

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 24/11/2025.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA
FILHO” (UNESP)
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS (FCAV)
Campus Jaboticabal
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária**

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
HEMOPARASITOS EM ANTAS (*Tapirus terrestris*) DE VIDA
LIVRE NO BRASIL**

Anna Claudia Baumel Mongruel
Médica Veterinária

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA
FILHO” (UNESP)
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS (FCAV)
Campus Jaboticabal
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária**

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
HEMOPARASITOS EM ANTAS (*Tapirus terrestris*) DE VIDA
LIVRE NO BRASIL**

Anna Claudia Baumel Mongruel

Orientador: Prof. Dr. Marcos Rogério André

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Doutora em Medicina Veterinária, área: Patologia Animal.

M743d Mongruel, Anna Claudia Baumel
Detecção e caracterização molecular de hemoparasitos em
antas (Tapirus terrestris) de vida livre no Brasil / Anna Claudia
Baumel Mongruel. -- Jaboticabal, 2024
314 f. : il., tabs., fotos, mapas

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP),
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientador: Marcos Rogério André
Coorientadora: Rosangela Zacarias Machado

1. Doenças de animais selvagens. 2. Diagnóstico. 3. Biologia
molecular. 4. Filogenia. 5. Parasitologia. I. Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.

Impacto potencial dessa pesquisa

A anta (*Tapirus terrestris*) é o maior mamífero terrestre nativo do Brasil. Essa espécie é amplamente distribuída na América do Sul, ocorrendo em pelo menos quatro biomas brasileiros (Amazônia, Cerrado, Mata Atlântica e Pantanal). Possui um papel ecológico importante na biodiversidade da flora dos habitats onde vive devido à capacidade de dispersar sementes de plantas e frutos. A anta é considerada um animal vulnerável à extinção em todo o país e os principais desafios relacionados à sua conservação estão ligados às consequências das ações humanas, como a caça ilegal, incêndios florestais, perda de habitat e atropelamentos em rodovias e estradas. Considerando a necessidade de entender quais outras ameaças esses animais podem enfrentar, o estudo dos hemoparasitos e agentes transmitidos por vetores que podem infectar as antas se faz importante, visto que ainda há pouca informação sobre essa temática. No presente trabalho, foi detectado DNA de bactérias das famílias Anaplasmataceae, Mycoplasmataceae, Bartonellaceae e Borreliaceae em amostras de sangue de antas de vida-livre do Pantanal e Cerrado. Além disso, detectou-se também DNA de protozoários da família Theileriidae. Alguns dos agentes encontrados foram relatados nessa espécie animal pela primeira vez, além da descrição de novas e *Candidatus* espécies e também de genótipos inéditos.

Potential impact from this research

The lowland tapir (*Tapirus terrestris*) is the largest land mammal from Brazil. This species is widely distributed in South America, occurring in at least four Brazilian biomes (Amazon, Cerrado, Atlantic Forest and Pantanal). It has an important ecological role in the flora biodiversity in the habitats where it lives due to its ability to disperse plant and fruits seeds. The lowland tapir is considered an animal vulnerable to extinction throughout the country and the main challenges related to its conservation are associated to the consequences of human actions, such as illegal hunting, forest fires, loss of habitat and being run over on highways and roads. Considering the need to unraveling other threats these animals may face, the study of blood and vector-borne agents that can infect tapirs is important, as there is still little information on this topic. In the present research, DNA from bacteria from the Anaplasmataceae, Mycoplasmataceae, Bartonellaceae and Borreliaceae families was detected in blood samples from free-living tapirs from the Pantanal and Cerrado. Furthermore, DNA from protozoa of the Theileriidae family was also detected. Some of the agents found were reported in this animal species for the first time, in addition to the description of novel *Candidatus* species and genotypes.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE HEMOPARASITOS EM ANTAS
(*Tapirus terrestris*) DE VIDA LIVRE NO BRASIL

AUTORA: ANNA CLAUDIA BAUMEL MONGRUEL

ORIENTADOR: MARCOS ROGÉRIO ANDRÉ

COORIENTADORA: ROSANGELA ZACARIAS MACHADO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Medicina Veterinária,
área: Patologia Animal pela Comissão Examinadora:

Documento assinado digitalmente
gov.br MARCOS ROGÉRIO ANDRÉ
Data: 25/05/2024 12:36:51-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. MARCOS ROGÉRIO ANDRÉ (Participação Virtual)
Departamento de Patologia Reproducao e Saude Unica / FCAV UNESP Jaboticaba

Documento assinado digitalmente
gov.br JULIA ANGELICA GONCALVES DA SILVEIRA
Data: 24/05/2024 17:16:27-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. JULIA ANGELICA GONÇALVES DA SILVEIRA (Participação Virtual)
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva / Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) - Belo Horizonte/MG

Prof. Dr. JOSÉ MAURICIO BARBANTI DUARTE (Participação Virtual)
Departamento de Zootecnia / FCAV UNESP Jaboticabal

Documento assinado digitalmente
gov.br JOAO FABIO SOARES
Data: 24/05/2024 16:28:38-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. JOÃO FABIO SOARES (Participação Virtual)
Departamento de Patologia Clínica Veterinária / Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) - Porto Alegre/RS

Prof. Dr. DANIEL GUARIZ PINHEIRO (Participação Virtual)
Departamento de Biotecnologia Agropecuaria e Ambiental / FCAV UNESP Jaboticabal

Documento assinado digitalmente
gov.br JOSE MAURICIO BARBANTI DUARTE
Data: 25/05/2024 11:57:03-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Documento assinado digitalmente
gov.br DANIEL GUARIZ PINHEIRO
Data: 24/05/2024 20:52:10-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Jaboticabal, 24 de maio de 2024

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Anna Claudia Baumel Mongruel – Filha de Isabela Baumel Mongruel e Roberto Alfredo Pietrobelli Mongruel, nasceu em 23 de outubro de 1993, na cidade de Ponta Grossa, no Estado do Paraná. Em 2011, ingressou no curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual do Centro-Oeste (UNICENTRO), em Guarapuava (PR), graduando-se em fevereiro de 2016. Durante a graduação, realizou duas iniciações científicas, voltadas para as temáticas de diagnóstico coproparasitológico e diagnóstico molecular de hemoparasitoses em animais selvagens, sob orientação dos Profa. Dra. Meire Christina Seki e do Prof. Dr. Adriano de Oliveira Torres Carrasco. Em 2016, ingressou na Residência Multiprofissional e em Área da Saúde pela Universidade Federal do Paraná (UFPR), campus Curitiba, na área de Patologia Clínica Veterinária – atuação em Biologia Molecular, sob orientação do Prof. Dr. Rafael Felipe da Costa Vieira. Durante a residência, refinou conhecimentos práticos e teóricos acerca do diagnóstico molecular de hemoparasitoses, coleta e identificação de carrapatos e organização e gerenciamento de ambiente laboratorial. Também durante a residência, visitou o Department of Comparative Pathobiology, da Purdue University (West Lafayette, Indiana, EUA), sob supervisão da Dra. Andrea Santos. Em 2018 ingressou no mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, em área de Saúde Única, da UFPR, novamente sob orientação do Prof. Dr. Rafael Vieira, com bolsa do CNPq, e defendendo sua dissertação em maio de 2019. Em 2021 completou a Pós-graduação (*lato sensu*) em Microbiologia Clínica pela Universidade Positivo, campus Curitiba, refinando e adquirindo conhecimentos técnicos e práticos acerca do diagnóstico microbiológico. Em 2020 ingressou no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, em área de Patologia Veterinária, sob orientação do Prof. Dr. Marcos Rogério André e coorientação da Prof. Dra. Rosângela Zacarias Machado, na UNESP campus Jaboticabal, inicialmente com bolsa CAPES e, posteriormente, sendo contemplada com bolsa FAPESP (#2019/26403-0). Entre fevereiro a agosto de 2023, realizou período de pesquisa no exterior, com bolsa BEPE FAPESP (#2022/13016-1), no Department of Ecology and Evolutionary Biology da Tulane University em New Orleans (Louisiana, EUA), sob supervisão do Dr. Keith Clay. Durante esse período, teve contato com técnicas de bioinformática voltadas para análises de microbiomas.

EPÍGRAFE

"There can be 100 people in one room, and 99 don't believe in you, but all it takes is one person to believe in you and that can change everything."

– Lady Gaga

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho à Anna Claudia que estava no primeiro ano de Medicina Veterinária.

AGRADECIMENTOS

Seriam as nossas escolhas uma simples soma de circunstâncias ou será que essa coisa de destino realmente existe? Em árabe, existe a palavra *maktub* que significa "estava escrito" ou "tinha que acontecer". Sendo bastante sincera, em diversos momentos durante o doutorado, eu não sabia o que eu estava fazendo. Eu não sabia se aquilo era pra mim, se eu era boa o suficiente ou se todo o tempo que eu estava dedicando a isso valeria a pena. Afinal, o doutorado toma muito tempo e todo mundo fala que o tempo é valioso. Por muitas vezes, eu desejei que o doutorado passasse rápido. Mas não tinha como: é um processo longo. E a prova disso é que muita coisa aconteceu enquanto eu estava nele. Quando eu fui aprovada para ingressar no programa, no final de 2019, ninguém sabia direito o que era passar por uma pandemia. Hoje, cinco anos depois, a gente lembra de 2020 e 2021 e quase não acredita em tudo o que aconteceu. Quando eu comecei o doutorado, eu tinha meus quatro avós. Hoje eu tenho um avô. Quando eu comecei o doutorado, eu não tinha nenhum sobrinho. Hoje eu tenho duas. Quando eu comecei o doutorado, eu estava namorando. Hoje eu estou noiva. Assim como várias outras coisas que aconteceram de forma simultânea na minha vida durante esses anos, o doutorado também aconteceu. E o principal: eu sentindo se aquilo era pra mim ou não, eu sabendo o que eu estava fazendo ou não, eu pensando em desistir ou não, eu tendo dias bons ou não... o doutorado aconteceu. E, por isso, eu penso que, talvez, era pra acontecer mesmo. Afinal, quais outras forças, se não uma tal força universal que se encarrega de desenhar o destino das pessoas, faria isso dar certo? Pois eu citaria sim algumas outras e é à elas que eu quero agradecer:

Obrigada aos meus pais, Roberto e Isabela, por acreditarem em mim. Ninguém acredita em mim tanto quanto vocês e isso me faz imaginar, um pouquinho, como é grande o amor que um pai e uma mãe sentem pelos seus filhos.

Obrigada ao meu orientador Prof. Dr. Marcos Rogério André, por ter confiado em mim e aceitado me orientar. Por ter me conduzido até aqui com paciência, educação e atenção. A eficiência, seriedade e paixão com as quais o senhor conduz o seu trabalho como professor e pesquisador é um exemplo para mim.

Obrigada às professoras Dra. Rosangela Zacarias Machado e Dra. Darci Moraes Barros-Battesti pelo pioneirismo e esforços dedicados à parasitologia veterinária que permitem que alunos como eu usufruam do conhecimento, infraestrutura e legado consequentes do trabalho das senhoras.

Obrigada ao meu noivo Guilherme Sagrillo, por ter sido, e sempre ser, tão paciente, cuidadoso e carinhoso. Durante os anos do doutorado, tivemos muitas despedidas dolorosas em rodoviárias e aeroportos. E, mesmo com o incômodo do relacionamento a distância, você sempre me apoiou, incentivou e dizia que tudo ia ficar bem (e ainda me pediu em casamento no meio disso tudo). Amo muito você.

Obrigada aos meus irmãos Felipe, Daniel, Cynthia e Marcello. Eu adoro contar pra todo mundo que eu tenho quatro irmãos. Vocês são parte de quem eu sou e eu amo vocês.

Obrigada também às minhas amigas da vida Katherinne, Salua e Nathália, por estarem sempre por perto há tantos anos (mesmo a quilômetros de distância).

Obrigada à todos os meus colegas pós-graduandos (atuais ou que já defenderam) e estagiários do Vector-Borne Bioagents Laboratory; em especial: Ana Calchi, Ana Carolina Santiago, Amir Alabi, Bianca Cardenal, Clara Dias, Lorena Freitas e Ricardo Bassini-Silva, pelas várias vezes em que vocês me emprestaram material, me passaram um protocolo ou revelaram um gel pra mim. Além de ajudarem a tornar essa caminhada mais leve com risadas, desabafos, almoços, cafézinhos e fofquinhas.

Many thanks to Dr. Keith Clay and all members from Clay Lab (Paul, Jake and Peyton) at Tulane University. My time in New Orleans was one of the most special and unforgettable chapters of my life! And you guys are part of it, always being very kind and helpful to me. Thank you, thank you, thank you!!

Obrigada à Dra. Patrícia Medici e todo o time de pesquisadores e profissionais da Iniciativa Brasileira para a Conservação da Anta Brasileira (INCAB/IPÊ), pelo trabalho sério realizado em prol do estudo da anta brasileira e pelo fornecimento das amostras para que esse projeto pudesse acontecer. Queria poder também agradecer às antas cujas as amostras de sangue vieram parar na minha mão e que, graças à esses animais, pude aprender tanta coisa nova.

Obrigada à CAPES, pelo provimento de bolsa no início do doutorado. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Obrigada à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) por acreditar no meu trabalho, concedendo bolsa de pesquisa (2019/26403-0) e bolsa de estágio (2022/13016-1) no exterior.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelos Auxílios à Pesquisa concedidos ao Prof. Marcos R. André para a realização do presente trabalho (Processos números 2020/12037-0 e 2022/08543-2).

Obrigada aos meus bichinhos de estimação: Antônia, Banzé e Peteco (esse último adotado na UNESP). Se hoje eu sou médica veterinária, é porque sempre gostei muito de bicho. E ter os meus bichinhos na minha vida é um reforço diário desse sentimento.

Por fim, mas não menos importante, meu agradecimento especial à essa força que pincelou meu caminho e me trouxe até aqui hoje, independente das minhas inseguranças e incertezas, fazendo com que tudo que tivesse que acontecer para o meu crescimento e evolução, acontecesse. Algumas pessoas chamam ela de Deus.

Sumário

<i>Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais</i>	<i>iv</i>
<i>Comprovante de cadastro no SISGEN</i>	<i>v</i>
<i>Resumo</i>	<i>vii</i>
<i>Abstract</i>	<i>viii</i>
<i>CAPÍTULO I – CONSIDERAÇÕES GERAIS</i>	<i>1</i>
1. Introdução.....	1
2. Objetivos	3
2.1. Objetivo Geral.....	3
2.2. Objetivos específicos	3
<i>CAPÍTULO II – REVISÃO DE LITERATURA</i>	<i>5</i>
1. O gênero <i>Tapirus</i> e a anta brasileira.....	5
2. Agentes bacterianos estudados neste trabalho	8
3. Protozoários estudados neste trabalho	19
3. Análise do microbioma	29
4. Referências.....	32
<i>CAPÍTULO III* – Expanding the Universe of Hemoplasmas: Multi-Locus Sequencing Reveals Putative Novel Hemoplasmas in Lowland Tapirs (Tapirus terrestris), the Largest Land Mammals in Brazil*</i>	<i>65</i>
Abstract.....	65
1. Introduction	66
2. Materials and Methods	67
3. Results.....	74
4. Discussion.....	91
5. Conclusions	96
References	97
<i>CAPÍTULO IV* – Theileria terrestris nov. sp.: A Novel Theileria in Lowland Tapirs (Tapirus terrestris) from Two Different Biomes in Brazil*</i>	<i>108</i>
Abstract.....	108
1. Introduction	109
2. Materials and Methods.....	110
3. Results.....	117

4. Discussion.....	126
5. Conclusions	129
References	131
<i>CAPÍTULO V* – Molecular evidence of Bartonella spp. in wild lowland tapirs (Tapirus terrestris), the largest land mammals in Brazil*</i>	138
Abstract.....	138
1. Introduction	139
2. Material and methods	140
3. Results.....	143
4. Discussion.....	147
5. Conclusion.....	151
References	153
<i>CAPÍTULO VI* – Molecular survey of vector-borne agents (Anaplasmataceae agents, Hepatozoon sp. and Coxiella burnetii) in lowland tapirs (Tapirus terrestris) from Brazil, with evidence of a putative novel Anaplasma genotype*</i>	162
Abstract.....	162
1. Introduction	163
2. Material and Methods	165
3. Results.....	171
4. Discussion.....	182
5. Conclusions	185
References	186
<i>CAPÍTULO VII* - First molecular detection of Borrelia sp. in tapirs (Tapirus terrestris)*</i>	203
Abstract.....	203
Introduction	204
Material and Methods.....	205
Results.....	209
Discussion	211
References	215
<i>CAPÍTULO VIII* – Investigating the blood bacterial microbiome of wild lowland tapirs (Tapirus terrestris)*</i>	222
Abstract.....	222
1. Introduction	223
2. Material and methods	225
3. Results.....	228

5. Discussion.....	239
6. Conclusions	245
References	246
CAPÍTULO IX – Resumo dos resultados obtidos.....	259
1. Resultados gerais dos ensaios de PCR e qPCR.....	259
2. Detecção de hemoplasmas	259
3. Detecção de piroplasmídeos.....	260
4. Detecção de <i>Bartonella</i> sp.	261
5. Detecção de <i>Anaplasma</i> sp.....	262
6. Detecção de <i>Neorickettsia</i> sp.....	263
7. Detecção de <i>Borrelia theileri</i>	263
8. Microbioma bacteriano do sangue de antas.....	264
9. Co-infecções identificadas pelos ensaios moleculares de triagem	265
10. Co-infecções confirmadas por sequenciamento	268
CAPÍTULO X – Considerações finais.....	271
APÊNDICES.....	273
APÊNDICE A – Material suplementar citado no Capítulo III.....	273
APÊNDICE B – Material suplementar do Capítulo IV	276
APÊNDICE C – Material suplementar citado no Capítulo VI	286
APÊNDICE D – Material suplementar citado no Capítulo VIII	287
APÊNDICE E - Resultados gerais obtidos no presente trabalho	293



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



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "**Detecção e caracterização molecular de agentes Anaplasmataceae, Bartonellaceae, Mycoplasmataceae, Coxiellaceae, Babesiidae e Theileriidae em antas (*Tapirus terrestris*) de vida livre no Brasil**" protocolo nº 4558/20, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Marcos Rogério André, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 15 de outubro de 2020.

Vigência do Projeto	01/11/2020 a 29/02/2024
Espécie / Linhagem	<i>Tapirus terrestris</i>
Nº de animais	102
Peso / Idade	Variável
Sexo	Variável
Origem	Animais capturados pela equipe da Iniciativa Nacional para a Conservação da Anta Brasileira (INCAB), projeto do Instituto de Pesquisas Ecológicas (IPÊ), para a instalação de colares satelitais de monitoramento e coleta de amostras biológicas para estudos de saúde e genética e animais que foram à óbito por atropelamento em rodovias

Jaboticabal, 15 de outubro de 2020.


Profª Drª Fabiana Pilarski
Coordenadora – CEUA

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



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso
Cadastro nº AE4CC0C

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

Número do cadastro: **AE4CC0C**
Usuário: **Marcos Rogério André**
CPF/CNPJ: **302.435.148-59**
Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

Espécie

Tapirus terrestris

Título da Atividade: **DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE AGENTES ANAPLASMATACEAE, BARTONELLACEAE, MYCOPLASMATACEAE, COXIELLACEAE, BABESIIDAE E THEILERIIDAE EM ANTAS (TAPIRUS TERRESTRIS) DE VIDA LIVRE NO BRASIL.**

Equipe

Marcos Rogério André	Campus de Jaboticabal
Rosângela Zacarias Machado	FCAV/Unesp Jaboticabal
Anna Claudia Baumel Mongruel	FCAV/Unesp Jaboticabal
Emília Patrícia Medici	INCAB/IPÊ

Parceiras Nacionais

66.831.223/0001-09 / Instituto de Pesquisas Ecológicas

Resultados Obtidos**Divulgação de resultados em meios científicos ou de comunicação**

Identificação do meio onde foi divulgado: <https://doi.org/10.3390/microorganisms1003061>

Data do Cadastro: 08/07/2022 10:58:57

Situação do Cadastro: Concluído

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em 10:59 de 08/07/2022.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
ASSOCIADO - **SISGEN**

DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE HEMOPARASITOS EM ANTAS (*Tapirus terrestris*) DE VIDA LIVRE NO BRASIL

RESUMO – A anta brasileira (*Tapirus terrestris*) é o maior mamífero terrestre do Brasil. Atualmente, essa espécie é considerada vulnerável à extinção em todo o país. O presente trabalho teve como objetivos detectar e caracterizar agentes das famílias bacterianas Mycoplasmataceae, Bartonellaceae, Anaplasmataceae, Coxiellaceae e Borreliaceae; e também das famílias de protozoários Babesiidae, Theileriidae e Hepatozoidae em amostras de sangue de antas de vida-livre do Cerrado e Pantanal, por meio de técnicas moleculares. Entre 2013 a 2018, amostras de sangue de *T. terrestris* de vida-livre foram coletadas de 94 indivíduos vivos e 8 atropelados, totalizando 125 amostras (alguns animais vivos foram amostrados mais de uma vez em momentos diferentes), no Estado do Mato Grosso do Sul. A coleta de sangue foi realizada pelos profissionais da Iniciativa Nacional para a Conservação da Anta Brasileira (INCAB-IPÊ). Desse total, 78 (78/125; 62,4%) amostras foram coletadas de 61 antas (61/94; 64,89%) no Pantanal e 39 amostras (39/125; 31,2%) foram coletadas de 33 antas (33/94; 35,11%) provenientes do Cerrado. Além disso, todas as antas atropeladas (8/125; 6,4%) foram amostradas no Cerrado, totalizando 41 indivíduos deste bioma. As amostras foram submetidas à protocolos de PCR (convencional) e qPCR (PCR quantitativa). Ainda, 86 amostras foram submetidas à amplificação de um fragmento de aproximadamente 400 pb da região V3-V4 do gene bacteriano 16S rRNA, por meio de sequenciamento de nova geração, para caracterização do microbioma. Como resultado, 33,61% demonstraram resultados positivos para a pesquisa de *Mycoplasma* spp. (PCR para os genes 16S rRNA, 23S rRNA, RNase P e *dnaK*), 52,2% para piroplasmídeos (PCR para os genes 18S rRNA, *hsp70* e *cox-1*), 6,55% para *Bartonella* sp. (qPCR para o gene *nuoG* e PCR para o gene *ribC*), 18% para *Anaplasma* spp. (PCR para o gene 16S rRNA e espaçador intragênico ITS 23S-5S), 25,4% para *Neorickettsia* spp. (PCR para o gene 16S rRNA), e 2% para *Borrelia* spp. (qPCR para o gene 16S rRNA e PCR para o gene *flaB*). Nenhuma amostra foi positiva para os protocolos testados para *Ehrlichia* spp. (PCR para o gene *dsb*), *Coxiella burnetii* (qPCR para o elemento gênico IS1111) e *Hepatozoon* spp. (PCR para o gene 18S rRNA). As análises filogenéticas das sequências obtidas demonstraram a presença de duas novas espécies *Candidatus* nesses animais: '*Candidatus Mycoplasma haematoterrestris*' e '*Candidatus Mycoplasma hematotapirus*'; uma nova espécie de *Theileria*, nominada *Theileria terrestres* nov. sp.; ocorrência de um genótipo similar à *Bartonella henselae*; ocorrência de um novo genótipo de *Anaplasma* sp., ocorrência de *Neorickettsia* sp.; e *Borrelia theileri*, patógeno anteriormente descrito somente em animais domésticos no Brasil. Na análise do microbioma do sangue das antas, os filos Pseudomonadota, Bacillota, Mycoplasmatota, Bacterioidota e Actinomycetota mostraram-se dominantes. A análise da diversidade *alpha* de amostras de animais vivos demonstrou que todos os grupos avaliados compartilham as mesmas comunidades bacterianas principais. O presente trabalho descreveu a ocorrência de diferentes hemoparasitos (*Mycoplasma* spp., *Theileria terrestris*, *Bartonella* sp., *Anaplasma* sp., *Neorickettsia* sp. e *Borrelia theileri*) em *T. terrestris* de vida livre no Brasil, além da primeira caracterização do microbioma do sangue dessa espécie.

Palavras-chave: Animais selvagens, diagnóstico, filogenia, hemoparasitos.

MOLECULAR DETECTION AND CHARACTERIZATION OF HEMOPARASITES IN WILD LOWLAND TAPIRS (*TAPIRUS TERRESTRIS*) FROM BRAZIL

ABSTRACT - The lowland tapir (*Tapirus terrestris*) is the largest land mammal in Brazil and is considered vulnerable to extinction throughout the country. The present research aimed to detect and characterize agents from the bacterial families Mycoplasmataceae, Bartonellaceae, Anaplasmataceae, Coxiellaceae, and Borreliaceae; and also the protozoan families Babesiidae, Theileriidae, and Hepatozoidae in blood samples of wild tapirs from the Cerrado and Pantanal biomes, using molecular techniques. Between 2013 and 2018, blood samples were collected from 94 living and 8 road-killed wild tapirs, totaling 125 samples (some living animals were sampled more than once at different times), in Mato Grosso do Sul State. Blood collection was carried out by professionals from the National Initiative for the Conservation of the Brazilian Tapir (INCAB-IPÊ). Out of this, 78 (78/125; 62.4%) samples were collected from 61 tapirs (61/94; 64.89%) in the Pantanal and 39 samples (39/125; 31.2%) were collected from 33 tapirs (33/94; 35.11%) from the Cerrado. Furthermore, all road-killed tapirs (8/125; 6.4%) were sampled in the Cerrado, totaling 41 individuals from this biome. Samples were subjected to PCR (conventional) and qPCR (quantitative PCR) protocols targeting the studied agents. Furthermore, 86 samples were subjected to amplification of a fragment of approximately 400 bp from the V3-V4 region of the bacterial 16S rRNA gene, through next generation sequencing, for blood microbiome characterization. From the tested samples, 33.61% obtained positive results for *Mycoplasma* spp. (PCR for the 16S rRNA, 23S rRNA, *RNAse P* and *dnaK* genes), 52.2% for piroplasmids (PCR for the 18S rRNA, *hsp70* and *cox-1* genes), 6.55% for *Bartonella* sp. (qPCR for the *nuoG* gene and PCR for the *ribC* gene), 18% for *Anaplasma* spp. (PCR for the 16S rRNA gene and ITS 23S-5S intragenic space), 25.4% for *Neorickettsia* spp. (PCR for the 16S rRNA gene), and 2% for *Borrelia* spp. (qPCR for the 16S rRNA gene and PCR for the *flaB* gene). None of the samples was positive for the protocols tested for *Ehrlichia* spp. (PCR for the *dsb* gene), *Coxiella burnetii* (qPCR for the IS1111 gene element) and *Hepatozoon* spp (PCR for the 18S rRNA gene). Phylogenetic analyses of obtained sequences demonstrated the presence of two *Candidatus* species: '*Candidatus Mycoplasma haematoterrestris*' and '*Candidatus Mycoplasma hematotapirus*'; detection of a novel species of *Theileria*, named *Theileria terrestris* nov. sp.; detection of a *Bartonella* sp. genotype similar to *Bartonella henselae*; a novel genotype of *Anaplasma* sp.; detection of *Neorickettsia* sp.; occurrence of *Borrelia theileri*, a pathogen previously described only in domestic animals in Brazil, was also detected. Regarding the analysis of the tapir blood microbiome, the phyla Pseudomonadota, Bacillota, Mycoplasmatota, Bacterioidota and Actinomycetota demonstrated to be dominant. When analyzing the diversity of living animals' samples, tapir populations from all analyzed groups demonstrate that they share the dominant bacterial community members. The present research described the occurrence of different hemoparasites (*Mycoplasma* spp., *Theileria terrestris*, *Bartonella* sp., *Anaplasma* sp., *Neorickettsia* sp. and *Borrelia theileri*) in free-living *T. terrestris* in Brazil, in addition to the first characterization of the blood microbiome from this species.

Keywords: Diagnosis, hemoparasites, phylogeny, wildlife.

CAPÍTULO I – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. Introdução

Considerando as perspectivas futuras para o diagnóstico de doenças infecciosas em animais selvagens, tecnologias inovadoras podem melhorar a detecção de patógenos, bem como contribuir com o conhecimento acerca de tais agentes em diferentes espécies (Michel et al., 2021). As zoonoses são doenças infecciosas compartilhadas entre os seres humanos e outras espécies animais e são causadas por cerca de 60% dos patógenos que infectam seres humanos (Aggarwal e Ramachandran, 2020). Áreas onde ocorre o contato próximo entre seres humanos, animais domésticos e animais selvagens são aquelas com as maiores chances de ocorrer a transmissão de agentes zoonóticos (Kalema-Zikusoka, 2005).

A ocorrência de patógenos transmitidos por vetores abrange desde áreas com climas tropicais e subtropicais até locais de clima temperado (Martens et al., 1995). O aumento das populações de artrópodes vetores, que ocorre principalmente em decorrência de alterações ambientais, influencia não apenas o aparecimento de novas doenças, mas também o ressurgimento de doenças já conhecidas (Gratz, 1999). Desde o início do século 20, as doenças transmitidas por carrapatos estão em ascensão devido ao aumento dos impactos ao meio ambiente. Embora os carrapatos sejam considerados os artrópodes mais relacionados à transmissão de patógenos, após os mosquitos, os estudos acerca da transmissão de agentes infecciosos por carrapatos são considerados negligenciados quando comparados àqueles transmitidos por artrópodes voadores (Boulanger et al., 2019).

O Pantanal é considerado a maior área alagada contínua de água doce do planeta, abrangendo cerca de 179.300 km² de planícies aluviais de baixa altitude. As estações de chuva e seca são bem definidas, com as chuvas concentrando-se durante o verão e favorecendo a ocorrência de cheias sazonais (Tomas et al., 2019). O Cerrado é o segundo maior bioma do Brasil, abrangendo a parte predominante das savanas neotropicais (Delitti et al., 2006). Diferentes tipos de vegetação podem ser encontradas no Cerrado. As paisagens são caracterizadas por florestas de savana que variam desde pastagens quase sem árvores, dominadas por gramíneas e

arbustos, até florestas de árvores semidecíduas (Furley et al., 1999). A área onde ocorre o Cerrado se estende por 2 milhões de km² da região central do planalto brasileiro e representa 21% da área terrestre do Brasil, o que o torna a região mais extensa de savana da América do Sul (Delitti et al., 2006). Considerando seu vasto vasto, as condições climáticas do Cerrado variam de acordo com a região na qual o bioma ocorre. Na região que abrange o Estado do Mato Grosso do Sul, o Cerrado é descrito apresentando estação chuvosa mais intensa entre os meses de Dezembro à Fevereiro, com pequenos períodos de estiagem no mês de Janeiro. As médias de temperatura anual para essa região podem variar entre 21°C a 25°C, sendo esta uma região que apresenta médias de temperaturas mais baixas quando comparadas à outras regiões onde esse bioma pode ser encontrado (Silva et al., 2008).

A principal causa de desmatamento nos países da América do Sul é a expansão de áreas de atividades ligadas à produção agropecuária (Arraes et al., 2012), assim como ocorre no Brasil (Domingues et al., 2014). A fragmentação de habitats naturais está relacionada a uma perda consistente da abundância de espécies selvagens (Haddad et al., 2015) e ao aumento no risco de extinção para mamíferos (Crooks et al., 2017). Nos últimos anos, tanto o Pantanal quanto o Cerrado têm enfrentado altas taxas de destruição no Brasil. Estima-se que os incêndios florestais destruíram aproximadamente 23% do Pantanal em 2020 (LASA/UFRJ, 2020), e em 2021, 7,9% da vegetação natural foi reportada como suprimida no Cerrado (PRODES/INPE, 2021). Incêndios florestais podem causar ferimentos diretos e morte de animais, mas também danos indiretos causados pela perda de habitat e esgotamento de recursos (Berlinck et al., 2021).

O interesse na vida selvagem tem crescido por diferentes razões: desde a necessidade de traçar planos para a conservação de espécies ameaçadas até mesmo o interesse econômico nesses animais, visto que, em países que apresentam uma alta taxa de biodiversidade, a fauna é considerada um importante atrativo e contribuinte da indústria do turismo (Michel et al., 2021). De fato, em 2022, a cadeia produtiva do turismo no Estado do Mato Grosso do Sul, na qual uma expressiva porção é relacionada ao ecoturismo, movimentou cerca de R\$21,6 bilhões na região (Fecomércio MS, 2023).

A espécie *Tapirus terrestris*, popularmente conhecida como anta brasileira, faz parte da ordem Perissodactyla e família Tapiridae (Medici et al., 2012) e é considerada o maior mamífero terrestre silvestre do Brasil (Rodrigues, 2007). A anta é considerada uma espécie mantenedora da biodiversidade da flora, visto a sua capacidade de dispersar sementes nos territórios onde habita (Barcelos et al., 2013). Dentre os países da América do Sul, o Brasil é o país com maiores perdas de habitat para a espécie (Cordeiro et al., 2016). Embora ainda possa ser encontrada em quatro biomas brasileiros (Mata Atlântica, Pantanal, Amazônia e Cerrado), a anta está classificada como vulnerável no país pela avaliação do risco de extinção da espécie (Medici et al., 2012).

Alterações de habitat são a principal causa do surgimento de doenças infecciosas em antas (Mangini et al., 2012). Os incentivos às pesquisas relacionadas à saúde e aos agentes infecciosos que podem afetar a espécie são listados como metas nos esforços que visam a conservação da anta brasileira (Medici et al., 2007). Entretanto, embora exista uma diversidade de estudos envolvendo hemoparasitos de animais silvestres, poucos são os relatos que descrevem a detecção de patógenos em antas.

6. Conclusions

The phyla Pseudomonadota, Bacillota, Mycoplasmatota, Bacteroidota and Actinomycetota were the dominant taxa present in the analysis of the microbiome of living and road-killed lowland tapirs using amplification and NGS of a fragment of approximately 400 pb from the V4-V3 regions of the bacterial 16S rRNA. Although it is not possible to state that it was derived from a dysbiosis situation, frequent phylum found herein matched with taxa described as commensal for the gut or skin microbiome in other mammal or *Tapirus* species.

The composition of the most frequent ASVs between samples from living and road-killed animals differed extensively as expected due to the process of

decomposition in road-killed animals. For living tapirs, diversity analyses suggest that the dominant community members are likely shared among tapirs from all groups.

Sequences from different vector-borne bacteria were found in the present study, mostly represented by Anaplasmataceae and Mycoplasmataceae families. Evidence of potential zoonotic agents, such as *Borrelia* sp. and *Bartonella* sp., was also found.

Acknowledgments

This study is part of Anna Mongruel's thesis. She is carrying out her research at Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária—Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho (UNESP/Jaboticabal) and is sponsored by a fellowship from Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP— Process #2019/26403-0 and #2022/13016-1) at the time of this study. Authors would like to thank the Lowland Tapir Conservation Initiative (LTCI)—Instituto de Pesquisas Ecológicas (IPÊ) for kindly providing the biological samples needed for the present study. The study of tapir health has been an important component of the long-term activities of the LTCI-IPÊ in Brazil. The LTCI has the institutional support from the International Union for Conservation of Nature (IUCN) Species Survival Commission (SSC) Tapir Specialist Group (TSG), Association of Zoos and Aquariums (AZA) Tapir Taxon Advisory Group (TAG), and European Association of Zoos and Aquariums (EAZA) Tapir Taxon Advisory Group (TAG). This work was supported by FAPESP - Process #2020/12037-0 and #2022/08543-2) and CNPq (National Council for Scientific and Technological Development; Productivity Grant to MRA - Process #303701/2021-8).

References

André, M.R. 2018. Diversity of Anaplasma and Ehrlichia/Neoehrlichia Agents in Terrestrial Wild Carnivores Worldwide: Implications for Human and Domestic Animal Health and Wildlife Conservation. *Front Vet Sci*, 5, 293. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00293>.

André, M.R., Adania, C.H., Machado, R.Z., Allegretti, S.M., Felipe, P.A., Silva, K.F., Nakaghi, A.C. 2010. Molecular and serologic detection of *Ehrlichia* spp. in endangered

Brazilian wild captive felids. *J Wildl Dis*, 46(3), 1017-1023. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-46.3.1017>. PMID: 20688716.

André, M.R., Dumler, J.S., Scorpio, D.G., Teixeira, R.H.F., Allegretti, S.M., Machado, R.Z. 2012. Molecular detection of tick-borne bacterial agents in Brazilian and exotic captive carnivores. *Ticks Tick-Borne Dis*, 3(4), 247-253. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2012.04.002>.

Barka, E.A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Meier-Kolthoff, J.P., Klenk, H.P., Clément, C., Ouhdouch, Y., van Wezel, G.P. 2015. Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*, 80(1), 1-43. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00019-15>.

Berlinck, C.N., Lima, L.H.A., Pereira, A.M.M., Carvalho, E.A.R. Jr., Paula, R.C., Thomas, W.M., Morato, R.G. 2021. The Pantanal is on fire and only a sustainable agenda can save the largest wetland in the world. *Braz J Biol*, 82, e244200. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.244200>.

Bosch, T.C., McFall-Ngai, M.J. 2011. Metaorganisms as the new frontier. *Zoology (Jena)*, 114(4), 185-190. <https://doi.org/10.1016/j.zool.2011.04.001>.

Bolyen, E., Rideout, J.R., Dillon, M.R., Bokulich, N.A., Abnet, C.C., Al-Ghalith, G.A., Alexander, H., Alm, E.J., Arumugam, M., Asnicar, F., Bai, Y., Bisanz, J.E., Bittinger, K., Brejnrod, A., Brislawn, C.J., Brown, C.T., Callahan, B.J., Caraballo-Rodríguez, A.M., Chase, J., Cope, E.K., Da Silva, R., Diener, C., Dorrestein, P.C., Douglas, G.M., Durall, D.M., Duvallet, C., Edwardson, C.F., Ernst, M., Estaki, M., Fouquier, J., Gauglitz, J.M., Gibbons, S.M., et al. 2019. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat Biotechnol*, 37(8), 852-857. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>.

Calchi, A.C., Vultão, J.G., Alves, M.H., Yogui, D.R., Desbiez, A.L.J., De Santi, M., Santana, M.S., da Silva, T.M.V., Werther, K., Teixeira, M.M.G., Machado, R.Z., André, M.R. 2020. *Ehrlichia* spp. and *Anaplasma* spp. in Xenarthra mammals from Brazil, with

evidence of novel 'Candidatus *Anaplasma* spp.'. *Sci Rep*, 10(1), 12615. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69263-w>.

Carter, D.O., Yellowlees, D., Tibbett, M. 2007. Cadaver decomposition in terrestrial ecosystems. *Naturwissenschaften*, 94, 12–24. <https://doi.org/10.1007/s00114-006-0159-1>.

Castillo, D.J., Rifkin, R.F., Cowan, D.A., Potgieter, M. 2019. The Healthy Human Blood Microbiome: Fact or Fiction? *Front Cell Infect Microbiol*, 9, 148. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00148>.

Chalukian, S.C., de Bustos, M.S., Lizárraga, R.L. 2013. Diet of lowland tapir (*Tapirus terrestris*) in El Rey National Park, Salta, Argentina. *Integr Zool*, 8(1), 48-56. <https://doi.org/10.1111/j.1749-4877.2012.12009.x>.

Chi, X., Gao, H., Wu, G., Qin, W., Song, P., Wang, L., Chen, J., Cai, Z., Zhang, T. 2019. Comparison of gut microbiota diversity between wild and captive bharals (*Pseudois nayaur*). *BMC Vet Res*, 15(1), 243. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-1993-7>.

Christian, N., Whitaker, B.K., Clay, K. 2015. Microbiomes: unifying animal and plant systems through the lens of community ecology theory. *Front Microbiol*, 6, 869. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00869>.

Clarke, K.R. 1993. Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. *Australian Journal of Ecology*, 18, 117-143. <https://doi.org/10.1111/j.1442-9993.1993.tb00438.x>.

Cordeiro, M.D., Bahia, M., Magalhães-Matos, P.C., Cepeda, M.B., Guterres, A., Fonseca, A.H. 2018. Morphological, molecular and phylogenetic characterization of *Borrelia theileri* in *Rhipicephalus microplus*. *Rev Bras Parasitol Vet*, 27(4), 555-561. <https://doi.org/10.1590/S1984-296120180083>.

Cullen, C.M., Aneja, K.K., Beyhan, S., Cho, C.E., Woloszynek, S., Convertino, M., McCoy, S.J., Zhang, Y., Anderson, M.Z., Alvarez-Ponce, D., Smirnova, E., Karstens,

L., Dorrestein, P.C., Li, H., Gupta, S.A., Cheung, K., Powers, J.G., Zhao, Z., Rosen, G.L. 2020. Emerging Priorities for Microbiome Research. *Front Microbiol*, 11, 136. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00136>.

D'Aquila, P., Giacconi, R., Malavolta, M., Piacenza, F., Bührle, A., Villanueva, M.M., Doll, M.E.T., Jansen, E., Grune, T., Gonos, E.S., Franceschi, C., Capri, M., Grubeck-Loebenstein, B., Sikora, E., Toussaint, O., Debaq-Chainiaux, F., Hervonen, A., Hurme, M., Slagboom, P.E., Schön, C., Bernhardt, J., Breusing, N., Passarino, G., Provinciali, M., Bellizzi, D. 2021. Microbiome in Blood Samples From the General Population Recruited in the MARK-AGE Project: A Pilot Study. *Front Microbiol*, 12, 707515. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.707515>.

Eisenhofer, R., Minich, J.J., Marotz, C., Cooper, A., Knight, R., Weyrich, L.S. 2019. Contamination in Low Microbial Biomass Microbiome Studies: Issues and Recommendations. *Trends in Microbiology*, 27(2), 105-117. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.11.003>.

Faccini-Martínez, A.A., Muñoz-Leal, S., Labruna, M.B., Angerami, R.N. 2021. Borrelioses in Brazil: Is it time to consider tick-borne relapsing fever a neglected disease in Brazil? *Rev Soc Bras Med Trop*, 54, e0443. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0443-2021>.

Faccini-Martínez, A.A., Silva-Ramos, C.R., Santodomingo, A.M., Ramírez-Hernández, A., Costa, F.B., Labruna, M.B., Muñoz-Leal, S. 2022. Historical overview and update on relapsing fever group *Borrelia* in Latin America. *Parasit Vectors*, 15(1), 196. <https://doi.org/10.1186/s13071-022-05289-5>.

Fernandes-Santos, R.C., Medici, E.P., Testa-José, C., Micheletti, T. 2020. Health assessment of wild lowland tapirs (*Tapirus terrestris*) in the highly threatened Cerrado Biome, Brazil. *J Wildl Dis*, 56(1), 34-46. PMID: 31526278.

Florin, T.A., Zaoutis, T.E., Zaoutis, L.B. Beyond cat scratch disease: widening spectrum of *Bartonella henselae* infection. *Pediatrics*, 121(5), e1413-25. <https://doi.org/10.1542/peds.2007-1897>.

Fronton, F., Ferchiou, S., Caza, F., Villemur, R., Robert, D., St-Pierre, Y. Insights into the circulating microbiome of Atlantic and Greenland halibut populations: the role of species-specific and environmental factors. *Sci Rep*, 13(1), 5971, 2023. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-32690-6>.

Galan, M., Razzauti, M., Bard, E., Bernard, M., Brouat, C., Charbonnel, N., Dehne-Garcia, A., Loiseau, A., Tatard, C., Tamisier, L., Vayssier-Taussat, M., Vignes, H., Cosson, J.F. 16S rRNA Amplicon Sequencing for Epidemiological Surveys of Bacteria in Wildlife. *mSystems*, 1(4), e00032-16, 2016. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00032-16>.

García, M.J., Medici, E.P., Naranjo, E.J., Novarino, W., Leonardo, R.S. 2012. Distribution, habitat and adaptability of the genus *Tapirus*. *Integr Zool*, 7(4), 346-355. <https://doi.org/10.1111/j.1749-4877.2012.00317.x>.

García, M., Jordan, C., O'Farril, G., Poot, C., Meyer, N., Estrada, N., Leonardo, R., Naranjo, E., Simons, Á., Herrera, A., Urgilés, C., Schank, C., Boshoff, L. & Ruiz-Galeano, M. 2016. *Tapirus bairdii*. *The IUCN Red List of Threatened Species* 2016: e.T21471A45173340. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-1.RLTS.T21471A45173340.en>. (accessed on 29 May 2024).

Gavish, Y., Kedem, H., Messika, I., Cohen, C., Toh, E., Munro, D., Dong, Q., Fuqua, C., Clay, K., Hawlena, H. 2014. Association of host and microbial species diversity across spatial scales in desert rodent communities. *PLoS One*, 9(10), e109677. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109677>.

Gibson, K.M., Nguyen, B.N., Neumann, L.M., Miller, M., Buss, P., Daniels, S., Ahn, M.J., Crandall, K.A., Pukazhenthil, B. 2019. Gut microbiome differences between wild and captive black rhinoceros – implications for rhino health. *Sci Rep*, 9, 7570. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43875-3>.

Goraya, M.U., Li, R., Mannan, A., Gu, L., Deng, H., Wang, G. 2022. Human circulating bacteria and dysbiosis in non-infectious diseases. *Front Cell Infect Microbiol*, 12, 932702. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.932702>.

Gupta, R.S., Nanda, A., Khadka, B. Novel molecular, structural and evolutionary characteristics of the phosphoketolases from bifidobacteria and Coriobacteriales. *PLoS One*, 12(2), e0172176. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172176>.

Hauther, K.A., Cobaugh, K.L., Jantz, L.M., Sparer, T.E., DeBruyn, J.M. 2015. Estimating Time Since Death from Postmortem Human Gut Microbial Communities. *Journal of Forensic Sciences*, 60, 1234-1240. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.12828>.

Herlemann, D.P., Labrenz, M., Jürgens, K., Bertilsson, S., Waniek, J.J., Andersson, A.F. 2011. Transitions in bacterial communities along the 2000km salinity gradient of the Baltic Sea. *The ISME Journal*, 5, 1571–1579. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.41>.

Huynh, U., Zastrow, M.L. 2023. Metallobiology of Lactobacillaceae in the gut microbiome. *J Inorg Biochem*, 238, 112023. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2022.112023>.

Illumina. 2013. 16S Metagenomic Sequencing Library; Illumina: San Diego, CA, USA. Available online: https://emea.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomiclibrary-prep-guide-15044223-b.pdf (Accessed on 2023 September 15th).

Jonge, N., Carlsen, B., Christensen, M.H., Pertoldi, C., Nielsen, J.L. 2022. The Gut Microbiome of 54 Mammalian Species. *Front Microbiol*, 13, 886252. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.886252>.

Labruna, M.B., Martins, T.F., Acosta, I.C.L., Serpa, M.C.A., Soares, H.S., Teixeira, R.H.F., Fernandes-Santos, R.C., Medici, E.P. 2021. Ticks and rickettsial exposure in

lowland tapirs (*Tapirus terrestris*) of three Brazilian biomes. *Ticks Tick Borne Dis*, 12(3), 101648. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2021.101648>.

LASA/UFRJ-Laboratório de Aplicações de Satélites Ambientais do Departamento de Meteorologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Área Queimada–Pantanal 2020. Available online: <https://lasa.ufrj.br/noticias/area-queimada-pantanal-2020/> (accessed on 23 May 2023).

Lizcano, D.J., Amanzo, J., Castellanos, A., Tapia, A. & Lopez-Malaga, C.M. 2016. *Tapirus pinchaque*. *The IUCN Red List of Threatened Species* 2016: e.T21473A45173922. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.20161.RLTS.T21473A45173922.en>. (accessed on 29 May 2024).

Lopes, F.A., Rezende, J., Silva, D.B.D.S., Alves, F.C.G., Oliveira, C.E., Costa, I.P.D. 2017. Molecular evidence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in patients in Brazilian central-western region. *Rev Bras Reumatol Engl*, 57(6), 641-645. <https://doi.org/10.1016/j.rbre.2017.05.001>.

Machado, R.Z., André, M.R., Werther, K., de Sousa, E., Gavioli, F.A., Alves Junior JR. 2012. Migratory and carnivorous birds in Brazil: reservoirs for *Anaplasma* and *Ehrlichia* species? *Vector Borne Zoonotic Dis*, 12(8), 705-8. <https://doi.org/10.1089/vbz.2011.0803>.

Makgabo, M.S., Brayton, K.A., Oosthuizen, M.C., Collins, N.E. 2023. Unravelling the diversity of *Anaplasma* species circulating in selected African wildlife hosts by targeted 16S microbiome analysis. *Current Research in Microbial Sciences*, 5, 100198. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2023.100198>.

Mann, M.B., Prichula, J., Castro, M.S., Severo, J.M., Abadie, M., De Freitas, T.M.L., Caorsi, V., Borges-Martins, M., Frazzon, J., Frazzon, A.P.G. 2021. The Oral Bacterial Community in *Melanophryniscus admirabilis* (Admirable Red-Belly Toads): Implications for Conservation. *Microorganisms*, 9(2), 220. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9020220>.

Martins, J.R., Ceresér, V.H., Côrrea, B.L., Smith, R.D. 1996. *Borrelia theileri*: observação em carrapatos do gênero *Boophilus microplus* no município de Guaíba, RS, Brasil. *Ciência Rural*, 26(3). <https://doi.org/10.1590/S0103-84781996000300018>.

McDonald, D., Price, M.N., Goodrich, J., Nawrocki, E.P., DeSantis, T.Z., Probst, A., Andersen, G.L., Knight, R., Hugenholtz, P. 2012. An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. *ISME J*, 6, 610-618. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.139>.

McMurdie PJ, Holmes S. phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS One*, 8(4), e61217. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>.

Medici, E.P., Flesher, K., Beisiegel, B.M., Keuroghlian, A., Desbiez, A.L.J., Gatti, A., Pontes, A.R.M., Campos, C.B., Tofoli, C.F., Moares Junior, E.A., Azevedo, F.C., Pinho, G.M., Cordeiro, J.L.P., Santos Junior, T.S., Moraes, A.A., Mangini, P.R., Rodrigues, L.F., Almeida, L.B. 2012. Avaliação do Risco de Extinção da Anta Brasileira *Tapirus terrestris* Linnaeus, 1758, no Brasil. *Biodivers Bras*, (3), 103-116. <https://doi.org/10.37002/biobrasil.v%25vi%25i.243>.

Medici, E.P. 2011. Family Tapiridae (Tapirs), in: Wilson, D.E.; Mittermeier, R.A. (Eds.), *Handbook of the Mammals of the World*, 1st ed., Lynx Edicions, Barcelona, p. 886.

Messick, J.B. 2014. Hemotrophic mycoplasmas (hemoplasmas): a review and new insights into pathogenic potential. *Vet Clin Pathol*, 33(1), 2-13. <https://doi.org/10.1111/j.1939-165x.2004.tb00342.x>.

Mohamed WMA, Ali AO, Mahmoud HYAH, Omar MA, Chatanga E, Salim B, Naguib D, Anders JL, Nonaka N, Moustafa MAM, Nakao R. 2021. Exploring Prokaryotic and Eukaryotic Microbiomes Helps in Detecting Tick-Borne Infectious Agents in the Blood of Camels. *Pathogens*, 10(3), 351. <https://doi.org/10.3390/pathogens10030351>.

Molist, F., Manzanilla, E., Pérez, J., Nyachoti, C. 2012. Coarse, but not finely ground, dietary fibre increases intestinal Firmicutes:Bacteroidetes ratio and reduces diarrhea

induced by experimental infection in piglets. *British Journal of Nutrition*, (108)1, 9-15. <https://doi.org/10.1017/S0007114511005216>.

Mongruel, A.C., Benevenuto, J.L., André, M.R., Carrasco, A.O., Machado, R.Z., Seki, M.C. 2017a. Molecular Characterization of *Anaplasma* sp. in Free-Living Gray Brockets (*Mazama gouazoubira*). *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 17(3), 165-171. <https://doi.org/10.1089/vbz.2016.2026>.

Mongruel, A.C.B., Benevenuto, J.L., Ikeda, P., André, M.R., Machado, R.Z., Carrasco, A.O.T., Seki, M.C. 2017b. Detection of *Anaplasma* sp. phylogenetically related to *A. phagocytophilum* in a free-living bird in Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet.*, 26(4), 505-510. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612017042>.

Mongruel, A.C.B., Medici, E.P., Canena, A.C., Calchi, A.C., Machado, R.Z., André, M.R. 2022. Expanding the universe of hemoplasmas: Multi-locus sequencing reveals putative novel species of hemoplasmas in lowland tapirs (*Tapirus terrestris*), the largest land mammals in Brazil. *Microorganisms*, 10(3). <https://doi.org/10.3390/microorganisms10030614>.

Mongruel, A.C.B., Medici, E.P., Canena, A.C., Dias, C.M., Machado, R.Z., André, M.R. 2023. Molecular evidence of *Bartonella* spp. in wild lowland tapirs (*Tapirus terrestris*), the largest land mammals in Brazil. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 101, 102042. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2023.102042>.

Oksanen, J., Blanchet, G.F., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlenn, D., Minchin, P.R., O'Hara, R.B., Simpson, G.L., Solymos, P., Stevens, M.H.M., Szoecs, E., Wagner, H. 2013. Package 'vegan'. Community ecology package, version 2.9.

Olomu, I.N., Pena-Cortes, L.C., Long, R.A., Vyas, A., Krichevskiy, O., Luellwitz, R., Singh, P., Mulks, M.H. 2020. Elimination of "kitome" and "splashome" contamination results in lack of detection of a unique placental microbiome. *BMC Microbiol.*, 20(1), 157. <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01839-y>.

Paula, W.V.F., Neves, L.C., de Paula, L.G.F., Serpa, M.C.A., de Oliveira, F.P., Dantas-Torres, F., Muñoz-Leal, S., Labruna, M.B., Krawczak, F.D.S. 2023. First molecular

detection of *Borrelia theileri* subclinical infection in a cow from Brazil. *Vet. Res. Commun.*, 47(2), 963-967. <https://doi.org/10.1007/s11259-022-10020-x>.

Petrosino, J.F., Highlander, S., Luna, R.A., Gibbs, R.A., Versalovic, J. 2009. Metagenomic pyrosequencing and microbial identification. *Clin. Chem.*, 55(5), 856-66. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.107565>.

Ran, J., Wan, Q.H., Fang, S.G. 2021. Gut microbiota of endangered crested ibis: Establishment, diversity, and association with reproductive output. *PLoS One*, 16(4), e0250075. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0250075>.

Rizzatti, G., Lopetuso, L.R., Gibiino, G., Binda, C., Gasbarrini, A. 2017. Proteobacteria: A Common Factor in Human Diseases. *Biomed Res Int.*, 9351507. <https://doi.org/10.1155/2017/9351507>.

Rodrigues, L.S.R. 2007. *Fauna do Paraná em Extinção*. 1. Ed. Curitiba: Instituto Ambiental do Paraná (IAP).

Rojas-Jaimes J, Lindo-Seminario D, Correa-Núñez G, Diringer B. 2022. Characterization of the bacterial microbiome of *Amblyomma scalpturatum* and *Amblyomma ovale* collected from *Tapirus terrestris* and *Amblyomma sabanerae* collected from *Chelonoidis denticulata*, Madre de Dios-Peru. *BMC Microbiol.*, 22(1), 305. <https://doi.org/10.1186/s12866-022-02717-5>.

Paster, B.J., Dewhirst, F.E. 2000. Phylogenetic foundation of spirochetes. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 2(4), 341-4. PMID: 11075904.

Paisse, S., Valle, C., Servant, F., Courtney, M., Burcelin, R., Amar, J., Lelouvier, B. 2015. Comprehensive description of blood microbiome from healthy donors assessed by 16S targeted metagenomic sequencing. *Transfusion.*, 55(5), 1138-47. <https://doi.org/10.1111/trf.13477>.

Perles, L., Herrera, H.M., Barreto, W.T.G., de Macedo, G.C., Calchi, A.C., Machado, R.Z., André, M.R. 2022. Multi-Locus Sequencing Reveals Putative Novel Anaplasmataceae Agents, 'Candidatus *Ehrlichia dumleri*' and *Anaplasma* sp., in Ring-

Tailed Coatis (Carnivora: *Nasua nasua*) from Urban Forested Fragments at Midwestern Brazil. *Microorganisms.*, 10(12), 2379. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10122379>.

Petersen, C., Round, J.L. 2014. Defining dysbiosis and its influence on host immunity and disease. *Cell Microbiol.*, 16(7), 1024-33. <https://doi.org/10.1111/cmi.12308>.

Preiswerk, D., Walser, J.C., Ebert, D. 2018. Temporal dynamics of microbiota before and after host death. *ISME Journal*, 12, 2076–2085. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0157-2>.

Sacchi, A.B.V., André, M.R., Calchi, A.C., de Santi, M., Guimarães, A., Pires, J.R., Baldani, C.D., Werther, K., Machado, R.Z. 2021. Molecular and serological detection of arthropod-borne pathogens in carnivorous birds from Brazil. *Vet. Parasitol. Reg. Stud. Reports.*, 23, 100539. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2021.100539>.

Sacchi, A.B., Duarte, J.M., André, M.R., Machado, R.Z. 2012. Prevalence and molecular characterization of Anaplasmataceae agents in free-ranging Brazilian marsh deer (*Blastocerus dichotomus*). *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 35(4), 325-34. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2012.02.001>.

Soares, H.S., Marcili, A., Barbieri, A.R.M., Minervino, A.H.H., Malheiros, A.F., Gennari, S.M., Labruna, M.B. 2017. Novel *Anaplasma* and *Ehrlichia* organisms infecting the wildlife of two regions of the Brazilian Amazon. *Acta Trop.*, 174, 82-87. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.07.006>.

Tan, C.C.S., Ko, K.K.K., Chen, H., Liu, J., Loh, M., SG10K_Health Consortium, Chia, M., Nagarajan, N. 2023. No evidence for a common blood microbiome based on a population study of 9,770 healthy humans. *Nature Microbiol.*, 8, 973–985. <https://doi.org/10.1038/s41564-023-01350-w>.

Tang, S., Li, Y., Huang, C., Yan, S., Li, Y., Chen, Z., Wu, Z. 2022. Comparison of Gut Microbiota Diversity Between Captive and Wild Tokay Gecko (*Gekko gecko*). *Front Microbiol.*, 13, 897923. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.897923>.

Traeholt, C., Novarino, W., bin Saaban, S., Shwe, N.M., Lynam, A., Zainuddin, Z., Simpson, B. & bin Mohd, S. 2016. *Tapirus indicus*. *The IUCN Red List of Threatened Species* 2016: e.T21472A45173636. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-1.RLTS.T21472A45173636.en>. (accessed on 29 May 2024).

Trevisan, G., Cinco, M., Trevisini, S., di Meo, N., Ruscio, M., Forgione, P., Bonin, S. 2021. *Borreliae* Part 2: *Borrelia* Relapsing Fever Group and Unclassified *Borrelia*. *Biology (Basel)*, 10(11), 1117. <https://doi.org/10.3390/biology10111117>.

Varela, D., Flesher, K., Cartes, J.L., de Bustos, S., Chalukian, S., Ayala, G., Richard-Hansen, C. 2019. *Tapirus terrestris*. *The IUCN Red List of Threatened Species*, e.T21474A45174127. <https://doi.org/10.2305/IUCN.UK.2019-1.RLTS.T21474A45174127.en>.

Paniagua-Voirol, L.R., Valsamakis, G., Yu, M., Johnston, P.R., Hilker, M. 2021. How the 'kitome' influences the characterization of bacterial communities in lepidopteran samples with low bacterial biomass. *J Appl Microbiol.*, 130(6), 1780-1793. <https://doi.org/10.1111/jam.14919>.

West, A.G., DeLaunay, A., Marsh, P., Perry, E.K., Jolly, M., Gartrell, B.D., Pas, A., Digby, A., Taylor, M.W. 2022. Gut microbiota of the threatened takahē: biogeographic patterns and conservation implications. *Anim. Microbiome.*, 4(1), 11. <https://doi.org/10.1186/s42523-021-00158-5>.

Werther, K., Luzzi, M.C., Gon.alves, L.R., Oliveira, J.P., Alves Junior, J.R.F., Machado, R.Z., Andr., M.R. 2017. Arthropod-borne agents in wild Orinoco geese (*Neochen jubata*) in Brazil. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 55, 30-41. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2017.09.003>.

Whittle, E., Leonard, M.O., Harrison, R., Gant, T.W., Tonge, D.P. 2019. Multi-Method Characterization of the Human Circulating Microbiome. *Front Microbiol.*, 9, 3266. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03266>.

Weyrich, L.S., Farrer, A.G., Eisenhofer, R., Arriola, L.A., Young, J., Selway, C.A., Handsley-Davis, M., Adler, C.J., Breen, J., Cooper, A. 2019. Laboratory contamination over time during low-biomass sample analysis. *Mol Ecol Resour.*, 19(4), 982-996. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13011>.

Yanez-Montalvo, A., Gaona, O., Águila, B., Arias-Dominguez, N., Falcon, L.I., Pérezs-Flores, J. 2021. *Tapirus bairdii*-Associated Fecal Microbiome from a Critical Conservation Area: Calakmul, México. *Curr. Microbiol.*, 78, 2648–2659. <https://doi.org/10.1007/s00284-021-02531-8>.