onivoria, insetivoria, frugivoria e carnivoria, sendo animais de grande relevância, principalmente quando se trata da dispersão de sementes, polinização e controle de insetos (Peracchi et al., 2006; Reis et al., 2007, 2017).

Características como capacidade de vôo, exclusiva dentre os mamíferos, alta longevidade, formação de grandes colônias populacionais, alta dispersão e colonização de diversos nichos, combinados com a capacidade de atuar como hospedeiros de diferentes patógenos zoonóticos (Muhldorfer, 2013), destacam a importância de compreender a epidemiologia de patógenos transmitidos por vetores nestes animais.

A subfamília Desmodontinae, pertencente à família Phyllostomidae, é composta por três espécies de morcegos hematófagos: *Desmodus rotundus*, *Diphylla ecaudata* e *Diaemus youngii*, as quais estão restritas ao Novo Mundo. Apenas essas três espécies são capazes de utilizar sangue como fonte única de alimento, visto que a hematofagia é a dieta mais especializada e requer diversas adaptações fisiológicas, morfológicas e comportamentais para o consumo de sangue (Coen, 2002). Apesar de demonstrar preferência para sangue de aves, *D. youngii*, assim como *Desmodus rotundus*, apresentam uma alimentação mais flexível (alimentando-se de bovinos, suínos, equinos, aves e humanos), enquanto *Diphylla ecaudata*, mostra-se como uma espécie-especialista, alimentando-se quase que exclusivamente de sangue de aves (Stoner-Duncan et al., 2014), exceto em condições ambientais degradadas, onde já demonstraram ingestão de sangue humano (Ito et al., 2016). *Desmodus rotundus* apresenta hábitos gregários e tendem a coexistir com outras espécies em árvores ocas, cavernas e minas abandonadas (Sampedro et al., 2008). O crescimento da população humana associado à expansão de atividades antrópicas, como desmatamento e mineração, tem reduzido drasticamente o habitat da fauna selvagem, trazendo como consequência a aproximação mais íntima entre animais domésticos, selvagens e humanos, favorecendo a disseminação de vetores e patógenos e contribuindo para o ressurgimento de zoonoses (Schneider et al., 2005).

A expansão humana e da pecuária para locais outrora dominados pela vida selvagem, coloca os seres humanos e animais de criação em risco. Neste sentido, criadores de gado afirmam que quirópteros da espécie *D. rotundus* preferem se alimentar de sangue de bovinos devido ao seu fácil acesso quando comparado a outros animais, levando a prejuízos econômicos. Como resposta, os proprietários recorrem a medidas drásticas como envenenamento, destruição de seus locais de abrigo e até mesmo a explosão de cavernas, colocando em risco toda a população de

morcegos. Assim, outras espécies de morcegos sofrem consequências severas, tais como aqueles da família Molossidae, a qual engloba morcegos insetívoros; da família Stenodermatinae, cujos representantes estão envolvidos na dispersão de sementes; e da família Glossophaginae, com morcegos polinizadores de plantas, extremamente importantes para o equilíbrio e a diversidade ecológica (Mayen, 2003).

Morcegos não são cegos e orientam-se principalmente por ondas sonoras de alta frequência, inaudíveis aos seres humanos, por meio da ecolocalização, que auxilia na obtenção de alimento, permitindo até mesmo encontrar insetos muito pequenos (Laurindo e Novaes, 2015). Além disso, os morcegos-vampiros-comuns apresentam em sua cavidade bucal sensores de calor que tornam possível localizar vasos sanguíneos superficiais em suas presas (Scheffer et al. 2015). A mordida indolor, devido aos dentes adaptados, permite um tempo de sucção de 10 a 40 minutos na presa, possibilitando a ingestão de aproximadamente 20 mL de sangue. Sua saliva contém substâncias anticoagulantes, como a draculina e a desmodontina, que auxiliam na alimentação (Fernandez et al., 1998).

Dentre os mamíferos, os morcegos são os animais que mais albergam vírus zoonóticos (Olival et al., 2017), principalmente o vírus da raiva e o SARS-Cov-2, o qual instaurou a pandemia iniciada em 2019. Além dos patógenos virais, observa-se também uma infinidade de patógenos que incluem bactérias, fungos e parasitos (Muhldorfer, 2013). Contudo, há uma lacuna significativa sobre a incidência de outros agentes patogênicos, além dos vírus, neste grupo de animais (Pacheco et al., 2010). Dessa forma, ressalta-se a importância de reunir mais informações epidemiológicas sobre potenciais patógenos zoonóticos circulantes em quirópteros hematófagos, que representam uma ampla e diversificada parcela da fauna brasileira. Considerando-se a relevância dos agentes investigados na saúde pública e animal, há um interesse em aprofundar a compreensão sobre a presença e variedade dos patógenos circulantes em morcegos hematófagos no país.

5. Conclusion

The present work revealed, by molecular methods, for the first time, *Anaplasma* sp. and different *Ehrlichia* genotypes in vampire bats from Brazil. While phylogenetic analyzes based on the *dsb* and *ftsZ* genes of *Ehrlichia* and 16S rRNA of *Anaplasma* spp. revealed phylogenetic proximity of the genotypes detected in vampire bats with Anaplasmataceae agents associated with domestic ruminants, phylogenetic

inferences based on the *gltA* and *groEL* genes evidenced the occurrence of genotypes apparently exclusive to bats. *Neorickettsia* sp. phylogenetically associated with *N. risticii* occurs in vampire bats sampled from northern Brazil.

References

- Afonso E, Goydadin AC (2018) Molecular detection of *Anaplasma phagocytophilum* DNA in the lesser horseshoe bat (*Rhinolophus hipposideros*) guano **Epidemiology and Infection**, p 1–6.
- Aguiar DM, Araujo JP, Nakazato L, Bard E, Cabezas-Cruz A (2019) Complete Genome Sequence of an *Ehrlichia minasensis* Strain Isolated from Cattle. **Nucleic Acids Research**, 8, e00161-19.
- Aguiar DM, Ziliani TF, Zhang X, Melo AL, Braga IA, Witter R, Freitas LC, Rondelli AL, Luis MA, Sorte EC (2014) A novel *Ehrlichia* genotype strain distinguished by the TRP36 gene naturally infects cattle in Brazil and causes clinical manifestations associated with ehrlichiosis. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, 5, 537–544.
- Alcantara DMC, Ikeda P, Souza CS, de Mello VVC, Torres JM, Lourenço EC, Bassini-Silva R, Herrera HM, Machado RZ, Barros-Battesti DM, Gracioli G, André MR (2022) Multilayer Networks Assisting to Untangle Direct and Indirect Pathogen Transmission in Bats. **Microbial Ecology**, doi: 10.1007/s00248-022-02108-3. Epub ahead of print. PMID: 36166070.
- Almeida AP, Souza TD, Marcili A, Labruna MB (2013) Novel *Ehrlichia* and *Hepatozoon* Agents Infecting the Crab-Eating Fox (*Cerdocyon thous*) in Southeastern Brazil. **Journal of Medical Entomology**, 50, 640–646.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, 215(3), 403–410.
- André MR (2018) Diversity of *Anaplasma* and *Ehrlichia/Neoehrlichia* Agents in Terrestrial Wild Carnivores Worldwide: Implications for Human and Domestic Animal Health and Wildlife Conservation. **Frontiers in Veterinary Science**, (5): 293.
- André MR, Ikeda P, Lee DAB, do Amaral RB, Carvalho LAL, Pinheiro DG, Torres JM, de Mello VVC, Rice GK, Cer RZ, Lourenço EC, Oliveira CE, Herrera HM, Barros-Battesti DM, Machado RZ, Bishop-Lilly KA, Dalgard CL, Dumler JS (2023) Characterization of the bacterial microbiome of non-hematophagous bats and associated ectoparasites from Brazil. **Frontiers in Microbiology**, (14) <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1261156>.
- Barlough JE, Reubel GH, Madigan JE, Vredevoe L K, Miller PE, Rikihisa Y (1998) Detection of *Ehrlichia risticii*, the agent of Potomac horse fever, in freshwater stream

snails (Pleuroceridae: *Juga* spp.) from northern California. **Applied and Environmental Microbiology**, 64(8): 2888-2893.

Battilani M, De Arcangeli S, Balboni A, Dondi F (2017) Genetic diversity and molecular epidemiology of *Anaplasma*. **Infection, Genetics and Evolution**, (49):195-211.

Benson DA, Cavanaugh M, Clark K, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Sayers EW (2012) GenBank. **Nucleic Acids Research**, 41: 36-42.

Birkenheuer AJ, Levy MG, Breitschwerdt EB (2003) 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**, 41(9):4172-7.

Cabezas-Cruz A, Zweggarth E, Vancová M, Broniszewska M, Grubhoffer L, Passos LMF, Ribeiro MFB, Alberdi P, de la Fuente J (2016) *Ehrlichia minasensis* sp. nov., isolated from the tick *Rhipicephalus microplus*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 66(3):1426–1430.

Calchi AC, Vultão JG, Alves MH, Yogui DR, Desbiez A, de Santi M, Santana MS, da Silva T, Werther K, Teixeira M, Machado RZ, André MR (2020) *Ehrlichia* spp. and *Anaplasma* spp. in Xenarthra mammals from Brazil, with evidence of novel 'Candidatus *Anaplasma* spp.' **Scientific Reports** 10(1):12615.

Chae JS, Kim EH, Kim MS, Kim MJ, Cho YH, Park BK (2003) Prevalence and sequence analyses of *Neorickettsia risticii*. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 990: 248–256.

Cicuttin GL, Boeri EJ, Beltrán FJ, Dohmen FEG (2013) Molecular detection of *Neorickettsia risticii* in Brazilian free-tailed bats (*Tadarida brasiliensis*) from Buenos Aires, Argentina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 33(5):648-650.

Cicuttin GL, de Salvo MN, La Rosa I, Dohmen FEG (2017) *Neorickettsia risticii*, *Rickettsia* sp. and *Bartonella* sp. in *Tadarida brasiliensis* bats from Buenos Aires, Argentina. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, 52:1–5.

Coimbra HS, Fernandes CG, Soares MP, Meireles MCA, Radamés R, Schuch LFD (2006) Equine monocytic Ehrlichiosis in Rio Grande do Sul: Clinical, pathological and epidemiological aspects. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 26:97– 101.

da Silva D, Ratzlaff FR, Osmani V, Fernandes FD, Lourenço EC, Famadas KM, Campos A, Witt AA, Pacheco SM, Vogel FSF, de Ávila Botton S, Sanigioni LA (2023) *Rhipicephalus microplus* larvae: first report in bats, *Molossus rufus*. **Veterinary Research Communications**, 47(3):1749-1751.

Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D (2012) ModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nature Methods**, v. 9, p. 772. [https://doi: 10.1038/nmeth.2109](https://doi.org/10.1038/nmeth.2109).

de Mello VVC, Placa AJV, Lee DAB, Franco EO, Lima L, Teixeira MMG, Hemsley C, Titball RW, Machado RZ, André MR (2023) Molecular detection of blood-borne agents in vampire bats from Brazil, with the first molecular evidence of *Neorickettsia* sp. in *Desmodus rotundus* and *Diphylla ecaudata*. **Acta Tropica**, (244):106945.

Dittrich S, Phuklia W, Turner GD, Rattanavong S, Chansamouth V, Dumler SJ, Ferguson DJ, Paris DH, Newton PN (2015) *Neorickettsia sennetsu* as a Neglected Cause of Fever in South-East Asia. **PLOS neglected tropical diseases**, 9(7): e0003908.

Doudier B, Olano J, Parola P, Brouqui P (2010) Factors contributing to emergence of *Ehrlichia* and *Anaplasma* spp. as human pathogens. **Veterinary Parasitology**, 167(2-4), 149-154.

Dumler JS, Barbet AF, Bekker CP, Dasch GA, Palmer GH, Ray SC, Rikihisa Y, Rurangirwa FR (2001) Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: Unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 51, 2145–2165, <https://doi.org/10.1099/00207713-51-6-2145>.

Dumler SJ, Rikihisa Y, Gregory A (2015) Dasch. "*Ehrlichia*" **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**, 1-11.

Dutra F, Schuch LDF, Delucchi E, Curcio BR, Coimbra HS, Raffi MB, Dellagostin O, Riet-Correa F (2001) Equine monocytic Ehrlichiosis (Potomac Horse Fever) in horses in Uruguay and southern Brazil. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation** 13:433–437.

Ewing B, Green P (1998) Basecalling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Research**, 8:186-194.

Garbino GST, Brandão MV, da Cunha Tavares V (2022). First confirmed records of Godman's Long-tailed Bat, *Choeroniscus godmani* (Thomas, 1903) (*Chiroptera*, *Phyllostomidae*), from Brazil and Panama. **Check List** (18):493–499.

Gibson KE, Rikihisa Y, Zhang C, Martin C (2005) *Neorickettsia risticii* is vertically transmitted in the trematode *Acanthatrium oregonense* and horizontally transmitted to bats. **Environmental Microbiology**, (2):203-212.

Greiman SE, Tkach VV, Pulis E, Fayton TJ, Curran SS (2014) Large Scale Screening of Digeneans for *Neorickettsia* Endosymbionts Using Real-Time PCR Reveals New *Neorickettsia* Genotypes, Host Associations and Geographic Records. **PLOS One**, 9.

Greiman SE, Vaughan JA, Elmahy R, Adisakwattana P, Van Ha N, Fayton TJ, Khalil AI, Tkach VV (2017) Real-time PCR detection and phylogenetic relationships of

Neorickettsia spp. in digeneans from Egypt, Philippines, Thailand, Vietnam and the United States. **Parasitology International**, 66(1):1003–1007.

Hildebrandt A, Franke J, Meier F, Sachse S, Dorn W, Straube E (2010) The potential role of migratory birds in transmission cycles of *Babesia* spp., *Anaplasma phagocytophilum*, and *Rickettsia* spp. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, 1(2):105-7.

Hoang DT, Chernomor O, von Haeseler A, Minh BQ, Vinh LS (2018) UFBoot2: Improving the Ultrafast Bootstrap Approximation. **Molecular Biology and Evolution**, 35(2), 518–522.

Hornok S, Szőke K, Estók P, Krawczyk A, Haarsma AJ, Kováts D, Boldogh SA, Morandini P, Szekeres S, Takács N, Kontschán J, Meli ML, Fernández de Mera IG, de la Fuente J, Gyuranecz M, Sulyok KM, Weibel B, Gönczi E, de Bruin A, Sprong H, Hofmann-Lehmann R (2018) Assessing bat droppings and predatory bird pellets for vector-borne bacteria: molecular evidence of bat-associated *Neorickettsia* sp. in Europe. **Antonie van Leeuwenhoek**, 111(9):1707–1717.

Hornok S, Szoke K, Meli ML, Sándor AD, Görföl T, Estók P, Wang Y, Tu VT, Kováts D, Boldogh SA, Corduneanu A, Sulyok KM, Gyuranecz M, Kontschán J, Takács N, Halajian A, Epis S, Hofmann-Lehmann R (2019) Molecular detection of vector-borne bacteria in bat ticks (Acari: Ixodidae, Argasidae) from eight countries of the Old and New Worlds. **Genetics Parasites and Vectors**, 12(1):1–7.

Ikeda P, Torres JM, Placa AJV, Mello VVCD, Lourenço EC, Herrera HM, Oliveira CE, Hemsley C, Titball RW, Machado RZ, et al. (2021) Molecular Survey of Anaplasmataceae Agents and Coxiellaceae in Non-Hematophagous Bats and Associated Ectoparasites from Brazil. **Parasitologia** 1:197–209.

Inayoshi M, Naitou H, Kawamori F, Masuzawa T, Ohashi N (2004) Characterization of *Ehrlichia* species from *Ixodes ovatus* ticks at the foot of Mt. Fuji, Japan. **Medical Microbiology and Immunology**, 48, 737–745.

Ismail N, McBride JW (2017) Tick-Borne Emerging Infections: Ehrlichiosis and Anaplasmosis. **Clinics in Laboratory Medicine** 37(2):317–340.

Katoh K, Rozewicki J, Yamada KD (2019) MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive, sequence choice and visualization. **Briefings in Bioinformatics**, 20:1160–1166.

Lau AO, Cereceres K, Palmer GH, Fretwell DL, Pedroni MJ, Mosqueda J, McElwain TF (2010) Genotypic diversity of merozoite surface antigen 1 of *Babesia bovis* within an endemic population. **Molecular and Biochemical Parasitology**, 172: 107-112.

Li H, Zheng YC, Ma L, Jia N, Jiang BG, Jiang RR (2015) Human infection with a novel tick-borne *Anaplasma* species in China: A surveillance study. **The Lancet Infectious Diseases**, 15, 663–670.

Lv J, Fernández de Marco M, Goharriz H, Phipps LP, McElhinney LM, Hernández-Triana LM, Wu S, Lin X, Fooks AR, Johnson N (2018) Detection of tick-borne bacteria and babesia with zoonotic potential in *Argas (Carios) vespertilionis* (Latreille, 1802) ticks from British bats. **Scientific reports**, 8(1):1865.

Massung RF, Slater K, Owens JH, Nicholson WL, Mather TN, Solberg VB, Olson JG (1998) Nested PCR assay for detection of granulocytic ehrlichiae. **Journal of Clinical Microbiology**, 36: 1090–1095.

Mayen F. (2003) Haematophagous bats in Brazil, their role in rabies transmission, impact on public health, livestock industry e alternatives to an indiscriminate reduction of bat population. **Journal of Veterinarian** 50: 469-472.

Miller MA, Pfeiffer W, Schwartz T (2010) Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees In Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE).

Mühldorfer, K (2013) Bats and Bacterial Pathogens: A Review. **Zoonoses Public Health** 60:93–103.

Müller A, Monti G, Otth C, Sepúlveda P, Bittencourt P, Nachum-Biala Y, Gutiérrez R, Harrus S (2018) "*Candidatus* Neoehrlichia chilensis" sp. nov.: Molecular detection and characterization of a novel *Anaplasmataceae* in wild rodents from Valdivia, southern Chile. **Transboundary and Emerging Diseases**, 65(2):357-362.

Nunes H, Rocha FL, Cordeiro-Estrela P (2017) Bats in urban areas of Brazil: roosts, food resources and parasites in disturbed environments. **Urban Ecosystems** 20(4):953–969.

Oh M R, Moon KH, Kim SY, Kim YG, Choi CY, Kang CW, Kim HJ, Lee KK, Yun YM (2014) Prevalence of *Anaplasma* sp. in thrushes (family Turdidae) in Jeju Island, Republic of Korea. **Journal of Veterinary Clinics**, 31(3), 206-211.

Parola P, Roux V, Camicas JL, Baradji I, Brouqui P, Raoult D (2000) Detection of ehrlichiae in African ticks by polymerase chain reaction. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 94(6): 707-708.

Paulino PG, Almosny N, Oliveira R, Viscardi V, Müller A, Guimarães A, Baldani C, da Silva C, Peckle M, Massard C, et al. (2020) Detection of *Neorickettsia risticii*, the agent of Potomac horse fever, in horses from Rio de Janeiro, Brazil. **Scientific Reports**, 10:7208.

Perles L, Barreto WTG, Macedo GC, Herrera HM, Machado RZ, André MR (2023) *Neorickettsia* sp. in coatis (*Nasua nasua*) in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária** 32(3): e006623.

Perles L, Herrera HM, Barreto WTG, de Macedo GC, Calchi AC, Machado RZ, André MR (2022) Multi-Locus Sequencing Reveals Putative Novel Anaplasmatidae Agents, 'Candidatus Ehrlichia dumleri' and *Anaplasma* sp., in Ring-Tailed Coatis (Carnivora: *Nasua nasua*) from Urban Forested Fragments at Midwestern Brazil. **Microorganisms** 30;10(12):2379.

Pusterla N, Johnson EM, Chae JS, Madigan JE (2003) Digenetic trematodes, *Acanthatrium* sp and *Lecithodendrium* sp, as vectors of *Neorickettsia risticii*, the agent of Potomac horse fever. **Journal of Helminthology**, 77(4):335–339.

Rar V, Golovljova I (2011) *Anaplasma*, *Ehrlichia*, and "Candidatus Neoehrlichia" bacteria: pathogenicity, biodiversity, and molecular genetic characteristics, a review. **Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases**, 11(8):1842–1861.

Rar V, Tkachev S, Tikunova N (2021) Genetic diversity of *Anaplasma* bacteria: Twenty years later. **Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases** 91:104833.

Reeves WK, Beck J, Orlova MV, Daly JL, Pippin K, Revan F, Loftis AD (2016) Ecology of Bats, Their Ectoparasites, and Associated Pathogens on Saint Kitts Island. **Journal of Medical Entomology**, 53(5):1218–1225.

Rejmanek D, Bradburd G, Foley J (2012) Molecular characterization reveals distinct genospecies of *Anaplasma phagocytophilum* from diverse North American hosts. **Journal of Medical Microbiology**, 61: 204–212.

Rymaszewska A, Grenda S (2008) Bacteria of the genus *Anaplasma* - characteristics of *Anaplasma* and their vectors: a review. **Veterinární Medicína**, 53(11), 573-584.

Saito T, Walker D (2016) Ehrlichioses: an important one health opportunity. **Veterinary Sciences**, 3:20.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, 74(12):5463-7.

Santana MS, Hoppe EGL, Carraro PE, Calchi AC, de Oliveira, LB, do Amaral RB, Mongrue ACB, Machado DMR, Burger KP, Barros'Batesti DM, Machado RZ, André MR (2022) Molecular detection of vector-borne agents in wild boars (*Sus scrofa*) and associated ticks from Brazil, with evidence of putative new genotypes of *Ehrlichia*, *Anaplasma*, and haemoplasmas. **Transboundary and Emerging Diseases** 69: e2808-e2831.

Silaghi C, Santos AS, Gomes J, Christova I, Matei IA, Walder G, Domingos A, Bell-Sakyi L, Sprong H, von Loewenich FD, Oteo JA, de la Fuente J, Dumler JS (2017) Guidelines for the Direct Detection of *Anaplasma* spp. in Diagnosis and Epidemiological Studies. **Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, NY)** 17(1):12–22.

Socolovschi C, Kernif T, Raoult D, Parola P (2012) *Borrelia*, *Rickettsia*, and *Ehrlichia* Species in Bat Ticks, France, 2010 **Emerging Infectious Diseases**, 18(12): 1966–1975.

Stöver BC, Müller KF (2010) TreeGraph 2: Combining and visualizing evidence from different phylogenetic analyses. **BMC Bioinformatics**, 11:7. doi: 10.1186/1471-2105-11-7.

Su H, Onoda E, Tai H, Fujita H, Sakabe S, Azuma K, Akachi S, Oishi S, Abe F, Ando S, Ohashi N (2021) Diversity unearthed by the estimated molecular phylogeny and ecologically quantitative characteristics of uncultured *Ehrlichia* bacteria in *Haemaphysalis ticks*, Japan. **Scientific Reports**, 11(1), 687.

Szubert-Kruszyńska A, Stańczak J, Cieniuch S, Podsiadły E, Postawa T, Michalik J (2019) *Bartonella* and *Rickettsia* Infections in Haematophagous *Spinturnix myotis* Mites (Acari: Mesostigmata) and their Bat Host, *Myotis myotis* (Yangochiroptera: Vespertilionidae), from Poland. **Microbial Ecology**, 77:759-768.

Trifinopoulos J, Nguyen LT, Haeseler VA, Minh BQ (2016) W-IQ-TREE: A fast-online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. **Nucleic Acids Research**, 44, 232–235.

Upham N, Burgin C, Widness J, Liphardt S, Parker C, Becker M. (2023) Mammal diversity database. **Mammal Diversity Database** (Version 1.11) [acessado em 06 de outubro de 2023]. Zenodo.

Vaughan JA, Tkach VV, Greiman SE (2012) Chapter 3 - Neorickettsial Endosymbionts of the Digenea: Diversity, Transmission and Distribution, In: Rollinson D, Hay SI (Eds.) **Advances in Parasitology**, Academic Press, p. 253-297.

Victoria LO, Montilla HJ, Qurollo BA, Maggi RG, Hegarty BC, Tornquist SJ, Breitschwerdt EB (2015) Potentially novel *Ehrlichia* species in horses, Nicaragua. **Emerging Infectious Diseases**, 21, 335–338.

Vieira TSWJ, Collere FCM, Ferrari LDR, Baggio RA, Lange RR, Ferrari MV, Duque JCM, Sanches GS, Pereira NA, Aguiar DM, Labruna MB, Vieira RFC (2022) Novel Anaplasmataceae agents ‘*Candidatus Ehrlichia hydrochoerus*’ and *Anaplasma* spp. **Emerging Infectious Diseases**, 28:480–482.

Vlaschenko A, Răileanu C, Tauchmann O, Muzyka D, Bohodist V, Filatov S, Rodenko O, Tovstukha I, Silaghi C (2022). First data on bacteria associated with bat ectoparasites collected in Kharkiv oblast, Northeastern Ukraine. **Parasites & Vectors**, 15(1), 1-8.

Zabashta MV, Orlova MV, Pichurin NL, Khametova AP, Romanova LV, Borodina TN, Zabashta AV (2019) Participation of bats (Chiroptera, Mammalia) and their ectoparasites in circulation of pathogens of natural focal infections in the south of Russia. **Entomological Review**, (99):513–521.

Zhang Y, Lv Y, Zhang F, Zhang W, Wang J, Cui Y, Wang R, Jian F, Zhang L, Ning C (2016) Molecular and phylogenetic analysis of *Anaplasma* spp. in sheep and goats from six provinces of China. **Journal of Veterinary Science**, 17, 523–529.

Zhao L, Li J, Cui X, Jia N, Wei J, Xia L, Wang H, Zhou Y, Wang Q, Liu X, Yin C, Pan Y, Wen H, Wang Q, Xue F, Sun Y, Jiang J, Li S, Cao W (2020) Distribution of *Haemaphysalis longicornis* and associated pathogens: analysis of pooled data from a China field survey and global published data. **Lancet Planet Health**, 4(8):e320-e329.