

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
ESPÉCIES DE *Mycoplasma* e *Bartonella* EM
ROEDORES SILVESTRES E SINANTRÓPICOS NO
BRASIL**

**Luiz Ricardo Gonçalves
Biólogo**

2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
ESPÉCIES DE *Mycoplasma* e *Bartonella* EM
ROEDORES SILVESTRES E SINANTRÓPICOS NO
BRASIL**

Luiz Ricardo Gonçalves
Orientador: Prof. Dr. Marcos Rogério André
Coorientadora: Profa. Dra. Rosangela Zacarias Machado

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 Microbiologia Agropecuária.

2016

G635d Gonçalves, Luiz Ricardo
Detecção e caracterização molecular de espécies de
Mycoplasma e *Bartonella* em roedores silvestres e sinantrópicos no
Brasil / Luiz Ricardo Gonçalves. – – Jaboticabal, 2016
xx, 82 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2016
Orientador: Marcos Rogério André
Coorientadora: Rosangela Zacarias Machado
Banca examinadora: José Mauricio Barbanti Duarte, Paulo
Eduardo Neves Ferreira Velho
Bibliografia

1. Análise filogenética. 2. *Bartonella*. 3. Brasil. 4. Caracterização
molecular. 5. *Mycoplasma*. 6. Roedores. I. Título. II. Jaboticabal-
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 576.85:599.323

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ESPÉCIES DE *Mycoplasma*
E *Bartonella* EM ROEDORES SILVESTRES E SINANTRÓPICOS NO BRASIL

AUTOR: LUIZ RICARDO GONÇALVES

ORIENTADOR: MARCOS ROGÉRIO ANDRÉ

CO-ORIENTADORA: ROSANGELA ZACARIAS MACHADO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em MICROBIOLOGIA
AGROPECUÁRIA, pela Comissão Examinadora:

Marcos R. André

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

Paulo Eduardo Neves Ferreira Velho
Prof. Dr. PAULO EDUARDO NEVES FERREIRA VELHO
Departamento de Clínica Médica / Universidade Estadual de Campinas

José Maurício Barbanti Duarte
Prof. Dr. JOSÉ MAURICIO BARBANTI DUARTE
Departamento de Zootecnia / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 27 de junho de 2016.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Luiz Ricardo Gonçalves – nascido na cidade de Jaboticabal, São Paulo, em 4 de novembro de 1985. Formado em Ciências Biológicas (Bacharelado) pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP, Jaboticabal, São Paulo, no ano de 2013. Durante a graduação, foi bolsista CNPQ e FAPESP (2010-2010 - CNPQ - Apoio Técnico - / Bolsa: 370406/2010-9; 2010-2011 – FAPESP – 2010/12873-0; 2012-2014 – CNPQ – Apoio Técnico - / Bolsa: 350104/2012-3), trabalhando com pesquisas na área de Parasitologia sob a orientação dos Professores: Profa. Dra. Rosangela Z. Machado e Prof. Dr. Marcos R. André. Ingressou no curso de Pós-Graduação em Microbiologia Agropecuária na FCAV/UNESP em Março de 2014 com bolsa da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

EPÍGRAFE

“...Metástase natural

O planeta se defende do homem

Que por algum motivo fabrica dez vezes mais do que precisa

E compra o dobro do que consome

Já dizia algum rei da antiga

Que quando a última árvore cair e o último rio secar

Vão descobrir que dinheiro não se come

É só papel sujo...”

(Aquele antiga canção: Oriente)

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais, Luzia C. Gonçalves e Luiz C. Gonçalves,
pelo amor, carinho e apoio em todas
as decisões da minha vida.

Maktub!

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as manhãs e pela chance de ser uma pessoa melhor a cada dia.

Aos meus pais, Luzia e Luiz, pelo amor sem limites.

Aos meus irmãos, Katia, Maiko e Luana, pelos incentivos.

As minhas sobrinhas, Aghata e Yasmim, pelo carinho incondicional.

Ao Professor Dr. Marcos R. André, pelos ensinamentos durante a orientação, respeito e confiança durante todos esses anos de Graduação e Pós-Graduação.

À Professora Dra. Rosangela Z. Machado, pelos ensinamentos e paciência durante todos esses anos.

Aos meus preciosos amigos, Jeferson A. de Sousa, Renato Camargo, João V. Vizoná, Carlos A. Matos, Marcelo Rodrigues, Natanael Camargo, Josiel Camara e Eliel Camara, pelo companherismo e lealdade.

A todos meus amigos do laboratório de Imunoparasitologia: Arvelino, Carla, Mácia, Carlos, Paulo, Otávio, Rafaela, Simone, Natália, Isabella, Inalda, Renan, Keyla, Jyan, Priscila, Letícia, Victória, Caroline, Joice, Diego e Kayo, pela amizade, colaboração e ensinamentos compartilhados.

Ao Pesquisador Dr. André L. R. Roqueda Fundação Oswaldo Cruz/FioCruz, por ter cedido as amostras analisadas no presente estudo e por ter auxiliado na redação dos trabalhos científicos frutos dessa dissertação.

À Isabel Di Azevedo, pela confiança e estadia no Rio de Janeiro.

Aos funcionários do Departamento de Patologia Veterinária, especialmente à Mabel Ap. Mastro Custodio.

À Coordenação do programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agropecuária.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo Auxílio à Pesquisa (Processo: 2015/14896-1).

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Minha imensa gratidão ao Professor Dr. Marcos R. André e à Professora Dra. Rosangela Z. Machado. Orientadores e motivadores incansáveis que, com entusiasmo, sabedoria e competência, sempre me motivaram, mesmo nos momentos turbulentos. Sempre os terei como um exemplo a ser seguido.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
LISTA DE TABELAS.....	xvi
LISTA DE FIGURAS.....	xvii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Infecções por micoplasmas hemotróficos (hemoplasmas).....	3
2.1.1. Taxonomia.....	3
2.1.2. Agentes etiológicos.....	3
2.1.3. Transmissão.....	4
2.1.4. Diagnóstico.....	4
2.1.5. Epizootiologia da hemoplasmosse em roedores.....	5
2.1.6. Infecção por hemoplasmas em humanos.....	6
2.2. Infecções por bartonelas.....	7
2.2.1. Taxonomia.....	7
2.2.2. Agentes etiológicos.....	8
2.2.3. Adaptação aos hospedeiros.....	11
2.2.4. Transmissão.....	13
2.2.5. Diagnóstico.....	17
2.2.6. Epizootiologia da bartonelose em roedores.....	18
2.2.7. Bartonelose em humanos.....	22
3. OBJETIVOS.....	26
3.1. Objetivo geral.....	26
3.2. Objetivos específicos.....	26

4. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
4.1. Distribuição e espécies de roedores amostrados.....	27
4.2. Reação em Cadeia pela Polimerase (cPCR).....	28
4.2.1. Extração de DNA das amostras de tecido esplênico de roedores.....	28
4.4.2. Controle endógeno da PCR.....	29
4.2.3. Detecção e caracterização molecular de <i>Mycoplasma</i> spp.....	30
4.2.4. Detecção, quantificação e caracterização molecular de <i>Bartonella</i> spp.....	31
4.3. Eletroforese de DNA em gel de agarose.....	33
4.4. Reação de sequenciamento.....	34
4.4.1. Purificação dos amplicómeros.....	34
4.4.2. Quantificação de DNA dos amplicómeros.....	34
4.4.3. Sequenciamento.....	34
4.5. Análise filogenética.....	35
4.6. Diversidade genética e distribuição de <i>Bartonella</i> sp. detectada em roedores no Brasil.....	36
5. RESULTADOS.....	37
5.1. Qualidade das amostras de DNA extraídas a partir de fragmentos de baço de roedores.....	37
5.2. Ocorrência de <i>Mycoplasma</i> spp.....	39
5.3. PCR em Tempo Real quantitativa (qPCR) para <i>Bartonella</i> spp.....	40
5.4. cPCR para <i>Bartonella</i> spp.....	41
5.5. Análise da identidade das sequências pelo BLASTn.....	45
5.5.1. Análise das sequências de <i>Mycoplasma</i> spp.....	45
5.5.2. Análise das sequências de <i>Bartonella</i> spp.....	47
5.6. Análise filogenética.....	47

5.6.1. Análise filogenética de <i>Mycoplasma</i> spp.....	47
5.6.2. Análise filogenética de <i>Bartonella</i> spp.....	50
5.6.3. Diversidade de <i>Bartonella</i> sp.....	50
6. DISCUSSÃO.....	58
7. CONCLUSÕES.....	66
8. REFERÊNCIAS.....	67



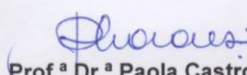
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 6.564/15 do trabalho de pesquisa intitulado **"Detecção e caracterização molecular de *Bartonella* spp. e hemoplasmas em roedores selvagens e sinantrópicos no 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

DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ESPÉCIES DE *Mycoplasma* e *Bartonella* EM ROEDORES SILVESTRES E SINANTRÓPICOS NO BRASIL

RESUMO – Patógenos transmitidos por vetores artrópodes são mundialmente importantes, podendo causar enfermidades tanto no homem quanto nos animais. Recentemente, diversos estudos têm sido realizados a fim de elucidar o papel dos animais selvagens na epidemiologia desses patógenos. A identificação desses microrganismos, assim como dos seus vetores e hospedeiros, permite mapear áreas de ocorrência desses patógenos, auxiliando os órgãos competentes na elaboração de medidas de controle. Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo detectar e caracterizar, por métodos moleculares, micoplasmas hemotróficos e bartonelas em amostras de baço de roedores selvagens e sinantrópicos distribuídos em cinco biomas brasileiros. Para tal, foram analisadas 500 amostras de roedores pertencentes a 51 espécies distribuídas em 13 estados. Dentre as 457 amostras de DNA positivas nos ensaios de PCR baseados nos genes *Interphotoreceptor retinoid binding protein* [IRBP] ou *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* [GAPDH], 100 (21,9%) mostraram-se positivas para *Mycoplasma* spp. por meio da cPCR baseada no gene 16S rRNA. A análise filogenética de 24 sequências do gene 16S rRNA mostrou a presença de dez diferentes *clusters*, todos agrupados dentro do grupo *Mycoplasma haemofelis*. O posicionamento filogenético associado com a baixa porcentagem de identidade entre as sequências amplificadas no presente estudo e aquelas previamente depositadas no Genbank sugere a circulação de novas espécies de hemoplasmas em roedores no Brasil. Por meio da qPCR, 117 (25,6%) amostras mostraram-se positivas para *Bartonella* sp. A análise de diversidade das sequências do gene *gltA* mostrou a presença de 15 haplótipos. A relação filogenética entre as sequências do gene *gltA* mostrou que a espécie de *Bartonella* detectada em roedores no Brasil é intimamente relacionada com *Bartonella* sp. denominada como grupo filogenético A detectada em roedores da Família Cricetidae na América do Norte, provavelmente formando uma única espécie ou um complexo de espécies. Por outro lado, as sequências amplificadas por meio de ensaios de cPCR adicionais, baseados nos genes *ftsZ*, *groEL* e *pap-31*, mostraram-se filogeneticamente próximas ao complexo *Bartonella vinsonii*. Por fim, as sequências de *Bartonella* amplificadas no presente estudo formaram um grupo monofilético e amplamente difundidas em sete diferentes espécies de roedores amostrados em três biomas. Tais achados sugerem uma provável dominância desse genótipo entre os roedores silvestres no Brasil. Copositividade para hemoplasmas e *Bartonella* sp. foi observada em 41 (9%) dos roedores amostrados. O presente estudo demonstrou, por meio de métodos moleculares, a ocorrência de micoplasmas hemotróficos e *Bartonella* sp. em roedores selvagens e sinantrópicos no Brasil.

Palavras-chave: Análise filogenética, *Bartonella*, Brasil, Caracterização molecular, *Mycoplasma*, Roedores

MOLECULAR DETECTION AND CHARACTERIZATION OF *Mycoplasma* AND *Bartonella* species IN WILD AND SYNANTHROPIC RODENTS IN BRAZIL

ABSTRACT – Arthropod-borne pathogens are worldwide important, causing diseases in humans and animals. Recently, several studies have been performed in order to elucidate the role of wild animals in the epidemiology of these pathogens. The identification of these microorganisms, as well as their vectors and hosts, allow to map the areas of occurrence of these pathogens, helping competent agencies in the development of control measures. Therefore, the present study aimed to detect and characterize, using molecular methods, hemotrophic mycoplasmas and *Bartonella* in wild and sinanthropic rodent spleen samples distributed in five Brazilian biomes. For this purpose, 500 rodent samples belonging to 51 species distributed in 13 states were analyzed. Among 457 DNA samples positive to PCR assays based on the Interphotoreceptor retinoid binding protein [IRBP] or *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* [GAPDH] genes, 100 (21.9%) were positive to *Mycoplasma* spp. by cPCR based on 16S rRNA gene. The phylogenetic analysis of 24 sequences of the 16S rRNA gene showed the presence of ten different clusters, which grouped within the *Mycoplasma haemofelis* group. The phylogenetic position associated with the low percentage of identity between the sequences amplified in the present study and those previously deposited in Genbank suggest the circulation of new hemoplasmas species in rodents in Brazil. Additionally, 117 (25.6%) samples were positive to *Bartonella* sp. by qPCR. The diversity analysis of the *gltA* gene sequences showed the presence of 15 haplotypes. The phylogenetic relationships between the sequences of *gltA* gene showed that *Bartonella* species detected in rodents in Brazil is closely related to *Bartonella* sp. namely phylogenetic group A detected in the rodents belonging to Cricetidae family in North America, probably constituting only one species, or a complex of species. On the other hand, the amplified sequences by additional cPCR assays based on *ftsZ*, *groEL* and *pap-31* genes were phylogenetically positioned to *Bartonella vinsonii* complex. Finally, the *Bartonella* sequences amplified in the present study formed a monophyletic and widespread group in seven different species of rodents sampled in three biomes. These findings suggest a probable dominance of this genotype among wild rodents in Brazil. Co-positivity was observed in 41 (9%) of rodents sampled. The presente study demonstrated using molecular methods, the occurrence of hemotrophic mycoplasmas and *Bartonella* sp. in wild and synanthropic rodents in Brazil.

Keywords: *Bartonella*, Brazil, Molecular characterization, *Mycoplasma*, Phylogenetic analisys, Rodents

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Espécies de <i>Bartonella</i> adaptadas a roedores, distribuição geográfica, espécies de hospedeiros roedores identificadas, vetores e potencial patogênico para humanos.....	9
Tabela 2. Espécies e subespécies de <i>Bartonella</i> detectadas em seres humanos, reservatórios, possíveis vetores, hospedeiros acidentais e manifestações clínicas em seres humanos.....	23
Tabela 3. Protocolos utilizados para caracterização molecular de <i>Bartonella</i> spp.....	33
Tabela 4. Distribuição, espécies e número de roedores analisados entre o período de 2000 a 2012.....	38
Tabela 5. Ocorrência e quantificação absoluta de DNA de <i>Bartonella</i> spp. entre os roedores capturados nos diferentes biomas brasileiros..	41
Tabela 6. Porcentagem de identidade (Blastn) entre as sequências do gene 16S rRNA de hemoplasmas detectadas em roedores no Brasil e outras sequências previamente depositadas no GenBank.....	46
Tabela 7. Polimorfismo e diversidade genética de <i>Bartonella</i> sp. detectada em roedores silvestres no Brasil.....	57

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Mecanismos experimentalmente demonstrados e potenciais rotas de transmissão de <i>Bartonella</i> spp. entre roedores. Linhas verdes: mecanismo experimentalmente demonstrado; Linhas vermelhas: ausência de transmissão; Linhas azuis pontilhadas: rotas de transmissão sugeridas. Caixas com linhas laranja indicam evidências indiretas para os mecanismos sugeridos.....	16
Figura 2. Ocorrência de <i>Bartonella</i> spp. em roedores.....	19
Figura 3. Distribuição dos roedores capturados em cinco biomas brasileiros.....	29
Figura 4. Fotografia de eletroforese em gel de agarose 1,0% corado com Brometo de Etídeo. Os amplímeros mostrados na foto são relativos à cPCR para controle endógeno (gene <i>IRBP</i>). Canaleta M: marcador de peso molecular em escala de 100 pares de bases (Life Technologies®); canaleta C+: controle positivo (DNA de <i>Akodon</i> sp.); canaleta C-: controle negativo (água ultra-pura esterilizada); canaletas 1-22: amostras de DNA de roedores.....	39
Figura 5. Fotografia de eletroforese em gel de agarose 1,0% corado com Brometo de Etídeo. Os amplímeros mostrados na foto são relativos à cPCR para <i>Mycoplasma</i> spp. (gene 16S rRNA). Canaleta M: marcador de peso molecular em escala de 100 pares de bases (Life Technologies®); canaleta C+: controle positivo (DNA de <i>M. haemofelis</i>); canaletas 1-19: amostras de DNA de roedores; canaleta C-: controle negativo (água ultra-pura esterilizada).....	40
Figura 6. qPCR para <i>Bartonella</i> spp. dirigida para o gene <i>nuoG</i> . Figura 6A: linhas pretas são referentes à amplificação da curva padrão; linhas vermelhas ultrapassando a linha de <i>threshold</i> são referentes às amostras de DNA de baço de roedores positivas para <i>Bartonella</i> spp. Figura 6B: Regressão logarítmica da curva padrão....	41
Figura 7. Fotografia de eletroforese em gel de agarose 1,0% corado com Brometo de Etídeo. Os amplímeros mostrados na foto são relativos à cPCR para <i>Bartonella</i> spp. (gene <i>gltA</i>). Canaleta M: marcador de peso molecular em escala de 100 pares de bases (Life Technologies®); canaleta C+: controle positivo (DNA de <i>B. henselae</i>); canaletas 1-5: amostras de DNA de roedores; canaleta C-: controle negativo (água ultra-pura esterilizada).....	42

- Figura 8.** Fotografia de eletroforese em gel de agarose 1,0% corado com Brometo de Etídeo. Os amplicómeros mostrados na foto são relativos à cPCR para *Bartonella* spp. (gene *ftsZ*). Canaleta M: marcador de peso molecular em escala de 1 kb (Life Technologies®); canaleta C+: controle positivo (DNA de *B. henselae*); canaletas 1-10: amostras de DNA de roedores; canaleta C-: controle negativo (água ultra-pura esterelizada)..... 42
- Figura 9.** Fotografia de eletroforese em gel de agarose 1,0% corado com Brometo de Etídeo. Os amplicómeros mostrados na foto são relativos à cPCR para *Bartonella* spp. (gene *groEL*). Canaleta M: marcador de peso molecular em escala de 100 pares de bases (Life Technologies®); canaleta C+: controle positivo (DNA de *B. henselae*); canaletas 1-12: amostras de DNA de roedores; canaleta C-: controle negativo (água ultra-pura esterelizada)..... 43
- Figura 10.** Fotografia de eletroforese em gel de agarose 1,0% corado com Brometo de Etídeo. Os amplicómeros mostrados na foto são relativos à cPCR para *Bartonella* spp. (gene *pap-31*). Canaleta M: marcador de peso molecular em escala de 100 pares de bases (Life Technologies®); canaleta C+: controle positivo (DNA de *B. henselae*); canaletas 1-18: amostras de DNA de roedores; canaleta C-: controle negativo (água ultra-pura esterelizada)..... 43
- Figura 11.** Fotografia de eletroforese em gel de agarose 1,0% corado com Brometo de Etídeo. Os amplicómeros mostrados na foto são relativos à cPCR para *Bartonella* spp. (fragmento *ITS*). Canaleta M: marcador de peso molecular em escala de 100 pares de bases (Life Technologies®); canaleta C+: controle positivo (DNA de *B. henselae*); canaletas 1 e 2: amostras de DNA de roedores; canaleta C-: controle negativo (água ultra-pura esterelizada)..... 44
- Figura 12.** Número de roedores simultaneamente positivos para *Bartonella* baseado em dois ou mais ensaios de cPCR..... 44
- Figura 13.** Relação filogenética dentro do gênero *Mycoplasma* baseada em um fragmento de 1500 pb do gene 16S rRNA. A árvore filogenética foi inferida usando o método de *Maximum Likelihood* e o modelo evolutivo GTRGAMMA + I. As sequências amplificadas no presente estudo estão destacadas em negrito. Os números em cada ramo são correspondentes aos valores de *bootstrap* maiores que 60% acessados com 1000 réplicas. *Mycoplasma pneumoniae* foi usado como *outgroup*..... 49

Figura 14. Relação filogenética dentro do gênero *Bartonella* baseado em um fragmento de 350 pb (após alinhamento) do gene *gltA*. A árvore filogenética foi inferida usando o método de *Maximum Likelihood* e o modelo evolutivo T92 + G + I. As sequências amplificadas no presente estudo estão destacadas. Os números em cada ramo são correspondentes aos valores de *bootstrap* maiores que 50% acessados com 1000 replicatas. *B. tamiae* foi usada como *outgroup*. MA: Mata Atlântica; CA: Caatinga; CE: Cerrado..... 51

Figura 15. Relação filogenética dentro do gênero *Bartonella* baseado em um fragmento de 350 pb (após alinhamento) do gene *gltA*. A árvore filogenética foi inferida usando a análise Bayesiana e o modelo evolutivo T92 + G + I. As sequências amplificadas no presente estudo estão destacadas. Os números em cada ramo são correspondentes aos valores das probabilidades posteriores maiores que 50% acessados com 10⁷ replicatas. *B. tamiae* foi usada como *outgroup*. MA: Mata Atlântica; CA: Caatinga; CE: Cerrado..... 52

Figura 16. Relação filogenética dentro do gênero *Bartonella* baseado em um fragmento de 750 pb (após alinhamento) do gene *ftsZ*. A árvore filogenética foi inferida usando o método de *Maximum Likelihood* e o modelo evolutivo GTR + G + I. As sequências amplificadas no presente estudo estão destacadas. Os números em cada ramo são correspondentes aos valores de *bootstrap* maiores que 50% acessados com 1000 replicatas. *B. tamiae* foi usada como *outgroup*. MA: Mata Atlântica; CE: Cerrado..... 53

Figura 17. Relação filogenética dentro do gênero *Bartonella* baseado em um fragmento de 1468 pb (após alinhamento) do gene *groEL*. A árvore filogenética foi inferida usando o método de *Maximum Likelihood* e o modelo evolutivo TN93 + G + I. As sequências amplificadas no presente estudo estão destacadas. Os números em cada ramo são correspondentes aos valores de *bootstrap* maiores que 50% acessados com 1000 replicatas. *B. tamiae* foi usada como *outgroup*. MA: Mata Atlântica; CE: Cerrado..... 54

Figura 18. Relação filogenética dentro do gênero *Bartonella* baseado em um fragmento de 582 pb (após alinhamento) do gene *pap-31*. A árvore filogenética foi inferida usando o método de *Maximum Likelihood* e o modelo evolutivo GTR + G + I. As sequências amplificadas no presente estudo estão destacadas. Os números em cada ramo são correspondentes aos valores de *bootstrap* maiores que 50% acessados com 1000 replicatas. *B. bacilliformis* foi usada como *outgroup*. MA: Mata Atlântica..... 55

Figura 19. Relação filogenética dentro do gênero *Bartonella* baseado na concatenação dos genes *gltA*, *ftsZ* e *groEL* (3375 pb). A árvore filogenética foi inferida usando a análise Bayesiana. As sequências amplificadas no presente estudo estão destacadas. Os números em cada ramo são correspondentes aos valores das probabilidades posteriores maiores que 50% acessados com 10^7 replicatas. *B. tamiae* foi usada como *outgroup*. MA: Mata Atlântica; CE: Cerrado..... **55**

Figura 20. Median-joining network dos haplótipos do gene *gltA* de *Bartonella* sp. detectados em roedores amostrados em diferentes locais do Brasil. MA: Mata Atlântica; CE: Cerrado; CA: Caatinga..... **56**

Figura 21. Distribuição dos haplótipos de *Bartonella* nos diferentes biomas brasileiros..... **56**

1. INTRODUÇÃO

Patógenos transmitidos por vetores artrópodes são importantes causas de morbidade e mortalidade em várias espécies de animais, incluindo os seres humanos. Neste cenário, micoplasmas hemotróficos (também conhecidos como hemoplasmas) e bartonelas emergem como importantes patógenos, tanto na medicina humana como veterinária (BREITSCHWERDT et al., 2010a; MAGGI et al., 2013a,b). Enquanto micoplasmas hemotróficos são parasitas obrigatórios com ausência de parede celular que se ligam à superfície dos eritrócitos, bartonelas são bactérias intracelulares facultativas que parasitam, preferencialmente, células endoteliais e eritrócitos, promovendo uma longa bacteremia intra-eritrocítica nos seus reservatórios (NEIMARK et al., 2001; 2005; MUSSO et al., 2001; EICHER e DEHIO, 2012).

Várias espécies de artrópodes (pulgas, carrapatos, piolhos, moscas e mosquitos) estão envolvidas na transmissão de bartonelas e hemoplasmas entre seus hospedeiros. O território brasileiro possui características climáticas adequadas ao desenvolvimento de vetores artrópodes, favorecendo o seu desenvolvimento e a possível transmissão de patógenos entre os hospedeiros suscetíveis (BIONDO et al., 2009; CHOMEL, 2011).

Rodentia representa a maior Ordem de mamíferos, abrangendo atualmente 2277 espécies descritas e aproximadamente 42% da biodiversidade de mamíferos em todo o mundo. No Brasil, uma ampla variedade de espécies de roedores é encontrada em diferentes habitats, incluindo semiaquáticos, terrestres, arborícolas e fossoriais (WILSON e REEDER, 2005; BONVIVINO et al., 2008).

Embora o potencial zoonótico das espécies de hemoplasmas associadas a roedores ainda não tenha sido estabelecido, oito, dentre as 22 espécies ou subespécies de *Bartonella* que infectam roedores, têm sido implicadas como agentes causais de manifestações clínicas em seres humanos, incluindo endocardites, miocardites, febre, distúrbios neurológicos, meningites, esplenomegalia, fadiga, mialgiae linfadenopatia (FOLEY et al., 1998; BREITSCHWERDT, 2014; GUTIÉRREZ et al., 2015).

Uma vez que 75% das doenças infecciosas emergentes são zoonoses, sendo a maioria transmitida por vetores artrópodes, uma abordagem

multidisciplinar *One Health* para as infecções causadas por micoplasmas hemotróficos e bartonelas, assim como para outros agentes zoonóticos, é necessária para revelar o verdadeiro impacto na Saúde Pública, e por fim, identificar quais fatores ambientais regem a distribuição desses patógenos em nosso território. O conceito *One Health* encoraja o espírito de cooperação entre médicos, veterinários, biólogos, ecólogos e outros profissionais da Saúde, e promove o desenvolvimento de medidas integradas para solucionar problemas complexos que impactam a saúde animal, humana e o planeta (BREITSCHWERDT, 2014).

Com o advento da era pós-genômica, inúmeras abordagens moleculares em Microbiologia surgiram e resultaram em uma ampla variedade de novas técnicas que têm auxiliado a identificação, descrição e caracterização dos organismos vivos (Taxonomia). Além disso, é possível estudar as relações de ancestralidade e adaptações dos organismos nos seus respectivos habitat (Sistemática) (LA SCOLA et al., 2003; KOSOY et al., 2012; BUFFET et al., 2013a).

Ainda que roedores silvestres e sinantrópicos sejam considerados reservatórios de *Mycoplasma* spp. e *Bartonella* spp., poucos estudos têm sido conduzidos no Brasil no que diz respeito à epidemiologia, diversidade genética, ecologia desses patógenos e, tampouco, sobre a biologia dos seus vetores. Sendo assim, o atual estudo propõe verificar se estes agentes estão presentes entre roedores selvagens capturados em diferentes biomas brasileiros.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Infecções por micoplasmas hemotróficos (hemoplasmas)

2.1.1. Taxonomia

Bactérias do gênero *Mycoplasma* estão posicionadas dentro da Classe Mollicutes, Ordem Mycoplasmatales, Família Mycoplasmataceae (TULLY et al., 1993). Anteriormente, as espécies de hemoplasmas associadas a roedores, *Mycoplasma haemomuris* e *Mycoplasma coccoides*, pertenciam a diferentes gêneros, sendo classificadas como *Haemobartonella muris* e *Eperythrozoon coccoides*, respectivamente, e posicionadas dentro da Família Anaplasmataceae, na Ordem Rickettsiales. Entretanto, com base em análises de sequências do gene 16S rRNA, Neimark et al. (2001; 2005) propuseram a transferência dessas duas espécies para o gênero *Mycoplasma*. Recentemente, Harasawa et al. (2015) sugeriram que a espécie *M. haemomuris* poderia ser dividida em duas subespécies, '*Candidatus Mycoplasma haemomuris* subsp. *musculi*' e '*Candidatus Mycoplasma haemomuris* subsp. *ratti*'.

2.1.2. Agentes etiológicos

Micoplasmas hemotróficos são bactérias fastidiosas, de formato cocóide e com ausência de parede celular, sendo encontradas aderidas à superfície dos eritrócitos ou livres no plasma. Quando ligadas aos eritrócitos, essas bactérias podem causar deformações na superfície celular. Todas as espécies descritas até o presente momento apresentam diâmetro menor que 0,9 µm, não são cultiváveis *in vitro* e são resistentes à penicilina e sensíveis à tetraciclina (NEIMARK et al., 2001).

Dentre as espécies de hemoplasmas descritas, *M. haemomuris* e *M. coccoides* são conhecidas por parasitarem roedores. Entretanto, recentes estudos têm demonstrado que diferentes genótipos e, provavelmente, novas espécies, circulam em roedores silvestres e sinantrópicos no Brasil e Hungria (VIEIRA et al., 2009; CONRADO et al., 2015; HORNOK et al., 2015).

2.1.3. Transmissão

O estilo de vida epieritrocítico dos hemoplasmas favorece a transmissão por artrópodes sugadores de sangue (carrapatos, pulgas, piolhos, etc.). Porém, estudos experimentais objetivando investigar a competência vetorial de tais artrópodes são escassos (BIONDO et al., 2009).

Estudos experimentais têm demonstrado a competência vetorial dos piolhos das espécies *Polyplax serrata* e *Polyplax spinulosa* em transmitir *M. coccoides* entre camundongos. Adicionalmente, verificou-se ausência de transmissão transovariana e sugeriu-se que a transmissão ocorre de forma mecânica, devido à ausência de replicação destas bactérias no interior destes artrópodes (ELIOT, 1936; BERKENKAMP e WESCOTT, 1988). Ainda, a transmissão de *M. coccoides* por ácaros (*Myocoptes musculus*, *Myobia musculi* e *Radfordia affinis*) não foi observada (BERKENKAMP e WESCOTT, 1988).

Recentemente, DNA de *Mycoplasma* sp. foi detectado em pulgas (*Synosternus cleopatrae*) coletadas de roedores (*Gerbillus andersoni*) amostrados no deserto de Negev, Israel (COHEN et al., 2015), destacando o possível papel de outros artrópodes na transmissão destes patógenos entre os roedores.

2.1.4. Diagnóstico

Historicamente, o diagnóstico da hemoplasmose era baseado na demonstração dos organismos na superfície dos eritrócitos parasitados por meio da microscopia de luz de esfregaços sanguíneos corados, especialmente na fase aguda da infecção (SYKES, 2010). Porém, essa metodologia apresenta baixa sensibilidade. Ainda, resultados falso-positivos podem ocorrer em função de artefatos refráteis, precipitados de corantes e corpúsculos de Howell-Jolly (TASKER e LAPIN, 2002; WILLI et al., 2007).

Atualmente, a amplificação de ácidos nucleicos (DNA), seja por meio da PCR convencional (cPCR) ou em tempo real (qPCR), é a ferramenta de escolha para o diagnóstico das infecções causadas por hemoplasmas (WILLI et al., 2007; SYKES, 2010). Nesse sentido, inúmeros protocolos que amplificam diferentes fragmentos gênicos (16S rRNA, RNase P [Ribonuclease P] e rnpB [subunidade β da RNA polimerase]) (BIRKENHEUER et al., 2002; MAGGI et

al., 2013a), por meio da cPCR, foram desenvolvidos e vêm facilitando o diagnóstico da hemoplasmose. A qPCR vem trazendo maiores rapidez e sensibilidade, aliada a um menor risco de contaminação durante a amplificação do DNA, facilitando o diagnóstico, principalmente quando há baixa bacteremia (WILLI et al., 2009).

2.1.5. Epizootiologia da hemoplasmose em roedores

Embora a hemoplasmose em animais domésticos seja bem documentada, pouco é conhecido sobre a prevalência, diversidade genética, rotas de transmissão e o impacto da infecção por hemoplasmas na saúde dos animais selvagens (FOLEY et al., 1998; WILLI et al., 2007).

Durante o controle de roedores na cidade de Morioka, Japão, DNA de *Mycoplasma* sp., filogeneticamente próximo a *M. haemomuris*, foi detectado em 11,1% (1/9) dos roedores sinantrópicos (*Rattus rattus*) capturados nos arredores de um hospital veterinário (SASHIDA et al., 2013).

Hornok et al. (2015) detectaram DNA de hemoplasmas em 67,3% (35/52) dos roedores sinantrópicos (*R. rattus* e *Mus musculus*) e silvestres (*Micromys minutus*) amostrados em dez diferentes locais nas fronteiras nordeste e sul da Hungria.

No Brasil, DNA de micoplasmas hemotróficos foi detectado em 64% (21/34) das amostras de sangue de capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) capturadas no estado do Paraná. Os fragmentos de DNA amplificados mostraram identidades variando de 91,6 a 92% com *M. coccoides* e 91 a 91,4% com '*Candidatus M. turicensis*'. Ainda, a análise de distância (*neighbour-joining*) mostrou que as sequências do 16S rRNA amplificadas posicionaram-se próximas à *M. coccoides* (VIEIRA et al., 2009). Recentemente, *Mycoplasma* spp. foram detectados em 63,5% (40/63) dos roedores sinantrópicos (*Rattus norvegicus*) amostrados no estado do Paraná. As sequências do 16S rRNA amplificadas, quando submetidas à análise de distância, posicionaram-se próximas a '*Candidatus Mycoplasma haemomuris subsp. ratti*' e fragmentos de DNA de *Mycoplasma* sp. detectados previamente em roedores sinantrópicos e silvestres amostrados no Japão e Hungria, respectivamente (CONRADO et al., 2015).

2.1.6. Infecção por hemoplasmas em humanos

Embora o potencial patogênico dos hemoplasmas em causar doença em seres humanos não tenha sido bem estabelecido, estes patógenos podem emergir como um possível problema de Saúde Pública (MAGGI et al., 2013a).

Baseado em métodos moleculares, até o presente momento cinco espécies de hemoplasmas foram detectadas em seres humanos: *Mycoplasma haemofelis*-like (DOS SANTOS et al., 2008), *Mycoplasma suis*-like (YUAN et al., 2009), *Mycoplasma ovis* (SYKES, 2010; MAGGI et al., 2013a), ‘*Candidatus Mycoplasma haemohominis*’ (STEER et al., 2011) e ‘*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*’ (MAGGI et al., 2013a,b). Adicionalmente, uma provável nova espécie, mas ainda não completamente caracterizada, compartilhando 93% de identidade com uma sequência de *Mycoplasma* sp. previamente amplificada em um roedor do Brasil, foi detectada em um veterinário no estado da Geórgia, Estados Unidos da América (MAGGI et al., 2013b).

Por meio de esfregaços sanguíneos, 37,5% dentre os 1677 pacientes humanos amostrados na Mongólia Interior, China, mostraram-se positivos para *Mycoplasma* sp. Dentre esses, 44 das 74 mulheres grávidas analisadas foram positivas. Ainda, *Mycoplasma* sp. foi detectado em 44 (100%) das amostras de cordões umbilicais avaliadas, sugerindo uma provável transmissão transplacentária. Adicionalmente, foi observada uma maior ocorrência da infecção por hemoplasmas entre o verão/outono, quando comparado àquela encontrada no inverno/primavera. Ainda, maior ocorrência foi verificada em pessoas com constante contato com animais (fazendeiros e médicos veterinários) quando comparadas àquelas com pouco ou nenhum contato com animais (YANG et al., 2000).

Um estudo retrospectivo analisando 24 trabalhos científicos, totalizando 52433 pacientes humanos provenientes de 18 províncias da China, demonstrou, por meio de esfregaços sanguíneos, que 28,5% (14591/52433) dos pacientes chineses analisados mostraram-se positivos para *Mycoplasma* spp. Ainda, verificou-se uma grande variação na ocorrência da infecção (0 a 97,3%), de acordo com a região geográfica, idade, ocupação e estação do ano (HUANG et al., 2012).

No Brasil, *M. haemofelis*-like foi detectado em um paciente HIV-positivo, co-infectado com *Bartonella henselae* (DOS SANTOS et al., 2008).

Recentemente, DNA de *Mycoplasma* sp. foi detectado, por meio da qPCR, em 1% (1/100) dos moradores de um assentamento rural no estado do Paraná. Entretanto, como não foi possível a amplificação dos fragmentos do 16S rRNA ou 23S rRNA pela cPCR, a identificação a nível de espécie não foi realizada (VIEIRA et al., 2015).

Embora alguns relatos de infecção humana com hemoplasmas tenham sido realizados, a falta de informação sobre o histórico clínico dos pacientes infectados, aliada à frequente coinfeção com outros patógenos, principalmente com *B. henselae* (DOS SANTOS et al., 2008; MAGGI et al., 2013b), impede a correlação da infecção com os sintomas e sinais clínicos apresentado pelos pacientes. Entretanto, Steer et al. (2011) relataram a infecção de uma mulher no condado de Devon, Inglaterra, positiva para '*Candidatus* Mycoplasma haemohominis' e apresentando febre, anemia hemolítica e neutropenia moderada após voltar de férias da Austrália e de Singapura.

2.2. Infecções por bartonelas

2.2.1. Taxonomia

Bactérias do gênero *Bartonella* pertencem à Classe Alfa-Proteobacteria, Ordem Rhizobiales e Família Bartonellaceae. O gênero *Bartonella* foi proposto há mais de um século, quando em 1905, Alberto Barton identificou o agente etiológico da doença de Carrión observando esfregaços sanguíneos de pacientes com a febre de Oroya. Posteriormente, essa bactéria foi nomeada como *Bartonella bacilliformis* em sua homenagem (KUYKENDALL, 2006; MINNICK et al., 2014).

Analisando sequências do gene 16S rRNA, observou-se que a *B. bacilliformis* era geneticamente similar ao agente causador da febre das trincheiras, o qual era denominado *Rochalimaea quintana* (BIRTLES et al., 1991) e ao emergente patógeno conhecido como *Rochalimaea henselae* (WELCH et al., 1992). Por fim, o gênero *Rochalimaea* foi incorporado ao gênero *Bartonella* (BRENNER et al., 1993). Adicionalmente, o gênero *Grahamella*, o qual era composto por diminutas bactérias detectadas principalmente em pequenos mamíferos, também foi incorporada ao gênero *Bartonella* (BIRTLES et al., 1995).

2.2.2. Agentes etiológicos

Atualmente, o gênero *Bartonella* é composto por aproximadamente 33 espécies e/ou subespécies (BUFFET et al., 2013a), compreendendo bactérias fastidiosas, gram-negativas e intracelulares facultativas que parasitam principalmente eritrócitos e células endoteliais, podendo também colonizar células dendríticas, macrófagos e monócitos de uma ampla variedade de mamíferos, incluindo os seres humanos (MUSSO et al., 2001; EICHER e DEHIO, 2012). Dentre as espécies e/ou subespécies descritas até o presente momento, 22 estão relacionadas a roedores, dentre as quais, oito estão envolvidas em infecções humanas (**Tabela 1**), causando inúmeras manifestações clínicas em dependência da espécie e do estado imunológico do hospedeiro envolvido (EICHER e DEHIO, 2012).

Um traço comum entre as espécies de *Bartonella* baseia-se no tropismo por eritrócitos, apresentando como característica marcante o desenvolvimento de uma bacteremia intra-eritrocítica duradoura. Esta propriedade garante uma parcial evasão do sistema imune e aumenta suas chances de transmissão para um novo hospedeiro susceptível mediada por vetores artrópodes (DEHIO, 2001). Ainda, outra característica das espécies de *Bartonella* é a capacidade de colonizar células do endotélio vascular, provocando vários distúrbios nessas células, tais como alterações no fenótipo pró-inflamatório, na dinâmica do citoesqueleto, no controle da apoptose e na sua divisão. Tais distúrbios podem levar ao surgimento de tumores vasculares e vasoproliferação, sendo essa última uma característica única dessas bactérias (DEHIO, 2005).

Tabela 1. Espécies de *Bartonella* spp. adaptadas a roedores, distribuição geográfica, espécies de hospedeiros roedores identificadas, vetores e potencial patogênico para humanos.

<i>Bartonella</i> spp.	Distribuição	Espécies acometidas	Possíveis vetores	Infecção humana
<i>B. acomydis</i>	Japão	<i>Acomys russatus</i>	Desconhecido	Não relatada
<i>B. birtlesii</i>	Europa	<i>Apodemus</i> spp., <i>Myodes glareolus</i>	Desconhecido	Não relatada
<i>B. callosciuri</i>	Japão	<i>Callosciurus notatus</i>	Desconhecido	Não relatada
<i>B. coopersplainsensis</i>	Ásia/Austrália	<i>Rattus</i> spp.	¹ <i>Stephanocircus pectinipes</i>	Não relatada
<i>B. doshiae</i>	Europa/América do Norte	<i>Apodemus</i> spp., <i>myodes glareolus</i> , <i>Microtus agrestis</i> e <i>Sigmodon hispidus</i>	¹ <i>Polygenis gwyni</i>	Sim
<i>B. elizabethae</i>	Mundial	<i>Rattus</i> spp., <i>Bandicota</i> spp., <i>Mus</i> spp., <i>Tatera leucogaster</i> , <i>Meriones shawi</i> , <i>Saccostomus campestris</i> , <i>Arvicanthis</i> spp., <i>Praomys</i> spp., <i>Grammomys</i> spp., <i>Aethomys namaquensis</i>	¹ <i>Xenopsylla cheopis</i> , ¹ <i>Xenopsylla ramesis</i> , ³ <i>Rhipicephalus microplus</i>	Sim
<i>B. grahamii</i>	Hemifério Norte	<i>Apodemus</i> spp., <i>Myodes</i> spp., <i>Microtus</i> spp., <i>Mus</i> spp., <i>Rattus</i> spp.	¹ <i>Ctenophthalmus nobilis nobilis</i>	Sim
<i>B. jaculi</i>	Japão/Egito	<i>Jaculus orientalis</i>	Desconhecido	Não relatada
<i>B. japonica</i>	Japão	<i>Apodemus argenteus</i>	Desconhecido	Não relatada
<i>B. pachyuromydis</i>	Japão	<i>Pachyuromys duprasi</i>	Desconhecido	Não relatada
<i>B. phoceensis</i>	Ásia/Europa	<i>Rattus</i> spp.	² <i>Polyplax spinulosa</i>	Não relatada
<i>B. queenslandensis</i>	América do Norte/Ásia Austrália/África	<i>Rattus</i> spp., <i>Bandicota</i> spp., <i>Suncus murinus</i> , <i>Mus</i> spp., <i>Arvicanthis</i> spp., <i>Praomys</i> spp., <i>Grammomys</i> spp.	¹ <i>Xenopsylla cheopis</i>	Não relatada
<i>B. rattaustraliani</i>	Austrália	<i>Melomys</i> spp., <i>Rattus</i> spp.	¹ <i>Stephanocircus dasyuri</i>	Não relatada
<i>B. rattimassiliensis</i>	Ásia/Europa	<i>Rattus</i> spp., <i>Bandicota</i> spp., <i>Suncus murinus</i> , <i>Mus</i> spp.	² <i>Polyplax spinulosa</i> , ³ <i>Haemaphysalis longicornis</i> e ² <i>Hoplopleura pacifica</i>	Não relatada
<i>B. rochalimae</i>	Hemifério Norte	<i>Rattus</i> spp., <i>Myodes glareolus</i> , <i>Apodemus</i> spp.	¹ <i>Xenopsylla cheopis</i>	Sim
<i>B. silvatica</i>	Japão	<i>Apodemus speciosus</i>	Desconhecido	Não relatada
<i>B. tamiae</i>	Tailândia	Desconhecido	³ <i>Haemaphysalis</i> spp., ⁴ <i>Leptotrombidium</i> spp.	Sim
<i>B. taylorii</i>	Europa/Ásia	<i>Apodemus</i> spp., <i>Myodes</i> spp., <i>Microtus</i> spp.	¹ <i>Ctenophthalmus nobilis nobilis</i>	Não relatada
<i>B. tribocorum</i>	Mundial	<i>Rattus</i> spp., <i>Bandicota</i> spp., <i>Mus</i> spp., <i>Aethomys namaquensis</i> , <i>Meriones shawi</i> , <i>Arvicanthis</i> spp., <i>Praomys</i> spp., <i>Grammomys</i> spp.	² <i>Polyplax spinulosa</i> e ¹ <i>Xenopsylla cheopis</i>	Sim
<i>B. vinsonii</i> subsp. <i>arupensis</i>	América do Norte	<i>Peromyscus</i> spp., <i>Onychomys</i> spp.	¹ <i>Oropsylla hirsuta</i> , ¹ <i>Aetheca wagneri</i> e ¹ <i>Orchopeas leucopus</i>	Sim
<i>B. vinsonii</i> subsp. <i>vinsonii</i>	América do Norte	<i>Neotoma</i> spp., <i>Myodes gapperi</i> , <i>Microtus pennsylvanicus</i>	Desconhecido	Não relatada
<i>B. washoensis</i>	Hemifério Norte	<i>Tamias</i> spp., <i>Spermophilus</i> spp., <i>Cynomys</i> spp.	¹ <i>Oropsylla hirsuta</i> , ¹ <i>Aetheca wagneri</i> e ¹ <i>Orchopeas leucopus</i>	Sim

*Adaptado de (BUFFET et al., 2013a).

¹Espécies de pulgas; ²Espécies de piolhos; ³Espécies de carrapatos; ⁴Espécies de ácaros

Aliada à alta prevalência de infecção por *Bartonella* spp. em roedores, diversos trabalhos têm relatado uma grande diversidade genética entre as espécies de *Bartonella* parasitando este grupo de animais (BERGLUND et al., 2010; BUFFET et al., 2013b). Esta alta diversidade genética, provavelmente, contribui para a alta prevalência da infecção em roedores, uma vez que a existência de diferentes amostras circulantes dificultaria a resposta imunológica do hospedeiro infectado (BUFFET et al., 2013a). Esta hipótese é suportada por trabalhos realizados na Europa e na América do Norte com roedores capturados, marcados e posteriormente recapturados em um segundo momento. Os resultados obtidos revelaram que estes hospedeiros permanecem infectados por longos períodos com diferentes amostras de *Bartonella* spp. (BAI et al., 2011; PAZIEWSKA et al., 2012).

Bactérias intracelulares apresentam baixa taxa de recombinação, provavelmente devido ao seu habitat relativamente isolado. De fato, as bactérias do gênero *Bartonella* possuem uma das menores taxas de recombinação entre as bactérias, devido a sua localização intracelular e também à sua restrita gama de hospedeiros (VOS e DIDELOT, 2009). Interessantemente, as variantes de *Bartonella* spp. circulantes em roedores mostraram mais eventos de recombinação quando comparadas àquelas espécies adaptadas a seres humanos (*Bartonella quintana*) e gatos domésticos (*Bartonella henselae*). Tais achados sugerem um maior espectro de hospedeiros para as espécies associadas a roedores (BERGLUND et al., 2010; PAZIEWSKA et al., 2011).

Uma vez que roedores podem ser infectados com mais de uma espécie ou genótipo de *Bartonella* (coinfecção) (MORICK et al., 2011), a interação entre os diferentes genótipos coexistindo em um mesmo indivíduo poderia ser a fonte dos eventos de recombinação (BERGLUND et al., 2010; PAZIEWSKA et al., 2011).

Além disso, as pulgas parecem exercer um papel fundamental nesses eventos de recombinação (PAZIEWSKA et al., 2012). Ao investigar pulgas (*Polygenis gwyni*) coletadas de roedores selvagens (*Sigmodon hispidus*) amostrados no estado da Geórgia, EUA, Abbot et al. (2007) identificaram amostras filogeneticamente relacionadas à *Bartonella clarridgeiae*, espécie tipicamente associada a gatos e não descrita em nenhum outro roedor.

Adicionalmente, Billeter et al. (2011) relataram uma discrepância entre os genótipos de *Bartonella* spp. detectados em roedores (*R. norvegicus*) capturados na cidade de Los Angeles, Califórnia, EUA, e suas respectivas pulgas. Enquanto a maioria dos roedores estavam infectados com *Bartonella tribocorum*, os genótipos detectados nas pulgas mostraram-se filogeneticamente próximos à *Bartonella rochalimae*.

A transferência horizontal de genes pode ocorrer entre bactérias dentro dos vetores artrópodes. O ambiente dentro dos vetores seria muito diferente daquele encontrado nos hospedeiros mamíferos. Assim, as variantes genotípicas poderiam se diversificar e explorar diferentes nichos (KOSOY et al., 2012).

2.2.3. Adaptação aos hospedeiros

Uma característica comum nas infecções causadas por *Bartonella* spp. em mamíferos é a prolongada bacteremia intra-eritrocítica, característica essa que representa uma adaptação ao modo de transmissão mediado por artrópodes vetores hematófagos. Essa bacteremia intra-eritrocítica duradoura ocorre exclusivamente em mamíferos reservatórios, os quais possuem uma longa história evolutiva com determinadas espécies de *Bartonella* (CHOMEL et al., 2009).

Uma vez que a transmissão de *Bartonella* para um hospedeiro é classicamente mediada por artrópodes vetores hematófagos, espera-se que a ecologia desses vetores desempenhe um papel importante na diversidade de hospedeiros parasitados (HARMS e DEHIO, 2012). Além disso, a estratégia de infecção em múltiplos passos (colonização do nicho primário; adesão; deformação e invasão dos eritrócitos; multiplicação; e por fim, persistência intra-eritrocítica) sugere que essa relação seria um fenômeno complexo. Cada passo envolve uma crítica interação entre as bactérias e as células do hospedeiro com uma refinada manipulação ao nível molecular (HARMS e DEHIO, 2012).

As pulgas parecem desempenhar um importante papel na transmissão e na manutenção de muitas das espécies de *Bartonella* entre gatos, assim como em comunidades de roedores (CHOMEL et al., 2009). A pulga *Ctenocephalides felis* é o vetor natural de *B. henselae*, agente etiológico da “doença da

arranhadura do gato” (DAG) em seres humanos. Seu potencial em transmitir essa espécie de bactéria entre os felinos foi experimentalmente comprovado (CHOMEL et al., 1996). Acredita-se que as bactérias se multipliquem no sistema digestório das pulgas e podem sobreviver por até três dias no ambiente em meio às fezes desses ectoparasitas (CHOMEL et al., 2009). Adicionalmente, adaptação entre pulgas e *Bartonella* sp. foi demonstrada por meio da inoculação experimental de pulgas da espécie *Xenopsylla ramensis* com *Bartonella* sp. OE 1-1, uma amostra filogeneticamente próxima à *B. elizabethae*. Os resultados da infecção mostraram que essa espécie de *Bartonella* não afeta o nível metabólico, consumo de sangue, tempo de vida, fecundidade ou fertilidade das pulgas fêmeas e, tampouco, da sua prole (MORICK et al., 2013a,b).

O fenômeno da especificidade parasitária a um hospedeiro mamífero pode ser determinado pela capacidade das espécies de *Bartonella* preferencialmente infectarem os eritrócitos de certos animais. Por outro lado, as células do endotélio vascular, as quais parecem ser o nicho primário durante o curso da infecção, podem ser parasitadas durante uma infecção acidental em hospedeiros não habituais (DEHIO, 2005; CHOMEL et al., 2009).

Aos níveis celular e molecular, a interação entre bactérias e as células dos hospedeiros é mediada principalmente por dois fatores patogênicos, VirB/VirD4 e Trw, ambos pertencentes ao sistema de secreção Tipo IV (T4SS). O primeiro está envolvido na invasão do nicho primário e com a adaptação ao hospedeiro mamífero. Por outro lado, o segundo está envolvido na adesão e invasão específica dos eritrócitos em determinados hospedeiros (DEHIO, 2005; BUFFET et al., 2013a). Esse sistema de secreção transloca moléculas efetoras (proteínas ou DNA) de dentro do citoplasma bacteriano para o citoplasma da célula do hospedeiro, subvertendo as funções celulares ao seu favor (CASCALES e CHRISTIE, 2003).

Interessantemente, foi observado que as espécies de *Bartonella* associadas aos roedores (*B. tribocorum* e *Bartonella grahamii*), além de possuírem maiores genomas (2,63 Mb e 2,28 Mb, respectivamente), possuem maior número de genes associados à adaptabilidade quando comparados a *B. henselae* (1,92 Mb) e *B. quintana* (1,58 Mb). Isso poderia capacitar as espécies a infectar diferentes hospedeiros, fato esse que explicaria a falta de

especificidade parasitária de algumas espécies ou genótipos de *Bartonella* (BERGLUND et al., 2009, 2010).

2.2.4. Transmissão

A transmissão das espécies de *Bartonella* entre seus hospedeiros é mediada, principalmente, por artrópodes vetores hematófagos. A competência vetorial na transmissão de *Bartonella* spp. entre hospedeiros tem sido demonstrada por várias espécies de ectoparasitas (CHOMEL, 2011).

O piolho *Pediculus humanus corporis* e o mosquito *Lutzomyia verrucarum* são os vetores de *B. quintana*, agente etiológico da febre das trincheiras, e *B. bacilliformis*, agente causador da doença de Carrión, respectivamente (TOWNSEND 1913, SWIF 1920; BATTISTINI, 1931 apud CHOMEL et al., 2009).

Várias espécies de *Bartonella* (*B. quintana*, *B. henselae*, *Bartonella capreoli*, *Bartonella washoensis* e *Bartonella vinsonii* subespécie *berkhoffii*) têm sido detectadas, por meio de métodos moleculares, em uma ampla variedade de espécies de carrapatos (*Ixodes* spp., *Dermacentor* spp., *Rhipicephalus sanguineus*) (revisado por BILLETER et al., 2008).

Entretanto, poucos estudos têm demonstrado a competência vetorial dos carrapatos em transmitir as espécies de *Bartonella* entre seus hospedeiros (REIS et al., 2011). Noguchi (1926) demonstrou a transmissão mecânica de *B. bacilliformis* por *Dermacentor andersoni* entre primatas (*Macaca mulatta*). Ainda, Cotté et al. (2008) relataram a competência vetorial do carrapato *Ixodes ricinus* em transmitir *B. henselae* entre gatos. Adicionalmente, Reis et al. (2011) demonstraram a competência vetorial de *I. ricinus* na transmissão de *B. birtlesii* entre roedores.

Entre os ectoparasitas de roedores, as pulgas são consideradas os principais vetores de *Bartonella* spp. Além de serem reservatórios adicionais dessas bactérias na natureza, foi demonstrado experimentalmente que esses artrópodes possuem uma alta eficiência na transmissão de *Bartonella* spp. entre roedores (BILLETER et al., 2008, MORICK et al., 2011, 2013a).

Em um estudo pioneiro realizado na Alemanha, Krampitz (1962) (apud GUTIÉRREZ et al. 2015) demonstrou a capacidade vetorial das pulgas da espécie *Xenopsylla cheopis* na transmissão de uma espécie de *Bartonella* não

identificada entre roedores (*Myodes glareolus*). Ainda, pulgas da espécie *Ctenophthalmus nobilis* demonstraram ser capazes de transmitir *B. grahamii* e *B. taylorii* entre *M. glareolus* mantidos em cativeiros na Universidade de Liverpool, Inglaterra (BOWN et al., 2004). Adicionalmente, *Xenopsylla ramensis* mostrou-se hábil na transmissão de *Bartonella* sp. OE 1-1 entre *Meriones crassus* amostrados no deserto de Negev, Israel (MORICK et al., 2011; 2013a).

Além da transmissão vetorial, as pulgas atuam como reservatórios adicionais dessas bactérias na natureza. Para desempenharem tal papel, esses artrópodes necessitam realizar a transmissão de espécies de *Bartonella* de uma geração para a outra, seja por meio da transmissão transtadial, transovariana ou *co-feeding* (PAROLA e RAOULT, 2001). A detecção de DNA de *Bartonella vinsonii* subsp. *arupensis* e *B. washoensis* em tecidos reprodutivos de pulgas das espécies *Cediopsylla inaequalis*, *Oropsylla hirsuta*, *Aetheca wagneri* e *Orchopeas leucopus* revela a potencial transmissão transovariana de *Bartonella* spp. entre pulgas (BRINKERHOFF et al. 2010). Entretanto, Morick et al. (2011) demonstraram experimentalmente que embora a pulga *X. ramensis* seja capaz de adquirir quatro diferentes genótipos de *Bartonella* sp., a transmissão transovariana não foi observada. O contraste observado revela que diferenças interespecíficas podem estar envolvidas nos resultados obtidos. Sendo assim, essa rota de transmissão pode não ser uma regra para todas as espécies de pulgas (GUTIÉRREZ et al., 2015). Adicionalmente, a presença de DNA de *Bartonella* sp. em conteúdo intestinal e fezes de pulgas infectadas sugere um diferente mecanismo de transmissão. Uma vez que sangue não digerido e regurgitado por pulgas adultas, assim como suas fezes, podem servir de fonte alimentar para suas respectivas larvas, foi demonstrado que as larvas expostas ao conteúdo intestinal e fezes de pulgas adultas infectadas com *Bartonella* sp. tornaram-se infectadas (MORICK et al., 2013b,c).

Alternativamente à transmissão vetorial, vários estudos avaliando a transmissão vertical e horizontal entre roedores têm sido realizados sob condições naturais e experimentais (**Figura 1**).

Inicialmente, a transmissão vertical de *Bartonella* spp. em roedores selvagens das espécies *Sigmondon hispidus* e *Peromyscus leucopus*, capturados em três estados americanos (Califórnia, Carolina do Norte e

Geórgia) foi demonstrada pelo isolamento de *Bartonella* spp. em amostras de placenta, embriões e neonatos (KOSOY et al., 1998). Adicionalmente, Morick et al. (2013b) demonstraram a presença de DNA de *Bartonella* sp. OE 1-1 em roedores (*M. crassus*) recém nascidos. Por outro lado, Bown et al. (2004) relataram a ausência de transmissão entre fêmeas de roedores (*M. glareolus*) experimentalmente infectadas com *B. grahamii* e *B. taylorii* e sua prole. Porém, o verdadeiro papel desse mecanismo de transmissão na epidemiologia da infecção causada por bartonela entre os roedores selvagens ainda é desconhecido.

A transmissão horizontal de *Bartonella* spp. entre roedores machos e fêmeas também foi investigada. Bown et al. (2004) relataram a ausência desse mecanismo de transmissão entre roedores experimentalmente infectados com *Bartonella* spp. e roedores não infectados, mantidos em ambiente livre de vetores.

Entretanto, futuros estudos objetivando acessar as lacunas nos mecanismos de transmissão de *Bartonella* spp. entre os roedores, mediados ou não por artrópodes, são necessários (**Figura 1**) (GUTIÉRREZ et al., 2015).

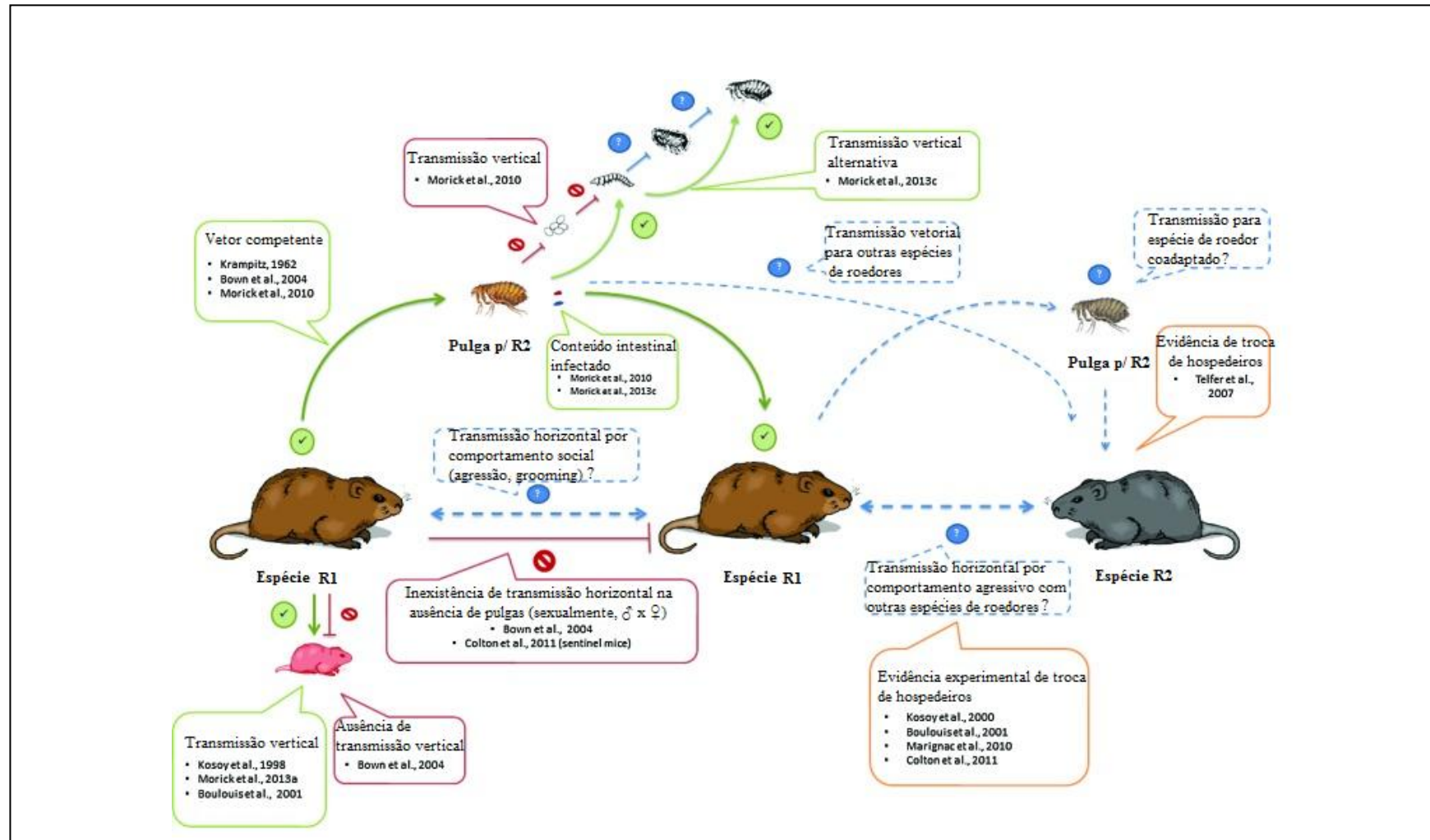


Figura 1. Mecanismos experimentalmente demonstrados e potenciais rotas de transmissão de *Bartonella* spp. entre roedores. Linhas verdes: mecanismo experimentalmente demonstrado; Linhas vermelhas: ausência de transmissão; Linhas azuis pontilhadas: rotas de transmissão sugeridas. Caixas com linhas laranja indicam evidências indiretas para os mecanismos sugeridos. Adaptado de Gutiérrez et al., 2015.

2.2.5. Diagnóstico

O diagnóstico da infecção por *Bartonella* spp. deve ser realizado preferencialmente pelo cultivo celular do organismo em meio pré-enriquecido, seguido de amplificação do DNA pela PCR a partir de amostras obtidas assepticamente (DUNCAN et al., 2007; BREITSCHWERDT et al., 2010a; PULTORAK et al., 2013). Ainda, a utilização dessa abordagem de enriquecimento em meio líquido (*Bartonella alpha* *Proteobacteria* *Growth Medium*, BAPGM) antes da realização da PCR tem se mostrado útil, aumentando a capacidade de detecção e facilitando o isolamento de *Bartonella* spp. em amostras de várias espécies de animais, incluindo os seres humanos (MAGGI et al., 2005, 2011; DINIZ et al., 2009; BREITSCHWERDT et al., 2010b; PEREZ et al., 2011).

Perez et al. (2011) demonstraram aumento na sensibilidade de detecção de *Bartonella* em amostras de sangue de cães submetidas à pré-cultura. Dentre as 61 amostras de cães positivas para *Bartonella* spp., 32 (52,5%) mostram-se positivas somente após o cultivo celular. Além disso, a utilização dessa plataforma de diagnóstico tem demonstrado que humanos imunocompetentes, principalmente aqueles com íntimo contado com animais, podem ter infecção intravascular crônica causada por *Bartonella* spp. (BREITSCHWERDT et al., 2010b). Entretanto, atualmente não há uma técnica padrão ouro para o diagnóstico das espécies de bartonelas, seja em amostras biológicas de seres humanos ou de animais.

Atualmente, a PCR é um método amplamente utilizado para detecção de agentes infecciosos. Além de ser de rápida aplicação, tem a sua sensibilidade aumentada pela Nested PCR (nPCR) e pela qPCR (GUPTILL et al., 2010; ANDRÉ et al., 2015). Adicionalmente, a partir de seus amplicons é possível realizar o sequenciamento, identificar e analisar as relações filogenéticas das diferentes espécies que infectam humanos e animais (LA SCOLA et al., 2003; BUFFET et al., 2013a).

Nesse sentido, inúmeros protocolos dirigidos para diferentes fragmentos gênicos, *pap-31* (*Heme-binding protein gene*), *rpoB* (subunidade beta da RNA polimerase), *ribC* (riboflavina sintase), *gltA* (citrato sintase), *groEL* (*heat shock protein*), *fstZ* (*cell division protein*) e ITS (região espaçadora intergênica do 16-23 rRNA), têm sido propostos objetivando o diagnóstico da bartonelose. Ainda,

a qPCR vêm facilitando o diagnóstico da bartonelose trazendo maiores rapidez e sensibilidade, detectando uma espécie específica (LI et al., 2013) ou várias espécies concomitantemente (DIAZ et al., 2012; ANDRÉ et al., 2015).

Embora os testes sorológicos Rifi (Reação de imunofluorescência indireta) e Elisa (Ensaio imunoenzimático ligado à enzima) demonstrem valor limitado no que diz respeito à confirmação de infecção ativa, e informações sobre reações cruzadas entre espécies de *Bartonella* e entre espécies filogeneticamente próximas sejam escassas, tais métodos mostram-se de grande importância para estudos epidemiológicos (DINIZ et al., 2007; BREITSCHWERDT et al., 2010a). Entretanto, Maggi et al. (2011) demonstraram que apenas 30,4% (14/46) das amostras de soro de seres humanos previamente positivos para *Bartonella* spp., por meio da cultura celular seguida da cPCR, mostraram-se soropositivas. Adicionalmente, Diniz et al. (2007) relataram que um cão positivo para *B. henselae* por meio da cultura e cPCR, mostrou-se negativo quando submetido à reação de imunofluorescência. Sendo assim, uma abordagem multi-metodológica, que leve em conta o estado clínico do paciente aliada a um painel composto por diferentes técnicas de diagnóstico (sorologia, cultivo e PCR), objetivando aumentar a sensibilidade e especificidade de detecção da *Bartonella* spp., é necessária para realizar o diagnóstico correto dessa enfermidade (BREITSCHWERDT, 2014).

2.2.6. Epizootiologia da bartonelose em roedores

Roedores representam importantes reservatórios de muitas espécies de *Bartonella*. Aproximadamente 22 espécies e/ou subespécies de *Bartonella* associada a roedores foram descritas, algumas das quais foram inicialmente isoladas de pacientes humanos (BUFFET et al., 2013a). A descrição cronológica dessas espécies de *Bartonella* é: *B. elizabethae* e *B. vinsonii* subsp. *vinsonii* (BRENNER et al. 1993), *B. doshiae*, *B. grahamii* e *B. taylorii* (BIRTLES et al., 1995), *B. tribocorum* (HELLER et al., 1998), *B. vinsonii* subsp. *arupensis* (WELCH et al., 1999), *B. birtlesii* (BERMOND et al. 2000), *B. washoensis* (KOSOY et al., 2003), *B. phoceensis* e *B. rattimassiliensis* (GUNDI et al. 2004), *B. rochalimae* (LIN et al., 2008), *B. tamiae* (KOSOY et al., 2008), *B. rattaustraliani*, *B. queenslandensis* e *B. coopersplainsensis* (GUNDI et al.,

2009), *B. japonica* e *B. silvatica* (INOUE et al., 2010), *B. jaculi*, *B. callosciuri*, *B. pachyuromydis* e *B. acomydis* (SATO et al., 2013). A análise filogenética dessas espécies tem mostrado que, com exceção de *B. rochalimae* e *B. tamiae*, todas as outras espécies estão agrupadas em uma única linhagem, evidenciando a ocorrência de uma evolução adaptativa entre essas bactérias e roedores (BUFFET et al., 2013a).

A associação entre roedores e *Bartonella* spp. tem se mostrado importante, uma vez que esses mamíferos desenvolvem bacteremia subclínica durante meses, e têm sido implicados como importantes fontes de infecção para outros hospedeiros susceptíveis, incluindo humanos (MORICK et al., 2013b; GUTIÉRREZ et al., 2015). As espécies de *Bartonella* têm sido detectadas em roedores ao redor de todo o mundo (**Figura 2**). Alguns estudos relataram uma alta prevalência em populações de roedores, chegando a 82% (BAI et al. 2011). Além disso, vários fatores (hábitat, comportamento, idade, especificidade, abundância de pulgas, sazonalidade, etc.) representam variáveis cruciais que podem influenciar o estabelecimento de infecções causadas por *Bartonella* spp. (revisado por GUTIÉRREZ et al., 2015).

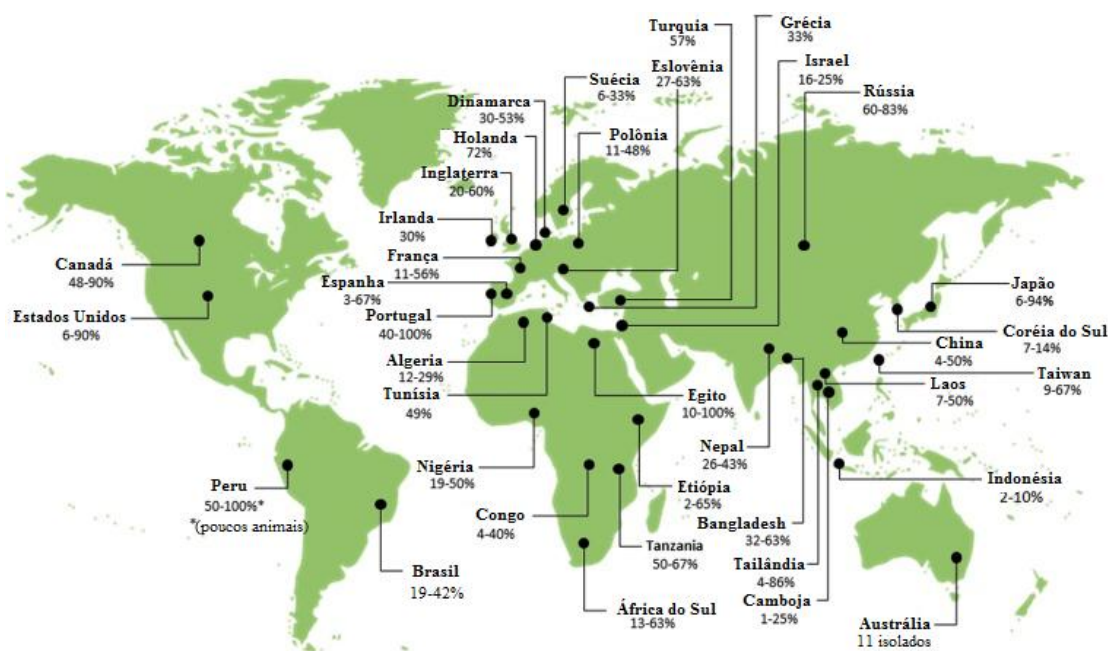


Figura 2. Ocorrência de *Bartonella* spp. em roedores. Adaptado de GUTIÉRREZ et al., 2015.

Entre as espécies de *Bartonella* adaptadas aos roedores sinantrópicos, principalmente aqueles pertencentes ao gênero *Rattus*, *B. elizabethae*, *B. tribocorum*, *B. queenslandensis* e *B. rattimassiliensis* possuem distribuição mundial, assim como seus reservatórios (BUFFET et al., 2013a). Ainda, *B. phoceensis*, *B. coopersplainsensis* e *B. rochalimae*, também são frequentemente detectadas em os roedores sinantrópicos ao redor do mundo (HELLER et al., 1998; GUNDI et al., 2004; WINOTO et al., 2005; GUNDI et al., 2012). Adicionalmente, Gundi et al. (2012) demonstraram alta ocorrência de *Bartonella* spp. (67,5%, 135/200) em roedores sinantrópicos amostrados no centro da cidade de Los Angeles, EUA.

Entre os roedores silvestres, diferentes genótipos de *B. grahamii* estão amplamente difundidos entre roedores dos gêneros *Myodes* e *Microtus* no Hemisfério Norte (América do Norte, Europa e Ásia), *Apodemus* na Eurásia e entre *Onychomys leucogaster* na América do Norte (MEDIANNIKOV et al., 2005; BAI et al., 2007; INOUE et al., 2008, 2009). A análise da diversidade genômica de 26 isolados de *B. grahamii* detectados em onze espécies de roedores, amostrados em sete países, revelou um forte padrão geográfico e maiores níveis de divergência do que previamente relatados para *B. henselae* e *B. quintana*. Esse forte padrão geográfico pode estar relacionado com os diferentes padrões de migração dos hospedeiros. Além disso, a emergência mais recente de *B. henselae* e *B. quintana* poderia explicar a menor divergência dessas duas espécies quando comparado à *B. grahamii* (BERGLUND et al., 2009).

Similarmente à *B. grahamii*, *B. taylorii* também exhibe alta diversidade genética e é frequentemente detectada em roedores dos gêneros *Apodemus*, *Myodes* e *Microtus* amostrados em florestas boreais na Eurásia (MEDIANNIKOV et al., 2005; BUFFET et al., 2012).

Enquanto *B. doshiae* é comumente detectada em pequenos roedores (*Apodemus*, *Myodes* e *Microtus*) na Europa (GIL et al., 2010; PAZIEWSKA et al., 2011) e em *Sigmodon hispidus* nos EUA (KOSOY et al., 1997), *B. birtlesii* parece ser restrita à Europa, infectando os roedores dos gêneros *Apodemus*, *Myodes* e *Microtus* (BERMOND et al., 2000; PAZIEWSKA et al., 2011). Contrapondo à alta diversidade e distribuição de *B. grahamii* e *B. taylorii*, *B. doshiae* e *B. birtlesii* apresentam baixas prevalência e distribuição.

Provavelmente, essas últimas espécies estão em um processo de *bottleneck* (redução do tamanho populacional). Tal fenômeno pode ser atribuído à perda ou a restrição a poucos vetores e/ou hospedeiros (BUFFET et al., 2013a).

Outras espécies do gênero *Bartonella* que parecem ser restritas a determinadas regiões são *B. japonica*, detectada em roedores no Japão e China (INOUE et al., 2010; LI et al., 2015) e *B. silvatica*, detectada apenas em roedores no Japão (INOUE et al., 2010). Ambas as espécies de *Bartonella* foram identificadas em roedores silvestres pertencentes ao gênero *Apodemus*.

Entre os isolados de *Bartonella* detectados em roedores pertencentes à família Sciuridae, mais precisamente aos gêneros *Spermophilus*, *Cynomys*, *Sciurus*, *Glaucomys* e *Tamias* amostrados nos EUA, México e China, quase todos os genótipos pertenciam à *B. washoensis* (BAI et al., 2008; INOUE et al., 2010; RUBUIO et al., 2014). Além disso, foi demonstrado, por meio da Análise de Sequências em Múltiplos Loci (MLSA) que os genótipos de *B. washoensis*, possivelmente, partem de um processo de coespeciação com esses roedores (INOUE et al., 2010).

Estudos realizados com roedores silvestres na América do Norte têm demonstrado que as espécies *Bartonella vinsonii* subsp. *vinsonii* e *B. vinsonii* subsp. *arupensis*, além de serem amplamente difundidas entre os roedores silvestres, apresentam alta prevalência (chegando a 68% e 82%, respectivamente). *B. vinsonii* subsp. *arupensis* tem sido detectada em os roedores silvestres dos gêneros *Peromyscus* e *Onychomys* nos EUA (BAI et al., 2007; 2011) e *Neotoma* no México (RUBUIO et al., 2014). Adicionalmente, *B. vinsonii* subsp. *vinsonii* tem sido detectada em roedores do gênero *Neotoma* nos EUA (MORWAY et al., 2008) e nas espécies *Myodes gapperi* (JARDINE et al., 2005) e *Microtus pennsylvanicus* (BAKER, 1946) amostradas no Canadá.

Por fim, *B. jaculi*, *B. callosciuri*, *B. pachyuromydis* e *B. acomydis* foram descritas em roedores das espécies *Jaculus orientalis*, *Callosciurus notatus*, *Pachyuromys duprasi* e *Acomys russatus*, importados pelo Japão como animais de estimação oriundos do Egito, Tailândia e Holanda (SATO et al., 2013).

No Brasil, apenas dois estudos avaliando a ocorrência de *Bartonella* spp. em roedores sinantrópicos (*Rattus norvegicus*) amostrados no estado da Bahia e em roedores silvestres capturados no estado do Mato Grosso do Sul, foram

relatados. Tais estudos reportaram o isolamento de *B. queenslandensis* (5/26) e *B. tribocorum* (1/26) em roedores sinantrópicos (COSTA et al., 2014) e a detecção de *B. vinsonii* subsp. *arupensis* (18/42) em roedores silvestres (FAVACHO et al., 2015). Adicionalmente, Favacho et al. (2015) ressaltaram que diferentes espécies de roedores (n=7) compartilharam a mesma espécie de *Bartonella*.

2.2.7. Bartonelose em humanos

Dentre as espécies e subespécies de *Bartonella* descritas, várias estão implicadas em infecções humanas, causando diferentes manifestações clínicas (**Tabela 2**). Entretanto, as espécies clinicamente mais importantes são *B. henselae*, *B. quintana* e *B. bacilliformis* (KAISER et al., 2010).

Historicamente, evidência de infecção humana por *B. bacilliformis* tem sido verificada desde a dinastia Inca, a centenas de anos atrás. A infecção por *B. bacilliformis* é caracterizada por uma síndrome (Doença de Carrión) de curso bifásico, que pode ocorrer sequencialmente ou independente uma da outra. A primeira fase, Febre de Oroya (FO), é mais comum em crianças (cerca de 60% dos casos) tanto em áreas endêmicas quanto não endêmicas. Além disso, a FO é caracterizada por uma anemia hemolítica aguda, aliada a uma severa redução do hematócrito (>80%). Essa fase possui alto índice de mortalidade, variando de 40 a 88% entre as pessoas não tratadas. A segunda fase, conhecida como verruga peruana (VP), é caracterizada pela formação de hemangiomas na pele, podendo persistir por várias semanas. Essa manifestação é mais comumente relatada em indivíduos de áreas endêmicas, provavelmente refletindo o estado imune da população. Embora raramente fatal, a VP é acompanhada de febre, mal-estar, linfadenopatia e dor articular (revisado por MINNICK et al., 2014).

Tabela 2. Espécies e subespécies de *Bartonella* detectadas em seres humanos, reservatórios, possíveis vetores, hospedeiros acidentais e manifestações clínicas em seres humanos.

<i>Bartonella</i> spp.	Reservatório primário	Possíveis vetores	Hospedeiro (s) acidental (is) (manifestações clínicas em humanos)
<i>Bartonella alsatica</i>	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	¹ <i>Spilopsyllus cuniculi</i>	Humanos (endocardite)
<i>Bartonella bacilliformis</i>	Humanos	² <i>Lutzomyia verrucarum</i>	Nenhum (Doença de Carrion: febre de Oroya e verruga peruana)
<i>Bartonella clarridgeiae</i>	<i>Felis catus</i>	¹ <i>Ctenocephalides felis</i>	Humanos e cães (doença da arranhadura do gato e endocardite)
<i>Bartonella doshiae</i>	Roedores silvestres	¹ <i>Polygenis gwyni</i>	Humanos (fadiga, artralgia e visão embaçada)
<i>Bartonella elizabethae</i>	<i>Rattus norvegicus</i>	¹ <i>Xenopsylla cheopis</i>	Humanos e cães (endocardite e neuroretinite)
<i>Bartonella grahamii</i>	Roedores silvestres	Pulgas de roedores	Humanos (neuroretinite)
<i>Bartonella henselae</i>	<i>F. catus</i>	¹ <i>C. felis</i>	Humanos, cães, cavalos e animais marinhos (doença da arranhadura do gato, endocardite, neuroretinite e angiomasose bacilar)
<i>Bartonella koehlerae</i>	<i>F. catus</i>	¹ <i>C. felis</i>	Humanos e cães (endocardite)
<i>Bartonella melophagi</i>	<i>Ovis aries</i>	³ <i>Melophagus ovinus</i>	Humanos (pericardite e fadiga)
<i>Bartonella quintana</i>	Humanos	⁴ <i>Pediculus humanus</i>	Gatos e cães (endocardite, febre das trincheiras e angiomasose bacilar)
<i>Bartonella rochalimae</i>	Roedores	¹ <i>Pulex</i> spp.?	Humanos e cães (febre)
<i>Bartonella schoenbuchensis</i>	Ruminantes	³ <i>Lipoptena cervi</i>	Humanos (febre, fadiga e dores musculares)
<i>Bartonella tamiae</i>	Roedores?	Ácaros?	Humanos (febre, mialgia e fadiga)
		Carrapatos?	
<i>Bartonella tribocorum</i>	Roedores	⁴ <i>Polyplax spinulosa</i> , ¹ <i>X. cheopis</i>	Humanos (febre)
<i>Bartonella vinsonii</i> subsp. <i>arupensis</i>	<i>Peromyscus leucopus</i>	Pulgas?	Humanos (febre e endocardite)
		Carrapatos?	
<i>Bartonella vinsonii</i> subsp. <i>berkhoffii</i>	Canídeos	Carrapatos?	Humanos e gatos (endocardite)
<i>Bartonella washoensis</i>	<i>Spermophilus beecheyii</i>	¹ <i>Oropsylla montana</i>	Humanos e cães (miocardite e febre)

*Adaptado de (BREITSCHWERDT, 2014).

¹Espécies de pulgas; ²Espécies de mosquitos; ³Espécies de moscas; ⁴Espécies de piolhos.

A *Bartonella quintana* foi inicialmente isolada em 1960 por J. W. Vinson e foi responsável por grandes epidemias na Europa durante a Primeira e Segunda Guerras Mundiais. Atualmente, a infecção por essa bactéria em humanos tem sido relatada, principalmente, em moradores de rua e alcoólatras. Na fase aguda da doença, os sintomas mais comuns são febre,

dores de cabeça e nas pernas. Adicionalmente, linfadenopatia, angiomatose bacilar (AB) e endocardite têm sido descritas em pacientes imunocomprometidos (revisado por MAURIN e RAOULT, 1996; KAISER et al., 2010).

Ao contrário das espécies *B. bacilliformis* e *B. quintana*, as quais têm os seres humanos como único ou principal hospedeiro, *B. henselae* têm como principais reservatórios gatos domésticos. A infecção causada por *B. henselae* é considerada como a zoonose mais comum causada por membros do gênero *Bartonella* (CHOMEL et al., 2010). A descrição clínica da DAG foi realizada inicialmente na França por Debré em 1950, mas a identificação do agente etiológico ocorreu apenas em 1993 (DOLAN et al., 1993). Em pessoas imunocompetentes, a DAG é caracterizada por uma linfadenopatia regional. Febre baixa, mal-estar e dores também são frequentemente relatadas. Manifestações atípicas, tais como: encefalite, endocardite, anemia hemolítica, hepatoesplenomegalia, glomerulonefrite, pneumonia e osteomielite podem ocorrer em 5 a 9% dos pacientes infectados por *B. henselae*. Por outro lado, em pacientes imunocomprometidos, AB ou peliose hepática (PH) são frequentemente observadas (revisado por CHOMEL et al., 2010).

Ambos os distúrbios clínicos (AB e PH) são caracterizados pela proliferação vascular anômala. Na AB as manifestações mucocutâneas são as mais frequentes, sendo essas papulosas, tumorais ou nodulares, solitárias ou múltiplas, sendo a pápula eritemato-violácea a lesão mais característica. A PH, por sua vez, caracteriza-se por lesões angioproliferativas associadas a dilatações dos capilares com formação de espaços cavernosos cheios de sangue (revisado por MAURIN e RAOULT, 1996; KAISER et al., 2010).

Dentre as espécies de *Bartonella* que infectam seres humanos, oito estão relacionadas com diferentes espécies de roedores (**Tabela 2**). *B. elizabethae* foi inicialmente isolada nos EUA em um indivíduo com endocardite e histórico de anorexia, fadiga e perda de peso (DALY et al., 1993). DNA de *B. grahamii* foi detectado em um paciente com neuroretinite na Holanda (KERKHOFF et al., 1999). *B. vinsonii* subsp. *arupensis* foi isolada de um criador de gado apresentando febre e desordens neurológicas (WELCH et al., 1999). *B. washoensis* foi isolada de um homem de 70 anos de idade nos EUA apresentando febre e miocardite. A análise das sequências de *Bartonella*

revelou uma estreita relação genética entre as sequências amplificadas dentre as amostras de DNA de roedores silvestres e àquela detectada no paciente humano (KOSOY et al., 2003). *B. rochalimae* foi inicialmente descrita em uma mulher que retornou para os EUA após uma viagem ao Peru. A paciente de 43 anos de idade apresentava febre e esplenomegalia (EREMEEVA et al., 2007). *B. tamiae* foi inicialmente isolada em três pacientes humanos na Tailândia. Os indivíduos apresentavam, principalmente, febre, mialgia, dores de cabeça e fadiga. Todos os pacientes relataram ter capturado roedores em suas casas (KOSOY et al., 2008). *B. tribocorum*, foi isolada em um paciente apresentando um quadro febril na Tailândia (KOSOY et al., 2010). Recentemente, infecção por *B. doshiae* foi reportada em uma mulher de 45 anos de idade com histórico de picadas por carrapatos. A paciente francesa apresentava como principais sintomas fadiga, visão embaçada e artralgia (VAYSSIER-TAUSSAT et al., 2016).

Embora o real impacto na Saúde Pública das espécies de *Bartonella* associadas a roedores ainda seja desconhecido, acrescente destruição de habitat naturais, associado à intensa atividade humana em áreas de florestas e presença de roedores selvagens em áreas peridomiciliares, roedores e humanos podem compartilhar os mesmos vetores e patógenos, aumentando assim o número de infecções humanas ocasionadas por essas bactérias (BUFFET et al., 2013a).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

O presente estudo teve como objetivo pesquisar, por meio de métodos moleculares, a ocorrência de *Mycoplasma* spp. e *Bartonella* spp. em roedores silvestres e sinantrópicos no Brasil.

3.2. Objetivos específicos

- Investigar, por meio de métodos moleculares, a ocorrência de *Mycoplasma* spp. e *Bartonella* spp. em amostras de baço de roedores capturados em cinco biomas brasileiros;
- Detectar e quantificar o DNA de *Bartonella* sp. em amostras de baço de roedores selvagens e sinantrópicos, pela PCR em tempo real quantitativa (qPCR) baseada no gene *nuoG* (subunidade gama da desidrogenase NADH);
- Caracterizar molecularmente as amostras de DNA de *Mycoplasma* spp. e *Bartonella* spp. detectadas por meio de ensaios de PCR convencional (cPCR) baseados em diferentes fragmentos gênicos (16S rRNA, *RNaseP* para *Mycoplasma* spp., e *gltA*, *rpoB*, *ftsZ*, *groEL*, *ribC*, *pap-31* e *ITS* para *Bartonella* spp.);
- Sequenciar os amplicons positivos da cPCR para validação dos mesmos e compará-los com aquelas sequências previamente depositadas no Genbank;
- Realizar a inferência filogenética das sequências obtidas por meio da construção de filogramas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Distribuição e espécies de roedores amostrados

Durante o período de 1999 e 2013, amostras de baço de pequenos mamíferos foram coletadas durante diferentes expedições científicas realizadas em diversas regiões do Brasil pelo Laboratório de Biologia de Tripanosomatídeos (LabTrip, Instituto Oswaldo Cruz-Fiocruz, IOC) e demais colaboradores (em especial o Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios – LBPMSR, IOC). Os pequenos mamíferos foram capturados utilizando armadilhas do tipo “*live-traps*” (modelos Tomahawk e Shermann), dispostas em transectos com estações de captura distribuídas a cada 10 metros. Em algumas das expedições, foi necessária a realização de eutanásia dos animais, normalmente para o diagnóstico da infecção por parasitos conforme autorização do IBAMA. Nos casos em que era realizada a eutanásia, os animais eram imobilizados quimicamente com uma associação de cloridrato de cetamina 10% (100 mg/ml) e acepromazina 1% (10 mg/ml) na proporção de 9:1, utilizando uma dose de 0,1 mL/100g via intramuscular. Quando a morte do animal anestesiado não ocorria após a coleta do sangue total, a eutanásia era realizada por meio da administração de cloreto de potássio a 19,1% via intracardíaca (2 mL/kg). Posteriormente, foram coletados fragmentos de baço, os quais eram acondicionados em microtubos livres de DNase e RNase, adicionando-se etanol absoluto para preservação do material. Tais amostras foram organizadas em uma coleção de fragmentos de baços – BAÇOTECA, a qual foi catalogada por número de registro, espécie de mamífero, data e localidade. Posteriormente, essas amostras foram armazenadas a - 20° C no LabTrip.

A identificação taxonômica dos roedores amostrados foi baseada inicialmente na morfologia externa e confirmada por análise cariotípica por técnicas citogenéticas e, quando necessário, pela análise da morfologia craniana (BONVICINO et al., 2008). A identificação dos roedores foi realizada pela equipe de mastozoólogos do LBPMSR (IOC-Fiocruz). Dentre um total de mais de 3300 fragmentos de tecidos armazenados na coleção, foram selecionados, de modo aleatório, 500 amostras, as quais haviam sido coletadas entre o período de 2000 a 2012, pertencentes a 51 espécies de

roedores amostrados em 13 estados, distribuídos em cinco biomas brasileiros **(Figura 3)**.

Todas as coletas foram realizadas seguindo autorização do IBAMA e aprovadas pelo Comitê de Ética do Uso de Animais da FIOCRUZ (P0007-99; P0179-03; P0292/06; L0015-07).

4.2. Reação em Cadeia pela Polimerase (cPCR)

4.2.1. Extração de DNA das amostras de tecido esplênico de roedores

A extração de DNA de tecido esplênico (10 mg) foi realizada com o DNeasy[®] Blood & Tissue Kit (Qiagen[®]), de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras de DNA extraídas foram então identificadas e armazenadas a -20°C até a realização da PCR. Os valores de concentração de DNA, assim como os de absorbância (260/280 nm), foram obtidos utilizando espectrofotômetro (Nanodrop[®], Term Scientific, EUA). A fim de assegurar a qualidade da extração de DNA a partir do tecido esplênico, uma amostra controle (água ultra-pura esterilizada) (Nuclease-Free Water, Promega[®], Madison, Wisconsin, EUA) foi extraída simultaneamente (a cada 30 amostras) com as amostras a serem analisadas.

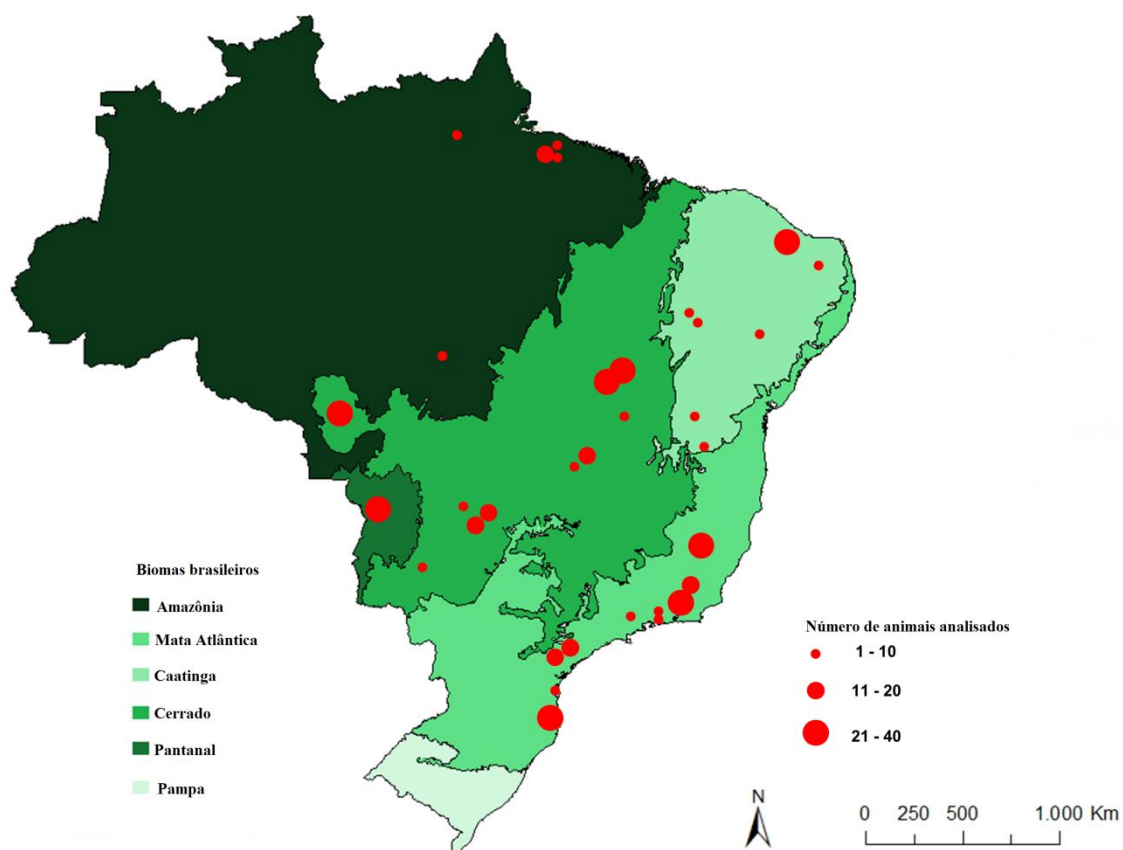


Figura 3. Distribuição dos roedores capturados (n=500) em cinco biomas brasileiros.

4.2.2. Controle endógeno da PCR

Com o objetivo de avaliar a qualidade do material genômico extraído, as amostras de DNA foram submetidas à cPCR objetivando a amplificação do gene *IRBP* (“Interphotoreceptor Retinoid Binding Protein”) de mamíferos (controle endógeno da reação). A reação de cPCR foi realizada utilizando-se 3 µL de DNA alvo, tampão da PCR (PCR Buffer 10X- 100nM Tris-HCl, pH 9,0, 500 mM KCl), 1,0 mM Cloreto de Magnésio (Life Technologies®), 0,6 mM deoxinucleotídeos (dNTPs), 1,5 U Taq DNA Polymerase (Life Technologies®), 1,25 µL de Dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma Aldrich®) e 0,5 µM de cada oligonucleotídeo iniciador IRBPfwd: (5'-TCCAACACCACCACTGAGATCTGGAC-3') e IRBPprev: (5'-GTGAGGAAGAAATCGGACTGGCC-3'), que flanqueiam uma região de 227 pb do gene supracitado. As condições da PCR para amplificação do gene *IRBP* foram de: desnaturação inicial a 94 °C por 4 minutos, seguidos de 35 ciclos de

desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 57°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto, seguidos por extensão final a 72°C por 5 minutos (FERREIRA et al., 2010). Posteriormente, todas as amostras negativas na cPCR supracitada foram submetidas à cPCR adicional dirigida para um fragmento de aproximadamente 450 pb do gene *GAPDH* utilizando os oligonucleotídeos iniciadores GAPDH-F (5'- CCTTCATTGACCTCAACTACAT-3') e GAPDH-R (5'- CCAAAGTTGTCATGGATGACC-3') e a mesma concentração dos reagentes descrita acima, exceto o DMSO. Os ciclos de amplificação foram de: 94°C por 5 minutos, seguidos por 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto, seguido por uma extensão final a 72°C por 5 minutos (BIRKENHEUER et al., 2003).

4.2.3. Detecção e caracterização molecular de *Mycoplasma* spp.

As amostras de DNA positivas nos ensaios de cPCR anteriores (controle endógeno) foram posteriormente submetidas a ensaios de PCR adicionais dirigidos para os genes 16S rRNA e *RNaseP* de *Mycoplasma* spp.

A detecção e caracterização de *Mycoplasma* spp. foi inicialmente realizada utilizando dois conjuntos de oligonucleotídeos iniciadores: HemMycop16S-41s (5'-GYATGCMATAAYACATGCAAGTCGARCG-3'), HemMycop16S-938as (5'-CTCCACCACTTGTTTCAGGTCCCCGTC-3') (os quais amplificam um fragmento de ~ 800 bp) e HemMycop 16S-322s (5'-GCCCATATTCCTACGGGAAGCAGCAGT-3'), HemMycop16S-1420as (5'-GTTTGACGGGCGGTGTGTACAAGACC-3') (os quais amplificam um fragmento de ~ 800 bp), flanqueando um fragmento de aproximadamente 1300 pb do 16S rRNA (com uma sobreposição de 600 pb). As condições de amplificação foram de: 95°C por 2 minutos, seguidos por 55 ciclos de 94°C por 15 segundos, 68°C por 15 segundos e 72°C por 18 segundos, seguido por uma extensão final a 72°C por 1 minuto (MAGGI et al., 2013a). Adicionalmente, amostras positivas para *Mycoplasma* spp. na cPCR baseada no gene 16S rRNA foram submetidas à cPCR para o gene *RNaseP*, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores (5'-GATKGTGYGAGYATATAAAAAATAAARCTCRAC-3') e HemoMycop RNaseP200as (5'-GMGGRGTTTACCGCGTTTCAC-3'), os quais amplificam

um fragmento de 165 pb de *Mycoplasma* spp. A sequência térmica e tempo de amplificação foram de: 95°C por 2 minutos, seguidos por 55 ciclos de 94°C por 15 segundos, 59°C por 15 segundos e 72°C por 18 segundos, seguido por uma extensão final a 72°C por 30 segundos (MAGGI et al., 2013a). As reações de amplificação foram realizadas utilizando reações de volume final de 25µL, contendo 0,2mM de cada deoxinucleotídeo (Life Technologies®), 0,5µM de cada oligonucleotídeo iniciador (Integrated DNA Technologies® – IDT, Coralville, Iowa, Estados Unidos), 1,5mM de Cloreto de Magnésio (Life Technologies®), 1,25U de Taq DNA Polimerase (Life Technologies®), tampão da PCR 10X (Life Technologies®), e água ultra-pura esterilizada q.s.p. 25µL. Amostra de DNA de *Mycoplasma haemofelis* detectada em um gato naturalmente infectado (MICELI et al., 2013), foi utilizada como controle positivo nas reações supracitadas. Água ultra-pura esterilizada (Nuclease-Free Water, Promega®, Madison, Wisconsin, Estados Unidos) foi utilizada como controle negativo em todos os ensaios cPCR.

4.2.4. Detecção, quantificação e caracterização molecular de *Bartonella* spp.

Com o objetivo de detectar e quantificar o DNA de *Bartonella* spp. (número de cópias/µL), as amostras de DNA de baço de roedores foram submetidas primariamente à qPCR baseada em um fragmento de 83 pb do gene *nuoG*, utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores F (5'-CAATCTTCTTTTGCTTCACC-3') e R (5'-TCAGGGCTTTATGTGAATAC-3') e a sonda de hidrólise TexasRed-5'-TTYGTCATTTGAACACG-3'[BHQ2a-Q]3' (IDT). A amplificação foi realizada utilizando uma reação com volume final de 10µL, contendo uma mistura de 1µL do DNA-amostra, 0,6µM de cada oligonucleotídeo iniciador e sonda de hidrólise, 5µL de tampão da PCR (Go Taq Probe qPCR Master Mix, Promega) e água ultra-pura esterilizada (Nuclease-Free Water, Promega®, Madison, Wisconsin, Estados Unidos) q.s.p. 10µL. As condições de amplificação foram de 95°C por 3 minutos, seguidos por 40 ciclos a 95°C por 10 segundos e 52,8°C por 30 segundos (ANDRÉ et al., 2015). As reações de qPCR foram realizadas utilizando o termociclador C1000 - CFX96 (Bio Rad®).

Com o objetivo de construir a curva padrão, uma diluição seriada foi realizada com diferentes concentrações de DNA plasmidial [($2,0 \times 10^7$ a $2,0 \times 10^0$ cópias/ μL) (IDT Technologies)] contendo a sequência alvo de 83 pb do gene *nuoG* de *Bartonella* spp. O número de cópias do plasmídeo foi determinado de acordo com a fórmula ($X \text{ g}/\mu\text{L DNA} / [\text{tamanho do plasmídeo (pb)} \times 660] \times 6,022 \times 10^{23} \times \text{cópias do plasmídeo}/\mu\text{L}$). Todas as amostras de DNA de baço de roedores, assim como o DNA plasmidial, foram processadas em duplicatas. As réplicas de uma determinada amostra que mostraram valores de C_q acima de 0,5 foram analisadas novamente. A eficiência de amplificação (E) foi calculada de acordo com o *slope* da curva padrão utilizando a fórmula ($E = 10^{-1/\text{slope}}$). Para determinar o limite de detecção da qPCR, a curva padrão ($2,0 \times 10^7$ a $2,0 \times 10^0$ cópias/ μL) foi utilizada para verificar a quantidade de DNA que pode ser detectado com 95% de sensibilidade.

Adicionalmente, todas as amostras positivas para *Bartonella* spp. por meio da qPCR, foram submetidas a ensaios de cPCR adicionais dirigidos para seis fragmentos gênicos: *gltA* (NORMAN et al., 1995 e BIRTLES e RAOULT, 1996), *rpoB* (DINIZ et al., 2007), *ftsZ* (PAZIEWSKA et al., 2011), *groEL* (ZEAITER et al., 2002 e PAZIEWSKA et al., 2011), *ribC* (PAZIEWSKA et al., 2011), *pap-31* (MAGGI e BREITSCHWERDT, 2005) e para região ITS do 16-23S rRNA (DINIZ et al., 2007) (**Tabela 3**). As reações de amplificação foram realizadas utilizando uma reação de volume total final de 25 μL , contendo uma mistura com 5 μL do DNA alvo, 0,8mM de deoxinucleotídeos (Life Technologies[®]), 0,5 μM de cada oligonucleotídeo iniciador (IDT), 1,5mM de Cloreto de Magnésio (Life Technologies[®]), 1,25U de Taq DNA Polimerase (Life Technologies[®]), tampão da PCR e água ultra-pura esterilizada (Nuclease-Free Water, Promega[®], Madison, Wisconsin, Estados Unidos) q.s.p. 25 μL . DNA de *B. henselae* detectado em um gato naturalmente infectado (ANDRÉ et al., 2015) foi utilizado como controle positivo nas reações de cPCR.

Tabela 3. Protocolos utilizados para caracterização molecular de *Bartonella* spp.

Região gênica	Oligonucleotídeos iniciadores	Tamanho	Ciclos de amplificação
(<i>gltA</i>) citrato sintase	CSH1f (GCGAATGAAGCGTGCCTAAA) BhCS1137 (AATGCAAAAAGAACAGTAAACA)	350 pb	94°C por 5 min. 35 ciclos de: 94°C por 30 seg., 54°C por 30 seg., 72°C por 1 min. e 72°C por 5 min.
(<i>rpoB</i>) subunidade β da RNA polimerase	1615s (5'-ATYACYCATAARCGYCGTCTTTCTGCTCTTGG3') 2267as (5'-GGATCTAAATCTTCYGTGACGRATACG-3')	656 pb	95°C por 2 min. 54 ciclos de: 94°C por 30 seg., 62°C por 30 seg., 72°C por 30 seg. e 72°C por 5 min.
(<i>fstZ</i>) "cell division protein"	F- (5'-CATATGGTTTTTCATTACTGCGGTATGG-3') R- (5'-TTCTTCGCGAATACGATTAGCAGCTTC-3')	515 pb	94°C por 2 min. 40 ciclos de: 94°C por 45 seg., 61°C por 45 seg., 72°C por 45 seg. e 72°C por 7 min.
(<i>groEL</i>) "heat shock protein"	F (5'-GGAAAAAGTGGGCAATGAAG-3') R (5'-TCCTTTAACGGTCAACGCATT-3')	752 pb	94°C por 2 min. 45 ciclos de: 94°C por 45 seg., 54°C por 45 seg., 72°C por 45 seg. e 72°C por 7 min.
(<i>ribC</i>) riboflavina sintase	Bart-F (5'-TYGGTTGTGTGAAGATGT-3') Bart-R (5'-AATAATMAGAACATCAAAAA-3')	420 pb	94°C por 2 min. 40 ciclos de: 94°C por 45 seg., 52°C por 45 seg., 72°C por 45 seg. e 72°C por 7 min.
(<i>pap-31</i>) "heme-binding protein gene"	1s (5'-ACTTCTGTTATCGCTTTGATTCRRCT-3') 688as (5'-CACCACCAGCAAAATAAGGCATMAY-3')	548 pb	95°C por 2 min. 54 ciclos de: 94°C por 30 seg., 58°C por 30 seg., 72°C por 30 seg. e 72°C por 5 min.
(<i>ITS</i>) região intergênica do 16S-23S rRNA	325s (5'-CTTCAGATGATGATCCCAAGCCTTYTGGCG-3') 1100as (5'-GAACCGACGACCCCTGCTTGCAAAGCA-3')	Espécie dependente	95°C por 2 min. 45 ciclos de: 94°C por 15 seg., 66°C por 15 seg., 72°C por 15 seg. e 72°C por 5 min.

4.3. Eletroforese de DNA em gel de agarose

Os produtos amplificados por meio dos ensaios de cPCR foram submetidos à eletroforese horizontal 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). A eletroforese foi realizada a 90V/150mA durante 60 minutos. Para a determinação dos produtos amplificados foi utilizado um marcador de peso molecular de 100 pares de base (Life Technologies®). Os resultados foram visualizados e analisados por meio

de um transiluminador de luz ultravioleta (ChemiDoc MP Imaging System, Bio Rad®)

4.4. Reação de sequenciamento

4.4.1. Purificação dos amplicómeros

Após a reação de cPCR, foi realizada a purificação dos produtos amplificados utilizando-se o *kit Silica Bead DNA Gel Extraction Kit* (Fermentas, São Paulo-SP), de acordo com as recomendações do fabricante.

4.4.2. Quantificação de DNA dos amplicómeros

A quantificação de material genômico total do produto purificado foi realizada em aparelho Nanodrop (Thermo Scientific), por meio da leitura da absorbância de cada amostra.

4.4.3. Sequenciamento

O sequenciamento dos produtos amplificados foi realizado por meio de técnica automatizada baseada no método de terminação da cadeia por dideoxinucleotídeos (SANGER et al., 1977). Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram os mesmos utilizados nas reações de PCR. O protocolo da reação de sequenciamento foi realizado com algumas modificações a partir daquele descrito pelo fabricante do *Kit Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* (Perkin-Elmer Applied Biosystems). Utilizaram-se 3,5 µL do Tampão 2,5x (200 mM Tris-HCl pH 9,0; 5mM MgCl₂), 0,5 µL de *Big Dye*, 5 pmoles de cada oligonucleotídeo, 2,5 µL de água ultra pura e 1,5 µL de DNA, sendo esta quantidade estimada pela verificação de intensidade das bandas em gel de agarose a 2,0%. As amplificações foram realizadas inicialmente em termociclador (MJ Research-Inc) a 96°C por 2 minutos e 35 ciclos de desnaturação a 96°C por 45 segundos, anelamento por 30 segundos (temperatura de anelamento variou de acordo com o protocolo de PCR para cada gene) e extensão a 60°C por 4 minutos sendo então mantidas a 4°C por tempo indeterminado.

O processo de lavagem das amostras foi realizado adicionando-se 80 µL Isopropanol 75% em cada amostra. A placa foi selada com alumínio e, após incubação por 15 minutos em local escuro à temperatura ambiente, foi

centrifugada a 4.000g por 30 minutos a 20°C. O sobrenadante foi descartado e 200 µL de etanol 70% foram adicionados, e a placa novamente centrifugada, por 10 minutos. O sobrenadante foi novamente descartado e a mesma quantidade de etanol 70% foi acrescida, repetindo o passo anterior. A placa foi centrifugada invertida (aceleração e desaceleração) e em seguida colocada na bomba de vácuo por 5 minutos para completa secagem das amostras. O sequenciamento foi conduzido no sequenciador ABI PRISM 3700 DNA Analyzer (Applied Biosystems). As reações de sequenciamento foram realizadas no Centro de Recurso Biológicos e Biologia Genômica (CREBIO- FCAV/UNESP).

4.5. Análise filogenética

A qualidade dos eletroferogramas obtidos por meio do sequenciamento dos produtos amplificados foram visualmente analisados no programa FinchTV 1.4.0. Adicionalmente, as sequências consenso foram obtidas pela análise das sequências *forward* e *reverse* utilizando o programa CAP3 (<http://mobyle.pasteur.fr/cgi-bin/MobylePortal/portal.py>). Com o propósito de se realizar a análise de identidade das sequências, os fragmentos gênicos amplificados foram confrontados com outros previamente depositados no Genbank por meio do Blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Por fim, as sequências do gene 16S rRNA para *Mycoplasma* spp. e *gltA*, *FtsZ*, *groEL* e *pap-31* para *Bartonella* spp. foram individualmente alinhadas com outras sequências disponíveis no Genbank utilizando-se o Clustal/W (THOMPSON et al., 1994) e manualmente ajustadas no programa Bioedit v. 7.0.5.3 (HALL, 1999). As análises filogenéticas utilizando o critério de *Maximum Likelihood* (ML) foram inferidas com RAxML-HPC BlackBox (7.6.3) (STAMATAKIS et al., 2008) por meio do CIPRES Science Gateway (MILLER et al., 2010). Adicionalmente, as sequências do gene *gltA* foram submetidas à Inferência Bayesiana (BI) utilizando o MrBayes X-SEDE (3.2.6) (RONQUIST e HUELSENBECK, 2003). Por fim, três sequências pertencentes aos genes *gltA*, *ftsZ* e *groEL*, foram analisadas simultaneamente (análise concatenada) e submetidas à Inferência Bayesiana. As primeiras árvores (25%) foram descartadas como *burn-in*. Os AICs (*Akaike Information Criterion*) obtidos por meio da análise das sequências, realizada no programa MEGA 5.05, foram utilizados para selecionar o modelo de evolução *best of fit*.

4.6. Diversidade genética e distribuição de *Bartonella* sp. detectada em roedores no Brasil.

O alinhamento das sequências dos genes *gltA*, *ftsZ*, *groEL* e *pap-31* amplificadas no presente estudo foram utilizados para calcular a diversidade de nucleotídeos (π), nível de polimorfismo (diversidade de haplótipo – [dh]), número de haplótipos (h) e a média do número de diferenças nucleotídicas (K) utilizando o programa DnaSP v5 (LIBRADO e ROZAS, 2009). Adicionalmente, as equências do gene *gltA* foram submetidas à análise de *median-joining network* (BANDELT et al., 1999), aqual foi inferida utilizando o programa *Population Analysis with Reticulate Trees* (popART) (LEIGH e BRYANT, 2015).

5. RESULTADOS

5.1. Qualidade das amostras de DNA extraídas a partir de fragmentos de baço de roedores

Dentre as 500 amostras de DNA analisadas, 457 mostraram-se positivas na cPCR do controle interno (gene *IRBP*) (**Tabela4**). Todas as amostras negativas para o gene *IRBP* também se mostraram negativas quando submetidas à cPCR dirigida ao gene *GAPDH*. Sendo assim, essas 43 amostras foram excluídas das análises posteriores. A concentração média e a relação de absorbância (260/280 nm) das amostras de DNA foram de 221,6 ng/μL e 2,1 nm, respectivamente. A **Figura 4** mostra a eletroforese em gel agarose de produtos amplificados na cPCR baseada no gene *IRBP* (fragmento de 227 pb).

Tabela 4. Distribuição, espécies e número de roedores analisados entre o período de 2000 a 2012.

Biomass/Estados	Espécies	Número de roedores analisados	Nº. de roedores positivos para o controle interno (IRBP Gene)
Mata Atlântica			
Rio de Janeiro	<i>Akodon</i> sp.	36	27
	<i>Necomys lasiurus</i>	4	4
	<i>Bucepattersonius</i> sp.	1	1
	<i>Delomys dorsalis</i>	9	9
	<i>Euryoryzomys russatus</i>	2	2
	<i>Oligoryzomys nigripes</i>	9	4
	<i>Oligoryzomys</i> sp.	1	1
	<i>Oxymycterus dasythricus</i>	3	3
	<i>Oxymycterus</i> sp.	3	3
	<i>Trinomys dimidiatus</i>	4	1
	<i>Trinomys iheringi</i>	4	3
	<i>Sciurus</i> sp.	1	1
	<i>Sphiggurus</i> sp.	1	1
	<i>Sphiggurus villosus</i>	1	1
Minas Gerais	<i>Nectomys squamipes</i>	4	4
	<i>Thrichomys apereoides</i>	10	10
	<i>Oligoryzomys nigripes</i>	7	7
	<i>Calomys cerqueirae</i>	3	3
São Paulo	<i>Oligoryzomys</i> sp.	4	4
	<i>Oligoryzomys nigripes</i>	11	11
	<i>Oligoryzomys flavescens</i>	3	3
	<i>Akodon montensis</i>	11	11
	<i>Calomys tener</i>	10	10
	<i>Mus musculus</i>	2	2
Santa Catarina	<i>Akodon montensis</i>	5	5
	<i>Mus musculus</i>	3	1
	<i>Euryoryzomys russatus</i>	12	10
	<i>Sooretamys angouya</i>	2	2
	<i>Mus musculus</i>	1	1
Amazônia			
Pará	<i>Rattus rattus</i>	8	8
	<i>Mus musculus</i>	1	1
	<i>Proechimys goeldii</i>	7	7
	<i>Proechimys roberti</i>	2	2
	<i>Proechimys gr.cuvieri</i>	2	2
	<i>Proechimys</i> sp.	3	3
	<i>Zygodontomys</i> sp.	3	2
Mato Grosso	<i>Rattus rattus</i>	2	2
	<i>Proechimys</i> sp.	3	3
	<i>Necomys lasiurus</i>	1	1
Caatinga			
Bahia	<i>Necomys lasiurus</i>	1	1
	<i>Mus musculus</i>	1	1
	<i>Thrichomys inermis</i>	7	7
	<i>Thrichomys laurentius</i>	2	2
	<i>Thrichomys</i> sp.	4	3
	<i>Galea spixii</i>	8	8
Ceará	<i>Galea spixii</i>	12	12
	<i>Mus musculus</i>	7	7
	<i>Rattus rattus</i>	12	12
	<i>Thrichomys laurentius</i>	15	8
Piauí	<i>Rhipidomys macrurus</i>	7	3
	<i>Thrichomys laurentius</i>	7	7
Rio Grande do Norte	<i>Cavia</i> sp.	1	1
	<i>Thrichomys laurentius</i>	3	3
Cerrado			
Mato Grosso	<i>Rattus rattus</i>	3	3
	<i>Necomys lasiurus</i>	15	15
	<i>Calomys</i> sp.	16	16
Mato Grosso do Sul	<i>Calomys expulsus</i>	1	1
	<i>Necomys lasiurus</i>	6	6
	<i>Nectomys rattus</i>	3	3
	<i>Nectomys</i> sp.	3	3
	<i>Nectomys squamipes</i>	2	2

... Continua

			... Continuação
Goiás	<i>Necomys lasiurus</i>	15	15
	<i>Cerradomys</i> sp.	3	3
	<i>Hylaeamys megacephalus</i>	7	7
	<i>Nectomys rattus</i>	5	5
	<i>Nectomys</i> sp.	2	2
	<i>Oecomys gr. bicolor</i>	5	4
	<i>Oryzomys megacephalus</i>	3	2
	<i>Rattus rattus</i>	4	4
	<i>Rhipidomys</i> sp.	10	10
	<i>Oligoryzomys nigripes</i>	2	2
	<i>Oligoryzomys fornesi</i>	2	2
Tocantins	<i>Calomys</i> sp.	27	27
	<i>Hylaeamys</i> sp.	10	9
	<i>Necomys lasiurus</i>	9	9
	<i>Rhipidomys</i> sp.	6	5
	<i>Mus musculus</i>	1	1
	<i>Juliomys</i> sp.	1	1
	<i>Oligoryzomys</i> sp.	6	6
	<i>Cerradomys</i> sp.	3	3
	<i>Oecomys</i> sp.	7	6
	<i>Oryzomys</i> sp.	3	2
Pantanal			
Mato Grosso do Sul	<i>Clyomys laticeps</i>	8	8
	<i>Holochilus</i> sp.	7	6
	<i>Thrichomys pachyurus</i>	19	18
Total		500	457

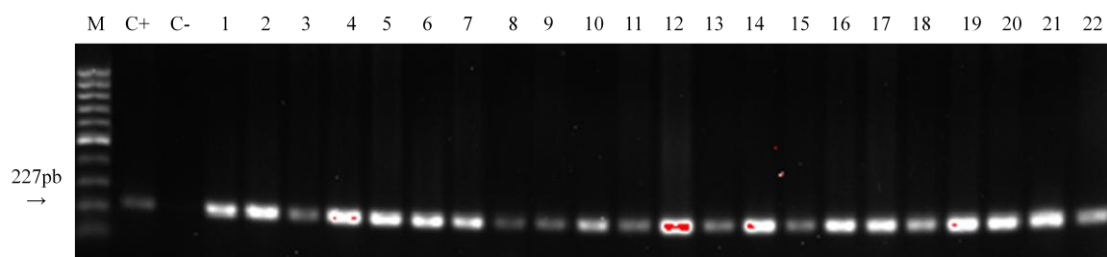


Figura 4. Fotografia de eletroforese em gel de agarose 1,0% corado com brometo de etídeo. Os amplicómeros mostrados na foto são relativos à cPCR para controle endógeno (gene *IRBP*). Canaleta M: marcador de peso molecular em escala de 100 pares de bases (Life Technologies®); canaleta C+: controle positivo (DNA de *Akodon* sp.); canaleta C-: controle negativo (água ultra-pura esterilizada); canaletas 1-22: amostras de DNA de roedores.

5.2. Ocorrência de *Mycoplasma* spp.

Das 457 amostras de DNA de roedores submetidas à cPCR, 21,9% (100/457) mostraram-se positivas para *Mycoplasma* spp. (**Figura 5**). A ocorrência de micoplasmas hemotróficos em roedores amostrados nos diferentes biomas foi de 9,3% (7/75) na Caatinga, 12,5% (4/32) no Pantanal, 24,7% (43/174) no Cerrado, 25,8% (8/31) na Amazônia e 26,2% (38/145) na

Mata Atlântica. Infelizmente, as amostras previamente positivas para *Mycoplasma* spp. na cPCR dirigida para o gene 16S rRNA quando submetidas à cPCR adicional baseada no gene *RNaseP* mostraram bandas de fraca intensidade, impossibilitando o sequenciamento desses fragmentos.

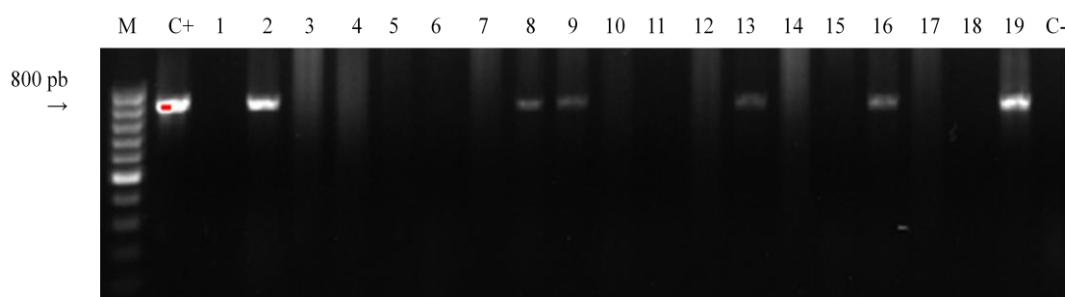


Figura 5. Fotografia de eletroforese em gel de agarose 1,0% corado com brometo de etídeo. Os amplicómeros mostrados na foto são relativos à cPCR para *Mycoplasma* spp. (gene 16S rRNA). Canaleta M: marcador de peso molecular em escala de 100 pares de bases (Life Technologies®); canaleta C+: controle positivo (DNA de *M. haemofelis*); canaletas 1-19: amostras de DNA de roedores; canaleta C-: controle negativo (água ultra-pura esterilizada).

5.3. PCR em Tempo Real quantitativa (qPCR) para *Bartonella* spp.

A eficiência média de amplificação (E) dos ensaios de qPCR para *Bartonella* spp. foi de: $E = 96.6\%$ [(90.8% - 101%, $DP \pm 2.78$); $slope = -3.407$; $r^2 = 0.994$]. O limite de detecção foi de 10 cópias de plasmídeo/ μL com 95% de sensibilidade. Entretanto, 11 amostras de DNA mostraram número de cópias de DNA menor que 10 cópias/ μL . Os valores mínimo e máximo do número de cópias do gene *nuoG* de *Bartonella* spp. detectados foram de 1,1 e 238000 cópias/ μL , respectivamente.

Dentre as 457 amostras de DNA analisadas por meio da qPCR para o gene *NuoG*, 25,6% (117/457) mostraram-se positivas para *Bartonella* spp. (**Figura6**). A ocorrência de *Bartonella* spp. em roedores capturados nos cinco diferentes biomas brasileiros, assim como o número de cópias de DNA de *Bartonella*, estão mostrados na **Tabela 5**.

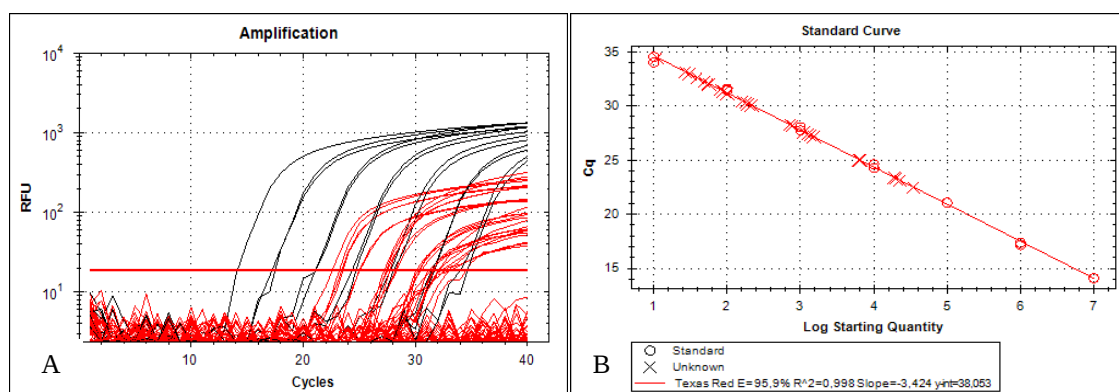


Figura 6. qPCR para *Bartonella* spp. dirigida para o gene *nuoG*. **Figura 6A:** linhas pretas são referentes à amplificação da curva padrão; linhas vermelhas ultrapassando a linha de *threshold* são referentes às amostras de DNA de baço de roedores positivos para *Bartonella* spp. **Figura 6B:** Regressão logarítmica da curva padrão.

Tabela 5. Ocorrência e quantificação absoluta de DNA de *Bartonella* spp. entre os roedores capturados nos diferentes biomas brasileiros.

Biomas	Ocorrência de <i>Bartonella</i> spp.	Quantificação absoluta (cópias de <i>nuoG</i> /μL)*
Amazônia	3,2% (1/31)	0,1 x 10 ²
Mata Atlântica	35,9% (52/145)	38 x 10 ²
Caatinga	6,7% (5/75)	7,5 x 10 ²
Cerrado	27,6% (48/174)	120 x 10 ²
Pantanal	34,4% (11/32)	8 x 10 ²
Total	25,6% (117/457)	34,7 x 10²

* Média da quantificação absoluta

5.4. cPCR para *Bartonella* spp.

Dentre as 117 amostras de DNA positivas para *Bartonella* spp. por meio da qPCR, 69,2 % (81/117) mostraram-se positivas nos ensaios de cPCR para o gene *ftsZ*, 56,4 % (66/117) para o gene *gltA*, 58,1% (68/117) para o gene *pap-31*, 35% (41/117) para a região *ITS* e 30% (35/117) para o gene *groEL* (**Figuras 7-11**). Nenhuma amostra mostrou-se positiva nos ensaios de cPCR para os genes *ribC* e *rpoB*. Amostras positivas para *Bartonella* em dois ou mais ensaios de cPCR concomitantemente podem ser vistas na **Figura 12**.

A presença de copositividade para *Mycoplasma* spp. e *Bartonella* spp. foi observada em 9% (41/457) dos roedores amostrados.

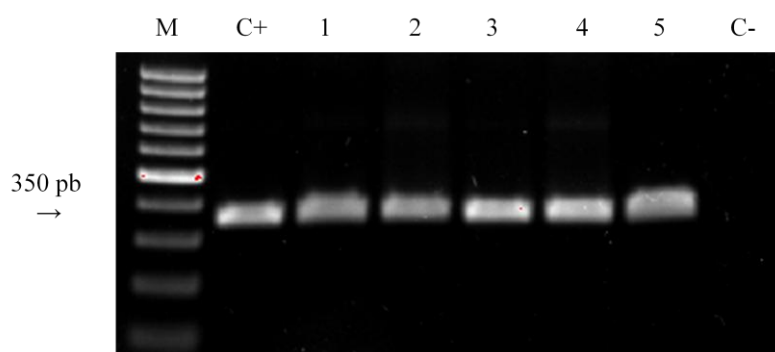


Figura 7. Fotografia de eletroforese em gel de agarose 1,0% corado com brometo de etídeo. Os amplicómeros mostrados na foto são relativos à cPCR para *Bartonella* spp. (gene *gltA*). Canaleta M: marcador de peso molecular em escala de 100 pares de bases (Life Technologies®); canaleta C+: controle positivo (DNA de *B. henselae*); canaletas 1-5: amostras de DNA de roedores; canaleta C-: controle negativo (água ultra-pura esterelizada).

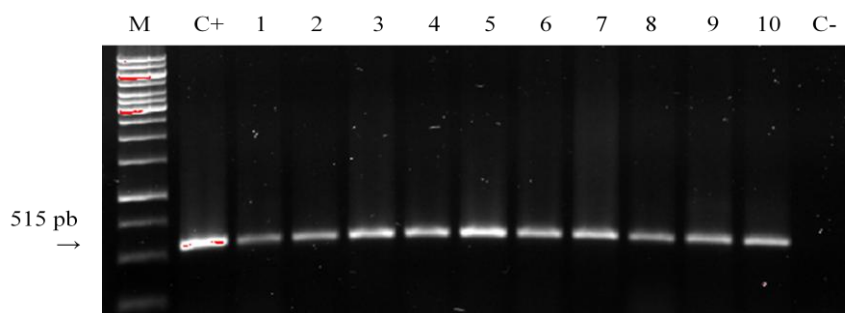


Figura 8. Fotografia de eletroforese em gel de agarose 1,0% corado com brometo de etídeo. Os amplicómeros mostrados na foto são relativos à cPCR para *Bartonella* spp. (gene *ftsZ*). Canaleta M: marcador de peso molecular em escala de 1 kb (Life Technologies®); canaleta C+: controle positivo (DNA de *B. henselae*); canaletas 1-10: amostras de DNA de roedores; canaleta C-: controle negativo (água ultra-pura esterelizada).

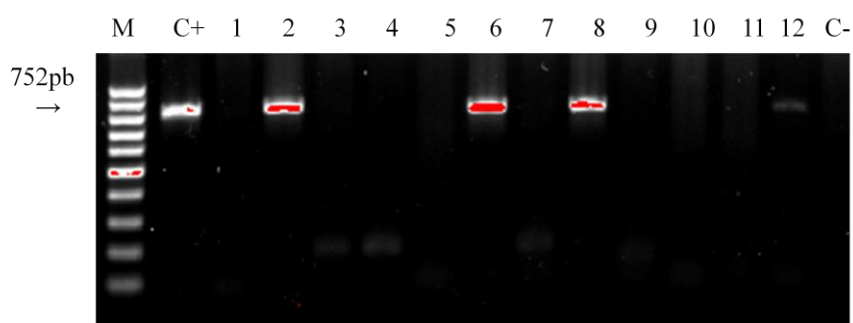


Figura 9. Fotografia de eletroforese em gel de agarose 1,0% corado com brometo de etídeo. Os amplicómeros mostrados na foto são relativos à cPCR para *Bartonella* spp. (gene *groEL*). Canaleta M: marcador de peso molecular em escala de 100 pares de bases (Life Technologies®); canaleta C+: controle positivo (DNA de *B. henselae*); canaletas 1-12: amostras de DNA de roedores; canaleta C-: controle negativo (água ultra-pura esterelizada).

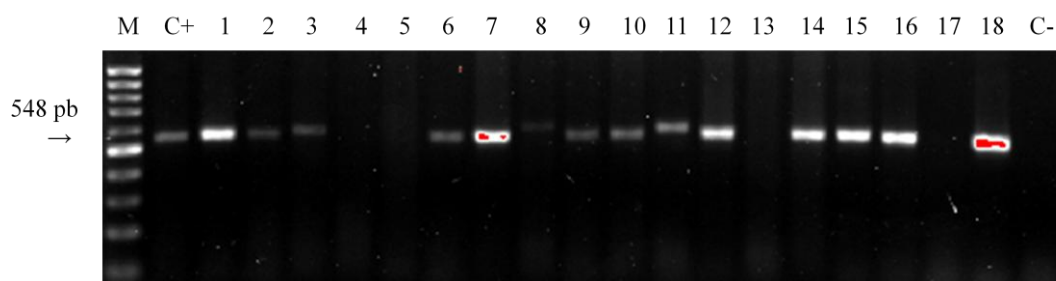


Figura 10. Fotografia de eletroforese em gel de agarose 1,0% corado com brometo de etídeo. Os amplicómeros mostrados na foto são relativos à cPCR para *Bartonella* spp. (gene *pap-31*). Canaleta M: marcador de peso molecular em escala de 100 pares de bases (Life Technologies®); canaleta C+: controle positivo (DNA de *B. henselae*); canaletas 1-18: amostras de DNA de roedores; canaleta C-: controle negativo (água ultra-pura esterelizada).

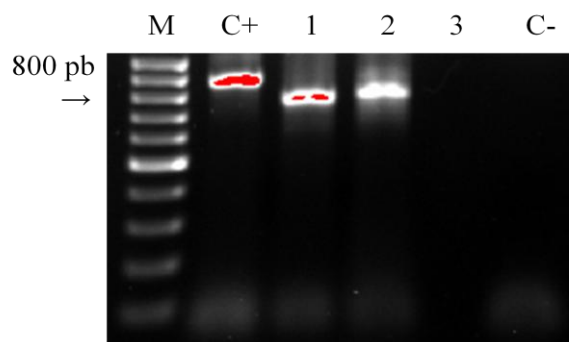


Figura 11. Fotografia de eletroforese em gel de agarose 1,0% corado com brometo de etídeo. Os amplímeros mostrados na foto são relativos à cPCR para *Bartonella* spp. (fragmento ITS). Canaleta M: marcador de peso molecular em escala de 100 pares de bases (Life Technologies®); canaleta C+: controle positivo (DNA de *B. henselae*); canaletas 1 e 2: amostras de DNA de roedores; canaleta C-: controle negativo (água ultra-pura esterelizada).

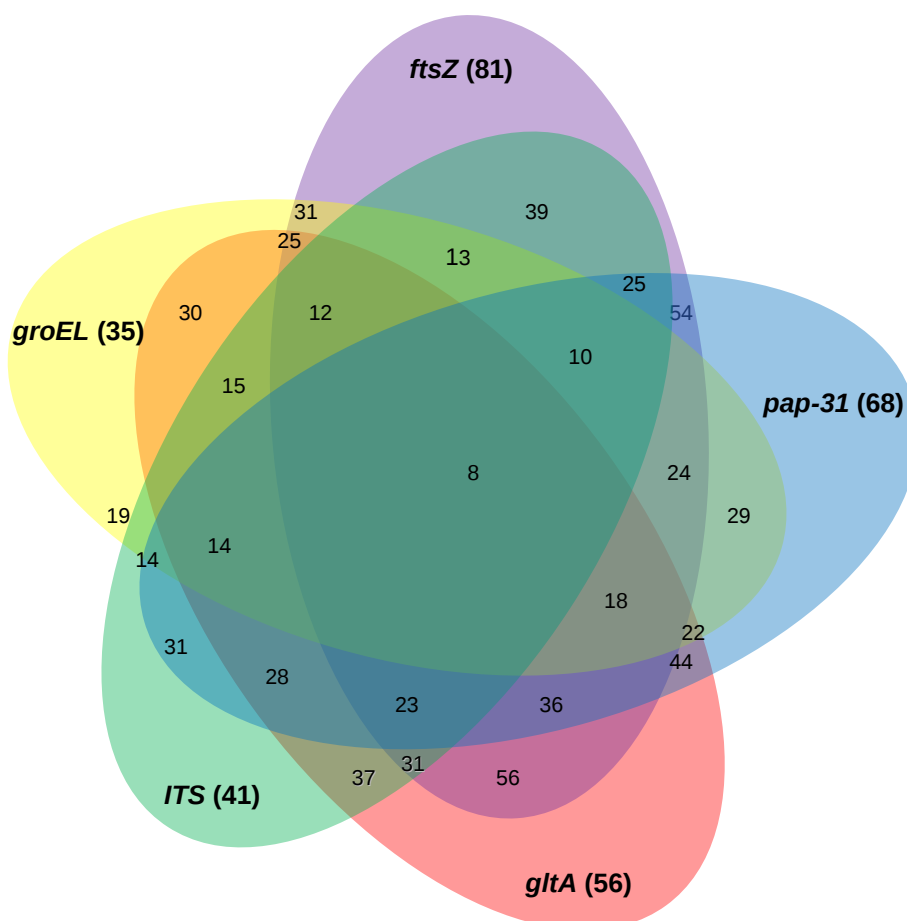


Figura 12. Número de roedores simultaneamente positivos em ensaios de cPCR para *Bartonella* baseados em dois ou mais genes.

5.5. Análise da identidade das sequências pelo BLASTn

5.5.1. Análise das sequências de *Mycoplasma* spp.

A análise de 24 sequências do gene 16S rRNA (~1240 pb) quando submetidas ao BLASTn mostrou identidade variando de 85 a 99% com outros hemoplasmas murinos ('*Candidatus* M. haemomuris subsp. musculi', '*Candidatus* M. haemomuris subsp. rattii' e *M. coccoides*) e com outras sequências detectadas em roedores amostrados no Brasil e Hungria (**Tabela 6**). A cobertura das sequências analisadas (*Query coverage*) variou de 97 a 100%. As sequências do gene 16S rRNA amplificadas no presente estudo foram depositadas no Genbank sob os números de acesso KT215620 - KT215643.

Tabela 6. Porcentagem de identidade (BLASTn) entre as sequências do gene 16S rRNA de hemoplasmas detectadas em roedores no Brasil e outras sequências previamente depositadas no GenBank.

Sequências detectadas no presente estudo	'C M. haemomuris subsp. rattii' (AB758435)	'C M. haemomuris subsp. musculi' (AB918692)	<i>Mycoplasma cocoides</i> (AY171918)	<i>Mycoplasma</i> sp. (<i>Micromys minutus</i>) (KC863983)	<i>Mycoplasma</i> sp. (<i>R. norvegicus</i>) (AB752303)	<i>Mycoplasma</i> sp. (<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>) (FJ667773)	<i>Mycoplasma</i> sp. (<i>H. hydrochaeris</i>) (FJ667774)
Cluster 1	93	93	91	90	90	89	89
KT215625*	89	89	86	86	85	86	86
KT215626*	93	93	90	90	89	89	89
Cluster 3	93	93	90	90	90	88	89
Cluster 4	93	93	89	90	89	88	89
Cluster 5	92	92	89	89	90	87	87
Cluster 6	93	93	89	89	89	88	88
Cluster 7	99	99	89	89	90	88	88
Cluster 8	90	89	90	89	93	88	89
Cluster 9	90	89	90	89	99	87	87
Cluster 10	91	89	93	96	89	92	92

*As sequências destacadas pertencem ao cluster 2.

5.5.2. Análise das sequências de *Bartonella* sp.

Dentre as amostras positivas para *Bartonella* sp. na cPCR, fragmentos parciais dos genes *gltA* (20), *ftsZ* (15), *groEL* (4) e *pap-31* (4) foram sequenciados e confrontados com outras sequências previamente depositadas no Genbank. Todas as sequências (*ftsZ*, *groEL* e *pap-31*) compartilharam baixas porcentagens de identidade, variando de 86 a 93%, com outras sequências de *Bartonella* spp., principalmente com as espécies do complexo *B. vinsonii*. Por outro lado, 18 sequências do gene *gltA* mostraram identidade variando de 96 a 98% com *Bartonella* sp. (nomeada como grupo filogenético A) detectada em roedores silvestres (*Sigmodon hispidus*, *Oryzomys palustris*, pertencentes à Família Cricetidae) e suas respectivas pulgas (*Polygenis gwyni*) amostrados nos EUA. Outras duas sequências do gene *gltA* (#7554 e #11790) detectadas em roedores da espécie *Necromys lasiurus* amostrados no Cerrado, compartilharam 97 e 98% de identidade, respectivamente, com *Bartonella* sp. strain *R-phy1* detectada em um roedor silvestre (*Phyllotis* sp. - Cricetidae) no Peru. Entre as sequências do gene *gltA* amplificadas, a diferença nucleotídica máxima foi de 3,6%. Todas as sequências de *Bartonella* detectadas e analisadas mostraram uma cobertura (*Query coverage*) variando de 92 a 100% no Blastn. As sequências de *Bartonella* sp. foram depositadas no Genbank sob os números de acessos: *gltA* KX086714-KX086733; *ftsZ* KX036231-KX036245; *groEL* KX086734-KX086737. As sequências do gene *pap-31* não foram depositadas no Genbank por conter um ou mais *gaps*.

5.6. Análise filogenética

5.6.1. Análise filogenética de *Mycoplasma* spp.

A análise filogenética (ML) baseada em fragmentos de 1500 pb (depois do alinhamento) do gene 16S rRNA de 24 sequências positivas para *Mycoplasma* spp., mostrou a presença de 10 *clusters* suportados por altos valores de *bootstrap* (87-100%). Todos os *clusters* posicionaram-se dentro do grupo *M. haemofelis*. As sequências amplificadas em roedores silvestres se agruparam em oito *clusters* (1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 e 10) (**Figura 12**).

O *cluster* 1 consistiu de cinco sequências (KT215620-KT215624) detectadas em três espécies de roedores (*Akodon* sp. [duas sequências], *Delomys dorsalis* [uma sequência] e *Necromys lasiurus* [uma sequência]).

amostrados na Mata Atlântica, e *N. lasiurus* [uma sequência] capturado no Cerrado). Duas sequências amplificadas em roedores das espécies *Thrichomys laurentius* (KT215625) e *Rhipidomys macrurus* (KT215626) amostrados na Caatinga posicionaram-se no *cluster* 2. As três sequências que formaram o *cluster* 3 (KT215627-KT215629) foram amplificadas em roedores pertencentes à espécie *Oligoryzomys nigripes* capturados na Mata Atlântica. O *cluster* 4 consistiu em apenas uma sequência (KT215630) detectada em um roedor da espécie *Rhipidomys* sp. amostrado no Cerrado. Três sequências (KT215631- KT215633) agruparam-se no *cluster* 5, as quais foram detectadas em *Nectomys rattus*, *Nectomys* sp., e *N. lasiurus*, amostrados no Cerrado. O *cluster* 6 consistiu de uma única sequência (KT215634) detectada em *Thrichomys fosteri* capturado no Pantanal. O *cluster* 8 foi formado por duas sequências (KT215637-KT215638) detectadas em roedores das espécies *Akodon* sp. e *N. lasiurus*, os quais foram amostrados na Mata Atlântica. O *cluster* 10, formado por uma sequência (KT215636) detectada em um roedor da espécie *Akodon* sp. capturado na Mata Atlântica, posicionou-se próximo a *Mycoplasma* sp. detectado em capivara (*H. hydrochaeris*) no Brasil.

Entre as seis sequências detectadas em roedores sinantrópicos (*R. rattus* amostrados na Amazônia e Cerrado), uma (KT215635) foi posicionada no *cluster* 7 e filogeneticamente próxima a ‘*Candidatus* M. haemomuris subsp. ratti’ detectada em *R. rattus* no Japão (AB758435). Outras cinco sequências (KT215639-KT215643) agrupadas no *cluster* 9 foram relacionadas com *Mycoplasma* sp. detectado em *R. norvegicus* no Japão (AB752303) e Hungria (KJ739312).

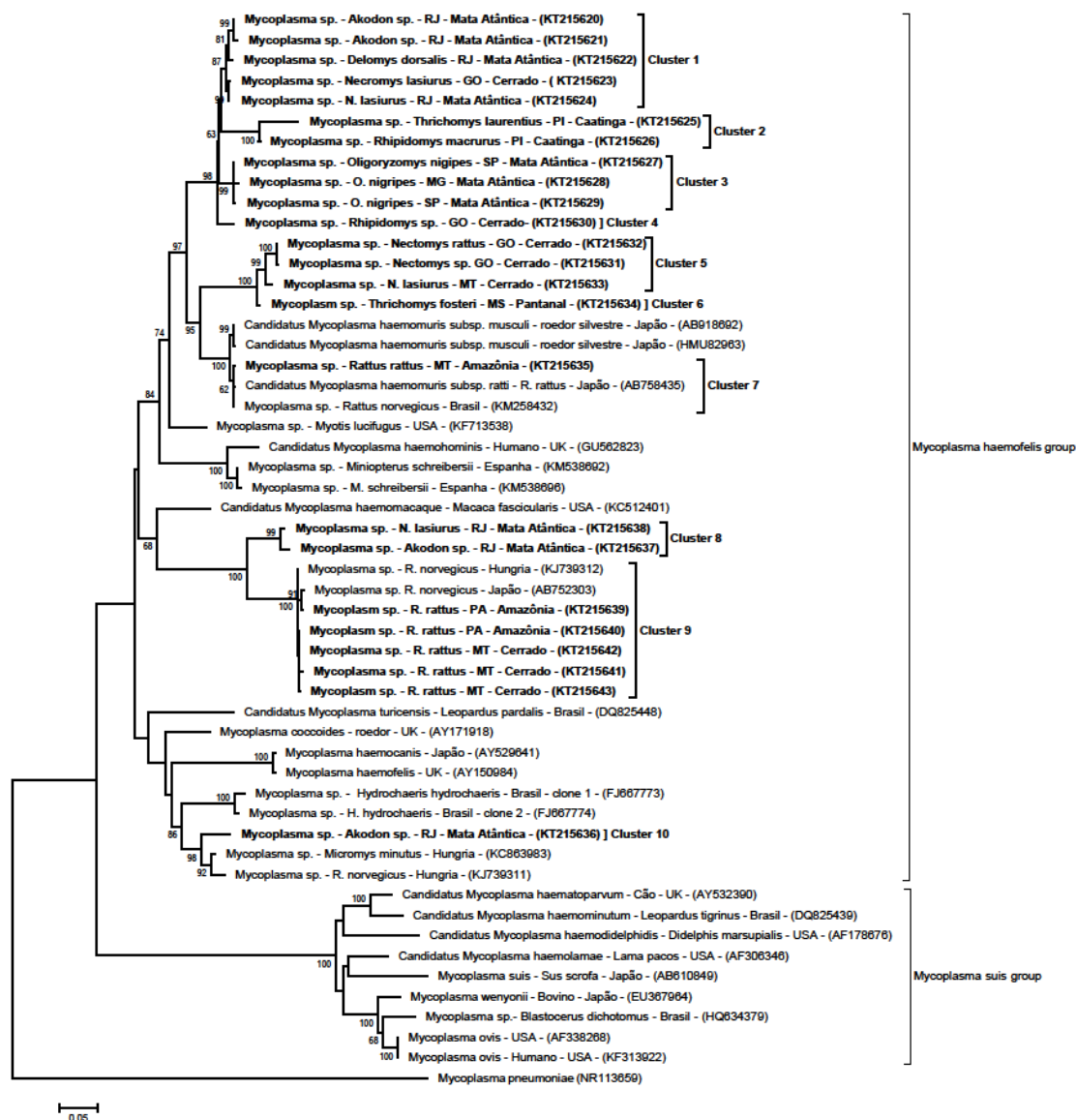


Figura 13. Relação filogenética dentro do gênero *Mycoplasma* baseada em um fragmento de 1500 pb do gene 16S rRNA. A árvore filogenética foi inferida usando o método de *Maximum Likelihood* e o modelo evolutivo GTRGAMMA + I. As sequências amplificadas no presente estudo estão destacadas em negrito. Os números em cada ramo são correspondentes aos valores de *bootstrap* maiores que 60% acessados com 1000 réplicas. *Mycoplasma pneumoniae* foi usado como *outgroup*.

5.6.2. Análise filogenética de *Bartonella* sp.

A relação filogenética (ML) das sequências de *Bartonella* amplificadas no presente estudo quando comparadas com outras sequências de *Bartonella* previamente depositadas no Genbank, mostrou uma clara separação em todos os genes analisados, constituindo em um grupo monofilético e amplamente distribuído entre sete espécies de roedores amostrados em três biomas brasileiros, agrupadas próximas às espécies do complexo *B. vinsonii*. Por outro lado, a Inferência Bayesiana mostrou que as sequências do gene *gltA*, amplificadas em roedores silvestres no Brasil agruparam-se entre as sequências de *Bartonella* sp. detectadas em roedores da família Cricetidae e suas respectivas pulgas nos EUA (grupo filogenético A) (**Figuras 14-18**). Adicionalmente, a análise concatenada das três sequências obtidas nos ensaios de cPCR baseados nos genes *gltA*, *ftsZ* e *grEL* e realizada por meio da análise Bayesiana, mostrou que as sequências amplificadas agruparam-se próximas às espécies do complexo *B. vinsonii* (**Figura 19**).

5.6.3. Diversidade de *Bartonella* sp.

Entre as 20 sequências do gene *gltA* analisadas (distribuídas em 11 locais diferentes), foram identificados 15 haplótipos mostrando um $\pi = 0,02459$, $dh = 0,958$ e $K = 8,1894$. Somente os haplótipos número #1, com quatro sequências (#8522, #6985, #2741, #11786), #5 com duas sequências (#11790, #7554) e #14 com duas sequências (#6068, #6076) foram formados por duas ou mais sequências. A análise *median-joining network* mostrou forte separação geográfica entre os haplótipos detectados. Exceto a sequência #2741 (pertencente ao haplótipo 1) detectado em roedor da espécie *Thrichomys laurentius* amostrado no bioma Caatinga, todos os haplótipos identificados foram exclusivos em um dado bioma (**Figura 20-21**). O resultado da diversidade genética dos demais genes analisado podem ser vistos na **Tabela 7**.

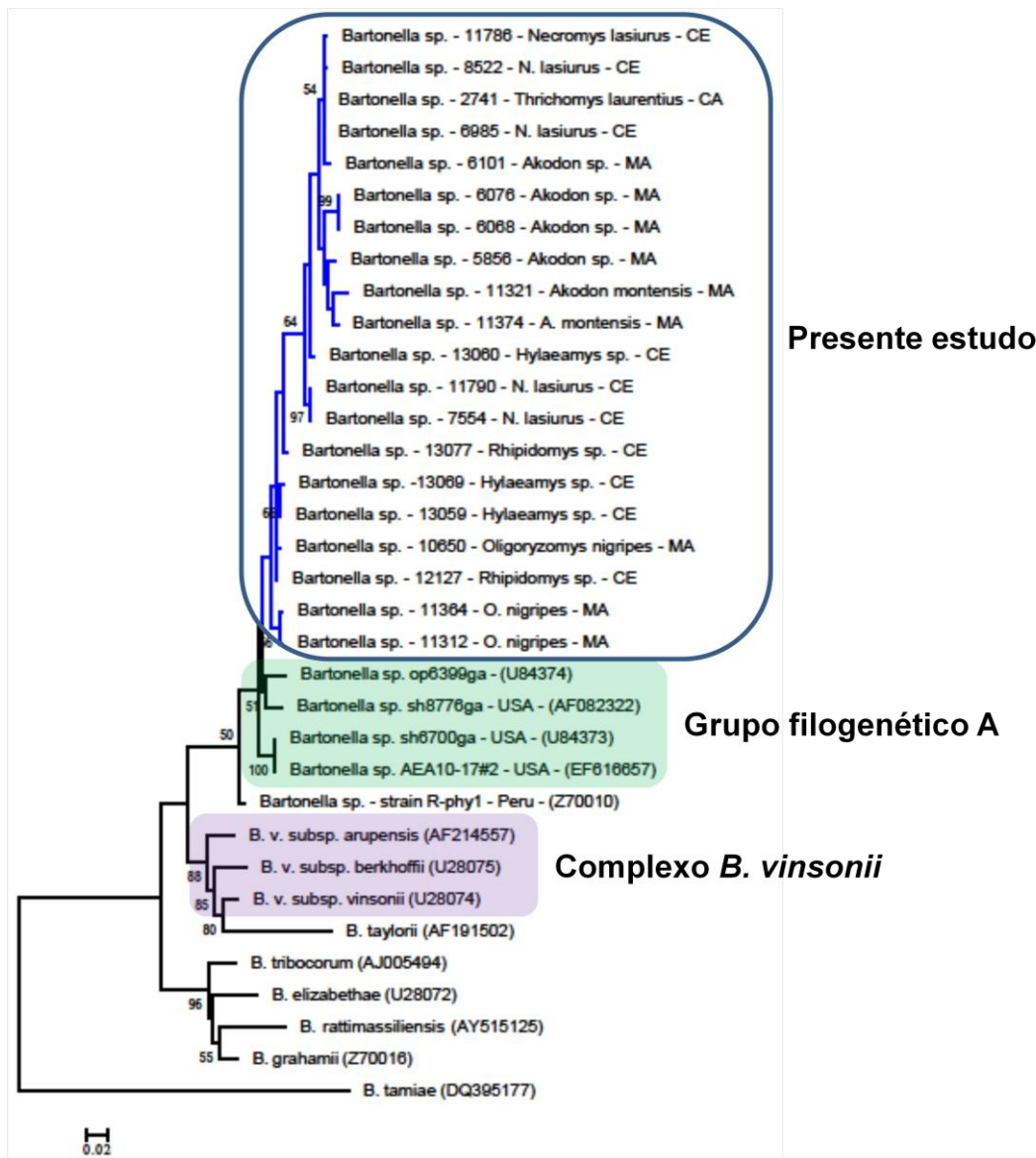


Figura 14. Relação filogenética dentro do gênero *Bartonella* baseado em um fragmento de 350 pb (após alinhamento) do gene *gltA*. A árvore filogenética foi inferida usando o método de *Maximum Likelihood* e o modelo evolutivo T92 + G + I. As sequências amplificadas no presente estudo estão destacadas. Os números em cada ramo são correspondentes aos valores de *bootstrap* maiores que 50% acessados com 1000 replicatas. *B. tamiae* foi usada como *outgroup*. MA: Mata Atlântica; CA: Caatinga; CE: Cerrado.

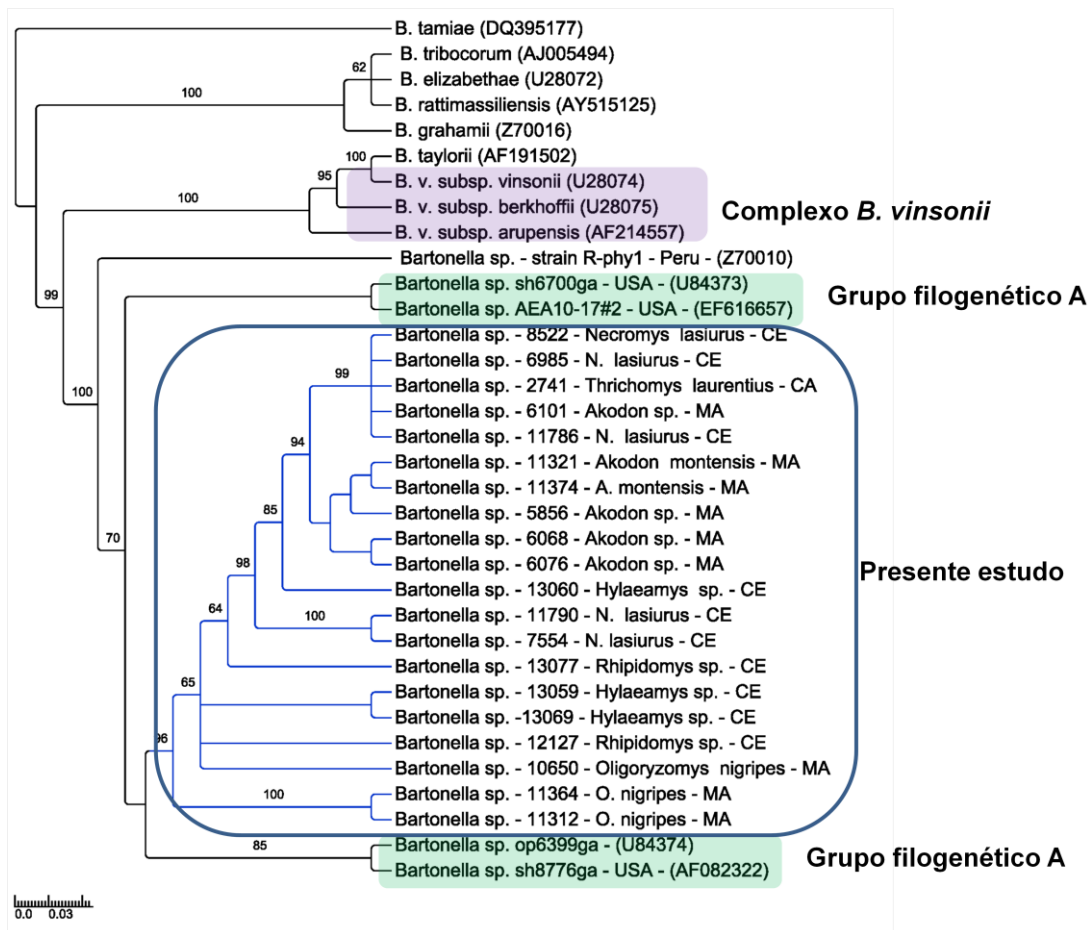


Figura 15. Relação filogenética dentro do gênero *Bartonella* baseado em um fragmento de 350 pb (após alinhamento) do gene *gltA*. A árvore filogenética foi inferida usando a análise Bayesiana e o modelo evolutivo T92 + G + I. As sequências amplificadas no presente estudo estão destacadas. Os números em cada ramo são correspondentes aos valores das probabilidades posteriores maiores que 50% acessados com 10^7 replicatas. *B. tamiae* foi usada como *outgroup*. MA: Mata Atlântica; CA: Caatinga; CE: Cerrado.

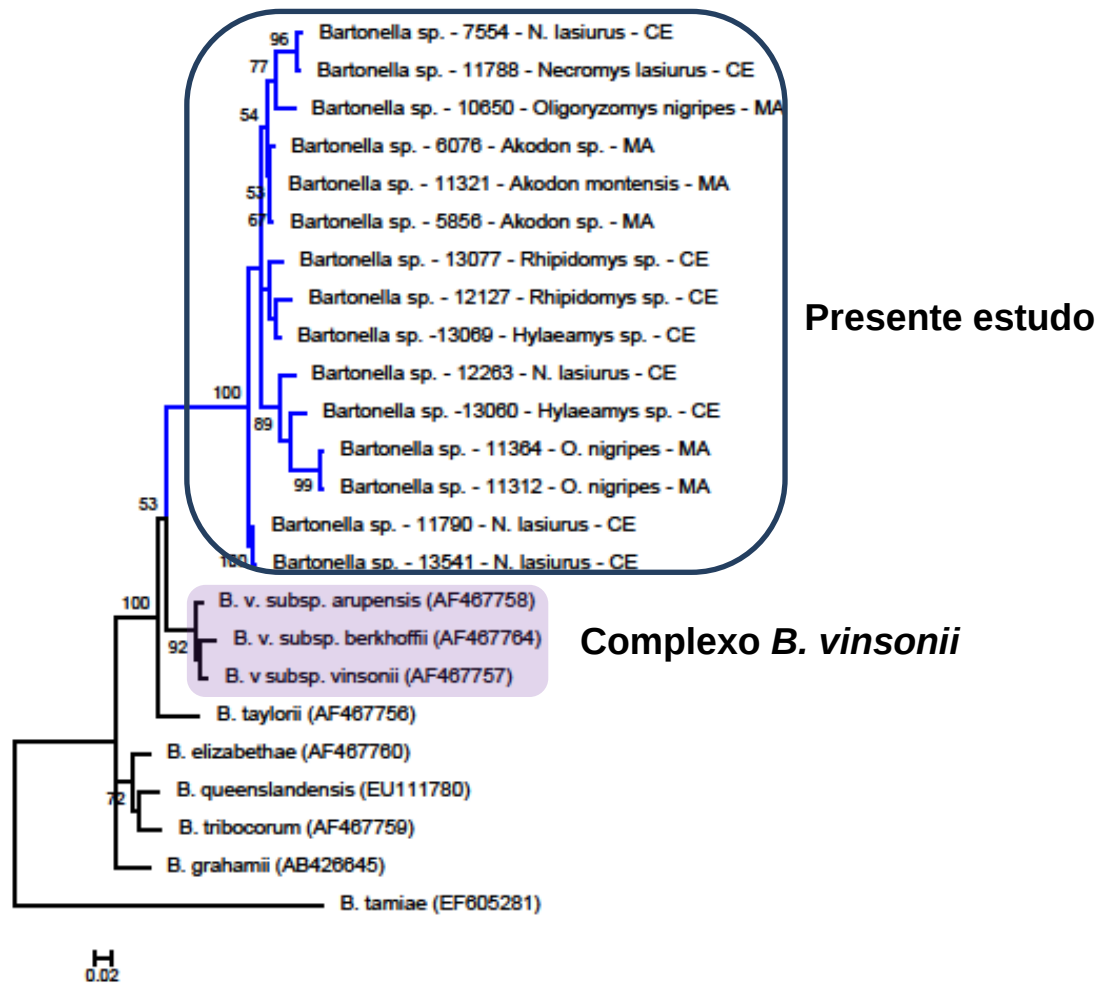


Figura 16. Relação filogenética dentro do gênero *Bartonella* baseado em um fragmento de 750 pb (após alinhamento) do gene *ftsZ*. A árvore filogenética foi inferida usando o método de *Maximum Likelihood* e o modelo evolutivo GTR + G + I. As sequências amplificadas no presente estudo estão destacadas. Os números em cada ramo são correspondentes aos valores de *bootstrap* maiores que 50% acessados com 1000 replicatas. *B. tamiae* foi usada como *outgroup*. MA: Mata Atlântica; CE: Cerrado.

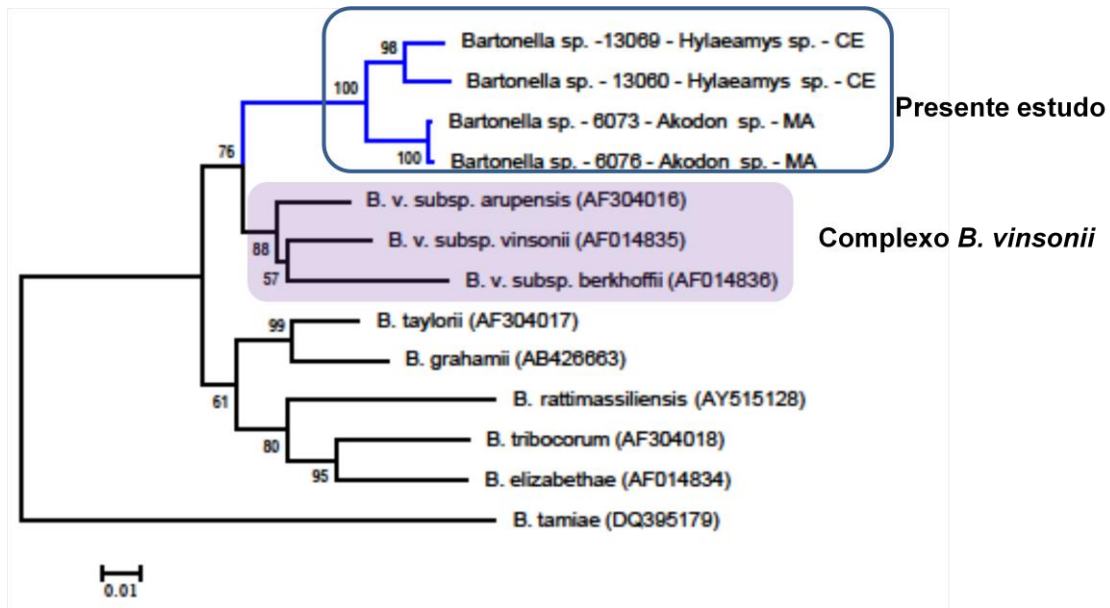


Figura 17. Relação filogenética dentro do gênero *Bartonella* baseado em um fragmento de 1468pb (após alinhamento) do gene *groEL*. A árvore filogenética foi inferida usando o método de *Maximum Likelihood* e o modelo evolutivo TN93 + G + I. As sequências amplificadas no presente estudo estão destacadas. Os números em cada ramo são correspondentes aos valores de *bootstrap* maiores que 50% acessados com 1000 replicatas. *B. tamiae* foi usada como *outgroup*. MA: Mata Atlântica; CE: Cerrado.

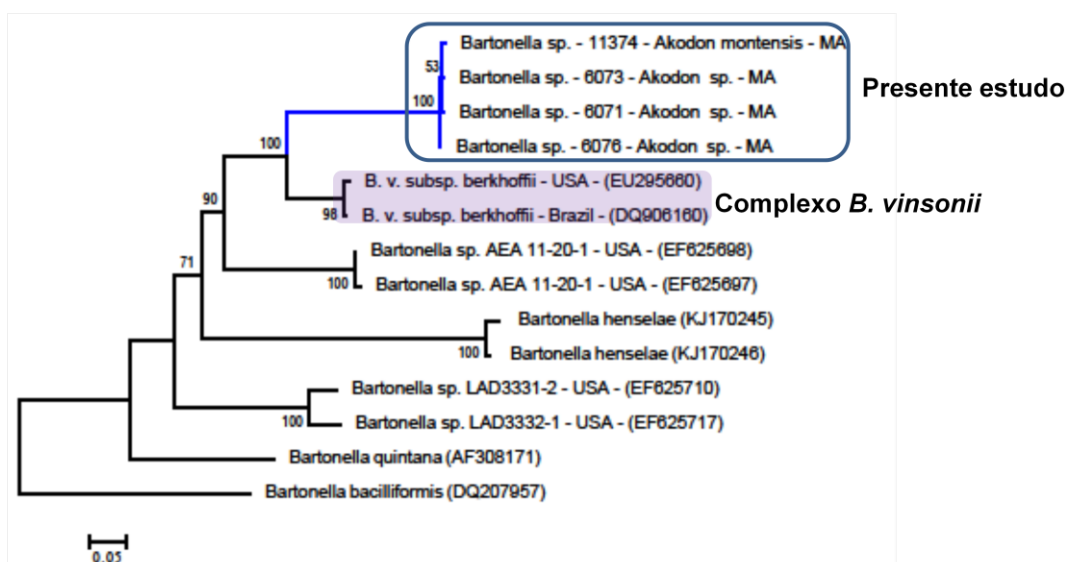


Figura 18. Relação filogenética dentro do gênero *Bartonella* baseado em um fragmento de 582 pb (após alinhamento) do gene *pap-31*. A árvore filogenética foi inferida usando o método de *Maximum Likelihood* e o modelo evolutivo GTR + G + I. As sequências amplificadas no presente estudo estão destacadas. Os números em cada ramo são correspondentes aos valores de *bootstrap* maiores que 50% acessados com 1000 replicatas. *B. bacilliformis* foi usada como *outgroup*. MA: Mata Atlântica.

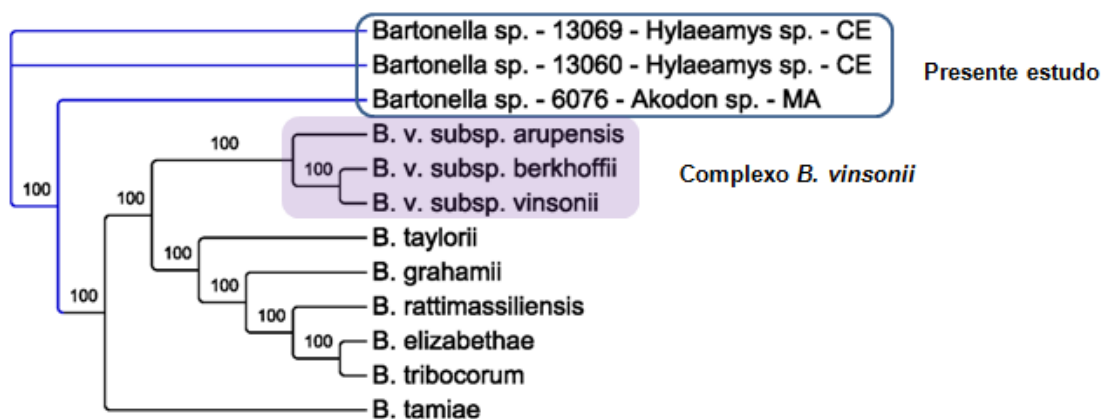


Figura 19. Relação filogenética dentro do gênero *Bartonella* baseado na concatenação dos genes *gltA*, *ftsZ* e *groEL* (3375 pb). A árvore filogenética foi inferida usando a análise Bayesiana. As sequências amplificadas no presente estudo estão destacadas. Os números em cada ramo são correspondentes aos valores das probabilidades posteriores maiores que 50% acessados com 10^7 replicatas. *B. tamiae* foi usada como *outgroup*. MA: Mata Atlântica; CE: Cerrado.

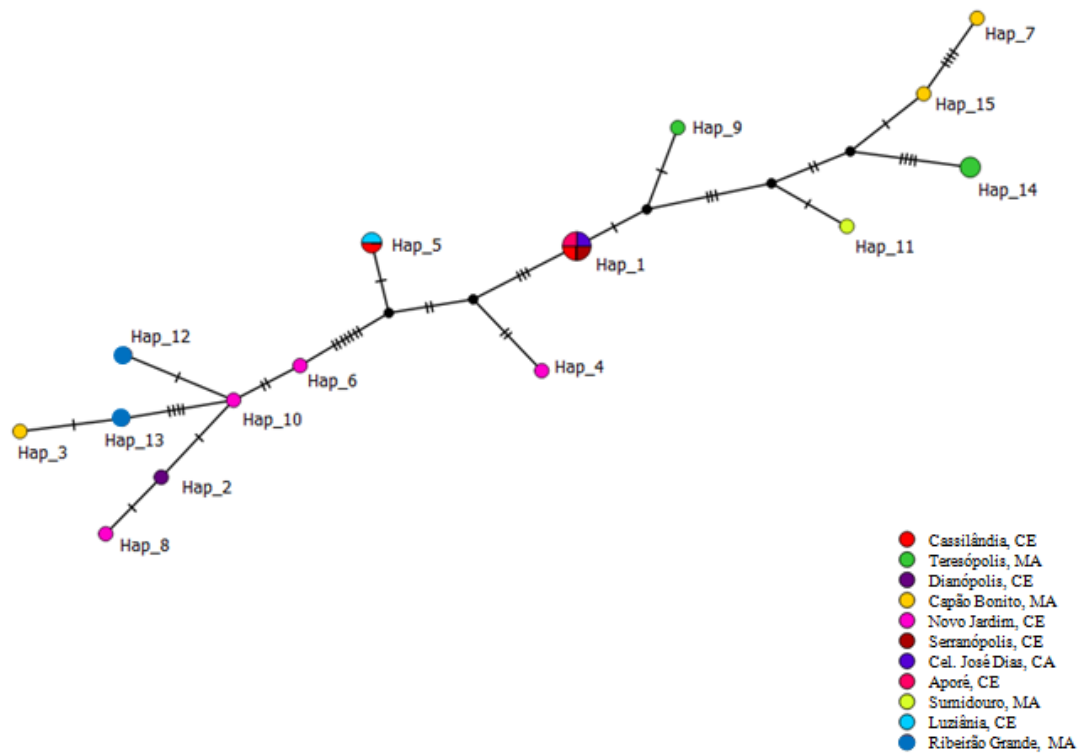


Figura 20. *Median-joining network* dos haplótipos do gene *gltA* de *Bartonellasp.* detectados em roedores amostrados em diferentes locais do Brasil. MA: Mata Atlântica; CE: Cerrado; CA: Caatinga.

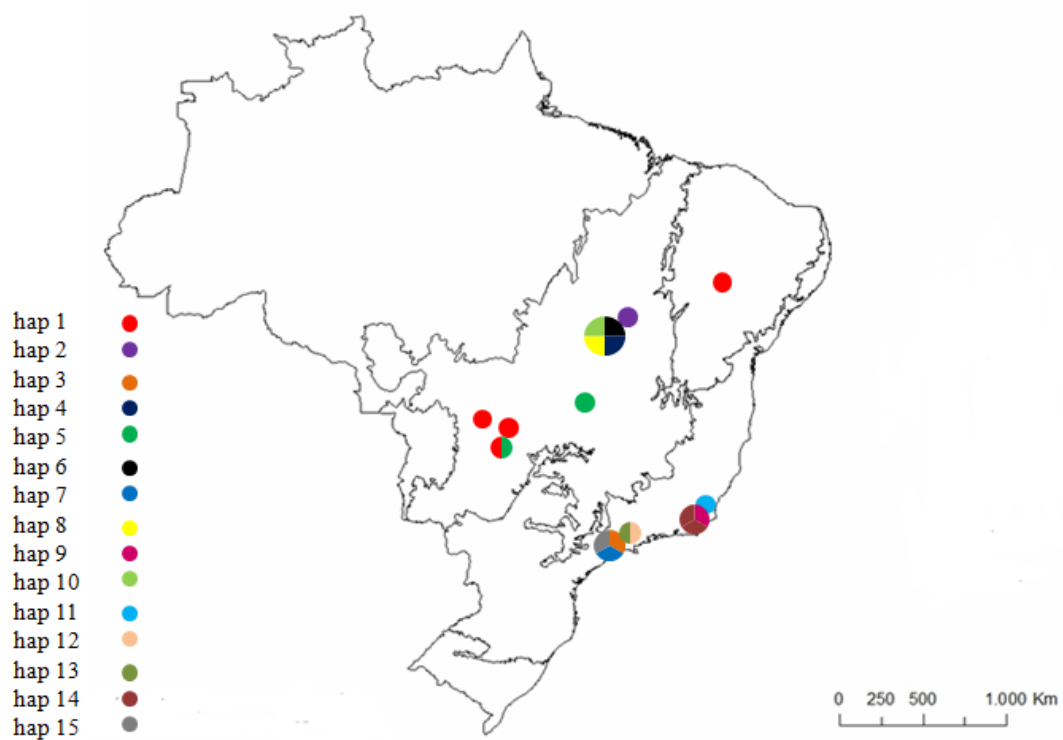


Figura 21. Distribuição dos haplótipos de *Bartonella* detectados em roedores amostrados nos diferentes biomas brasileiros.

Tabela 7. Polimorfismo e diversidade genética de *Bartonella* sp. detectada em roedores silvestres no Brasil.

Gene	pb	N	SV	h	GC (%)	dh (média ±DP)	π (média ±DP)	K
<i>gltA</i>	333	20	26	15	35,0	0,958± 0,033	0,024± 0,001	8,189
<i>ftsZ</i>	551	15	56	15	47,2	1,000± 0,024	0,037± 0,003	20,047
<i>groEL</i>	750	4	33	4	41,7	1,000± 0,117	0,027± 0,006	20,000
<i>pap-31</i>	546	4	5	4	40,7	1,000± 0,117	0,005± 0,001	2,500

N, número de sequências analisadas; SV, número de sítios variáveis; h, número de haplótipos; GC, conteúdo de G+C; dh, diversidade de haplótipos; DP, desvio padrão; π , diversidade de nucleotídeos (por sítio = PI); K, número médio da diferença nucleotídica.

6. DISCUSSÃO

Recentemente, diversos estudos têm sugerido que *Mycoplasma* spp. e *Bartonella* spp. têm coevoluído com várias espécies de animais, incluindo os seres humanos. Adicionalmente, tais estudos vêm ressaltando o papel dos animais selvagens na manutenção de diferentes patógenos na natureza e na emergência e/ou reemergência de algumas zoonoses. Entretanto, pouco se sabe a respeito da epidemiologia dos patógenos dos gêneros *Mycoplasma* e *Bartonella* que parasitam roedores no Brasil. Uma vez que os roedores podem servir como reservatórios para esses agentes, a identificação desses animais selvagens poderia auxiliar na adoção de medidas de caráter preventivo a fim de reduzir a exposição do homem e outros animais a esses agentes.

O presente estudo demonstrou a ocorrência de hemoparasitas (*Mycoplasma* e *Bartonella*) em roedores silvestres e sinantrópicos capturados em cinco biomas brasileiros.

No que diz respeito à ocorrência de hemoplasmas, 21,9% dos roedores amostrados foram positivos para *Mycoplasma* spp. A porcentagem de animais positivos no presente estudo foi inferior àquela reportada em capivaras ([64%] 20/31) amostradas no Santuário Bela Vista, Foz do Iguaçu, Paraná (VIEIRA et al., 2009) e em roedores da espécie *R. norvegicus* ([63,5%] 40/60) capturados no zoológico de Curitiba, Paraná (CONRADO et al., 2015). O menor número de locais analisados, aliado ao baixo número de roedores amostrados nos estudos supracitados – destacando a distribuição agregada das enfermidades parasitárias – comparados com a do presente estudo, onde os 457 roedores foram amostrados em cinco diferentes biomas, com características climáticas e ambientais diversas, pode ter influenciado o número de animais positivos encontrado.

A ausência de uma maior identidade (85-96%) entre as sequências amplificadas em amostras de roedores silvestres no presente estudo e aquelas previamente depositadas no Genbank destaca a existência de um alto grau de diversidade genética entre os hemoplasmas infectando os roedores silvestres. No geral, a análise filogenética baseada no gene 16S do rRNA realizada no presente estudo mostrou a presença de dez diferentes clusters, sugerindo a possibilidade de novas espécies de *Mycoplasma* parasitando roedores no Brasil.

Um recente estudo sugeriu que a distinção de *M. haemomuris* em dois subgrupos ('*Candidatus M. haemomuris* subsp. *musculi*' detectado em roedores silvestres e '*Candidatus M. haemomuris* subsp. *ratti*' detectado em roedores sinantrópicos) seja função da diferença entre as espécies de hospedeiros, ao invés da localização geográfica onde os animais foram amostrados (HARASAWA et al., 2015). Entretanto, nosso estudo verificou que a maioria dos clusters consistiu de sequências amplificadas em roedores capturados em um específico bioma, com exceção dos clusters 1 e 9. Além disso, é importante enfatizar que existe uma grande sobreposição na distribuição do hábitat de muitos dos roedores positivos para *Mycoplasma* spp. detectados no presente estudo (BONVICINO et al., 2008) e, conseqüentemente, um mesmo genótipo poderia circular em diferentes espécies de roedores coexistindo em um certo bioma.

Interessantemente, as sequências de micoplasmas hemotróficos detectadas em roedores silvestres no presente estudo mostraram-se filogeneticamente distantes dos outros hemoplasmas murinos (*M. coccoides*, '*Candidatus M. haemomuris* subsp. *musculi*' e '*Candidatus M. haemomuris* subsp. *ratti*'). Considerando o fato que os roedores sinantrópicos (*R. rattus*, *R. norvegicus* e *M. musculus*) possuem origem asiática e foram introduzidos no Brasil apenas há aproximadamente 500 anos atrás, nós levantamos a hipótese que as espécies de hemoplasmas detectadas em roedores sinantrópicos foram introduzidas no Brasil juntamente com seus hospedeiros durante a colonização européia (GONÇALVES et al., 2015). Adicionalmente, nossos resultados sugerem que essas espécies de hemoplasmas sejam restritas aos roedores sinantrópicos ou possuem uma baixa ocorrência entre os roedores silvestres no Brasil. Tal hipótese pode ser suportada pela biologia dessas espécies de roedores no meio ambiente. Embora *R. rattus* e *M. musculus* tenham sido reportados em todos os estados brasileiros, tais espécies são geralmente encontradas próximas à habitações humanas (BONVICINO et al., 2008). Por outro lado, o ambiente natural onde os roedores silvestres são encontrados compreende bosques, veredas, florestas, campos, savanas e outras áreas menos antropizadas (BONVICINO et al., 2008). Esse fato poderia reduzir o contato e o intercâmbio de patógenos entre roedores sinantrópicos e silvestres. Fato esse que promoveria uma baixa ocorrência dessas espécies de

hemoplasmas de roedores sinantrópicos entre os roedores silvestres. Além disso, todas as sequências de DNA amplificadas em *R. rattus* no presente estudo agruparam-se com *Mycoplasma* spp. previamente detectadas em roedores sinantrópicos (clusters 7 e 9). Entretanto, futuros estudos amostrando um maior número de roedores sinantrópicos são necessários para corroborar essa hipótese. Por outro lado, Conrado et al. (2015) detectaram genótipo de *Mycoplasma* sp. (KM203857) em roedores da espécie *R. norvegicus* filogeneticamente próximo à *Mycoplasma* sp. (KJ739311 e KC863983, compartilhando 99% e 98% de identidade, respectivamente) detectados em *R. norvegicus* e *Micromys minutus*, respectivamente, amostrados na Hungria (HORNOK et al., 2015). Tais achados revelam que genótipos filogeneticamente relacionados podem circular entre roedores silvestres e sinantrópicos.

Diferentemente de estudos prévios, o presente trabalho analisou a maioria das sequências de *Mycoplasma* sp. detectadas em roedores silvestres e/ou sinantrópicos amostrados no Brasil (VIEIRA et al., 2009; CONRADO et al., 2015), Japão (RIKIHISA et al., 1997; SASHIDA et al., 2013; HARASAWA et al., 2015) e Hungria (HORNOK et al., 2014). O resultado dessa análise mostrou uma grande heterogeneidade entre os hemoplasmas parasitando esse grupo de hospedeiros. Embora estudos tenham sugerido que hemoplasmas coevoluíram com várias espécies de animais (SYKES, 2010; MAGGI et al., 2013a; HORNOK et al., 2014), pouco é conhecido sobre a origem, evolução e dispersão dos micoplasmas hemotróficos. De acordo com nossos resultados, levantamos a hipótese de que as espécies de *Mycoplasma* detectadas em roedores silvestres no presente estudo já existiam antes da introdução dos roedores sinantrópicos e seus respectivos hemoplasmas durante a colonização (GONÇALVES et al., 2015). Entretanto, futuros estudos usando uma abordagem filogeográfica, por exemplo, são necessários para corroborar tal hipótese.

Embora a competência vetorial de *P. serrata* e *P. spinulosa* em transmitir *M. coccoides* tenha sido confirmada (ELIOT, 1936; BERKENKAMP e WESCOTT, 1988), a ampla e complexa diversidade de micoplasmas hemotróficos infectando diferentes espécies de roedores revelada pelo nosso estudo, associada ao fato do DNA de *Mycoplasma* spp. ter sido detectado em pulgas (*Synosternus cleopatrae*) coletadas de roedores silvestres

(*Gerbillus andersoni*) (COHEN et al., 2015), destaca a necessidade de futuros estudos para avaliar o papel de outros artrópodes vetores (pulgas, carrapatos, e ácaros) na transmissão desses patógenos entre roedores e outros animais.

Como provável resultado da coevolução entre *Bartonella* spp. e roedores, tais hospedeiros desenvolvem uma longa e subclínica bacteremia associada a uma alta diversidade de genótipos de *Bartonella* (CHOMEL et al., 2009; LEI e OLIVAL, 2014; GUTIÉRREZ et al., 2015). Embora a diversidade genotípica desse grupo de bactérias tenha sido bem documentada (BUFFET et al., 2013b; HALLIDAY et al., 2015), essa alta diversidade tem proporcionado um grande desafio no estabelecimento taxonômico desse grupo de bactérias quando antigos critérios, tais como hibridização DNA-DNA, comparação de sequências do gene 16S rRNA e características fenotípicas, são usados para descrever espécies de *Bartonella*.

A ocorrência de *Bartonella* spp. entre os roedores amostrados em nosso estudo (25,6% [117/457]) foi menor que aquela recentemente reportada em roedores silvestres amostrados no Pantanal (42,9% [18/42]) (FAVACHO et al., 2015). Por outro lado, foi maior que aquela encontrada entre roedores sinantrópicos (19,2% [5/26]) capturados em Salvador, Bahia. (COSTA et al., 2014). Da mesma forma que anteriormente mencionado para a ocorrência de hemoplasmas, a amostragem dos roedores em cinco diferentes biomas, com características peculiares, pode ter influenciado o número de animais positivos para *Bartonella* spp. encontrado no presente estudo.

Entre todas as sequências do gene *gltA* amplificadas no presente estudo, a diferença na constituição de nucleotídeos foi de 3,6%, sugerindo que todas as sequências detectadas pertencem a mesma espécie de *Bartonella*, de acordo com os critérios previamente estabelecidos por La Scola et al. (2003). No trabalho intitulado: “*Gene-sequence-based criteria for species definition in bacteriology: the Bartonella paradigm*”, os autores estabeleceram um ponto de corte (*cut-off*) para a definição de espécies de *Bartonella* com base na similaridade das sequências pertencentes aos genes 16S rDNA, *gltA*, *groEL*, *rpoB*, *ftsZ*, *ribC* e da região ITS. Dentre os resultados obtidos, as regiões gênicas foram classificadas de acordo com o seu poder discriminatório, sendo os genes *gltA* e *rpoB* eleitos como os mais adequados para distinguir as 17 espécies de *Bartonella* analisadas (LA SCOLA et al., 2003).

As análises filogenéticas das sequências dos genes *ftsZ*, *groEL* e *pap-31* mostraram uma evidente separação entre as sequências amplificadas em nosso estudo e aquelas pertencentes às espécies de *Bartonella* previamente descritas e depositadas no Genbank, corroborando com os resultados obtidos pelo BLAST. Entretanto, as sequências do gene *gltA* posicionaram-se próximas às sequências de *Bartonella* sp. denominadas como grupo filogenético A e *strain* R-phy1, ambas detectadas em roedores da família Cricetidae amostrados nos EUA e Peru, e em pulgas parasitando alguns desses roedores na América do Norte.

Tais achados levantam uma interessante questão sobre a relação filogenética entre essas sequências. Seriam todas as sequências detectadas em roedores pertencentes à família Cricetidae na América do Norte (grupo filogenético A), Peru (*strain* R-phy1) e agora no Brasil (além de um roedor da espécie *Thrichomys laurentius*, pertencente à Família Echimyidae) representantes de uma única espécie de *Bartonella*? De acordo com os critérios estabelecidos por La Scola et al. (2003), sim. A fim de resolver esse problema, a terminologia “complexo de espécies” proposta por Kosoy et al. (2012) também poderia ser utilizada. Nesse estudo, os autores ressaltam que características biológicas e ecológicas associadas a uma abordagem molecular poderiam levar a formação de complexos de espécies, os quais poderiam ser formados por uma única espécie filogeneticamente distinta (complexo *B. bacilliformis*), por diferentes espécies, porém que compartilham características biológicas ou ecológicas (complexo *B. elizabethae*, formado por *B. rattimassillensis*, *B. tribocorum* e *B. queenslandensis*, as quais têm como principais reservatórios os roedores do gênero *Rattus*) ou genótipos similares que formam ecótipos (ex: complexo *B. vinsonii*, formado por três subespécies: *B. vinsonii* subsp. *arupensis*, *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* e *B. vinsonii* subsp. *vinsonii*) (KOSOY et al., 2012).

Em nosso estudo, a mesma espécie de *Bartonella* foi detectada em diferentes espécies de roedores capturados em distintos e distantes biomas, mostrando uma provável dominância dessa espécie. Entretanto, é importante enfatizar que há uma grande sobreposição na área de distribuição de muitas das espécies de roedores positivos para *Bartonella* sp. (BONVICINO et al., 2008). Consequentemente, um mesmo genótipo poderia circular em diferentes

espécies habitando locais distintos, assim como anteriormente descrito para os hemoplasmas. Adicionalmente, o número de espécies de *Bartonella* circulando em roedores silvestres no Brasil é provavelmente maior, como previamente demonstrado por Favacho et al. (2015) em roedores capturados no Pantanal.

Embora tenha sido relatado que o grupo filogenético A parasite apenas uma espécie de roedor (*Sigmodon hispidus*) ou espécie filogeneticamente próxima (*Oryzomys palustris*) (KOSOY et al., 1997; 2000), nossos resultados demonstraram que a espécie de *Bartonella* detectada em roedores silvestres no Brasil está amplamente distribuída entre inúmeras espécies de hospedeiros (n=7), destacando um provável evento de *spillover* nas espécies de roedores analisadas. Nossos resultados são semelhantes àqueles reportados em roedores no Reino Unido (BIRTLES et al., 1994), onde uma mesma espécie de *Bartonella* foi detectada em cinco diferentes espécies de roedores (*Apodemus sylvaticus*, *A. flavicollis*, *Clethrionomys glareolus*, *Microtus agrestis* e *Neomys fodiens*). A razão para esse cenário distinto pode estar relacionado aos chamados fatores de virulência, que limitam ou capacitam uma bactéria “pular” de um hospedeiro para o outro (BERGLUND et al., 2009).

A diversidade de haplótipos é controlada por diferentes processos, incluindo, mas não restrito a mutação, recombinação e demografia (STUMPF, 2004). A análise de haplótipos (gene *gltA*) realizada no presente estudo sugere que a diversidade genética de *Bartonella* sp. detectada em roedores silvestres no Brasil é semelhante aquela reportada em *B. grahamii* (uma espécie de *Bartonella* com alta diversidade genética) quando comparou-se 36 sequências pertencentes ao gene *gltA* dessa mesma espécie de *Bartonella* detectada em roedores amostrados na Ásia ($\pi = 0,021$; $dh = 0,943$) e América do Norte e Europa ($\pi = 0,014$; $dh = 0,889$) (LI et al., 2015). Entretanto, foi inferior aquela demonstrada em roedores da espécie *Myodes glareolus* ($\pi = 0,077$) amostrados em Paris, França (BUFFET et al 2013b). Adicionalmente, a diversidade nucleotídica revelada em nosso estudo foi superior aquela detectada em roedores pertencentes às espécies *Myodes rutilus*, *Microtus fortis* e *Apodemus agrarius* ($\pi = 0,012$; $dh = 0,700$) amostrados na China (LI et al., 2015). Tais achados destacam que mesmo dentro de uma mesma espécie e gene (*B. grahamii* e *gltA*, respectivamente), diferentes taxas de mutações,

recombinações e características demográficas específicas, poderiam promover diversidade de haplótipos distinta.

Embora o genótipo de *Bartonella* pertencente ao grupo filogenético A não tenha causado enfermidade clínica em roedores (*S. hispidus*) experimentalmente infectados (KOSOY et al., 1999), o potencial zoonótico dessa espécie ainda é desconhecido. Considerando a crescente destruição de habitat naturais associada à intensa atividade humana em áreas de florestas e a presença de roedores em áreas peridomiciliares, roedores selvagens e seres humanos podem compartilhar os mesmos artrópodes vetores e patógenos. Sendo assim, uma abordagem multidisciplinar, ou seja, “*One Health*”, é necessária para elucidar a ecologia dos vetores e a dinâmica de transmissão desses patógenos detectados em roedores selvagens no Brasil e o seu possível papel como agentes etiológicos em infecções humanas.

A maioria das infecções humanas por espécies de *Bartonella* spp. detectadas no Brasil são causadas por *B. henselae* e *B. quintana* (MAGALHÃES et al., 2010; FAVACHO et al., 2010; PITASSI et al., 2015; SICILIANO et al., 2015). Embora *Bartonella* spp. associada a roedores ainda não tenha sido detectada em humanos no Brasil, o alto número de espécies de *Bartonella* adaptadas a esses hospedeiros associado ao fato dos roedores compreenderem a maior Ordem de mamíferos (Rodentia) (WILSON e REEDER, 2005), enfatizamos a necessidade de futuros estudos avaliando o potencial de tais espécies de *Bartonella* em infecções humanas no Brasil. Nesse sentido, roedores sinantrópicos, principalmente aqueles do gênero *Rattus*, seriam importantes alvos em estudos futuros devido a sua ampla distribuição e proximidade com os seres humanos. Além disso, quatro das oito espécies de *Bartonella* associadas a roedores que infectam ser humanos foram detectadas em roedores pertencentes ao gênero *Rattus* (revisado por BUFFET et al., 2013a).

No presente estudo, 9% (41/457) dos roedores amostrados mostraram copositividade para *Mycoplasma* spp. e *Bartonella* sp. Coinfecção por hemoplasmas e bartonela têm sido reportada em seres humanos no Brasil e EUA (DOS SANTOS et al., 2008; SYKES, 2010; MAGGI et al., 2013a), entre gatos domésticos no Canadá e Brasil (KAMRANI et al., 2008; DE BORTOLI et al., 2012; MICELI et al., 2013; ANDRÉ et al., 2014) e em roedores em Israel

(COHEN et al., 2015). Adicionalmente, Cohen et al. (2015) detectaram DNA de *Mycoplasma* sp. e *Bartonella* sp. em pulgas da espécie *S. cleopatrae*. Uma vez que é bem estabelecido que pulgas atuam como os principais vetores de *Bartonella* spp. entre os roedores (MORICK et al., 2013b; GUTIÉRREZ et al., 2015), e aliado ao fato de que Cohen et al. (2015) detectaram - assim como em nosso estudo - coinfeção por hemoplasmas e *Bartonella* em roedores, consideramos a hipótese de que um mesmo artrópode vetor possa estar transmitindo tais hemoparasitas para esses hospedeiros. Sendo assim, futuros estudos objetivando a identificação, distribuição e avaliação da capacidade vetorial desses artrópodes são necessários a fim de se adotar medidas de prevenção da transmissão desses agentes entre animais e possivelmente para seres humanos, assim como o mapeamento de áreas de ocorrência e de risco de infecção por tais agentes.

Embora os resultados do nosso estudo tenham revelado diferença na ocorrência de micoplasma e bartonela em roedores amostrados nos diferentes biomas brasileiros, tais resultados devem ser analisados com ressalva, uma vez que no presente estudo não foi realizado o cálculo amostral. Sendo assim, o número de animais amostrados nos diferentes biomas pode não refletir o tamanho real da população de roedores e, por consequência, atribuir a diferença no número de indivíduos positivos para esses dois hemoparasitas às características ambientais onde os animais foram capturados poderia gerar imprecisão. Por fim, outros estudos que contemplem uma abordagem ecológica, de posse das informações previamente disponibilizadas pelo presente estudo, devem ser conduzidos a fim de confrontar o número de indivíduos positivos para esses e outros hemoparasitas com diferentes características. Por exemplo, o local de amostragem, a estação do ano, a espécie de hospedeiro, a idade, o sexo, a condição corporal, a interação com outros patógenos, o comportamento social dos hospedeiros, a densidade de ectoparasitas, etc. Tais estudos contribuirão para uma melhor caracterização da área e dos fatores que regem a distribuição desses hemoparasitas em nosso território.

7. CONCLUSÕES

- *Mycoplasma* spp. e *Bartonella* circulam em roedores sinantrópicos e silvestres amostrados em cinco biomas no Brasil;
- A análise filogenética das sequências do 16S rRNA, suportada pela baixa identidade pelo BLAST, demonstrou a circulação de novos genótipos/espécies de micoplasmas hemotróficos em roedores silvestres no Brasil;
- A espécie de *Bartonella* detectada no presente estudo não é espécie-específica, e sim, amplamente distribuída em diferentes espécies de roedores e regiões geográficas do Brasil;
- Os genótipos de *Bartonella* detectados em roedores silvestres no Brasil foram filogeneticamente próximos a outros previamente detectados em roedores da família Cricetidae nas Américas, provavelmente, formando uma única espécie, ou um complexo de espécies.

8. REFERÊNCIAS

- ABBOT, P.; AVILES, A. E.; ELLER, L.; DURDEN, L. A. Mixed infections, cryptic diversity, and vector-borne pathogens: Evidence from *Polygenis* fleas and *Bartonella* species. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, n. 19, p. 6045-6052, 2007.
- ANDRÉ, M. R.; BACCARIM, N. C. D.; de SOUSA, K. C. M.; GONÇALVES, L. R.; HENRIQUE, P. C.; ONTIVERO, C. R. G. R.; GONZALEZ, I. H. L.; NERY, C. V. C.; CHAGAS, C. R. F.; MONTICELLI, C.; de SANTIS, A. C. A.; MACHADO, R. Z. Arthropod-borne pathogens circulating in free-roaming domestic cats in a zoo environment in Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 5, n. 5, p. 545-551, 2014.
- ANDRÉ, M. R.; DUMLER, J. S.; HERRERA, H. M.; GONÇALVES, L. R.; DE SOUSA, K. C. M.; 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 PCR using the NADH dehydrogenase gamma subunit (*nuoG*) for *Bartonella* species in domiciled and stray cats in Brazil. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, 2015.
- BAI, Y.; KOSOY, M. Y.; CULLY, J. F.; BALA, T.; RAY, C.; COLLINGE, S. K. Acquisition of nonspecific *Bartonella* strains by the northern grasshopper mouse (*Onychomys leucogaster*). **FEMS Microbiology and Ecology**, Amsterdam, v. 61, n. 3, p. 438-448, 2007.
- BAI, Y.; KOSOY, M. Y.; RAY, C.; BRINKERHOFF, R. J.; COLLINGE, S. K. Temporal and spatial patterns of *Bartonella* infection in black-tailed prairie dogs (*Cynomys ludovicianus*). **Microbial Ecology**, New York, v. 52, n. 2, p. 373-382, 2008.
- BAI, Y.; CALISHER, C. H.; KOSOY, Y. M.; ROOT, J. J.; DOTY, J. B. Persistent infection or successive reinfection of deer mice with *Bartonella vinsonii* subsp. *arupensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 77, n. 5, p. 1728-1731, 2011.
- BAKER, J. A. A Rickettsial infection in Canadian voles. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 84, n. 1, p. 37-50, 1946.
- BANDELT, H.; FORSTER, P.; RÖHL, A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**, v. 16, n. 1, p. 37-48, 1999.
- BERGLUND E. C.; FRANK, A. C.; CALTEAU, A.; VINNERE, P. O.; GRANBERG, F.; ERIKSSON, A. S.; NASLUND, K.; HOLMBERG, M.; LINDROOS, H.; ANDERSSON, S. G. Run-off replication of host-adaptability genes is associated with gene transfer agents in the genome of mouse-infecting *Bartonella grahamii*. **PLOS Genetics**, San Francisco, v. 5, n. 7, pe1000546, 2009.

BERGLUND, E. C.; ELLEGAARD, K.; GRANBERG, F.; XIE, Z.; MARUYAMA, S.; KOSOY, M. Y.; BIRTLES, R. J.; ANDERSSON, S. G. E. Rapid diversification by recombination in *Bartonella grahamii* from wild rodents in Asia contrasts with low levels of genomic divergence in Northern Europe and America. **Molecular Ecology**, Malden, v. 19, n. 11, p. 2241-2255, 2010.

BERKENKAMP, S. D.; WESCOTT, R. B. Arthropod transmission of *Eperythrozoon coccoides* in mice. **Laboratory animal science**, Mênfis, v. 38, n. 4, p. 398-401, 1988.

BERMOND, D.; HELLER, R.; BARRAT, F.; DELACOUR, G.; DEHIO, C.; ALLIOT, A.; MONTEIL, H.; CHOMEL, B.; BOULOUIS, H. J.; PIÉMONT, Y. *Bartonella birtlesii* sp. nov., isolated from small mammals (*Apodemus* spp.). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 50, n. 6, p. 1973-1979, 2000.

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**, Oxford, v.22, n. p. 2008.

BILLETER SA, GUNDI VA, ROOD MP, KOSOY MY. Molecular detection and identification of *Bartonella* species in *Xenopsylla cheopis* fleas (Siphonaptera: Pulicidae) collected from *Rattus norvegicus* rats in Los Angeles, California. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 77, n. 21, p. 7850-7852, 2011.

BIONDO, A. W.; DOS SANTOS, A. P.; GUIMARÃES, A. M. S.; VIEIRA, R. F. C.; VIDOTTO, O.; MACIEIRA, D. B.; ALMOSNY, N. R. P.; MOLENTO, M. B.; TIMENETSKY, J.; DE MORAIS, H. A.; GONZÁLEZ, F. H. D.; MESSICK, J. B. A review of the occurrence of hemoplasmas (hemotrophic mycoplasmas) in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v.18, n. 3, p. 1-7, 2009.

BIRKENHEUER, A.J.; BREITSCHWERDT, E.B.; ALLEMAN, A.R.; PITULLE, C. Differentiation of *Haemobartonella canis* and *Mycoplasma haemofelis* on the basis of comparative analysis of gene sequences. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 63, n. 10, p. 1385-1388, 2002.

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**, Washington, v. 41, n. 9, p. 4172-4177, 2003.

BIRTLES, R. J.; HARRISON, T. G.; FRY, N. K.; SAUNDERS, N. A.; TAYLOR, A. G. Taxonomic considerations of *Bartonella bacilliformis* based on phylogenetic and phenotypic characteristics. **FEMS Microbiology Letters**, v. 67, n. 2, p. 187-191. 1991.

BIRTLES, R. J.; HARRISON, T. G.; MOLYNEUX, D. H. *Grahamella* in small woodland mammals in the U.K.: isolation prevalence and host specificity. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, v. 88, n. 3. p.317-327, 1994.

BIRTLES, R. J.; HARRISON T. G.; SAUNDERS, N. A.; MOLYNEUX, D. H. Proposals to unify the genera *Grahamella* and *Bartonella*, with descriptions of *Bartonella talpae* comb. nov., *Bartonella peromysci* comb. nov., and three new species, *Bartonella grahamii* sp. nov., *Bartonella taylorii* sp. nov., and *Bartonella doshiae* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, London, v. 45, n.1, p.1-8, 1995.

BIRTLES, R. J.; RAOULT, D. Comparison of partial citrate synthase gene (*gltA*) sequences for phylogenetic analysis of *Bartonella* species. **International Journal of Systematic Bacteriology**, London, v. 46, n. 4, p. 891-897. 1996.

BONVICINO, C. R.; OLIVEIRA, J. A.; D'ANDREA, P. S. Guia dos Roedores do Brasil com chaves para gêneros baseadas em caracteres externos, Centro Pan-Americano de Febre Aftosa–OPAS/OMS, Rio de Janeiro, 2008.

BOULUIS, H. J.; BARRAT, F.; BERMOND, D.; BERNEX, F.; THIBAUT, D.; HELLER, R.; FONTAINE, J-J.; PIÉMONT, Y.; CHOMEL, B. B. Kinetics of *Bartonella birtlesii* infection in experimentally infected mice and pathogenic effect on reproductive functions. **Infection and Immunity**, Washington, v. 69, n. 9, p. 5313-5317, 2001.

BOWN, K. J.; BENNET, M.; BEGON, M.; Flea-borne *Bartonella grahamii* and *Bartonella taylorii* in bank voles. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v.10, n. 4, p. 684-687, 2004.

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**, San Antonio, v. 20, n. 1, p. 8-30, 2010a.

BREITSCHWERDT, E. B.; MAGGI, R. G.; MOZAYENI, B. R.; HEGARTY, B. C.; BRADLEY, J. M.; MASCARELLI, P. E. PCR amplification of *Bartonella koehlerae* from human blood and enrichment blood cultures **Parasites & Vectors**, London, v. 3, n. 76, 2010b.

BREITSCHWERDT, E. B. Bartonellosis: One Health perspectives for an emerging infectious disease. **ILAR Journal**, Washington, v. 55, n. 1 p. 46-58, 2014.

BRENNER, D. J.; O'CONNOR, S. P.; WINKLER, H. H.; STEIGERWALT, A.G. Proposals to unify the genera *Bartonella* and *Rochalimaea*, with descriptions of *Bartonella quintana* comb. nov., *Bartonella vinsonii* comb. nov., *Bartonella henselae* comb. nov., and *Bartonella elizabethae* comb. nov., and to remove the family Bartonellaceae from the order Rickettsiales. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 43, n. 4, p. 777-786, 1993.

BRINKERHOFF, R. J.; KABEYA, H.; INOUE, K.; BAI, Y.; MARUYAMA, S. Detection of multiple *Bartonella* species in digestive and reproductive tissues of fleas collected from sympatric mammals. **The ISME Journal**, London, v. 4, n. 7, p. 955-958, 2010.

BUFFET, J. P.; MARSOT, M.; VAUMOURIN, E.; GASQUI, P.; MASSÉGLIA, S.; MARCHETEAU, E.; HUET, D.; CHAPUIS, J. L.; PISANU, B.; FERQUEL, E.; HALOS, L.; VOUREH, G.; VAYSSIER-TAUSSAT, M. Co-infection of *Borrelia afzelii* and *Bartonella* spp. in bank voles from a suburban forest. **Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases**. Oxford, v. 35, n. 6, p. 583-589, 2012.

BUFFET, J-P.; KOSOY, Y. M.; VAYSSIER-TAUSSAT, M. Natural history of *Bartonella*-infecting rodents in light of new knowledge on genomics, diversity and evolution. Review. **Future Microbiology**, Londres, v. 8, n. 9, p. 1117-1128, 2013a.

BUFFET, J-P.; PISANU, B.; BRISSE, S.; ROUSSEL, S.; FÉLIX, B.; HALOS, L.; CHAPUIS, J-L.; VAYSSIER-TAUSSAT, M. Deciphering *Bartonella* Diversity, Recombination, and Host Specificity in a Rodent Community. **PLOS One**, California, v. 8, n. 7, p. e68956, 2013b.

CASCALES, E.; CHRISTIE, P. J. The versatile bacterial type IV secretion systems. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 1, n. 2, p. 137-149, 2003.

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.; BREITSCHWERDT, E. B.; KASTEN, R. W.; VAYSSIER-TAUSSAT, M.; BIRTLES, R. J.; KOEHLER, J. E.; DEHIO, C. Ecological fitness and strategies of adaptation of *Bartonella* species to their hosts and vectors. **Veterinary Research**, Chicago, v. 40, n. 2, 2009.

CHOMEL, B. B.; KASTEN, R. W. Bartonellosis, an increasingly recognized zoonosis. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 109, n. 3, p. 743-750, 2010.

CHOMEL, B. B. Lack of transovarial transmission of *Bartonella* by rodent fleas. **Molecular Ecology**, Malden, v. 20, n. 13, p. 2660-2661, 2011.

COHEN, C.; TOH, E.; MUNRO, D.; DONG, Q.; HAWLENA, H. Similarities and seasonal variations in bacterial communities from the blood of rodents and their flea vectors. **The ISME journal**, London, v. 9, n. 7, p. 1662-1676, 2015.

COLTON, L.; ZEIDNER, N.; KOSOY, M. Y. Experimental infection of Swiss webster mice with four rat bartonella strains: Host specificity, bacteremia kinetics, dose dependent response, and histopathology. **Comparative**

Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, Oxford, v. 34, n. 6, p. 465-473.

CONRADO, F. O.; NASCIMENTO, N. C.; DOS SANTOS, A. P.; ZIMPEL, C. K.; MESSICK, J. B.; BIONDO, A. W. Occurrence and identification of hemotropic mycoplasmas (Hemoplasmas) in free ranging and laboratory rats (*Rattus norvegicus*) from two Brazilian zoos. **BMC Veterinary Research**, v. 11, n. 286, p. 1-10, 2015.

COSTA, F.; PORTER, F. H.; RODRIGUES, G.; FARIAS, H.; DE FARIA, M. T.; WUNDER, E. A.; OSIKOWICZ, L. M.; KOSOY, M. Y.; REIS, M. G.; CHILDS, J. E. Infections by *Leptospira interrogans*, Seoul Virus, and *Bartonella* spp. Among Norway Rats (*Rattus norvegicus*) from the Urban Slum Environment in Brazil. **Vector-borne and Zoonotic Diseases**, Larchmont, v. 14, n. 1, p. 33-40, 2014.

COTTÉ, V.; BONNET, V.; Le RHUN, D.; Le NAOUR, E.; CHAUVIN, A.; BOULOUIS, H. J.; LECUELLE, B.; LILIN, T.; VAYSSIER-TAUSSAT, M. Transmission of *Bartonella henselae* by *Ixodes ricinus*. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v.14, n. 7, p. 1074–1080, 2008.

DALY, J. S.; WORTHINGTON, M. G.; BRENNER, D. J.; MOSS, C. H.; HOLLIS, D. G.; WEYANT, R. S.; STEIGERWALT, A. G.; WEAVER, R. E.; DANESHVAR, M. I.; O' CONNOR. *Rochalimaea elizabethae* sp. nov. isolated from a patient with endocarditis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 31, n.4, p. 872-881, 1993.

DE BORTOLI, C. P.; ANDRÉ, M. R.; SEKI, M. C.; PINTO, A. A.; MACGADO Sde. T.; MACHADO, R. Z. Detection of hemoplasma and *Bartonella* species and co-infection with retroviruses in cats subjected to a spaying/neutering program in Jaboticabal, SP, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 21, n. 3, p. 219-223, 2012.

DEHIO, C. *Bartonella* interactions with endothelial cells and erythrocytes. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 9, n. 6, p. 279-285, 2001.

DEHIO, C. Review: *Bartonella* host cell interactions and vascular tumour formation. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 3, n. 8, p. 621-631, 2005.

DIAZ, M. H.; BAI, Y.; MALANIA, L.; WINCHELL, J. M.; KOSOY, M. Y. Development of a Novel Genus-Specific Real-Time PCR Assay for Detection and Differentiation of *Bartonella* Species and Genotypes. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 50, n. 5, p. 1645-1649, 2012.

DINIZ, P.P.V.P.; MAGGI, R.G.; SCHWARTZ, D.S.; CADENAS, M.B.; BRADLEY, M.; HEGARTY, B.; BREITCHWERDT, E.B. Canine bartonellosis: serological and molecular prevalence in Brazil and evidence of co-infection with *Bartonella henselae* and *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii*. **Veterinary Research**, Chicago, v. 38, n. 5, p. 697-710, 2007.

DINIZ, P. P. V. P.; WOOD, M.; MAGGI, R. G.; SONTAKKE, S.; STEPNIK, M.; BREITSCHWERDT, E. B. Co-isolation of *Bartonella henselae* and *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* from blood, joint and subcutaneous seroma fluids from two naturally infected dogs. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 138, n. 3-4, p. 368-372, 2009.

DOLAN, M. J.; WONG, M. T.; REGNER, R. L.; JORGENSEN, J. H.; GARCIA, M.; PETERS, J.; DREHNER, D. Syndrome of *Rochalimaea henselae* adenitis suggesting cat scratch disease. **Annals of Internal Medicine**, Philadelphia, v. 118, n. 5, p. 331-336, 1993.

DOS SANTOS, A. P.; DOS SANTOS, R. P.; BIONDO, A. W.; DORA, J. M.; GOLDANI, L. Z.; DE OLIVEIRA, S. T.; GUIMARÃES, A. M. S.; TIMENETSKY, J.; DE MORAIS, H. A.; GONZÁLEZ, F. H. D.; MESSICK, J. B. Hemoplasma infection in HIV-positive patient, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 14, n. 12, p. 1922-1924, 2008.

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**, Amsterdam, v. 69, n. 2, p. 273-281, 2007.

EICHER, S. C.; DEHIO, C. *Bartonella* entry mechanisms into mammalian host cells. **Cellular Microbiology**, Oxford, v. 14, n. 8, p. 1166-1173, 2012.

ELIOT, C. P. The insect vector for the natural transmission of *Eperythrozoon coccoides* in mice. **Science**, New York, v. 84, n. 2183, p. 397, 1936.

EREMEEVA, M.E., GERNES, H.L., LYDY, S.L., GOO, J.S., RYAN, E.T., MATHEW, S.S., FERRARO, M.J., HOLDEN, J.M. NICHOLSON, W. L.; DASCH, G. A.; KOEHLER, J. E. Bacteremia, fever, and splenomegaly caused by a newly recognized *Bartonella* species. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 356, n. 23, p. 2381-2387, 2007.

FAVACHO, A. R.; ROGER, I.; AKEMI, A. K.; PESSOA, A. A.; VARON, A. G.; GOMES, R.; GODOY, D. T.; PEREIRA, S.; LEMOS, E. R. Molecular identification of *Bartonella henselae* in a seronegative cat scratch disease patient with AIDS in Rio de Janeiro, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 56, n. 4, p. 363-365, 2010.

FAVACHO, A. R. M.; ANDRADE, M. N.; OLIVEIRA, R. C.; BONVICINO, C. R.; D'ANDREA, P. S.; LEMOS E. R. S. Zoonotic *Bartonella* species in wild rodents in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Microbes and Infections**, Paris, v. 1, n. 11-12, p. 889-892, 2015.

FERRERA, E. C.; CONTIJO, C. M.; CRUZ, I.; MELO, M. N.; SILVA, A. M. Alternative PCR protocol using a single primer set for assessing DNA quality in several tissues from a large variety of mammalian species living in areas

endemic for leishmaniasis, **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 105, n. 7, p 895-898, 2010.

FOLEY, J.E.; HARRUS, S.; POLAND, A.; CHOMEL, B.; PEDERSEN, N.C. Molecular, clinical, and pathologic comparison of two distinct strains of *Haemobartonella felis* in domestic cats. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v.59, n.12, p.1581-1588, 1998.

GIL, H.; GARCÍA-ESTEBAN, C.; BARANDIKA, J. F.; PEIG, J.; TOLEDO, A.; ESCUDERO, R.; JADO, I.; RODRÍGUEZ-VARGAS, M.; GARCÍA-AMIL, C.; LOBO, B.; ROALES, P.; RODRÍGUEZ-MORENO, I.; OLMEDA, A. S.; GARCÍA-PÉREZ, A. L.; ANDA, P. Variability of *Bartonella* genotypes among small mammals in Spain. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 76, n. 24, p. 8062-8070, 2010.

GONÇALVES, L. R.; ROQUE, A. L. R.; MATOS, C. A.; FERNANDES, S. J.; OLMOS, I. D. F.; 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**, Oxford, v. 43, p. 50-56, 2015.

GUNDI, V. A.; DAVOUST, B.; KHAMIS, A.; BONI, M.; RAOULT, D.; La SCOLA, B. Isolation of *Bartonella rattimassiliensis* sp. nov. and *Bartonella phoceensis* sp. nov. from European *Rattus norvegicus*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.42, n. 8, p. 3816-3818, 2004.

GUNDI, V. A.; TAYLOR, C.; RAOULT, D.; La SCOLA, B. *Bartonella rattaaustraliani* sp. nov., *Bartonella queenslandensis* sp. nov. and *Bartonella coopersplainsensis* sp. nov., identified in Australian rats. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 59, n. 12, p. 2956-2961, 2009.

GUNDI, V. A. K. B.; BILLETER, S. A.; ROOD, M. P.; KOSOY, M. Y. *Bartonella* spp. in Rats and Zoonoses, Los Angeles, California, USA. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 18, n. 4, p. 631-633, 2012.

GUPTILL, L. Review: Bartonellosis. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 140, n. 3-4, p. 347-359, 2010.

GUTIÉRREZ, R.; KRASNOV, B.; MORRICK, D.; GOTTLIEB, Y.; KHOKHLOVA, I. S.; HARRUS, S. *Bartonella* infection in rodents and their flea ectoparasites: An Overview. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, Larchmont, v. 15, n. 1, p. 27-39, 2015.

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

HALLIDAY, J. E. B.; KNOBEL, D. L.; AGWANDA, B.; BAI, Y.; BREIMAN, E. F.; CLEAVELAND, S.; NJENGA, M. K.; KOSOY, M. Y. Prevalence and diversity of

small mammal-associated *Bartonella* species in rural and urban Kenya. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 9, n. 3, p. e0003608, 2015.

HARMS, A.; DEHIO, C. Intruders below the radar: Molecular pathogenesis of *Bartonella* spp. **Clinical Microbiology reviews**, Washington, v. 25, n. 1, p. 42-78, 2012.

HARASAWA, R.; FUJITA, H.; KADOSAKA, T.; ANDO, S.; RIKIHISA, Y. Proposal for '*Candidatus Mycoplasma haemomuris* subsp. *musculi*' in mice, and '*Candidatus Mycoplasma haemomuris* subsp. *ratti*' in rats. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 65, n. 2, p. 734-737, 2015.

HELLER, R.; RIEGEL, P.; HANSMANN, Y.; DELACOUR, G.; BERMOND, D.; DEHIO, C.; LAMARQUE, F.; MONTEIL, H.; CHOMEL, B. B.; PIÉMONT, Y. *Bartonella tribocorum* sp. nov., a new *Bartonella* species isolated from the blood of wild rats. **International Journal of Systematic Bacteriology**, London, v. 48, n. 4, p. 1333-1339, 1998.

HORNOK, S.; FOLDVÁRI, G.; ROGÓ, K.; MELI, M. L.; GONCZI, E.; RÉPÁSI, A.; FARKAS, R.; PAPP, I.; KONTSCHÁN, J.; HOFMMANN-LEHMANN, R. Synanthropic rodents and their ectoparasites as carriers of a novel haemoplasma and vector-borne, zoonotic pathogens indoors. **Parasites & Vectors**, London, v.8, n. 27, p. 1-6, 2015.

HUANG, D.; GUAN, P.; WU, W.; SHEN, T.; LIU, H.; CAO, S.; ZHOU, H. Infection rate of *Eperythrozoon* spp. in Chinese population: a systematic review and metaanalysis since the first Chinese case reported in 1991. **BMC Infectious Diseases**, v. 12, 2012.

INOUE, K.; MARUYAMA, S.; KABEYA, H.; YAMADA, N.; OHASHI, N.; SATO, Y.; YUKAWA, M.; MASUZAWA, T.; KAWAMORI, F.; KADOSAKA, T.; TAKADA, N.; FUJITA, H.; KAWABATA, H. Prevalence and genetic diversity of *Bartonella* species isolated from wild rodents in Japan. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 74, n. 16, p. 5086-5092, 2008.

INOUE, K.; KABEYA, H.; KOSOY, M. Y.; BAI, Y.; SMIRNOV, G.; MCCOLL, D.; ARTSOB, H.; MARUYAMA, S. Evolutional and geographical relationships of *Bartonella grahamii* isolates from wild rodents by multi-locus sequencing analysis. **Microbial Ecology**, New York, v. 57, n. 3, p. 534-541, 2009.

INOUE, K.; KABEYA, H.; SHIRATORI, H.; UEDA, K.; KOSOY, M. Y.; CHOMEL, B. B.; BOULOUIS, H. J.; MARUYAMA, S. *Bartonella japonica* sp. nov. and *Bartonella silvatica* sp. nov., isolated from *Apodemus mice*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 60, n. 4, p. 759-763, 2010.

JARDINE, C.; APPLEYARD, G.; KOSOY, M. Y.; MCCOLL, C.; CHIRINO-TREJO, M.; WOBESER, G.; LEIGHTON, F. A. Rodent-associated *Bartonella* in

Saskatchewan, Canada. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, Larchmont, v. 5, n. 4, p. 402-409, 2005.

KAISER, P. O.; RIESSA, T.; O' ROUERKE, F.; LINKEB, D.; KEMPF, V. A. J. *Bartonella* spp.: Throwing light on uncommon human infections. **International Journal of Medical Microbiology**, Jena, v. 301, n. 1, p. 7-15, 2010.

KAMRANI, A.; PARREIRA, V. R.; GREENWOOD, J.; PRESCOTT, J. F. The prevalence of *Bartonella*, hemoplasma, and *Rickettsia felis* infections in domestic cats and in cat fleas in Ontario. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 72, n. 5, p. 411-419, 2008.

KERKHOFF, F. T.; BERGMANS, A. M.; VAN DER ZEE, A.; ROTHOVA, A. Demonstration of *Bartonella grahamii* DNA in ocular fluids of a patient with neuroretinitis. **Journal Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, n. 12, p. 4034-4038, 1999.

KOSOY, M. Y.; REGNERY, R. S.; TZIANABOS T, MARSTON, E. L.; JONES, D. C.; GREEN, D.; MAUPIN, G. O.; OLSON, J. G.; CHILDS, J. E. Distribution, diversity, and host specificity of *Bartonella* in rodents from the southeastern United State. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Mclean, v. 57, n. 5, p. 578-588, 1997.

KOSOY, M. Y.; REGNERY, R. L.; KOSAYA, O. I.; JONES, D. C.; MARSTON, E. L.; CHILDS, J. E. Isolation of *Bartonella* spp. from embryos and neonates of naturally infected rodents. **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, v. 34, n. 2, p. 305-309, 1998.

KOSOY, M. Y.; REGNERY, R. L.; KOSAYA, O. I.; CHILDS, J. E. Experimental infections of cotton rats with three naturally occurring *Bartonella* species. **Journal of Wildlife Diseases**. Ames, v. 35, n. 2, p. 275-284, 1999.

KOSOY, M. Y.; SAITO, E. K.; GREEN, D.; MARSTON, E. L.; JONES, D. C.; CHILDS, J. E. Experimental evidence of host specificity of *Bartonella* infection in rodents. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, Oxford, v. 23, n. 4, p. 221-238, 2000.

KOSOY, M.; MURRAY, M.; GILMORE, R. D.; BAY, Y.; GAGE, K. L. *Bartonella* strains from ground squirrels are identical to *Bartonella washoensis* isolated from a human patient. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 41, n. 2, p. 645-650, 2003.

KOSOY, M.; MORWAY, C.; SHEFF, K. W.; BAI, Y.; COLBORN, J.; CHALCRAFT, L.; DOWELL, S. F.; PERUSKI, L. F.; MALONEY, S. .; BAGGETT, H.; SUTTHIRATTANA, S.; SIDHIRAT, A.; MARUYAMA, S.; KABEYA, H.; CHOMEL, B. B.; KASTEN, R.; POPOV, V. *Bartonella tamiae* sp. nov., a newly recognized pathogen isolated from three human patients from Thailand. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 46, n. 2, p. 772-775, 2008.

KOSOY, M. Y.; BAI, Y.; SHEFF, K.; MORWAY, C.; BAGGETT, H.; MALONEY, S. A.; BOONMAR, S.; BHENGSR, S.; DOWELL, S. F.; SITDHIRASDR, A.; LERDTHUSNEE, K.; RICHARDSON, J.; PERUSKI, L. F. Identification of *Bartonella* infections in febrile human patients from Thailand and their potential animal reservoirs. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Mclean, v. 82, n. 6, p. 1140-1145, 2010.

KOSOY, M.; HAYMAN, D. T. S.; CHAN, K-S. *Bartonella* bacteria in nature: Where does populations variability end and a species start? **Infections, Genetic and Evolution**, v. 12, n. 5, p. 894-904, 2012.

KUYKENDALL, L. D. Order VI. Rhizobiales ord. nov. Bergey's Manual of 528 Systematic Bacteriology. In: Brenner, D. J.; Krieg, N. R.; Staley, J. T.; Garrity, G. M. 529 (Eds.), vol. 2, Springer, New York, p. 324, 2006.

LA SCOLA, B.; ZEAITER, Z.; KHAMIS, A.; RAOULT, D. Gene-sequence-based criteria for species definition in bacteriology: the *Bartonella* paradigm. **TRENDS in Microbiology**, v. 11, n. 7, p. 318-321, 2003.

LEI, B. R.; OLIVAL, K. J. Contrasting patterns in mammal–bacteria coevolution: *Bartonella* and *Leptospira* in bats and rodents. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 8, n. 3, p. e2738, 2014.

LEIGH, J.; BRYANT, D. POP-ART: full-feature software for haplotype network construction. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 6, n. 9, p.1110-1116, 2015.

LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism. **Bioinformatics**, Oxford, v. 25, n. 11, p. 1451-1452, 2009.

LI D, SONG X, WANG J, LIU Q. Real-Time PCR-based detection of *Bartonella vinsonii subsp. berkhoffii* by TaqMan minor groove binder probe. **Wei Sheng Wu Xue Bao**, v. 53, n. 9, p. 976-983, 2013.

LI, D-M.; HOU, Y.; SONG, X-P.; FU, Y-Q.; LI, G-C.; LI, M.; EREMEEVA, M. E.; WU, H-X.; PANG, B.; YUE, Y-J.; HUANG, Y.; LU, L.; WANG, J.; LIU, Q-Y. High prevalence and genetic heterogeneity of rodent-borne *Bartonella* species on Heixiazhi Island, China. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 81, n. 23, p. 7981-7992. 2015.

LIN, J. W.; CHEN, C. Y.; CHEN, W. C.; CHOMEL, B. B.; CHANG, C. C. Isolation of *Bartonella* species from rodents in Taiwan including a strain closely related to '*Bartonella rochalimae*' from *Rattus norvegicus*. **Journal of Medical Microbiology**, London, v. 57, n. 12, p. 1496-1501, 2008.

MAGALHÃES, R. F.; CINTRA, M. L.; BARJAS-CASTRO, M, L. ; DEL NEGRO, G. M. B.; OKAY, T. S.; VELHO, P. E. N. F. Blood donor infected with *Bartonella henselae*. **Transfusion Medicine**, v. 20, n. 4, p. 280-282, 2010.

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**, Washington, v. 43, n. 3, p. 1171-1176, 2005.

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**, Washington, v. 43, n. 6, p. 2651–2655, 2005.

MAGGI, R. G.; MASCARELLI, P. E.; PULTORACK, E. L.; HEGARTY, B. C.; BRADLEY, J. M.; MOZAYENI, B. R.; BREITSCHWERDT, E. B. Bartonella spp. bacteremia in high-risk immunocompetent patients. **Diagnostic Microbiology and Infection Diseases**, v. 71, n. 4, p. 430-437, 2011.

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

MAGGI, R. G.; MASCARELLI, P. E.; HAVENGA, L. N.; NAIDOO, V.; BREITSCHWERDT, E. B. Co-infection with *Anaplasma platys*, *Bartonella henselae* and “*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*” in a veterinarian. **Parasites & Vectors**, London, v. 6, 2013b.

MARIGNAC, G.; BARRAT, F.; CHOMEL, B. B.; VAYSSIER-TAUSSAT, M.; GANDOIN, C.; BOUILLIN, C.; BOULOUIS, H. J. Murine model for Bartonella birtlesii infection: New aspects. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, Oxford, v. 33, n. 2, p. 95-107.

MAURIN, M.; RAOULT, D. Bartonella (Rochalimaea) quintana infections. **Clinical Microbiology reviews**, v. 9, n. 3, p. 273-292, 1996.

MEDIANNIKOV, O.; IVANOV, L.; ZDANOVSKAYA, N.; VYSOCHINA, N.; FOURNIER, P. E.; TARASEVICH, I.; RAOULT, D. Molecular screening of Bartonella species in rodents from the Russian Far East. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 1063, p. 308-311, 2005.

MICELI, N. G.; GAVIOLI, F. A.; GONÇALVES, L. R.; ANDRÉ, M. R.; SOUSA, V. R.; SOUSA, K. C.; MACHADO, R. Z. Molecular detection of feline arthropod-borne pathogens in cats in Cuiabá, state of Mato Grosso, central-western region of Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 22, n. 3, p. 385-390, 2013.

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), New Orleans, LA, 1-8, 2010.

MINNICK, M. F.; ANDERSON, B. E.; LIMA, A.; BATTISTI, J. M.; LAWYER, P. G.; BIRTLES, R. J. Oroya fever and verruga peruana: Bartonelloses unique to

South America. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 8, n. 7, p. e2919, 2014.

MORWAY, C.; KOSOY, M.; EISEN, R. A.; MONTENIERI, J.; SHEFF, K.; REYNOLDS, P. J.; POWERS, N. A longitudinal study of *Bartonella* infection in populations of woodrats and their fleas. **Journal of Vector Ecology**, Santa Ana, v. 33, n. 2, p. 353-364, 2008.

MORICK, D.; KRASNOV, B. R.; KHOKHLOVA, I. S.; GOTTLIEB, Y.; HARRUS, S. Investigation of *Bartonella* acquisition and transmission in *Xenopsylla ramesis* fleas (Siphonaptera: Pulicidae). **Molecular Ecology**, Malden, v. 20, n. 13, 2864-2870, 2011.

MORICK, D.; KRASNOV, B. R.; KHOKHLOVA, I. S.; GUTIÉRREZ, R.; FIELDEN, L. J.; GOTTLIEB, Y.; HARRUS, S. Effects of *Bartonella* spp. on flea feeding and reproductive performance. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 79, n. 11, p. 3438-3443, 2013b.

MORICK, D.; KRASNOV, B. R.; KHOKHLOVA, I. S.; GUTIÉRREZ, R.; GOTTLIEB, Y.; HARRUS, S. Vertical nontransovarial transmission of *Bartonella* in fleas. **Molecular Ecology**, Malden, v. 22, n. 18, p. 4747-4752, 2013c.

MORICK, D.; KRASNOV, B. R.; KHOKHLOVA, I. S.; GOTTLIEB, Y.; HARRUS, S. Transmission dynamics of *Bartonella* sp. strain OE 1-1 in Sundevall's jirds (*Meriones crassus*). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 79, n. 4, p. 1258-1264, 2013a.

MUSSO, T.; BADOLATO, R.; RAVARINO, D.; STORNELLO, S.; PANZANELLI, P.; MERLINO, C. Interaction of *Bartonella henselae* with the murine macrophage cell line J774: infection and proinflammatory response. **Infection and Immunity**, Washington, v. 69, n. 9, p. 5974-5980, 2001.

NEIMARK, H.; JOHANSSON, KARL-ERIK.; 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**, London, v. 51, n. 3, p. 891-899, 2001.

NEIMARK, H.; PETERS, W.; ROBINSON, B. L.; STEWART, L. B. Phylogenetic analysis and description of *Eperythrozoon coccoides*, proposal to transfer to the genus *Mycoplasma* as *Mycoplasma coccoides* comb. nov. and Request for an Opinion. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 55, n. 3, p. 1385-1391, 2005.

NOGUCHI, H.; SHANNON, R. C.; TILDEN, E. B.; TYLER, J. R. Etiology of Oroya Fever : XIV. The Insect Vectors of Carrion's Disease. **The Journal of experimental medicine**, New York, v. 49, n. 6, p. 993-1008, 1926.

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, p. 1797-1803, 1995.

PAROLA, P.; RAOULT, D. Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: An emerging infectious threat. **Clinical Infectious Diseases**, Oxford, v.32, n. 6, p. 897-928, 2001.

PAZIEWSKA, A.; HARRIS, P. D.; ZWOLINSKA, L.; BAJER, A.; SINSKI, E. Recombination within and between species of the Alpha Proteobacterium *Bartonella* infecting rodents. **Microbial Ecology**, New York, v. 61, n. 1, p. 134-145, 2011.

PAZIEWSKA, A.; HARRIS, P. D.; ZWOLINSKA, L.; BAJER, A. SINSKI, E. Differences in the ecology of *Bartonella* infections of *Apodemus flavicollis* and *Myodes glareolus* in a boreal forest. **Parasitology**, Cambridge, v.139, n. 7, p. 881-893, 2012.

PÉREZ, C.; MAGGI, R. G.; DINIZ, P. P. V. P.; BREITSCHWERDT, E. B. Molecular and serological diagnosis of *Bartonella* infection in 61 dogs from the United States, **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Lawrence, v. 25, n. 4, p. 805-810, 2011.

PITASSI, L. H. U.; DINIZ, P. P. V. P.; SCORPIO, D. G.; DRUMMOND, M. R.; LANIA, B. G.; BARJAS-CASTRO, M. L.; 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. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v.9, n. 1, p. e0003467, 2015.

PULTORACK, E. L.; MAGGI, R. G.; MASCARELLI, P. E.; BREITSCHWERDT, E. B. Serial testing from a 3-day collection period by use of the *Bartonella* Alphaproteobacteria growth medium platform may enhance the sensitivity of *Bartonella* species detection in bacteremic human patients. **Journal Clinical Microbiology**, Washington, v. 51, n. 6, p. 1673-1677, 2013.

REIS, C.; COTE, M.; Le RHUN, D.; LECUELLE, B.; LEVIN, M. L.; VAYSSIER-TAUSSAT, M.; BONNET, S. I. Vector competence of the tick *Ixodes ricinus* for transmission of *Bartonella birtlesii*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 5, n.5, p. e1186, 2011.

RIKIHISA, Y.; KAWAHARA, M.; WEN, B.; KOCIBA, G.; FUERST, P.; KAWAMORI, F.; SUTO, C.; SHIBATA, S.; FUTOHASHI, M. Western immunoblot analysis of *Haemobartonella muris* and comparison of 16S rRNA gene sequences of *H. muris*, *H. felis*, and *Eperythrozoon suis*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.35, n. 4, p. 823-829, 1997.

RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, Oxford, v. 19, n. 12, p. 1572-1574, 2003.

RUBIO, A. V.; ÁVILA-FLORES, R.; OSIKOWICZ, L. M.; BAI, Y.; SUZÁN, G.; KOSOY, M. Y. Prevalence and genetic diversity of *Bartonella* strains in rodents from Northwestern Mexico. **Vector-borne and Zoonotic Diseases**, Larchmont, v. 14, n. 12, p. 838-845, 2014.

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**. Washington, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

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

SATO, S.; KABEYA, H.; FUJINAGA, Y.; INOUE, K.; UNE, Y.; YOSHIKAWA, Y.; MARUYAMA, S. *Bartonella jaculi* sp. nov., *Bartonella callosciuri* sp. nov., *Bartonella pachyuromydis* sp. nov., and *Bartonella acomydis* sp. nov. isolated from wild Rodentia. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 63, n. 5, p. 1734-1740, 2013.

SICILIANO, R. F.; CASTELLI, J. B.; MANSUR, A. F.; DO SANTOS, F. P.; COLOMBO, S.; DO NASCIMENTO, E. M.; PADDOCK, C.; BRASIL, R. A.; VELHO, P. E. N. F.; DRUMMOND, M. R.; GRINBERG, M.; STRABELLI, T. M. V. *Bartonella* spp. and *Coxiella burnetii* associated with community-acquired, culture-negative endocarditis, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 21, n. 8, p. 1429-1432, 2015.

STAMATAKIS, A.; HOOVER, P.; ROUGEMONT, J. A rapid bootstrap algorithm for the RAxML Web servers. **Systematic Biology**, v. 57, n. 5, p. 758-771, 2008.

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, p. 147-151, 2011.

STUMPF, M. P. Haplotype diversity and SNP frequency dependence in the description of genetic variation. **European Journal of Human Genetics**, v. 12, n. 6, p. 469-477, 2004.

SYKES, J.E. Feline hemotropic mycoplasmas. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, San Antonio, v. 20, n. 1, p. 62-69, 2010.

TASKER, S.; LAPPIN, M.R. *Haemobartonella felis*: recent developments in diagnosis and treatment. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, Thousand Oaks v. 4, n. 1, p. 3-11, 2002.

TELFER, S.; CLOUGH, H. E.; BIRTLES, R. J.; BENNETT, M.; CARSLAKE, D.; HEYLAR, S.; BEGON, M. Ecological differences and coexistence in a guild of microparasites: *Bartonella* in wild rodents. **Ecology**, Washington, v. 88, n. 20, p. 1841-1849, 2007.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 22, n. 22, p. 4673-4680, 1994.

TULLY J. G.; BOVÉ, J. M.; LAIGRET, F.; WHITCOMB, R. F. Revised Taxonomy of the Class Mollicutes: Proposed elevation of a monophyletic cluster of arthropod-associated Mollicutes to ordinal rank (Entomoplasmatales ord. nov.), with provision for familial rank to separate species with nonhelical morphology (Entomoplasmataceae fam. nov.) from helical species (Spiroplasmataceae), and emended descriptions of the Order Mycoplasmatales, Family Mycoplasmataceae. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Londres, v. 43, n. 2, p. 378-385, 1993.

VAYSSIER-TAUSSAT, M.; MOUTAILLER, S.; FÉMÉNIA, F.; RAYMOND, P.; CROCE, O.; LA SCOLA, B.; FOURNIER, P-E.; RAOULT, D. Identification of Novel Zoonotic Activity of *Bartonella* spp., France. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 22, n. 3, p. 457-462, 2016.

VIEIRA, R. F. C.; MOLENTO, M. B.; DOS SANTOS, L. C.; MORAES, W.; CUBAS, Z. S.; SANTOS, A. P.; GUIMARÃES, A. M. S.; MOHAMED, A.; FILHO, I. R. B.; 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**, Filadélfia, v. 139, n. 3-4, p. 410-413, 2009.

VIEIRA, R. F.; VIDOTTO, O.; VIEIRA, T. S.; GUIMARAES, A. M.; DOS SANTOS, A. P.; NASCIMENTO, N. C.; DOS 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 São Paulo*, v. 57, n. 4, p. 353-357, 2015.

VOS, M.; DIDELOT, X. A comparison of homologous recombination rates in bacteria and archaea. **The ISME Journal**, Londres, v. 3, n. 2, p. 199-208, 2009.

WILLI, B.; BORETTI, F.S.; TASKER, S.; MELI, M.L.; WENGI, N.; REUSCH, C.E.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R. From *Haemobartonella* to hemoplasma: molecular methods provide new insights. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 125, n. 3-4, p. 197-209, 2007.

WILLI, B.; MELI, M. L.; LUTHY, R.; HONEGGER, H.; WENGI, N.; HOELZLE, L. E.; REUSCH, C. E.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R. Development and application of a universal hemoplasma screening assay based on the SYBR

Green PCR principle. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.47, n. 12, p. 4049–4054, 2009.

WILSON, D. E.; REEDER, D. M. Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference. **Johns Hopkins University Press**, Baltimore, Maryland. 2005. Acessado em: Janeiro/2016.

WINOTO, I. L.; GOETHERT, H.; IBRAHIM, I. N.; YUNIHERLINA, I.; STOOPS, C.; SUSANTI, I.; KANIA, W.; MAGUIRE, J. D.; BANGS, M. J.; TELFORD, S. R. 3RD.; WONGSRICHANALAI, C. *Bartonellas* pecies in rodents and shrews in the greater Jakarta area. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, Bangkok, v. 36, n. 6, p. 1523-1529, 2005.

WELCH, D. F.; PICKETT, D. A.; SLATER, L. N.; STEIGERWALT, A. G.; BRENNER, D. J. *Rochalimaea henselae* sp. nov., a cause of septicemia, bacillary angiomatosis, and parenchymal bacillary peliosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 2, p. 275-280, 1992.

WELCH, D. F.; CARROLL, K. C.; HOFMEISTER, E. K.; PERSING, D. H.; ROBISON, D. A.; STEIGERWALT, A. G.; BRENNER, D. J. Isolation of a new subspecies, *Bartonella vinsonii* subsp. *arupensis*, from a cattle rancher: identity with isolates found in conjunction with *Borrelia burgdorferi* and *Babesia microti* among naturally infected mice. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, n. 8, p. 2598-2601, 1999.

YANG, D.; TAI, X.; QIU, Y.; YUN, S. Prevalence of *Eperythrozoon* spp. infection and congenital eperythrozoonosis in humans in Inner Mongolia, China. **Epidemiology and Infectious**, v. 125, n. 2, 421-426, 2000.

YUAN, C. L.; LIANG, A. B.; YAO, C. B.; YANG, Z. B.; ZHU, J.G.; CUI, L.; YU, F.; ZHU, N. Y.; YANG, X. W.; HUA, X. G. Prevalence of *Mycoplasma suis* (*Eperythrozoon suis*) infection in swine and swine-farm workers in Shanghai, China. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago , v. 70, n. 7, p. 890-894, 2009.

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**, 52, 165-171, 2002.