



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ANA CLÉCIA DOS SANTOS SILVA

**PATÓGENOS DE INTERESSE EM SAÚDE ÚNICA
TRANSMITIDOS POR CARRAPATOS EM GAMBÁS-DE-
ORELHA-BRANCA (*Didelphis albiventris*) EM ALAGOAS,
NORDESTE DO BRASIL**

ANA CLÉCIA DOS SANTOS SILVA

**PATÓGENOS DE INTERESSE EM SAÚDE ÚNICA
TRANSMITIDOS POR CARRAPATOS EM GAMBÁS-DE-
ORELHA-BRANCA (*Didelphis albiventris*) EM ALAGOAS,
NORDESTE BRASIL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. João Luis Garcia

Londrina
2024

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

A532p Santos Silva, Ana Clécia.

PATO?GENOS DE INTERESSE EM SAÚDE ÚNICA TRANSMITIDOS POR CARRAPATOS EM GAMBA?S-DE-ORELHA-BRANCA (*Didelphis albiventris*) EM ALAGOAS, NORDESTE BRASIL / Ana Clécia Santos Silva. - Londrina, 2024.
58 f.

Orientador: João Luis Garcia.

Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2024.

Inclui bibliografia.

1. Patógenos transmitidos por Carrapatos em *Didelphis albiventris* - Tese. I. Garcia, João Luis. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

CDU 619

ANA CLECIA DOS SANTOS SILVA

**PATÓGENOS DE INTERESSE EM SAÚDE ÚNICA
TRANSMITIDOS POR CARRAPATOS EM GAMBÁS-DE-
ORELHA-BRANCA (*Didelphis albiventris*) EM ALAGOAS,
NORDESTE DO BRASIL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Philippe Vieira Alves
Universidade Estadual Paulista - UNESP

Prof. Dr. Rafael Felipe da Costa Vieira
University of North Carolina at Charlotte –
UNC Charlotte

Prof. Dr. Luiz Daniel de Barros
Universidade Federal de Lavras - UFLA

Prof. Dr. Fernando de Souza Rodrigues
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 16 de agosto de 2024.

SILVA, Ana Clécia dos Santos. **Patógenos de interesse em Saúde Única transmitidos por carrapatos em gambás-de-orelha-branca (*Didelphis albiventris*) em Alagoas, nordeste do Brasil**. 2024. 56f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2024.

RESUMO

O conceito de Saúde Única destaca-se pelos seus esforços em enfrentar desafios com uma perspectiva que compreende e conecta vários aspectos entre saúde, zoonoses e meio ambiente, e patógenos transmitidos por carrapatos estão diretamente envolvidos nesse conceito. *Ehrlichia* sp. e Piroplasmas, ambos com potencial zoonótico, são detectados em várias espécies animais, incluindo *Didelphis albiventris*. Portanto, este trabalho tem como objetivo estudar a ocorrência de patógenos transmitidos por carrapatos em *D. albiventris* de Alagoas, nordeste do Brasil, com objetivos específicos de caracterizar molecularmente *Ehrlichia* sp. e Piroplasmas desses animais. Foram coletadas 30 amostras de sangue de *D. albiventris* anestesiados com ketamina (10 mg/kg) e xilazina (2 mg/kg) aplicadas via intramuscular. A extração de DNA foi realizada usando um kit comercial. Todas as amostras foram triadas para *Ehrlichia* sp. e Piroplasmas. Para *Ehrlichia* sp., a triagem foi realizada pelo gene 16S seguido de *dsb* para sequenciamento por Oxford Nanopore e amostras positivas foram submetidas a uma PCR do gene *groEL* para sequenciamento por Sanger. Para Piroplasma, foi realizada uma PCR para o gene 18S e sequenciamento por Sanger. Sequências *consensus* foram geradas para análises filogenéticas pelo sequenciamento de Sanger. Dos 30 animais, 19/30 (63,33%) eram machos e 11/30 (36,66%) fêmeas. 23/30 (76,6%; IC 95%: 59,07 – 88,21%) testaram Anaplasmapaceae-positivo pelo ensaio de PCR do gene 16S, 24/30 (80%; IC 95%: 62,69 - 90,49%) testaram positivo para *Ehrlichia* pelo gene *dsb*. Todas as 24 amostras também testaram positivo na PCR do gene *groEL* e sete amplicons foram sequenciados. Quatro das 30 amostras (13,33%; IC 95%: 5,31 - 29,62%) testaram positivo para Piroplasma pelo ensaio de PCR do gene 18S, e todos os quatro amplicons foram sequenciados. As sequências de 18S de Piroplasma obtidas foram agrupadas em uma politomia com sequências de Piroplasma de marsupiais do Brasil. Até o momento, isso representa a primeira detecção molecular com dados de sequenciamento de *Babesia* sp. em *D. albiventris* do nordeste do Brasil, reforçando ainda mais a existência do clado de Piroplasma "South American Marsupialia". O sequenciamento do gene *groEL* confirmou que os *D. albiventris* estavam infectados por uma possível nova espécie de *Ehrlichia* sp. e todas as sequências estavam em uma politomia, em um clado exclusivo. Estudos futuros devem focar em possíveis carrapatos vetores e se esse novo agente ehrlichial pode causar doença clínica em populações de gambás. Este estudo também fornece o primeiro relato da ocorrência de *Babesia* sp. em *D. albiventris* no nordeste do Brasil, e esses dados servem de base para pesquisas futuras para esclarecer melhor a circulação de Piroplasmas não apenas no país e em toda a América do Sul.

Palavras-chave: Ehrliquiose. Piroplasmose. Doenças transmitidas por carrapatos. Zoonose. Gambá.

SILVA, Ana Clécia dos Santos. **Tick-borne pathogens of One Health concern in white-eared opossums (*Didelphis albiventris*) in Alagoas, northeastern Brazil.** 2024. 56pp. Thesis (Doctorate in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2024.

ABSTRACT

The concept of One Health stands out for its efforts in addressing challenges with a perspective that understands and connects various aspects between health, zoonoses and the environment, and tick-borne pathogens are directly involved in this concept. *Ehrlichia* sp. and Piroplasms, both with zoonotic potential, are detected in various animal species, including *Didelphis albiventris*. Therefore, this work aims to study the occurrence of tick-borne pathogens in *D. albiventris* from Alagoas, northeast Brazil, with specific objectives to molecularly characterize *Ehrlichia* sp. and Piroplasms from these animals. 30 blood samples were collected from *D. albiventris* anesthetized by ketamine (10 mg/kg) and xylazine (2 mg/kg) were administered intramuscularly. DNA extraction was performed using a commercial kit. All samples were screened for *Ehrlichia* sp. and Piroplasms. From 30 animals, 19/30 (63.33%) were male and 11/30 (36.66%) female. To *Ehrlichia* sp. the PCR reaction was by *dsb* gene and positive samples were to a PCR of the *groEL* gene to sequencing. To Piroplasm a PCR to 18S gene was conducted and positive samples were sent for sequencing. Consensus sequences were produced for phylogenetic analyses. Were tested piroplasm-positive by the 18S gene PCR assay four/30 (13.33%, 95% CI 5.31-29.62%), and all four amplicons were sequenced. The Piroplasm 18S sequences obtained were found to be grouped into a polytomy with Piroplasms sequences from marsupials from Brazil. This represents the initial molecular detection with sequencing data of *Babesia* sp. in *D. albiventris* from northeastern Brazil, further reinforcing the existence of the Piroplasmid clade "South American Marsupialia". The *groEL* gene fragment confirmed the *D. albiventris* opossums were infected by a putative new *Ehrlichia* sp. species and all sequences were into a polytomy, in an exclusive clade. Further studies should focus on putative tick vectors and whether this novel ehrlichial agent may cause clinical disease in opossum populations. And this study provides the first report of the occurrence of *Babesia* sp. in *D. albiventris* in Northeastern, Brazil, and these data serve as a basis for future research to better clarify the circulation of Piroplasmids not only in the country but also in South America.

Key-words: Ehrlichiosis. Piroplasmosis. Tick-borne disease. Zoonosis. Opossum.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Mórula de *E. ewingii* presente em um granulócito de esfregaço sanguíneo de um paciente humano em aumento original de 300x 17
- Figura 2** – Merozoítos de *Babesia canis* em eritrócitos de esfregaço sanguíneo de um cão infectado. 18

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>groEL</i>	heat shock protein <i>groEL</i> gene
UEL	Universidade Estadual de Londrina
NCBI	National Center for Biotechnology Information

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1	DOENÇAS TRANSMITIDAS POR CARRAPATOS E SUA RELAÇÃO COM A SAÚDE ÚNICA.....	15
2.2	DOENÇAS TRANSMITIDAS POR CARRAPATOS EM GAMBÁS.....	16
2.2.2	<i>Ehrlichia</i> sp.	17
2.2.2	Piroplasmas.....	18
2.3	DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE DOENÇAS TRANSMITIDAS POR CARRAPATOS EM GAMBÁS NO BRASIL E SUA IMPORTÂNCIA PARA A SAÚDE ÚNICA	19
3	REFERÊNCIAS.....	20
4	HIPÓTESE	26
5.	OBJETIVOS	27
5.1	OBJETIVO GERAL.....	27
5.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
6	ARTIGO A – <i>EHRlichia</i> SP. IN WHITE-EARED OPOSSUMS (<i>DIDELPHIS ALBIVENTRIS</i>) FROM ALAGOAS, NORTHEASTERN BRAZIL.....	28
7	ARTIGO B – PIROPLASM IN WHITE-EARED OPOSSUMS (<i>Didelphis Albiventris</i>) FROM ALAGOAS, NORTHEASTERN BRAZIL	45
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS/CONCLUSÃO	58
9	ANEXOS.....	59

1 INTRODUÇÃO

O conceito de Saúde Única se destaca por seus esforços no enfrentamento de desafios com uma perspectiva que compreende e conecta diversos aspectos entre saúde, ambiente e zoonoses (Atlas, 2012; Shaheen, 2022). Os patógenos transmitidos por carrapatos estão diretamente envolvidos nesse conceito e a proliferação desses vetores tem se intensificado impulsionados por mudanças climáticas, atividades humanas, uso da terra e fatores diversos, trazendo consigo o aumento da propagação de doenças bacterianas por eles transmitidas (Gilbert, 2021; Madison-Antenucci et al., 2020).

Com essa conexão direta entre zoonoses e Saúde Única, animais com comportamento sinantrópico tem um papel fundamental no esclarecimento de aspectos de saúde e doença, e os *Didelphis albiventris* são animais que exemplificam com maestria a definição de sinantrópico pois são muito bem adaptados ao meio urbano e silvestre, além de contar com diversas espécies, sendo quatro documentadas na América do Sul *D. albiventris*, *D. aurita*, *D. imperfecta*, and *D. marsupialis* (Bezerra-Santos et al., 2020; Do Nascimento & Horta, 2014). Estes animais são potenciais hospedeiros ou reservatórios para vários patógenos transmitidos por vetores (Carreira et al., 2012; Da Silva et al., 2017; Horta et al., 2009; Maurício C. Horta et al., 2009; Zecca et al., 2020), incluindo aqueles transmitidos por carrapatos (Horta et al., 2007; Miziara et al., 2008; Muller et al., 2005).

Ehrlichia sp. e Piropasmas, ambos com potencial zoonótico são detectados em diversas espécies animais, inclusive gambás. Diante disso, este trabalho teve como objetivo geral investigar a ocorrência de patógenos transmitidos por carrapato em *D. albiventris* de Alagoas, nordeste do Brasil, especificamente caracterizar molecularmente *Ehrlichia* spp. e Piropasmas oriundos desses animais.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 DOENÇAS TRANSMITIDAS POR CARRAPATOS E SUA RELAÇÃO COM A SAÚDE ÚNICA

O conceito de Saúde Única não é recente, vem sendo discutido a cerca de 200 anos estabelecendo ligações entre a saúde humana, animal e ambiental (Atlas, 2012; Shaheen, 2022). Este conceito, se destaca como pioneiro nos esforços para enfrentar os desafios de saúde por meio de uma perspectiva abrangente e conectada, e as zoonoses sinantrópicas estão totalmente inseridas nesse contexto (Atlas, 2012).

Dentro deste cenário, é importante ressaltar que os patógenos transmitidos por carrapatos tem distribuição cosmopolita, e que a proliferação de espécies de carrapatos, impulsionada por diferentes aspectos como mudanças climáticas, atividade humana no uso da terra, populações de vetores, crescimento populacional e em vários outros fatores, contribuíram para a propagação de doenças bacterianas transmitidas por carrapatos (Gilbert, 2021; Madison-Antenucci et al., 2020). À medida que as populações de carrapatos vêm aumentando significativamente, expandindo seus territórios para novas localidades e trazendo consigo agentes patogênicos, torna-se crucial compreender os mecanismos de transmissão e do hospedeiro, além de acompanhar diligentemente o surgimento de patógenos novos e existentes (Gilbert, 2021).

Outra questão diretamente relacionada as doenças transmitidas por carrapatos é o bioma. A região nordeste do Brasil é coberta por Caatinga, Mata Atlântica, Cerrado e Amazônia (Puentes & Riet-Correa, 2023), mais especificamente, o estado de Alagoas apresenta dois diferentes biomas, Caatinga (clima seco, tropical semiárido) e Mata Atlântica (tropical e úmido) (MMA, 2024). Dentro dessas circunstâncias, os efeitos da sazonalidade devem ser considerados ao observar a complexidade dos ciclos de agentes envolvendo carrapatos e animais silvestres (Campbell-Lendrum et al., 2015; Nogueira et al., 2022). Esses fatores estão diretamente ligados a dinâmica do ciclo dos carrapatos e consequentemente, no comportamento dos agentes que eles abrigam (El-Sayed et al., 2020).

Aliada à expansão das populações de carrapatos para novas localidades, a crescente incidência de doenças transmitidas por estes vetores em todo

o mundo merece atenção por parte de pesquisadores e profissionais da saúde (Rochlin & Toledo, 2020). Carrapatos são considerados o segundo vetor mais comum de patógenos causadores de doenças em humanos, ficando atrás apenas dos mosquitos (Parola & Raoult, 2001). Dentre os agentes transmitidos por carrapatos podemos citar vírus de diferentes famílias (Flaviviridae, Orthomyxoviridae, Reoviridae), diferentes gêneros de bactérias (*Borrelia*, *Rickettsia*, *Ehrlichia*. e *Anaplasma*) e Piroplasmas (*Theileria* e *Babesia*) (Kernif et al., 2016; Rochlin & Toledo, 2020).

Com os avanços em técnicas de Biologia Molecular, a descrição de potenciais novas espécies de parasitos e bactérias transmitidas por carrapatos tem se intensificado desde o início do século XXI, e dentre esses podemos citar *Ehrlichia* spp. e *Babesia* spp. que são focos dessa tese. Os agentes causadores de borrelioses, erliquioses, anaplasmoses e riquetsioses em alguns casos foram identificados em carrapatos antes mesmo que fosse estabelecida a relação causal com a doença (Parola & Raoult, 2001; Platonov et al., 2011).

2.2 DOENÇAS TRANSMITIDAS POR CARRAPATOS EM GAMBÁS

O gênero *Didelphis* definido por Linnaeus (Linnaeus, 1758), possui quatro espécies conhecidas na América do Sul, são elas *D. albiventris*, *D. aurita*, *D. imperfecta*, e *D. marsupialis* (Bezerra-Santos et al., 2020; Do Nascimento & Horta, 2014). No nordeste do Brasil, três dessas espécies foram relatadas, *D. albiventris*, *D. marsupialis* e *D. aurita* (Assis, 2011; Nascimento, 2015).

A interação entre espécies de *Didelphis* e o humano pode apresentar-se através da prática da caça para o consumo de carne ou a obtenção de produtos terapêuticos, reflexos de um hábito cultural presente em comunidades tradicionais do Brasil (Kuhnen et al., 2017).

Esses animais apresentam uma grande capacidade adaptativa que aliada ao seu comportamento sinantrópico os tornam importantes hospedeiros para diversos parasitos e bactérias já relatados nesses animais como helmintos (Bezerra-Santos et al., 2020), carrapatos (Horta et al., 2007; Miziara et al., 2008; Muller et al., 2005), e vários agentes transmitidos por vetores (Carreira et al., 2012; Da Silva et al., 2017; Horta et al., 2009; Zecca et al., 2020).

2.2.1 *Ehrlichia* spp.

Ehrlichia spp. são bactérias com potencial zoonótico transmitidas por carrapatos, intracelular obrigatórias que infectam leucócitos de diversas espécies de mamíferos domésticos e silvestres (Muraro et al., 2021; Vieira et al., 2011). Oito espécies de *Ehrlichia* sp. estão identificadas e cadastradas no banco de dados taxonômicos do NCBI, *E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *E. japonica*, *E. muris*, *E. ruminantium*, *E. ovina* e *E. minasensis* (Schoch et al., 2020).

Figura 1 – Mórula de *E. ewingii* presente em um granulócito de esfregaço sanguíneo de um paciente humano em aumento original de 300x.



Fonte: Hamilton et al. 2004

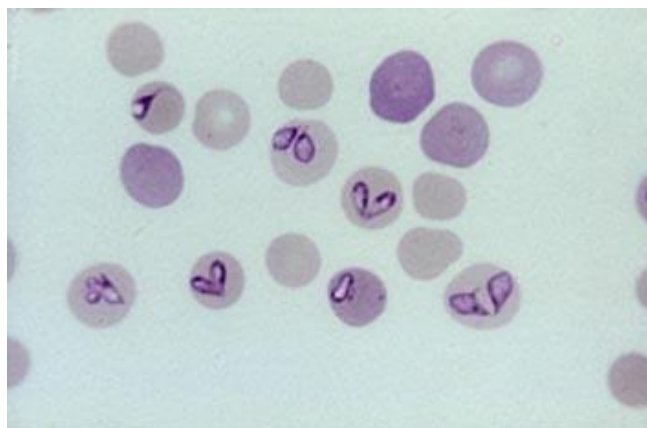
Essas bactérias vêm sendo descritas com potenciais novas espécies em cavalos (O'Nion et al., 2015; Vieira et al., 2016; Vieira et al., 2018), capivaras (Vieira et al., 2022), raposas (Almeida et al., 2013), pinguins (Muñoz-Leal et al., 2019) preguiça e javalis (Soares et al., 2017), roedores (Zhao et al., 2021), bem como em diferentes espécies de gambás no Brasil (*Didelphis albiventris* e *Gracilinanus agilis*) (André et al., 2022; Braga et al., 2023; de Oliveira et al., 2020; Guimarães et al., 2019; Lopes et al., 2018; Orozco et al., 2022), e Argentina (*D. albiventris*) (Tarragona et al., 2022). Esses relatos servem como base para futuras caracterizações mais detalhadas para uma definição de espécies.

2.2.2 Piroplasmas

Os Piroplasmas (Apicomplexa, Piroplasmida), são parasitos protozoários intra eritrocíticos que afetam animais selvagens, domésticos, e até mesmo os humanos, e dentre os vários gêneros presentes, destacam-se *Babesia*, *Theileria* e *Cytauxzoon* (Schoch et al., 2020). O grupo Piroplasmida recebe esse nome

1 devido aos estágios intra-eritrocíticos em formato de pêra (piriforme), indicando
2 parasitos intracelulares. Esses parasitos são transmitidos exclusivamente por
3 carrapatos duros (Ixodidae), conforme destacado por Mehlhorn & Schein (1993).

4
5 **Figura 2:** *Babesia canis* em eritrócitos de esfregaço sanguíneo de um
6 cão infectado.



7
8 **Fonte:** Mehlhorn, 2008.
9

10 Piroplasmas foram descritos pela primeira vez em *D. marsupialis* no
11 Brasil em esfregaço sanguíneo em um estudo no Pará em 1961 (Deane & Deane,
12 1961), e alguns anos depois em esfregaço sanguíneo de *D. albiventris* no Rio de
13 Janeiro em 1979 (Serra-Freire, 1979).

14 Contudo, a primeira descrição molecular em gambás ocorreu apenas
15 em 2016 no Mato Grosso, em animais da espécie *Monodelphis domestica* (Wolf et al.,
16 2016), seguidos de relatos em *D. marsupialis* no Pará (Soares et al., 2017) e Mato
17 Grosso (Colle et al., 2019), em *D. albiventris* associados a carrapatos da espécie
18 *Amblyomma dubitatum* em Mato Grosso do Sul e Distrito Federal (Gonçalves et al.,
19 2021) e em *D. aurita* no Rio de Janeiro (Oliveira et al., 2023). Em todos os casos a
20 detecção foi baseada no gene 18S.

21 A descrição frequente de possíveis novas espécies de *Babesia* sp.
22 circulando em gambás tem reforçado a necessidade de uma caracterização mais
23 completa do protozoário.

24 2.3 DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE DOENÇAS TRANSMITIDAS POR CARRAPATOS EM GAMBÁS 25 NO BRASIL E SUA IMPORTÂNCIA PARA A SAÚDE ÚNICA

26 Embora existam diferentes relatos de patógenos transmitidos por

1 carrapatos encontrados em diferentes espécies de marsupiais, o foco desta tese está
2 nos relatos de *Ehrlichia* sp. e Piroplasmas do gênero *Babesia* com dados moleculares.

3 Dentre esses relatos, temos descrições de uma cepa de *Ehrlichia* sp.
4 atualmente chamada de “*strain Natal*” relatada inicialmente em *D. albiventris* (Lopes
5 et al., 2018) e *Gracilianus agilis* (De Oliveira et al., 2020) no Brasil e em *D. albiventris*
6 na Argentina (Tarragona et al., 2022). É interessante destacar que existem relatos
7 também de *Ehrlichia* sp. em *G. agilis* (De Souza et al., 2017), *D. aurita* (Guimarães et
8 al., 2019), *D. marsupialis* (Braga et al., 2023), e *D. albiventris* (André et al., 2022) todos
9 no Brasil, e em *Ambyomma* sp. coletados de *D. virginiana* no México (Guzmán-
10 Cornejo et al., 2024). Essas diferenças na descrição, em que a caracterização não
11 ocorre a nível de espécie demonstra as dificuldades enfrentadas na caracterização
12 molecular de *Ehrlichia* sp.

13 Quanto aos Piroplasmida do gênero *Babesia*, o registro frequente em
14 algumas espécies de marsupiais no Brasil, tem demonstrado a provável existência de
15 uma espécie em circulação nesses animais na América do Sul, uma vez que a
16 caracterização pelo gene 18S vem mostrando uma identidade igual ou próxima de
17 100% entre as sequências de *Babesia* sp. Esses relatos forçam os pesquisadores a
18 produzirem uma melhor caracterização dessa espécie. Piroplasmas também vêm
19 sendo descritos em marsupiais no Brasil, mas com apenas um relato em *D. albiventris*
20 associado a *A. dubidatum* (Gonçalves et al., 2021), além de relato em *D. marsupialis*
21 (Braga et al., 2023) *D. aurita* (Oliveira et al., 2023), e *Monodelphis domestica* (Colle et
22 al., 2019) todos no Brasil, e um relato em *D. marsupialis* na Guatemala (Thomas et al.,
23 2023).

24 Estudos moleculares com uma maior precisão de dados de
25 sequenciamento e emprego de tecnologias mais recentes como Nanopore podem
26 trazer mais informações com uma descrição detalhada, gerando dados para basear
27 pesquisas clínicas e pautar o esclarecimento características epidemiológicas de
28 agentes como *Ehrlichia* sp. e *Babesia* sp.

3 REFERÊNCIAS

- Almeida, A. P., Souza, T. D., Marcili, A., & Labruna, M. B. (2013). Novel *Ehrlichia* and *Hepatozoon* Agents Infecting the Crab-Eating Fox (*Cerdocyon thous*) in Southeastern Brazil. *Journal of Medical Entomology*, 50(3), 640-646. <https://doi.org/10.1603/me12272>
- André, M. R., Calchi, A. C., Perles, L., Gonçalves, L. R., Uccella, L., Lemes, J. R. B., Nantes, W. A. G., Santos, F. M., Porfírio, G. E. O., Barros-Battesti, D. M., Herrera, H. M., & Machado, R. Z. (2022). Novel *Ehrlichia* and *Hepatozoon* genotypes in white-eared opossums (*Didelphis albiventris*) and associated ticks from Brazil. *Ticks Tick Borne Diseases*, 13(6), 102022. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2022.102022>
- Assis, A. P. A. (2011). Estudo de padrões de distribuição da diversidade genética e morfológica em *Didelphis aurita* (Didelphidae, Didelphimorphia): investigando a biogeografia da Floresta Atlântica. <https://doi.org/10.11606/d.41.2011.tde-09062011-172456>
- Atlas, R. M. (2012). One Health: Its Origins and Future. In *Current Topics in Microbiology and Immunology* (pp. 1-13). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/82_2012_223
- Bezerra-Santos, M. A., Fontes, C. S., Nogueira, B. C. F., Yamatogi, R. S., Ramos, R. A. N., Galhardo, J. A., Furtado, L. F. V., Rabelo, É. M. L., De Araújo, J. V., & Campos, A. K. (2020). Gastrointestinal parasites in the opossum *Didelphis aurita*: Are they a potential threat to human health? *Journal of Parasitic Diseases*, 44(2), 355-363. <https://doi.org/10.1007/s12639-020-01205-9>
- Braga, M., Costa, F. B., Calchi, A. C., de Mello, V. V. C., Mongruel, A. C. B., Dias, C. M., Bassini-Silva, R., Silva, E. M. C., Pereira, J. G., Ribeiro, L., da Costa, A. P., de Andrade, F. H. E., Silva, A. L. A., Machado, R. Z., & Andre, M. R. (2023). Molecular detection and characterization of vector-borne agents in common opossums (*Didelphis marsupialis*) from northeastern Brazil. *Acta Tropica*, 244, 106955. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2023.106955>
- Colle, A. C., Mendonça, R. F. B. D., Maia, M. O., Freitas, L. D. C., Witter, R., Marcili, A., Aguiar, D. M. D., Muñoz-Leal, S., Labruna, M. B., Rossi, R. V., & Pacheco, R. D. C. (2019). Molecular survey of tick-borne pathogens in small mammals from Brazilian Amazonia. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 28(4), 592-604. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612019086>
- da Serra Freire, N. M. (1979). *Babesia ernestoi* sp. n., in *Didelphis marsupialis* L., 1758, and *D. albiventris* Lund, 1841, in Brazil. *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B*, 26(8), 614-622. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.1979.tb00855.x>
- de Oliveira, G. M. B., da Silva, I. W. G., da Cruz Ferreira Evaristo, A. M., de Azevedo Serpa, M. C., Silva Campos, A. N., Dutra, V., Nakazato, L., de Aguiar, D. M., Bahia Labruna, M., & Horta, M. C. (2020). Tick-borne pathogens in dogs, wild small mammals and their ectoparasites in the semi-arid Caatinga biome, northeastern

Brazil. *Ticks Tick Borne Dis*, 11(4), 101409.

<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2020.101409>

Deane, L. M., & Deane, M. P. (1961). Sobre dois hemocitozoários encontrados em mamíferos silvestres da Região Amazonica. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 3(3), 107-110.

De Sousa K. C. M., Calchi, A. C., Herrera, H. M., et al. Anaplasmatidae agents among wild mammals and ectoparasites in Brazil. *Epidemiology and Infection*. 2017;145(16):3424-3437. <https://doi.org/10.1017/S095026881700245X>

Do Nascimento, C. C., & Horta, M. C. (2014). Didelphimorphia (Gambá, Cuíca). In *Tratado de animais selvagens: medicina veterinária* (Vol. 1).

El-Sayed, A., & Kamel, M. (2020). Climatic changes and their role in emergence and re-emergence of diseases. *Environmental science and pollution research international*, 27(18), 22336–22352. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08896-w>

Gilbert, L. (2021). The Impacts of Climate Change on Ticks and Tick-Borne Disease Risk. *Annual Review of Entomology*, 66(1), 373-388. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-052720-094533>

Gonçalves, L. R., Paludo, G., Bisol, T. B., Perles, L., De Oliveira, L. B., De Oliveira, C. M., Da Silva, T. M. V., Nantes, W. A. G., Duarte, M. A., Santos, F. M., De Oliveira Porfírio, G. E., Hirano, L. Q. L., Herrera, H. M., Barros-Battesti, D. M., Machado, R. Z., & André, M. R. (2021). Molecular detection of Piroplasmids in synanthropic rodents, marsupials, and associated ticks from Brazil, with phylogenetic inference of a putative novel *Babesia* sp. from white-eared opossum (*Didelphis albiventris*). *Parasitology Research*, 120(10), 3537-3546. <https://doi.org/10.1007/s00436-021-07284-8>

Guimarães, A., Raimundo, J. M., Silva, A. T. D., Carpintero, F. M., Pires, J. R., Benevenuto, J. L., Machado, R. Z., André, M. R., & Baldani, C. D. (2019). Detection of a putative novel genotype of *Ehrlichia* sp. from opossums (*Didelphis aurita*) from Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet*, 28(1), 140-144. <https://doi.org/10.1590/S1984-296120180068>

Guzmán-Cornejo, C., Herrera-Mares, A., García-Prieto, L., Ocegüera-Figueroa, A., López-Pérez, A. M., & Dzúl-Rosado, K. (2024). Potential zoonotic role of the tick *Amblyomma* cf. *oblongoguttatum* (Ixodida: Ixodidae) in the bacterial transmission of *Ehrlichia chaffeensis* (Rickettsiales: Anaplasmatidae) in a deciduous tropical forest in Mexico. *Journal of medical entomology*, 61(4), 1026–1030. <https://doi.org/10.1093/jme/tjae047>

Hamilton, K. S., Standaert, S. M., & Kinney, M. C. (2004). Characteristic peripheral blood findings in human ehrlichiosis. *Modern Pathology*, 17(5), 512-517. <https://doi.org/10.1038/modpathol.3800075>

- 1 Horta, M. C., Labruna, M. B., Pinter, A., Linardi, P. M., & Schumaker, T. T. (2007).
2 *Rickettsia* infection in five areas of the state of São Paulo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo*
3 *Cruz*, 102(7), 793-801. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762007000700003>
4
- 5 Horta, M. C., Moraes-Filho, J., Casagrande, R. A., Saito, T. B., Rosa, S. C.,
6 Ogrzewalska, M., Matushima, E. R., & Labruna, M. B. (2009). Experimental infection
7 of opossums *Didelphis aurita* by *Rickettsia rickettsii* and evaluation of the
8 transmission of the infection to ticks *Amblyomma cajennense*. *Vector Borne Zoonotic*
9 *Dis*, 9(1), 109-118. <https://doi.org/10.1089/vbz.2008.0114>
10
- 11 Kernif, T., Leulmi, H., Raoult, D., & Parola, P. (2016). Emerging Tick-Borne Bacterial
12 Pathogens. *Microbiology Spectrum*, 4(3), 10.1128/microbiolspec.ei1110-0012-2016.
13 <https://doi.org/doi:10.1128/microbiolspec.ei10-0012-2016>
14
- 15 Kuhnen, V. V., Romero, G. Q., Linhares, A. X., Vizentin-Bugoni, J., Porto, E. A. C., &
16 Setz, E. Z. F. (2017). Diet overlap and spatial segregation between two neotropical
17 marsupials revealed by multiple analytical approaches. *PLoS ONE*, 12(7), e0181188.
18 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181188>
19
- 20 Linnaeus, C. (1758). *Systema Naturae per regna tria naturae, secundum classes,*
21 *ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis. Editio*
22 *decima, reformata [10th revised edition], vol. 1: 824 pp. Laurentius Salvius: Holmiae.*
23 <https://doi.org/10.5962/bhl.title.542>
24
- 25 Lopes, M. G., Muñoz-Leal, S., de Lima, J. T. R., Fournier, G. F. D. S., Acosta, I. D. C.
26 L., Martins, T. F., Ramirez, D. G., Gennari, S. M., & Labruna, M. B. (2018). Ticks,
27 rickettsial and erlichial infection in small mammals from Atlantic Forest remnants in
28 northeastern Brazil. *International Journal Parasitology Parasites and Wildlife*, 7(3),
29 380-385. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2018.10.001>
30
- 31 Madison-Antenucci, S., Kramer, L. D., Gebhardt, L. L., & Kauffman, E. (2020).
32 Emerging Tick-Borne Diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, 33(2).
33 <https://doi.org/10.1128/cmr.00083-18>
34
- 35 Mehlhorn, H. (2008). *Babesia*. In H. Mehlhorn (Ed.), *Encyclopedia of Parasitology*
36 (pp. 143-143). Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-48996-](https://doi.org/10.1007/978-3-540-48996-2_337)
37 [2_337](https://doi.org/10.1007/978-3-540-48996-2_337)
38
- 39 MMA. (2024). *Biomas*. <https://antigo.mma.gov.br/biomas.html>
40
- 41 Muñoz-Leal, S., Cledes, Y. S., Lopes, M. G., Acosta, I. C. L., Serpa, M. C. A.,
42 Mayorga, L. F. S. P., Gennari, S. M., González-Acuña, D., & Labruna, M. B. (2019).
43 Novel *Ehrlichia* sp. detected in Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*) and in
44 the seabird tick *Ixodes uriae* from Magdalena Island, southern Chile. *Ticks and Tick-*
45 *borne Diseases*, 10(6), 101256.
46 <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.06.015>
47
- 48 Muraro, L. S., Nogueira, M. F., Borges, A. M. C. M., Souza, A. O., Vieira, T. S. W. J.,
49 & de Aguiar, D. M. (2021). Detection of *Ehrlichia* sp. in *Amblyomma sculptum*

- parasitizing horses from Brazilian Pantanal wetland. *Ticks and Tick Borne Diseases*, 12(3), 101658. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2021.101658>
- Nascimento, D. C. d. (2015). Padrões de distribuição e diversidade genética das espécies *Didelphis albiventris*, *Didelphis marsupialis* e *Didelphis aurita* (Didelphimorphia: Didelphidae) de ocorrência no Nordeste brasileiro UEMA].
- O'Nion, V. L., Montilla, H. J., Qurollo, B. A., Maggi, R. G., Hegarty, B. C., Tornquist, S. J., & Breitschwerdt, E. B. (2015). Potentially novel *Ehrlichia* species in horses, Nicaragua. *Emerging Infectious Diseases*, 21(2), 335-338. <https://doi.org/10.3201/eid2102.140290>
- Oliveira, Á. F. X. D., Calchi, A. C., Stocco, A. V., Stocco, N. V., Costa, A. C., Mureb, E. N., Pires, J. R., Guimarães, A., Raimundo, J. M., De Almeida Balthazar, D., Machado, R. Z., André, M. R., & Baldani, C. D. (2023). Expanding the universe of Piroplasmids: morphological detection and phylogenetic positioning of putative novel Piroplasmids in black-eared opossums (*Didelphis aurita*) from southeastern Brazil, with description of "South American Marsupialia Group" of Piro. *Parasitology Research*, 122(7), 1519-1530. <https://doi.org/10.1007/s00436-023-07852-0>
- Orozco, A. M. O., Bento, L. D., Souto, P. C., Girardi, F. M., Nogueira, B. C. F., Yamatogi, R. S., Campos, A. K., Cray, C., Montiani-Ferreira, F., Collere, F. C. M., Vieira, T. S. W. J., Vieira, R. F. D. C., & Fonseca, L. A. D. (2022). 'Candidatus Mycoplasma Haemoalbiventris' and Tick-Borne Pathogens in Black-Eared Opossum (*Didelphis aurita*) from Southeastern Brazil. *Microorganisms*, 10(10), 1955. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10101955>
- Parola, P., & Raoult, D. (2001). Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. *Clin Infect Dis*, 32(6), 897-928. <https://doi.org/10.1086/319347>
- Platonov, A. E., Karan, L. S., Kolyasnikova, N. M., Makhneva, N. A., Toporkova, M. G., Maleev, V. V., Fish, D., & Krause, P. J. (2011). Humans Infected with Relapsing Fever Spirochete *Borrelia miyamotoi*, Russia. *Emerging Infectious Diseases*, 17(10), 1816-1823. <https://doi.org/10.3201/eid1710.101474>
- Puentes, J. D., & Riet-Correa, F. (2023). Epidemiological aspects of cattle tick fever in Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 32(1). <https://doi.org/10.1590/s1984-29612023007>
- Rochlin, I., & Toledo, A. (2020). Emerging tick-borne pathogens of public health importance: a mini-review. *Journal of Medical Microbiology*, 69(6), 781-791. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001206>
- Schoch, C. L., Ciufo, S., Domrachev, M., Hottton, C. L., Kannan, S., Khovanskaya, R., Leipe, D., Mcveigh, R., O'Neill, K., Robbertse, B., Sharma, S., Soussov, V., Sullivan, J. P., Sun, L., Turner, S., & Karsch-Mizrachi, I. (2020). NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. *Database*, 2020. <https://doi.org/10.1093/database/baaa062>

- 1 Shaheen, M. N. F. (2022). The concept of one health applied to the problem of
2 zoonotic diseases. *Reviews in Medical Virology*, 32(4).
3 <https://doi.org/10.1002/rmv.2326>
4
- 5 Soares, H. S., Marcili, A., Barbieri, A. R. M., Minervino, A. H. H., Malheiros, A. F.,
6 Gennari, S. M., & Labruna, M. B. (2017). Novel *Anaplasma* and *Ehrlichia* organisms
7 infecting the wildlife of two regions of the Brazilian Amazon. *Acta Tropica*, 174, 82-
8 87. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.07.006>
9
- 10 Tarragona, E. L., Flores, F. S., Lamattina, D., Torrents, J., Sebastian, P. S., & Nava,
11 S. (2022). Two novel *Ehrlichia* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) strains detected in
12 ticks (Ixodida, Ixodidae) and opossums (Didelphimorphia: Didelphidae) in Argentina.
13 *Ticks Tick Borne Dis*, 13(6), 102043. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2022.102043>
14
- 15 Thomas, R., Santodomingo, A., Parragué-Migone, C., Portillo, E., Barrios, M.,
16 Venzal, J.M., & Muñoz-Leal, S. (2023). A novel *Babesia* sp. of the Western
17 *Babesia* group detected in opossums from Guatemala. *Ticks and tick-borne*
18 *diseases*, 14(6), 102248. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2023.102248>
19
- 20 Vieira, R. F. D. C., Biondo, A. W., Guimarães, A. M. S., Santos, A. P. D., Santos, R.
21 P. D., Dutra, L. H., Diniz, P. P. V. D. P., Morais, H. A. D., Messick, J. B., Labruna, M.
22 B., & Vidotto, O. (2011). Ehrlichiosis in Brazil. *Brazilian Journal of Veterinary*
23 *Parasitology*, 20(1), 01-12. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612011000100002>
24
- 25 Vieira, T. S., Vieira, R. F., Krawczak, F. S., Soares, H. S., Guimarães, A. M., Barros-
26 Filho, I. R., Marcondes, M., Labruna, M. B., Biondo, A. W., & Vidotto, O. (2016).
27 *Ehrlichia* sp. infection in carthorses of low-income owners, Southern Brazil.
28 *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 48, 1-5.
29 <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2016.07.002>
30
- 31 Vieira, T. S. W. J., Collere, F. C. M., Ferrari, L. D. R., Baggio, R. A., Lange, R. R.,
32 Ferrari, M. V., Duque, J. C. M., Sanches, G. S., Pereira, N. A., Aguiar, D. M.,
33 Labruna, M. B., & Vieira, R. F. C. (2022). Novel Anaplasmataceae agents
34 *Candidatus Ehrlichia hydrochoerus* and *Anaplasma* spp. Infecting Capybaras, Brazil.
35 *Emerging Infectious Diseases*, 28(2), 480-482.
36 <https://doi.org/10.3201/eid2802.210705>
37
- 38 Vieira, T. S. W. J., Qurollo, B. A., Mongruel, A. C. B., Baggio, R. A., Vidotto, O.,
39 Breitschwerdt, E. B., & Vieira, R. F. C. (2018). Potentially Same Novel *Ehrlichia*
40 Species in Horses in Nicaragua and Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, 24(5),
41 953-953. <https://doi.org/10.3201/eid2405.172076>
42
- 43 Wolf, R. W., Aragona, M., Muñoz-Leal, S., Pinto, L. B., Melo, A. L., Braga, I. A.,
44 Costa Jdos, S., Martins, T. F., Marcili, A., Pacheco Rde, C., Labruna, M. B., & Aguiar,
45 D. M. (2016). Novel *Babesia* and *Hepatozoon* agents infecting non-volant small
46 mammals in the Brazilian Pantanal, with the first record of the tick *Ornithodoros*
47 *guaporensis* in Brazil. *Ticks Tick Borne Dis*, 7(3), 449-456.
48 <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.01.005>
49
- 50 Zhao, H. Q., Liu, P. P., Xue, F., Lu, M., Qin, X. C., & Li, K. (2021). Molecular Detection

- 1 and Identification of *Candidatus* Ehrlichia Hainanensis, A Novel *Ehrlichia* Species in
- 2 Rodents from Hainan Province, China. *Biomedical and Environmental Sciences*,
- 3 34(12), 1020. <https://doi.org/https://doi.org/10.3967/bes2021.138>

1 **4 HIPÓTESE**

2 *“Didelphis albiventris pode atuar como modelo sentinela de origem silvestre*
3 *para investigar a circulação de patógenos de interesse para populações humanas.”*

1 5 OBJETIVOS

2 5.1 GERAL

3 INVESTIGAR A OCORRÊNCIA DE PATÓGENOS TRANSMITIDOS POR
4 CARRAPATO EM *DIDELPHIS ALBIVENTRIS* DO ESTADO DE ALAGOAS,
5 NORDESTE DO BRASIL

6 5.2 ESPECÍFICOS

7 CARACTERIZAR MOLECULARMENTE E VERIFICAR AS RELAÇÕES EVOLUTIVAS
8 DE *EHRlichia* SP. EM *D. ALBIVENTRIS*
9 CARACTERIZAR MOLECULARMENTE E VERIFICAR AS RELAÇÕES EVOLUTIVAS
10 DE PIROPLASMAS EM *D. ALBIVENTRIS*

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

***Ehrlichia* sp. in white-eared opossums (*Didelphis albiventris*) from Alagoas, Northeastern Brazil**

Ehrlichia sp. em gambás de Orelhas Brancas (*Didelphis albiventris*) de Alagoas, Nordeste do Brasil

Ana Clécia dos Santos Silva¹; Epitácio Correia de Farias Junior³; Ana Cecília Pires de Azevedo Lopes⁴; Thiago Fernandes Martins⁵; Marcelo Bahia Labruna⁵; Thállitha Samih Wischral Jayme Vieira⁶; João Luis Garcia¹; Jonatas Campos de Almeida³; Rafael Felipe da Costa Vieira^{2,6}

¹Graduate Program on Animal Sciences, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brazil.

²Department of Epidemiology and Community Health, The University of North Carolina at Charlotte, Charlotte, North Carolina, USA.

³Centro de Engenharia e Ciências Agrárias, Universidade Federal de Alagoas, Viçosa, Alagoas, Brazil.

⁴Instituto do Meio Ambiente, Centro de Triagem de Animais Silvestres, Maceió, Alagoas, Brazil.

⁵Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil.

⁶Center for Computational Intelligence to Predict Health and Environmental Risks (CIPHER), The University of North Carolina at Charlotte, Charlotte, North Carolina, USA.

Abstract

The genus *Didelphis* (Marsupialia, Didelphidae), comprising synanthropic marsupials adapted to anthropogenic environments, is known to host various vector-borne agents, including tick-borne bacteria like *Ehrlichia* spp. This study investigated *Ehrlichia* spp. in *Didelphis albiventris* from transitional areas of the Atlantic Forest and Caatinga biomes in Alagoas, Brazil. Blood samples from 30 opossums were collected, and DNA was extracted for PCR screening targeting the 16S, *dsb* and *groEL* genes. Phylogenetic analyses revealed a *Ehrlichia* species closely related to known soft ticks. Seasonality and biome diversity in Brazil were considered,

emphasizing the importance of understanding the dynamics of tick-borne diseases. A high infection rate (80%) in opossums underscores the need for further research on potential tick vectors and the clinical impact on opossum populations. Molecular characterization studies play a crucial role in identifying species, necessitating comprehensive approaches involving nucleotide identity, epidemiological characteristics, and host-vector interactions. This study highlights the significance of exploring new technologies for accurate descriptions. It emphasizes the importance of ongoing research to assess *Ehrlichia* species' clinical implications and potential vectors. We describe an *Ehrlichia* species infecting *D. albiventris* from Alagoas, northeastern Brazil. Further studies should focus on putative tick vectors and whether this novel ehrlichial agent may cause clinical disease in opossum populations.

Keywords: Tick-borne diseases; Ehrlichiosis; Zoonosis; Opossum.

Resumo

O gênero *Didelphis* compreende marsupiais sinantrópicos adaptados a ambientes antropogênicos, é conhecido por hospedar vários agentes transmitidos por vetores, incluindo bactérias transmitidas por carrapatos, como *Ehrlichia* spp. e este estudo investigou *Ehrlichia* sp. em *Didelphis albiventris* de áreas de transição dos biomas da Mata Atlântica e Caatinga em Alagoas, Brasil. Amostras de sangue de 30 gambás foram coletadas, e o DNA foi extraído para triagem por PCR direcionada aos genes 16S, *dsb* e *groEL*. Análises filogenéticas revelaram uma espécie de *Ehrlichia* estreitamente relacionada a carrapatos argasídeos previamente descritos. A sazonalidade e a diversidade de biomas no Brasil foram consideradas, enfatizando a importância de compreender a dinâmica das doenças transmitidas por carrapatos. Uma alta taxa de infecção (80%) em gambás ressalta a necessidade de mais pesquisas sobre possíveis vetores de carrapatos e o impacto clínico nas populações de gambás. Estudos de caracterização molecular desempenham um papel crucial na identificação de espécies, exigindo abordagens abrangentes que envolvam identidade nucleotídica, características epidemiológicas e interações hospedeiro-vetor. Este estudo destaca a importância de explorar novas tecnologias para descrições precisas e enfatiza a importância da pesquisa contínua para avaliar as implicações clínicas das espécies de *Ehrlichia* e potenciais vetores. Descrevemos *Ehrlichia* infectando *D. albiventris* de Alagoas, no nordeste do Brasil. Estudos futuros devem focar em possíveis vetores de carrapatos e se este novo agente ehrlichial pode causar doenças clínicas nas populações de gambás.

Palavras-chave: Doenças transmitidas por carrapatos; Erliquiose; Zoonoses; Gambás.

1 Introduction

2 The genus *Didelphis* comprises marsupials that are well-adapted to anthropogenic
3 activities, displaying a notable synanthropic behavior. In South America, four species have been
4 documented *D. albiventris*, *D. aurita*, *D. imperfecta*, and *D. marsupialis* (Bezerra-Santos et al.,
5 2020; Do Nascimento & Horta, 2014). Commonly known as opossums, this marsupial group is
6 a potential host or reservoir for various vector-borne agents (Carreira et al., 2012; Da Silva et
7 al., 2017; Horta et al., 2009; Maurício C. Horta et al., 2009; Zecca et al., 2020), including tick-
8 borne (Horta et al., 2007; Miziara et al., 2008; Muller et al., 2005).

9 *Ehrlichia* spp. are gram-negative, pleomorphic, obligate intracellular tick-borne bacteria
10 that infect leukocytes of mammalian hosts worldwide (Dumler et al., 2001; Muraro et al., 2021;
11 Snowden et al., 2022; Vieira et al., 2011). To date eight *Ehrlichia* species have been identified
12 *E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *E. japonica*, *E. muris*, *E. ruminantium*, *E. ovina* and *E.*
13 *minasensis* (Schoch et al., 2020). Moreover, potentially novel *Ehrlichia* species have been
14 described in horses (O'Nion et al., 2015; Vieira et al., 2016, 2018), capybaras (*Hydrochoerus*
15 *hydrochaeris*) (Vieira et al., 2022), and other wild animal species (Almeida et al., 2013; Muñoz-
16 Leal et al., 2019; Soares et al., 2017; Zhao et al., 2021), including opossums, *D. albiventris*
17 (André et al., 2022; Lopes et al., 2018) *D. marsupialis* (Braga et al., 2023), *D. aurita*
18 (Guimarães et al., 2019; Orozco et al., 2022) and *Gracilinanus agilis* (de Oliveira et al., 2020),
19 in Brazil, and *D. albiventris* in Argentina (Tarragona et al., 2022).

20 Although opossums play an important role in the cycle of various vector-borne
21 pathogens, there are currently few reports of *Ehrlichia* sp. in opossums with sequencing data
22 (de Souza et al., 2017), which complicates the monitoring of this agent in different regions
23 where opossums could be important sentinels.

24 Herein, the aim was to screen and molecularly characterize *Ehrlichia* sp. in *D.*
25 *albiventris* from transitional areas of the Atlantic Forest and Caatinga biomes in the State of
26 Alagoas, northeastern, Brazil.

27 Material and methods

29 This study was approved by the Ethics Committee on Animal Use at the Federal
30 University of Alagoas (protocol number 21/2021). Animal and laboratory procedures were
31 approved and performed under regulations of the Chico Mendes Institute for Biodiversity
32 Conservation (ICMBio, protocol number 79797-1).

A total of 30 blood samples (up to 2 mL each) were collected from *D. albiventris* from Maceió regions (Gruta de Lourdes - 9°37'14.53"S 35°43'55.76"O; Barro Duro - 9°36'56.36"S 35°43'8.83"O; Jardim do Horto - 9°36'38.47"S 35°44'13.46"O) with Caatinga and Atlantic Forest biomes, rescued to the Centro de triagem de Animais Silvestres of Alagoas state (CETAS) between November and December 2022. The samples were obtained by venipuncture of the coccygeal lateral vein (Do Nascimento & Horta, 2014).

For chemical restraint, ketamine (10 mg/kg) and xylazine (2 mg/kg) were administered intramuscularly. The samples were stored in sterile EDTA-coated tubes (Becton & Dickinson Co, Franklin Lakes, NJ, USA) for hematological analyses and were subsequently kept at -20 °C prior the DNA extraction. Ectoparasites found on the animals were collected for identification. After the procedures, opossums were monitored until complete recovery from chemical restraint and later released at the same place where they were captured.

DNA extraction was performed from all blood samples using a commercially available kit (IndiSpin® Pathogen kit) following the manufacturer's instructions. To ensure the absence of cross-contamination, ultrapure water served as a negative control in parallel. The DNA concentration and purity were assessed through fluorimetry using the Qubit® dsDNA HS Assay (Qubit® 2.0 Fluorometer). To verify the effectiveness of DNA extraction a polymerase chain reaction (PCR) targeting the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*gapdh*) endogenous gene of mammals (Birkenheuer et al., 2003) was performed on all samples.

We performed an Anaplasmatidae-specific 16S PCR (421 bp) (Stuenkel et al., 2003) for all samples, and after sequencing results were conducted PCR assay for *Ehrlichia* sp. targeting the *dsb* (349 bp) gene (Almeida et al., 2013). For species characterization, *dsb*-PCR positive samples were subjected to a PCR targeting a fragment of the *groEL* (600 bp) gene (Barber et al., 2010) followed by sequencing. Table 1 includes primers used herein.

To verify the effectiveness of DNA extraction a polymerase chain reaction (PCR) targeting the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*gapdh*) endogenous gene of mammals (Birkenheuer et al., 2003) was performed on all samples. Opossum DNA-samples were initially screened by PCR assays targeting Anaplasmatidae-specific 16S rRNA gene PCR (421 bp) (Stuenkel et al., 2003) and *Ehrlichia* sp.-specific *dsb* (349 bp) genes (Almeida et al., 2013). Thereafter, PCR-positive samples were submitted to PCR assays targeting the *groEL* (600 bp) (Barber et al., 2010), and *sodB* (300bp) (Quorolillo et al., 2013) genes of *Ehrlichia* spp. for species characterization. Table 1 includes primers used herein.

The amplified PCR products were subjected to gel electrophoresis in SYBR-safe stained-agarose gels (1.5%) (SYBR® Safe DNA Gel Stain, Invitrogen) for 1 h at 100 V and visualized under a 312 nm UV light transilluminator (Chemidoc). The amplicons derived from positive samples underwent extraction and purification from the gel through enzymatic purification using ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent (Thermo Scientific, Waltham, USA). Subsequently, their concentration and purity were assessed via spectrophotometry using the NanoDrop™ One Spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, USA). PCR products with poor Sanger sequencing quality were sequenced using oxford nanopore technology (ONT) due to its high sensibility (Hu et al., 2021). The nucleotide sequences of the 16S rRNA, *dsb* and *groEL* genes of *Ehrlichia* sp. amplified in this study were deposited in the GenBank® database under accession numbers for 16S rRNA, *dsb*, and PQ117746 - PQ117752 for *groEL* genes. Consensus sequences were produced using Geneious Prime version 2023.2 and then subjected to BLASTn analysis (Altschul et al., 1990) to ascertain their alignment with sequences previously deposited in GenBank® database.

Phylogenetic analyses of the *groEL* gene sequences was performed based on Bayesian inference using the Beast 1.8.0 package (Drummond et al., 2012). Three separate iterations of Monte Carlo Markov Chain (MCMC), each comprising 100,000,000 generations, were executed. Sampling occurred once every 10,000 generations, and a 10% burn-in was applied. The substitution model was determined as GTR + G through AIC estimation using jModeltest 2.1.10 (Darriba et al., 2012). Reconstructions were visualized using the FigTree 1.4.4 software (Rambaut, 2012). The *groEL* gene tree was rooted with *Neorickettsia risticii*. The phylogenetic tree was visualized with FigTree software version 1.4.4 and the final layout was done with Inkscape version 0.92.2.

Results and discussion

From 30 animals, 19/30 (63.33%) were male and 11/30 (36.66%) female. Overall, 23/30 (76.6%; 95% CI: 59.07 – 88.21%) tested Anaplasmapaceae-positive by 16S gene PCR assay, and 24/30 (80%; 95% CI: 62.69 – 90.49%) tested *Ehrlichia*-positive by the *dsb* gene PCR assay. All 24 samples also tested positive by the *groEL*-PCR assay. The four 16S sequences obtained showed that *D. albiventris* were infected by *Ehrlichia* sp by Oxford Nanopore sequencing. The seven *Ehrlichia dsb* sequences also obtained by Oxford Nanopore confirmed the ehrlichial infection and *groEL* sequences obtained from the same animals that *dsb* herein showed 93.77% of identity and 91% of query cover with sequences obtained from *Ornithodoros capensis* of birds from Japan (LC649942), 92% identity and 99% of query cover with sequences from

1 *Haemaphysalis bispinosa* of cattle from Malaysia (KY046307, KY046308) from Genbank
 2 database. In this article, we decided to assemble the phylogeny based on *groEL* using sequences
 3 obtained by Sanger sequencing, since the sequences for *Ehrlichia* deposited in GenBank are
 4 almost entirely derived from the Sanger method. Additionally, Oxford Nanopore technology
 5 has greater applicability for long-read sequencing (Hu et al., 2021).

6 Phylogenetic analysis of the *groEL* gene fragment confirmed the *D. albiventris*
 7 opossums were infected by *Ehrlichia* sp. (Figure 1), closely related with *Ornithodoros capensis*
 8 of birds from Japan (LC649942). All sequences obtained were found to be grouped into a
 9 polytomy, in an exclusive clade.

10 With the molecular biology updates, researchers have documented potential new species
 11 across various agents, such as *Ehrlichia* spp., and it is crucial to underscore the importance of
 12 following meticulous steps to validate the existence of these new putative taxa. These steps
 13 thoroughly examine nucleotide identity levels, epidemiological characteristics, hosts, and
 14 vectors involved in the observed phenomena. It is necessary to speculate on some points for
 15 identifying a new bacteria species with different aspects: phylogenetic, descriptive, diagnostic,
 16 and associative (Wayne et al., 1987).

17 Brazil has six biomes and it's a particular characteristic to be considered when
 18 elucidating novel pathogens, particularly vector-borne ones. Alagoas is a state with
 19 predominant caatinga (dry climate and vegetation) and Atlantic Forest (humid tropical) biomes
 20 (MMA, 2024). Furthermore, the seasonality effects must be considered when observing the
 21 complexity of the agent cycle involving ticks and wildlife animals (Campbell-Lendrum et al.,
 22 2015; Nogueira et al., 2022).

23 Ehrlichiosis is a globally prevalent illness transmitted by ticks and is caused by various
 24 species of the *Ehrlichia* bacteria, impacting both animals and humans (Cocco et al., 2003;
 25 Ismail et al., 2010; Vieira et al., 2011). The severity of this disease makes it necessary to
 26 investigate the dynamics of bacterial infections and hosts. Different gene sequences are used to
 27 screening *Ehrlichia* in wild and domestic animals including opossums (de Oliveira et al., 2020;
 28 Guimarães et al., 2019; Lopes et al., 2018; Orozco et al., 2022; Tarragona et al., 2022),
 29 capybaras (Vieira et al., 2022), horses (O'Nion et al., 2015; Vieira et al., 2016; Vieira et al.,
 30 2018), humans (Lu et al., 2023), and ticks (Matsumoto et al., 2011; Tarragona et al., 2022),
 31 with putative new species. Table 2 shows the *Ehrlichia* sp. record in opossums.

32 Herein, a high percentage of *Ehrlichia* was found in opossums (80%). Previous studies
 33 have found infection rates ranging from 0% to 6.66% (Guimarães et al., 2019; Oliveira et al.,

2021; Orozco et al., 2022). Differences between studies may be due to the seasonality of ticks, the presence of competent tick vectors, and the sensitivity and specificity of PCR assays used.

Furthermore, various tick species were reported to parasitize opossums in different Brazilian states with different biomes: in Minas Gerais *Ixodes loricatus* and *Amblyomma sculptum* (Bezerra-Santos et al., 2020), and just *I. loricatus* (Saraiva et al., 2012); in Mato Grosso do Sul *A. dubitatum* (André et al., 2022), *I. loricatus* (Miziara et al., 2008), *A. dubitatum*, *Amblyomma* sp. and *I. loricatus* (Horta et al., 2007); in Rio Grande do Sul *A. aureolatum* and *I. loricatus* (Muller et al., 2005); in Rio de Janeiro *I. loricatus* (Luz et al., 2018; Oliveira et al., 2014); *I. loricatus* also in São Paulo (Barros-Battesti et al., 2000; Gonzalez et al., 2017); *I. loricatus* in Recife (Dantas-Torres et al., 2012); *A. auricularium* in Rio Grande do Norte (Lopes et al., 2018); and *Amblyomma* spp. from Espírito Santo (Acosta et al., 2016). In the present study, the most common ectoparasite was *Ornithodoros mimon*, and there were no detected hard ticks. The ectoparasite results are shown in Table 3.

O. mimon has a wide distribution in Central and South America with records in Argentina, Bolivia, Brazil, and Uruguay (Ramos et al., 2015; Sponchiado et al., 2015; Nava et al., 2017) in different species including opossums (Labruna et al., 2014; Tarragona et al., 2022), probable because of the generalist parasitism of *O. mimon* (Sponchiado et al., 2015) combined with the behavior of opossums sharing spaces with birds and bats that are natural hosts of these ticks (Labruna et al., 2014).

Molecular characterization studies contribute profoundly to clarifying these issues, especially when they demonstrate putative new species in synanthropic hosts, such as opossums. However, other aspects must be considered to ensure the accuracy of descriptions, and next-generation sequencing technologies and whole-genome tools can be employed to manage these aspects, in addition to tick and host mapping.

Conclusion

We describe the first sequencing data from *Ehrlichia* sp. infecting *D. albiventris* from Alagoas, northeastern Brazil. Further studies should focus on putative tick vectors and whether this novel ehrlichial agent may cause clinical disease in opossum populations.

References

Acosta, I. C. L., Martins, T. F., Marcili, A., Soares, H. S., Krawczak, F. S., Vieira, F. T., & Labruna, M. B. (2016). Ticks (Acari: Ixodidae, Argasidae) from humans, domestic and wild animals in the state of Espírito Santo, Brazil, with notes on rickettsial

infection. *Vet Parasitol Reg Stud Reports*, 3-4, 66-69.
<https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2016.08.001>

Almeida, A. P., Souza, T. D., Marcili, A., & Labruna, M. B. (2013). Novel *Ehrlichia* and *Hepatozoon* Agents Infecting the Crab-Eating Fox (*Cerdocyon thous*) in Southeastern Brazil. *Journal of Medical Entomology*, 50(3), 640-646.
<https://doi.org/10.1603/me12272>

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403-410.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)

André, M. R., Calchi, A. C., Perles, L., Gonçalves, L. R., Uccella, L., Lemes, J. R. B., Nantes, W. A. G., Santos, F. M., Porfirio, G. E. O., Barros-Battesti, D. M., Herrera, H. M., & Machado, R. Z. (2022). Novel *Ehrlichia* and *Hepatozoon* genotypes in white-eared opossums (*Didelphis albiventris*) and associated ticks from Brazil. *Ticks Tick Borne Diseases*, 13(6), 102022. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2022.102022>

Bandelt, H. J., Forster, P., & Röhl, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16(1), 37-48.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036>

Barber, R. M., Li, Q., Diniz, P. P. V. P., Porter, B. F., Breitschwerdt, E. B., Claiborne, M. K., Birkenheuer, A. J., Levine, J. M., Levine, G. J., Chandler, K., Kenny, P., Nghiem, P., Wei, S., Greene, C. E., Kent, M., Platt, S. R., Greer, K., & Schatzberg, S. J. (2010). Evaluation of Brain Tissue or Cerebrospinal Fluid with Broadly Reactive Polymerase Chain Reaction for *Ehrlichia*, *Anaplasma*, Spotted Fever Group *Rickettsia*, *Bartonella*, and *Borrelia* Species in Canine Neurological Diseases (109 Cases). *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 24(2), 372-378. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2009.0466.x>

Barros-Battesti, D. M., Yoshinari, N. H., Bonoldi, V. L. N., & de Castro Gomes, A. (2000). Parasitism by *Ixodes didelphidis* and *I. loricatus* (Acari: Ixodidae) on Small Wild Mammals from an Atlantic Forest in the State of Sao Paulo, Brazil. *Journal of Medical Entomology*, 37(6), 820-827. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-37.6.820>

Bezerra-Santos, M. A., Fontes, C. S., Nogueira, B. C. F., Yamatogi, R. S., Ramos, R. A. N., Galhardo, J. A., Furtado, L. F. V., Rabelo, É. M. L., De Araújo, J. V., & Campos, A. K. (2020). Gastrointestinal parasites in the opossum *Didelphis aurita*: Are they a potential threat to human health? *Journal of Parasitic Diseases*, 44(2), 355-363.
<https://doi.org/10.1007/s12639-020-01205-9>

Birkenheuer, A. J., Levy, M. G., & Breitschwerdt, E. B. (2003). Development and Evaluation of a Seminested PCR for Detection and Differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian Genotype) and *B. canis* DNA in Canine Blood Samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(9), 4172-4177. <https://doi.org/10.1128/jcm.41.9.4172-4177.2003>

Braga, M., Costa, F. B., Calchi, A. C., de Mello, V. V. C., Mongruel, A. C. B., Dias, C. M., Bassini-Silva, R., Silva, E. M. C., Pereira, J. G., Ribeiro, L., da Costa, A. P., de Andrade, F. H. E., Silva, A. L. A., Machado, R. Z., & Andre, M. R. (2023). Molecular

detection and characterization of vector-borne agents in common opossums (*Didelphis marsupialis*) from northeastern Brazil. *Acta Tropica*, 244, 106955. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2023.106955>

Campbell-Lendrum, D., Manga, L., Bagayoko, M., & Sommerfeld, J. (2015). Climate change and vector-borne diseases: what are the implications for public health research and policy? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370(1665), 20130552. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0552>

Carreira, J. C. A., Da Silva, A. V. M., De Pita Pereira, D., & Brazil, R. P. (2012). Natural infection of *Didelphis aurita* (Mammalia: Marsupialia) with *Leishmania infantum* in Brazil. *Parasites & Vectors*, 5(1), 111. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-111>

Cocco, R., Sanna, G., Cillara, M. G., Tola, S., Ximenes, L., Pinnaparapaglia, M. L., & Masala, G. (2003). Ehrlichiosis and rickettsiosis in a canine population of Northern Sardinia. *Ann N Y Acad Sci*, 990, 126-130. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2003.tb07350.x>

Da Silva, M. R. L., Fornazari, F., Demoner, L. D. C., Teixeira, C. R., Langoni, H., & O'Dwyer, L. H. (2017). *Didelphis albiventris* naturally infected with *Hepatozoon canis* in southeastern Brazil. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 8(6), 878-881. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2017.07.005>

Dantas-Torres, F., AlÉssio, F. M., Siqueira, D. B., Mauffrey, J.-F., Marvulo, M. F. V., Martins, T. F., Moraes-Filho, J., Camargo, M. C. G. O., D'Auria, S. R. N., Labruna, M. B., & Silva, J. C. R. (2012). Exposure of small mammals to ticks and rickettsiae in Atlantic Forest patches in the metropolitan area of Recife, North-eastern Brazil. *Parasitology*, 139(1), 83-91. <https://doi.org/10.1017/S0031182011001740>

Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., & Posada, D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9(8), 772-772. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2109>

Dawson, J. E., Stallknecht, D. E., Howerth, E. W., Warner, C., Biggie, K., Davidson, W. R., Lockhart, J. M., Nettles, V. F., Olson, J. G., & Childs, J. E. (1994). Susceptibility of white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) to infection with *Ehrlichia chaffeensis*, the etiologic agent of human ehrlichiosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 32(11), 2725-2728. <https://doi.org/10.1128/jcm.32.11.2725-2728.1994>

De Oliveira, G. M. B., da Silva, I. W. G., da Cruz Ferreira Evaristo, A. M., de Azevedo Serpa, M. C., Silva Campos, A. N., Dutra, V., Nakazato, L., de Aguiar, D. M., Bahia Labruna, M., & Horta, M. C. (2020). Tick-borne pathogens in dogs, wild small mammals and their ectoparasites in the semi-arid Caatinga biome, northeastern Brazil. *Ticks Tick Borne Dis*, 11(4), 101409. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2020.101409>

De Sousa K. C. M., Calchi, A. C., Herrera, H. M., et al. Anaplasmatidae agents among wild mammals and ectoparasites in Brazil. *Epidemiology and Infection*. 2017;145(16):3424-3437. <https://doi.org/10.1017/S095026881700245X>

- Do Nascimento, C. C., & Horta, M. C. (2014). Didelphimorphia (Gambá, Cuíca). In *Tratado de animais selvagens: medicina veterinária* (Vol. 1).
- Doyle, C. K., Labruna, M. B., Breitschwerdt, E. B., Tang, Y. W., Corstvet, R. E., Hegarty, B. C., Bloch, K. C., Li, P., Walker, D. H., & McBride, J. W. (2005). Detection of medically important *Ehrlichia* by quantitative multicolor TaqMan real-time polymerase chain reaction of the *dsb* gene. *The Journal of molecular diagnostics: JMD*, 7(4), 504-510. [https://doi.org/10.1016/S1525-1578\(10\)60581-8](https://doi.org/10.1016/S1525-1578(10)60581-8)
- Dumler, J. S., Barbet, A. F., Bekker, C. P., Dasch, G. A., Palmer, G. H., Ray, S. C., Rikihisa, Y., & Rurangirwa, F. R. (2001). Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: Unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and agents as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. Em *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (Vol. 51, Número 6, p. 2145–2165). Microbiology Society. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-6-2145>
- Drummond, A. J., Suchard, M. A., Xie, D., & Rambaut, A. (2012). Bayesian Phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution*, 29(8), 1969-1973. <https://doi.org/10.1093/molbev/mss075>
- Gonzalez, I. H. L., Labruna, M. B., Chagas, C. R. F., Salgado, P. A. B., Monticelli, C., Morais, L. H., Moraes, A. A., Antunes, T. C., Ramos, P. L., & Martins, T. F. (2017). Ticks infesting captive and free-roaming wild animal species at the São Paulo Zoo, São Paulo, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet*, 26(4), 496-499. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612017036>
- Guimarães, A., Raimundo, J. M., Silva, A. T. D., Carpintero, F. M., Pires, J. R., Benevenuto, J. L., Machado, R. Z., André, M. R., & Baldani, C. D. (2019). Detection of a putative novel genotype of *Ehrlichia* sp. from opossums (*Didelphis aurita*) from Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet*, 28(1), 140-144. <https://doi.org/10.1590/S1984-296120180068>
- Guzmán-Cornejo C, Herrera-Mares A, García-Prieto L, Ocegüera-Figueroa A, López-Pérez AM, Dzul-Rosado K. Potential zoonotic role of the tick *Amblyomma* cf. *oblongoguttatum* (Ixodida: Ixodidae) in the bacterial transmission of *Ehrlichia chaffeensis* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in a deciduous tropical forest in Mexico. *J Med Entomol*. Apr 14 2024; <http://doi.org/10.1093/jme/tjae047>
- Horta, M. C., Labruna, M. B., Pinter, A., Linardi, P. M., & Schumaker, T. T. S. (2007). *Rickettsia* infection in five areas of the state of São Paulo, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102(7), 793-801. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762007000700003>
- Horta, M. C., Moraes-Filho, J., Casagrande, R. A., Saito, T. B., Rosa, S. C., Ogrzewalska, M., Matushima, E. R., & Labruna, M. B. (2009). Experimental infection of opossums *Didelphis aurita* by *Rickettsia rickettsii* and evaluation of the transmission of the infection to ticks *Amblyomma cajennense*. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 9(1), 109-118. <https://doi.org/10.1089/vbz.2008.0114>

- 1 Ismail, N., Bloch, K. C., & McBride, J. W. (2010). Human Ehrlichiosis and
2 Anaplasmosis. *Clinics in Laboratory Medicine*, 30(1), 261-292.
3 <https://doi.org/10.1016/j.cll.2009.10.004>
4
- 5 Hu, T., Chitnis, N., Monos, D., & Dinh, A. (2021). Next-generation sequencing
6 technologies: An overview. *Human immunology*, 82(11), 801–811.
7 <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2021.02.012>
8
- 9 Inokuma, H., Brouqui, P., Drancourt, M., & Raoult, D. (2001). Citrate Synthase Gene
10 Sequence: a New Tool for Phylogenetic Analysis and Identification of
11 *Ehrlichia*. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(9), 3031-3039.
12 <https://doi.org/10.1128/jcm.39.9.3031-3039.2001>
13
- 14 Labruna, M. B., Marcili, A., Ogrzewalska, M., Barros-Battesti, D. M., Dantas-Torres,
15 F., Fernandes, A. A., Leite, R. C., & Venzal, J. M. (2014). New Records and Human
16 Parasitism by *Ornithodoros mimon* (Acari: Argasidae) in Brazil. *Journal of Medical*
17 *Entomology*, 51(1), 283-287. <https://doi.org/10.1603/me13062>
18
- 19 Leigh, J. W., & Bryant, D. (2015). <scp>popart</scp>: full-feature software for
20 haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution*, 6(9), 1110-1116.
21 <https://doi.org/10.1111/2041-210x.12410>
22
- 23 Lopes, M. G., Muñoz-Leal, S., de Lima, J. T. R., Fournier, G. F. D. S., Acosta, I. D. C.
24 L., Martins, T. F., Ramirez, D. G., Gennari, S. M., & Labruna, M. B. (2018). Ticks,
25 rickettsial and ehrlichial infection in small mammals from Atlantic forest remnants in
26 northeastern Brazil. *International Journal Parasitology Parasites and Wildlife*, 7(3),
27 380-385. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2018.10.001>
28
- 29 Lu, M., Qin, X.-C., Jiang, Y.-Z., Guo, Q., Jin, X.-J., Teng, Z.-Q., Sun, X.-R., Yu, L.,
30 Zhang, Y.-F., Wang, W., Chen, Q.-Q., Liang, J.-R., Wan, J., Ren, H.-Y., Lv, Y., Wang,
31 Y.-H., Yi, L., Chang, H.-W., Hong, D.-Y., Zheng, C., Lian, X.-X., Li, K., Xu, P.-X.,
32 Wen, B., Kan, B., Xu, J., & Qin, T. (2023). Emergence of ehrlichiosis by a new tick-
33 borne *Ehrlichia* species in China. *International Journal of Infectious Diseases*, 131, 32-
34 39. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2023.03.038>
35
- 36 Luz, H. R., Costa Neto, S. F. D., Weksler, M., Gentile, R., & Faccini, J. L. H. (2018).
37 Ticks parasitizing wild mammals in Atlantic Forest areas in the state of Rio de Janeiro,
38 Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet*, 27(3), 409-414. [https://doi.org/10.1590/s1984-
39 296120180027](https://doi.org/10.1590/s1984-296120180027)
40
- 41 Massung, R. F., Slater, K., Owens, J. H., Nicholson, W. L., Mather, T. N., Solberg, V.
42 B., & Olson, J. G. (1998). Nested PCR Assay for Detection of Granulocytic
43 Ehrlichiae. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(4), 1090-1095.
44 <https://doi.org/10.1128/jcm.36.4.1090-1095.1998>
45
- 46 Matsumoto, K., Takeuchi, T., Yokoyama, N., Katagiri, Y., Ooshiro, M., Zakimi, S.,
47 Kawamori, F., Ohashi, N., & Inokuma, H. (2011). Detection of the New *Ehrlichia*
48 Species Closely Related to *Ehrlichia ewingii* from *Haemaphysalis longicornis* in
49 Yonaguni Island, Okinawa, Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, 73(11),
50 1485-1488. <https://doi.org/10.1292/jvms.11-0007>

- Maurício C. Horta, Jonas Moraes-Filho, R. A. C., Tais B. Saito, Simone C. Rosa, Maria Ogrzewalska, E. R. M., & Labruna, M. B. (2009). Experimental Infection of Opossums *Didelphis aurita* by *Rickettsia rickettsii* and Evaluation of the Transmission of the Infection to Ticks *Amblyomma cajennense*. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 9(1), 109-118. <https://doi.org/10.1089/vbz.2008.0114>
- Miziara, S. R., Paiva, F., Andreotti, R., Koller, W. W., Lopes, V. A., Pontes, N. T., & Bitencourt, K. (2008). Ocorrência de *Ixodes loricatus* Neumann, 1899 (Acari: Ixodidae) parasitando *Didelphis albiventris* (Lund, 1841), (Didelphimorphia: Didelphidae), em Campo Grande, MS. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 17(3), 158-160. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612008000300008>
- MMA. (2024). *Biomass*. <https://antigo.mma.gov.br/biomass.html>
- Muller, G., Brum, J. G. W., Langone, P. Q., Michels, G. H., Sinkoc, A. L., Ruas, J. L., & Berne, M. E. A. (2005). *Didelphis albiventris* Lund, 1841, parasitado por *Ixodes loricatus* Neumann, 1899, e *Amblyomma aureolatum* (pallas, 1772) (acar: ixodidae) no Rio Grande do Sul. *Arquivos do Instituto Biológico*, 72(3), 319-324. <https://doi.org/10.1590/1808-1657v72p3192005>
- Muñoz-Leal, S., Clemes, Y. S., Lopes, M. G., Acosta, I. C. L., Serpa, M. C. A., Mayorga, L. F. S. P., Gennari, S. M., González-Acuña, D., & Labruna, M. B. (2019). Novel *Ehrlichia* sp. detected in Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*) and in the seabird tick *Ixodes uriae* from Magdalena Island, southern Chile. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 10(6), 101256. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.06.015>
- Muraro, L. S., Nogueira, M. F., Borges, A. M. C. M., Souza, A. O., Vieira, T. S. W. J., & de Aguiar, D. M. (2021). Detection of *Ehrlichia* sp. in *Amblyomma sculptum* parasitizing horses from Brazilian Pantanal wetland. *Ticks and Tick Borne Diseases*, 12(3), 101658. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2021.101658>
- Nava, S., Venzal, j. M., Martins, T. F., Guglielmone, A. A., & Acuña, D. G. (2017). *Ticks of the Southern Cone of America: Diagnosis Distribution and Hosts with Taxonomy Ecology and Sanitary Importance*. Academic Press, an imprint of Elsevier.
- Nogueira, B. C. F., Campos, A. K., Munoz-Leal, S., Pinter, A., & Martins, T. F. (2022). Soft and hard ticks (Parasitiformes: Ixodida) on humans: A review of Brazilian biomes and the impact of environmental change. *Acta Tropica*, 234, 106598. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2022.106598>
- O'Nion, V. L., Montilla, H. J., Qurollo, B. A., Maggi, R. G., Hegarty, B. C., Tornquist, S. J., & Breitschwerdt, E. B. (2015). Potentially novel *Ehrlichia* species in horses, Nicaragua. *Emerging Infectious Diseases*, 21(2), 335-338. <https://doi.org/10.3201/eid2102.140290>
- Oliveira, H., Gomes, V., Amorim, M., Gazêta, G. S., Serra-Freire, N. M., Quinelato, I. P. F., Morelli-Amaral, V. F., Almeida, A. B., Carvalho, R., & Carvalho, A. (2014). Diversidade de ixodida em roedores e marsupiais capturados no Parque Estadual da

Pedra Branca, Rio de Janeiro, Brasil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 66, 1097-1104. <https://doi.org/10.1590/1678-6532>

Oliveira, R. P. A. D., Collere, F. C. M., Ferrari, L. D. R., Coradi, V. D. S., Soares, N. D. A., Leandro, A. D. S., Oliveira, W. F. D., Galvão, S. R., Kafka, R., Delai, R. M., Martini, R., Saldanha, A., Santos, L. P. D., Cubas, Z. S., Lange, R. R., Vieira, T. S. W. J., & Vieira, R. F. D. C. (2021). ‘*Candidatus* Mycoplasma haemoalbiventris’ and tick-borne pathogens screening in white-eared opossums (*Didelphis albiventris*) from Curitiba and Foz do Iguaçu Cities, Paraná State, southern Brazil. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*, 30(4). <https://doi.org/10.1590/s1984-29612021072>

Orozco, A. M. O., Bento, L. D., Souto, P. C., Girardi, F. M., Nogueira, B. C. F., Yamatogi, R. S., Campos, A. K., Cray, C., Montiani-Ferreira, F., Collere, F. C. M., Vieira, T. S. W. J., Vieira, R. F. D. C., & Fonseca, L. A. D. (2022). ‘*Candidatus* Mycoplasma Haemoalbiventris’ and Tick-Borne Pathogens in Black-Eared Opossum (*Didelphis aurita*) from Southeastern Brazil. *Microorganisms*, 10(10), 1955. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10101955>

Parola, P., Roux, V., Camicas, J. L., Baradji, I., Brouqui, P., & Raoult, D. (2000). Detection of ehrlichiae in African ticks by polymerase chain reaction. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 94(6), 707-708. [https://doi.org/10.1016/s0035-9203\(00\)90243-8](https://doi.org/10.1016/s0035-9203(00)90243-8)

Qurollo, B. A., Davenport, A. C., Sherbert, B. M., Grindem, C. B., Birkenheuer, A. J., & Breitschwerdt, E. B. (2013). Infection with Panama Mountain *Ehrlichia* sp. in a Dog with Atypical Lymphocytes and Clonal T-Cell Expansion. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 27(5), 1251-1255. <https://doi.org/10.1111/jvim.12148>

Rambaut, A. (2012). *Figtree v1.4. Molecular evolution, phylogenetics and epidemiology*. University of Edinburgh, Institute of Evolutionary Biology.

Saraiva, D., Fournier, G., Martins, T., Leal, K., Vieira, F., Câmara, E., Costa, C., Onofrio, V., Barros Battesti, D., Guglielmone, A., & Labruna, M. (2012). Ticks (Acari: Ixodidae) associated with small terrestrial mammals in the state of Minas Gerais, southeastern Brazil. *Experimental & Applied Acarology*, 58, 159-166. <https://doi.org/10.1007/s10493-012-9570-9>

Ramos, D. G. d. S., Melo, A. L. T., Martins, T. F., Alves, A. d. S., Pacheco, T. d. A., Pinto, L. B., Pinho, J. B., Labruna, M. B., Dutra, V., Aguiar, D. M., & Pacheco, R. C. (2015). Rickettsial infection in ticks from wild birds from Cerrado and the Pantanal region of Mato Grosso, midwestern Brazil. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 6(6), 836-842. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2015.07.013>

Schoch, C. L., Ciufo, S., Domrachev, M., Hotton, C. L., Kannan, S., Khovanskaya, R., Leipe, D., Mcveigh, R., O'Neill, K., Robbertse, B., Sharma, S., Soussov, V., Sullivan, J. P., Sun, L., Turner, S., & Karsch-Mizrachi, I. (2020). NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. *Database*, 2020. <https://doi.org/10.1093/database/baaa062>

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

1 infecting the wildlife of two regions of the Brazilian Amazon. *Acta Tropica*, 174, 82-
2 87. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.07.006>

3
4 Snowden J, Bartman M, Kong EL, Simonsen KA. Ehrlichiosis. In: *StatPearls*.
5 Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; September 12, 2022.

6
7 Sponchiado, J., Melo, G. L., Martins, T. F., Krawczak, F. S., Labruna, M. B., &
8 Cáceres, N. C. (2015). Association patterns of ticks (Acari: Ixodida: Ixodidae,
9 Argasidae) of small mammals in Cerrado fragments, western Brazil. *Experimental and*
10 *Applied Acarology*, 65(3), 389-401. <https://doi.org/10.1007/s10493-014-9877-9>

11
12 Stuen, S., Nevland, S., & Moum, T. (2003). Fatal Cases of Tick-Borne Fever (TBF) in
13 Sheep Caused by Several 16S rRNA Gene Variants of *Anaplasma phagocytophilum*.
14 *Annals of the New York Academy of Sciences*, 990(1), 433-434.
15 <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2003.tb07407.x>

16
17 Tabara, K., Arai, S., Kawabuchi, T., Itagaki, A., Ishihara, C., Satoh, H., Okabe, N., &
18 Tsuji, M. (2007). Molecular Survey of *Babesia microti*, *Ehrlichia* Species and
19 *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* in Wild Rodents from Shimane Prefecture,
20 Japan. *Microbiology and Immunology*, 51(4), 359-367. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2007.tb03923.x>

21
22
23 Tarragona, E. L., Flores, F. S., Lamattina, D., Torrents, J., Sebastian, P. S., & Nava, S.
24 (2022). Two novel *Ehrlichia* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) strains detected in ticks
25 (Ixodida, Ixodidae) and opossums (Didelphimorphia: Didelphidae) in Argentina. *Ticks*
26 *Tick Borne Dis*, 13(6), 102043. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2022.102043>

27
28 Vieira, R. F. D. C., Biondo, A. W., Guimarães, A. M. S., Santos, A. P. D., Santos, R. P.
29 D., Dutra, L. H., Diniz, P. P. V. D. P., Moraes, H. A. D., Messick, J. B., Labruna, M. B.,
30 & Vidotto, O. (2011). Ehrlichiosis in Brazil. *Brazilian Journal of Veterinary*
31 *Parasitology*, 20(1), 01-12. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612011000100002>

32
33 Vieira, T. S., Vieira, R. F., Krawczak, F. S., Soares, H. S., Guimarães, A. M., Barros-
34 Filho, I. R., Marcondes, M., Labruna, M. B., Biondo, A. W., & Vidotto, O. (2016).
35 *Ehrlichia* sp. infection in carthorses of low-income owners, Southern Brazil.
36 *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 48, 1-5.
37 <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2016.07.002>

38
39 Vieira, T. S. W. J., Collere, F. C. M., Ferrari, L. D. R., Baggio, R. A., Lange, R. R.,
40 Ferrari, M. V., Duque, J. C. M., Sanches, G. S., Pereira, N. A., Aguiar, D. M., Labruna,
41 M. B., & Vieira, R. F. C. (2022). Novel Anaplasmataceae agents *Candidatus Ehrlichia*
42 *hydrochoerus* and *Anaplasma* spp. Infecting Capybaras, Brazil. *Emerging Infectious*
43 *Diseases*, 28(2), 480-482. <https://doi.org/10.3201/eid2802.210705>

44
45 Vieira, T. S. W. J., Quorollo, B. A., Mongrue, A. C. B., Baggio, R. A., Vidotto, O.,
46 Breitschwerdt, E. B., & Vieira, R. F. C. (2018). Potentially Same Novel *Ehrlichia*
47 Species in Horses in Nicaragua and Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, 24(5), 953-
48 953. <https://doi.org/10.3201/eid2405.172076>

Wayne, L. G., Moore, W. E. C., Stackebrandt, E., Kandler, O., Colwell, R. R., Krichevsky, M. I., Truper, H. G., Murray, R. G. E., Grimont, P. A. D., Brenner, D. J., Starr, M. P., & Moore, L. H. (1987). Report of the Ad Hoc Committee on Reconciliation of Approaches to Bacterial Systematics. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 37(4), 463-464. <https://doi.org/10.1099/00207713-37-4-463>

Zecca, I. B., Hodo, C. L., Slack, S., Auckland, L., & Hamer, S. A. (2020). *Trypanosoma cruzi* infections and associated pathology in urban-dwelling Virginia opossums (*Didelphis virginiana*). *Int J Parasitol Parasites Wildl*, 11, 287-293. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2020.03.004>

Zhao, H. Q., Liu, P. P., Xue, F., Lu, M., Qin, X. C., & Li, K. (2021). Molecular Detection and Identification of *Candidatus Ehrlichia Hainanensis*, A Novel *Ehrlichia* Species in Rodents from Hainan Province, China. *Biomedical and Environmental Sciences*, 34(12), 1020. <https://doi.org/https://doi.org/10.3967/bes2021.138>

Table 1: Primers frequently used for *Ehrlichia* sp. sequencing.

Gene	Primer name	Primer Sequence	Base pairs	Reference
16S conventional PCR	EHR16SD	GGTACCYACAGAAGAAGTCC	~345	Parola et al., 2000
	EHR16SR	5'-TAGCACTCATCGTTTACAGC		
	ECB	5'-CGTATTACCGCGGCTGCTGG CA-3'		
	ECC	5'-AGAACGAACGCTGGCGGCAAG CC-3'		
16S rRNA nested PCR	ge3a	5'-CACATGCAAGTCGAACGGATTATTC-3'	932	Massung et al., 1998
	ge10r	5'-TTCCGTTAAGAAGGATCTAATCTCC-3'		
	ge9f	5'-AACGGATTATTCTTTATAGCTTGCT-3'		
	ge2	5'-GGCAGTATTAAGCAGCTCCAGG-3'		
<i>groEL</i> conventional PCR	groEL-643s	5'-ACTGATGGTATGCARTTTGAYCG-3'	~600	Barber et al., 2010
	groEL-1236as	5'-TCTTTTCGTTTCYTTMACYTCAACTTC-3'		
<i>groEL</i> nested PCR	gro607F	5'-GAAGATGCWGTWGGWTGTACKGC-3'	650	Tabara et al., 2007
	gro1294R	5'-AGMGCTTCWCCTTCWACRTCCTC-3'		
	gro677F	5'-ATTACTCAGAGTGCTTCTCARTG-3'		
	gro1121R	5'-TGCATACCRCTCAGTYTTTCAAC-3'		
<i>gltA</i> nested PCR	F4b	5'-CCAGGCTTTATGTCAACTGC-3'	800	Inokuma et al., 2001
	R1b	5'-CGATGACCAAAACCCAT-3'		
	EHR-CS136F	5'-TTYATGTCYACTGCTGCKTG-3'		
	EHR-CS778R	5'-GCNCCMCCATGMGCTGG-3'		
<i>sodB</i> conventional PCR	sodb-F	5'-TTTAATAATGCTGGTCAAGTATGGAATCAT-3'	300	Quorollo et al., 2013.
	sodb-R	5'-AAGCGTGTTCCTACATCCATAG-3'		
<i>dsb</i> hemi-nested PCR	Dsb-330Fw	5'-GATGATGTTTGAAGATATSAACAAAT-3'	401	Doyle et al., 2005
	Dsb-720Rv	5'-CTATTTTACTTCTTAAAGTTGATAWATC-3'		

Dsb-380Fw

5'-ATTTTGTAGRGATTTTCCAATACTTGG-3'

349

Almeida et al., 2013

Table 2: Record *Ehrlichia* sp. in opossums.

Opossum specie	<i>Ehrlichia</i> specie	Tissue or Tick	Country	Reference
<i>Didelphis virginiana</i>	<i>E. chaffeensis</i>	<i>Amblyomma</i> sp.	Mexico	Guzmán-Cornejo et al., 2024
<i>D. marsupialis</i>	<i>Ehrlichia</i> sp.	Blood	Brazil	Braga et al., 2023
<i>D. albiventris</i>	<i>Ehrlichia</i> sp. strain Natal	Blood	Argentina	Tarragona et al., 2022
<i>D. albiventris</i>	<i>Ehrlichia</i> sp.	Blood	Brazil	Andre et al., 2022
<i>Gracilinanus agilis</i>	<i>Ehrlichia</i> sp. strain Natal	Blood	Brazil	De Oliveira et al., 2020
<i>D. aurita</i>	<i>Ehrlichia</i> sp.	Blood	Brazil	Guimarães et al., 2019
<i>D. albiventris</i>	<i>Ehrlichia</i> sp. strain Natal	Spleen	Brazil	Lopes et al., 2018
<i>G. agilis</i>	<i>Ehrlichia</i> sp.	Spleen	Brazil	De Souza et al., 2017

Table 3: Ectoparasites found in opossums in the present study.

Animal ID	<i>Ornithodoros mimon</i> (larvae)	<i>Ctenocephalides felis</i>	<i>Ehrlichia</i> positive/gene
AL31	2	1	16S, <i>dsb</i> , and <i>groEL</i>
AL34	4	0	16S, <i>dsb</i> , and <i>groEL</i>
AL35	6	0	0
AL37	2	1	16S, <i>dsb</i> , and <i>groEL</i>
AL42	0	1	16S, <i>dsb</i> , and <i>groEL</i>
AL43	1	2	16S, <i>dsb</i> , and <i>groEL</i>
AL44	2	0	16S, <i>dsb</i> , and <i>groEL</i>



Figure 1. Phylogenetic tree based on partial sequences of the *groEL* gene (600 bp), showing the relationship between the *Ehrlichia* sp. detected in the White-eared opossums (*Didelphis albiventris*) from this study and other *Ehrlichia* sequences published and deposited on GenBank. *Neorickettsia risticii* was the outgroup used. The GenBank sequences were presented by accession number of each agent. Bayesian inferences were carried out by applying the GTR + G model and 1000 bootstrap replicates for all analyses.

1 Piroplasms in white-eared opossums (*Didelphis albiventris*) from Alagoas, Northeastern
2 Brazil

3 Piroplasmídios em gambás de orelhas brancas (*Didelphis albiventris*) de Alagoas, Nordeste do
 4 Brasil

5

6 Ana Clécia dos Santos Silva¹; Epitácio Correia de Farias Junior³; Ana Cecília Pires de Azevedo
 7 Lopes⁴; Thiago Fernandes Martins⁵; Marcelo Bahia Labruna⁵; Thállitha Samih Wischral
 8 Jayme Vieira⁶; João Luis Garcia¹; Jonatas Campos de Almeida³; Rafael Felipe da Costa
 9 Vieira^{2,6}

10 ¹Graduate Program on Animal Sciences, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná,
 11 Brazil.

12 ²Department of Epidemiology and Community Health, The University of North Carolina at
 13 Charlotte, Charlotte, North Carolina, USA.

14 ³Centro de Engenharia e Ciências Agrárias, Universidade Federal de Alagoas, Viçosa, Alagoas,
 15 Brazil.

16 ⁴Instituto do Meio Ambiente, Centro de Triagem de Animais Silvestres, Maceió, Alagoas,
 17 Brazil.

18 ⁵Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de Medicina
 19 Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil.

20 ⁶Center for Computational Intelligence to Predict Health and Environmental Risks (CIPHER),
 21 The University of North Carolina at Charlotte, Charlotte, North Carolina, USA.

22

23 *Abstract*

24

25 This study investigates the presence of piroplasms, specifically *Babesia* spp., in the opossum
 26 species *Didelphis albiventris* from Alagoas, northeastern Brazil. Opossums are known potential
 27 carriers of various vector-borne pathogens, and the Piroplasmida group, transmitted exclusively
 28 by hard ticks, includes genera like *Babesia*. Blood samples from 30 opossums were collected,
 29 with subsequent DNA extraction and PCR assays targeting the 18S gene. Four out of 30 samples
 30 (13.33%) tested positive for *Babesia* sp., and their sequences showed similarities to known
 31 *Babesia* sp. from different Brazilian states. Phylogenetic analysis supports the existence of a
 32 piroplasmid clade in South American marsupials. This study represents the first molecular
 33 detection with sequencing data of *Babesia* sp. in *D. albiventris* from northeastern Brazil,

contributing to the understanding of piroplasm circulation in South American marsupials. However, further research, incorporating multiple genes and comprehensive characterization, is crucial for confirming and classifying potential new *Babesia* species. The present study provides the first report of the occurrence of *Babesia* sp. in *D. albiventris* in Northeastern, Brazil, and these data serve as a basis for future research to better clarify the circulation of piroplasmids not only in the country but also in South America.

Keywords: Tick-borne diseases; *Babesia*; Zoonosis; Opossum.

Resumo

Este estudo investiga a presença de piroplasmídeos, especificamente *Babesia* sp., na espécie de gambá *Didelphis albiventris* em Alagoas, no nordeste do Brasil. Os gambás são conhecidos por serem possíveis portadores de vários patógenos transmitidos por vetores, e o grupo Piroplasmida, transmitido exclusivamente por carrapatos argasídeos, inclui gêneros como *Babesia*. A pesquisa envolveu a coleta de amostras de sangue de 30 gambás, com extração de DNA e reações de PCR direcionados ao gene 18S. Quatro das 30 amostras (13,33%) testaram positivo para *Babesia* sp., e suas sequências mostraram semelhanças com sequências conhecidas de *Babesia* sp. de diferentes estados brasileiros. A análise filogenética apoia a existência de um clado de piroplasmídeos em marsupiais sul-americanos. Este estudo representa a primeira detecção molecular com dados de sequenciamento de *Babesia* sp. em *D. albiventris* do nordeste do Brasil, contribuindo para a compreensão da circulação de piroplasmídeos em marsupiais sul-americanos. No entanto, mais pesquisas, incorporando múltiplos genes e uma caracterização abrangente, são cruciais para confirmar e classificar possíveis novas espécies de *Babesia*. O presente estudo fornece o primeiro relato da ocorrência de *Babesia* sp. em *D. albiventris* no Nordeste do Brasil, e esses dados servem como base para pesquisas futuras para esclarecer melhor a circulação de piroplasmídeos não apenas no Brasil, mas também na América do Sul.

Palavras-chave: Doenças transmitidas por carrapatos; *Babesia*; Zoonoses; Gambás.

Introduction

Intra-erythrocytic protozoan parasites, known as piroplasms (Apicomplexa, Piroplasmida), impact wild and domestic carnivores, with several genera, including *Babesia*, *Theileria*, and *Cytauxzoon* (Schoch et al., 2020). The Piroplasmida group earned its name from

the pear-shaped (pyriform) intra-erythrocytic stages, it denotes intracellular parasites transmitted exclusively by hard ticks (Ixodidae) (Mehlhorn & Schein, 1993). Piroplasmid infections, notorious for their devastating impact on the health of both wild and domestic animals in tropical and subtropical regions and the human babesiosis cases suggest the emergence of this disease as a significant zoonotic threat (Jongejan & Uilenberg, 2004; Kjemtrup & Conrad, 2000).

The genus *Didelphis*, commonly known as opossums, includes species that have effectively adapted to human activities, showing a significant tendency towards synanthropy (Bezerra-Santos et al., 2020). In South America, researchers have identified four specific species: *D. albiventris*, *D. aurita*, *D. imperfecta*, and *D. marsupialis* (Do Nascimento & Horta, 2014). Opossums, as they are commonly referred to, are recognized as potential carriers or reservoirs for a range of vector-borne pathogens (Carreira et al., 2012; Da Silva et al., 2017; Horta et al., 2009; Zecca et al., 2020), helminths (Bezerra-Santos et al., 2020), and tick species (Horta et al., 2007; Miziara et al., 2008; Muller et al., 2005). Different tick-borne pathogens (TBP) have been documented in opossums across Brazil (Guimarães et al., 2019; Melo et al., 2016; Soares et al., 2017), including piroplasm species.

The occurrence of Piroplasmids in different opossum species was reported in different Brazilian states such as Mato Grosso (Colle et al., 2019; Wolf et al., 2016), Pará (Soares et al., 2017), Brasília (Gonçalves et al., 2021), Rio de Janeiro (Oliveira et al., 2023), and Maranhão (Braga et al., 2023), and these descriptions can serve as a basis for the existence of a piroplasmid clade “South American Marsupialia” (Braga et al., 2023; Oliveira et al., 2023).

This study aimed to detect and molecularly characterize Piroplasm in *Didelphis albiventris* transitional areas of the Atlantic Forest and Caatinga biomes in Alagoas state, northeastern, Brazil.

Material and methods

The sampling took place from November to December 2022, when 30 blood samples, each up to 2 mL, from *D. albiventris*, from different Maceió areas (Gruta de Lourdes - 9°37'14.53"S 35°43'55.76"O; Barro Duro - 9°36'56.36"S 35°43'8.83"O; Jardim do Horto - 9°36'38.47"S 35°44'13.46"O) with Caatinga and Atlantic Forest biomes, rescued to the Centro de triagem de Animais Silvestres of Alagoas state (CETAS). This procedure involved venipuncture of the lateral vein in the tail (Do Nascimento & Horta, 2014), and the samples were gathered into sterile tubes coated with EDTA (Becton & Dickinson Co, Franklin Lakes, NJ, USA) intended for blood analysis. For chemical restraint, ketamine (10 mg/kg) and xylazine

(2 mg/kg) were administered intramuscularly. Samples were collected in sterile EDTA-coated tubes (Becton & Dickinson Co, Franklin Lakes, NJ, USA) for hematological analyses and stored at -20°C until DNA extraction. Ectoparasites found on the animals were collected for identification. After sample collection, the animals were monitored until they fully recovered from the chemical restraint.

DNA was extracted from all collected blood samples utilizing the IndiSpin[®] Pathogen kit adhering strictly to the guidelines provided by the manufacturer. To prevent any cross-contamination, ultrapure water was used as a negative control concurrently. The assessment of DNA concentration and purity was conducted using fluorometric analysis, specifically through the Qubit[®] dsDNA HS Assay kit, with measurements taken on a Qubit[®] 2.0 Fluorometer (Invitrogen). To validate the efficiency of DNA extraction, a polymerase chain reaction (PCR) targeting the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*gapdh*) endogenous gene of mammals (Birkenheuer et al., 2003) was carried out on all collected samples.

All samples were tested for the 18S (800 bp) gene (Jefferies et al., 2007), and positive samples sent for sequencing. After PCR reactions, all samples were viewed using electrophoresis in 1,5% agarose gel with SYBR Safe DNA Gel Stain (Thermo Fisher Scientific) and visualized under UV light. A 100 bp DNA ladder (Thermo Fisher Scientific) was used in all agarose gels. Table 1 includes primers used herein.

The amplicons derived from four Piroplasm-positive samples underwent extraction and purification from the gel through enzymatic purification using ExoSAP-IT[™] PCR Product Cleanup Reagent (Thermo Scientific, Waltham, USA). Subsequently, their concentration and purity were assessed via spectrophotometry using the NanoDrop[™] One Spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, USA). The sequencing of these amplicons was carried out bidirectionally using Sanger's method on the 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Consensus sequences were crafted utilizing Geneious Prime version 2023.2 and subsequently subjected to BLASTn analysis (Altschul et al., 1990) for the identification of similarities with sequences already present in GenBank[®]. Phylogenetic analyses on the 18S gene sequences were performed based on Bayesian inference using the Beast 1.8.0 package (Drummond et al., 2012). Three separate iterations of Monte Carlo Markov Chain (MCMC), each comprising 100,000,000 generations, were executed. Sampling occurred once every 10,000 generations, and a 10% burn-in was applied. The substitution model was determined as GTR + G through AIC estimation using jModeltest 2.1.10 (Darriba et al., 2012). Reconstructions were visualized using the FigTree 1.4.4 software (Rambaut, 2012). The 18S

gene tree was performed with *Hemolivia stellata* (KP881349) outgroup. Moreover, a haplotype network for each fragment was estimated in the PopArt 1.7 (Leigh & Bryant, 2015) using the median-joining method (Bandelt et al., 1999). The phylogenetic tree was visualized with FigTree software version 1.4.4 and the final layout was done with Inkscape version 0.92.2.

Results and discussion

Of 30 animals, 19/30 (63.33%) were male and 11/30 (36.66%) were female. Were tested Piroplasm-positive by the 18S gene PCR assay four/30 (13.33%, 95% CI 5.31-29.62%), and all four positive samples were sequenced.

The Piroplasm 18S sequences obtained were deposited at Genbank by numbers PQ113404-PQ113407 and found to be grouped with Piroplasms sequences from marsupials of Brazil, (figure 1). Furthermore, the sequences reported here showed an Identity and Query cover of 100% with a *Babesia* sp. sequence of *D. albiventris* from Brasília (MW290046), an Identity of 100% with Query cover of 97% (KY684002) and 100% and Query cover of 94% (MK257776) both *Babesia* sp. of *D. marsupialis* from Pará and Mato Grosso respectively, an Identify of 97.3% with a Query cover of 100% (OP751800) with a *Babesia* sp. of *D. aurita* from Rio de Janeiro, and Identify of 98.1% with a Query cover of 93% with a *Babesia* sp. of *D. marsupialis* from Maranhão (OQ787671). Table 2 shows the Piroplasm record in opossums.

In the present study, the most common ectoparasite was *Ornithodoros mimon*, and there were no detected hard ticks the ectoparasite results are shown in Table 3. In the present study, was not found Piroplas positive animals with ectoparasites. Other authors have described *O. mimon* distributed in Central and South America with records in Argentina, Bolivia, Brazil, and Uruguay (Ramos et al., 2015; Sponchiado et al., 2015; Nava et al., 2017) in different species including opossums (Labruna et al., 2014; Tarragona et al., 2022). The opossum's behavior, including sharing spaces with other species such as bats and birds, and its generalist parasitism (Labruna et al., 2014; Sponchiado et al., 2015), create a perfect scenario that makes the opossum a natural host for these ticks.

The present study reports the occurrence of *Babesia* sp. in 13.33% of *D. albiventris* from Alagoas, northeast, Brazil. The occurrence of Piroplasmids in opossums is variable, from 0% to 25.5% (Gonçalves et al., 2021; Oliveira et al., 2021). Variations in research findings could arise from the seasonal patterns of tick activity, the presence of proficient tick vectors, as well as variations in the sensitivity and specificity of the employed PCR assays.

The first molecular detection of Piroplasm in opossums was in *Monodelphis domestica* from Mato Grosso, Brazil (Wolf et al., 2016), since then, different *Babesia* sp. sequences have

been related in opossums from other Brazilian states, how are the case of *D. marsupialis* from Pará (Soares et al., 2017) and Mato Grosso (Colle et al., 2019), *D. albiventris* from Brasília (Gonçalves et al., 2021), *D. aurita* from Rio de Janeiro (Oliveira et al., 2023), and at this time, the only published report of *Babesia* sp. isolates of *Didelphis* in the northeast was from Maranhão (Braga et al., 2023) in *D. marsupialis*.

To date, this represents the first molecular detection with sequencing data of *Babesia* sp. in *D. albiventris* from northeastern Brazil, further reinforcing the existence of the piroplasmid clade “South American Marsupialia” (Braga et al., 2023; Oliveira et al., 2023), and it confirms that a putative new species of *Babesia* in circulation, however, the utilization of this casual term helps avoid taxonomic instability by refraining from employing unsuitable scientific names until adequate data is amassed to formally elucidate the species and integrate them into a dependable taxonomic structure (Harris, 2016). However, these steps involve a comprehensive analysis of nucleotide identity levels, epidemiological characteristics, hosts, and vectors associated with the observed phenomena.

The data presented here are based on the 18S gene, and it is crucial for a consistent and complete characterization, along with other genes, to ensure that a new species is circulating in South American opossums. Furthermore, additional recommendations for characterizing new species can be considered, such as housekeeping genes, DNA profiling, and DNA arrays (Stackebrandt et al., 2002).

Conclusion

The present study provides the first report of the occurrence of *Babesia* sp. in *D. albiventris* in Northeastern, Brazil, and these data serve as a basis for future research to better clarify the circulation of piroplasmids not only in the country but also in South America.

References

- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403-410. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Bandelt, H. J., Forster, P., & Röhl, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16(1), 37-48. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036>
- Bezerra-Santos, M. A., Fontes, C. S., Nogueira, B. C. F., Yamatogi, R. S., Ramos, R. A. N., Galhardo, J. A., Furtado, L. F. V., Rabelo, É. M. L., De Araújo, J. V., & Campos, A. K. (2020). Gastrointestinal parasites in the opossum *Didelphis aurita*: Are they a

potential threat to human health? *Journal of Parasitic Diseases*, 44(2), 355-363.
<https://doi.org/10.1007/s12639-020-01205-9>

Birkenheuer, A. J., Levy, M. G., & Breitschwerdt, E. B. (2003). Development and Evaluation of a Seminested PCR for Detection and Differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian Genotype) and *B. canis* DNA in Canine Blood Samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(9), 4172-4177. <https://doi.org/10.1128/jcm.41.9.4172-4177.2003>

Braga, M., Costa, F. B., Calchi, A. C., de Mello, V. V. C., Mongruel, A. C. B., Dias, C. M., Bassini-Silva, R., Silva, E. M. C., Pereira, J. G., Ribeiro, L., da Costa, A. P., de Andrade, F. H. E., Silva, A. L. A., Machado, R. Z., & Andre, M. R. (2023). Molecular detection and characterization of vector-borne agents in common opossums (*Didelphis marsupialis*) from northeastern Brazil. *Acta Tropica*, 244, 106955. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2023.106955>

Carreira, J. C. A., Da Silva, A. V. M., De Pita Pereira, D., & Brazil, R. P. (2012). Natural infection of *Didelphis aurita* (Mammalia: Marsupialia) with *Leishmania infantum* in Brazil. *Parasites & Vectors*, 5(1), 111. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-111>

Colle, A. C., Mendonça, R. F. B. D., Maia, M. O., Freitas, L. D. C., Witter, R., Marcili, A., Aguiar, D. M. D., Muñoz-Leal, S., Labruna, M. B., Rossi, R. V., & Pacheco, R. D. C. (2019). Molecular survey of tick-borne pathogens in small mammals from Brazilian Amazonia. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 28(4), 592-604. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612019086>

Corduneanu, A., Hrazdilová, K., Sándor, A.D. *et al.* (2017). *Babesia vesperuginis*, a neglected piroplasmid: new host and geographical records, and phylogenetic relations. *Parasites Vectors* 10, 598. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2536-3>

Da Silva, M. R. L., Fornazari, F., Demoner, L. D. C., Teixeira, C. R., Langoni, H., & O'Dwyer, L. H. (2017). *Didelphis albiventris* naturally infected with *Hepatozoon canis* in southeastern Brazil. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 8(6), 878-881. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2017.07.005>

Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., & Posada, D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9(8), 772-772. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2109>

Do Nascimento, C. C., & Horta, M. C. (2014). Didelphimorphia (Gambá, Cuíca). In *Tratado de animais selvagens: medicina veterinária* (Vol. 1).

Drancourt, M., & Raoult, D. (2005). Sequence-Based Identification of New Bacteria: a Proposition for Creation of an Orphan Bacterium Repository. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(9), 4311-4315. <https://doi.org/10.1128/jcm.43.9.4311-4315.2005>

Drummond, A. J., Suchard, M. A., Xie, D., & Rambaut, A. (2012). Bayesian Phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution*, 29(8), 1969-1973. <https://doi.org/10.1093/molbev/mss075>

Gonçalves, L. R., Paludo, G., Bisol, T. B., Perles, L., De Oliveira, L. B., De Oliveira, C. M., Da Silva, T. M. V., Nantes, W. A. G., Duarte, M. A., Santos, F. M., De Oliveira

- Porfírio, G. E., Hirano, L. Q. L., Herrera, H. M., Barros-Battesti, D. M., Machado, R. Z., & André, M. R. (2021). Molecular detection of piroplasmids in synanthropic rodents, marsupials, and associated ticks from Brazil, with phylogenetic inference of a putative novel *Babesia* sp. from white-eared opossum (*Didelphis albiventris*). *Parasitology Research*, 120(10), 3537-3546. <https://doi.org/10.1007/s00436-021-07284-8>
- Gou, H., Guan, G., Liu, A., Ma, M., Xu, Z., Liu, Z., Ren, Q., Li, Y., Yang, J., Chen, Z., Yin, H., & Luo, J. (2012). A DNA barcode for Piroplasma. *Acta Tropica*, 124(1), 92–97. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2012.07.001>
- Guimarães, A., Raimundo, J. M., Silva, A. T. D., Carpintero, F. M., Pires, J. R., Benevenuto, J. L., Machado, R. Z., André, M. R., & Baldani, C. D. (2019). Detection of a putative novel genotype of *Ehrlichia* sp. from opossums (*Didelphis aurita*) from Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet*, 28(1), 140-144. <https://doi.org/10.1590/S1984-296120180068>
- Greay, T.L., Zahedi, A., Krige, A.S. *et al.* (2018). Endemic, exotic and novel apicomplexan parasites detected during a national study of ticks from companion animals in Australia. *Parasites Vectors* 11, 197. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2775-y>
- Harris, D. J. (2016). Naming no names: Comments on the taxonomy of small piroplasmids in canids. *Parasites & Vectors*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1567-5>
- Horta, M. C., Labruna, M. B., Pinter, A., Linardi, P. M., & Schumaker, T. T. (2007). *Rickettsia* infection in five areas of the state of São Paulo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 102(7), 793-801. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762007000700003>
- Horta, M. C., Moraes-Filho, J., Casagrande, R. A., Saito, T. B., Rosa, S. C., Ogrzewalska, M., Matushima, E. R., & Labruna, M. B. (2009). Experimental infection of opossums *Didelphis aurita* by *Rickettsia rickettsii* and evaluation of the transmission of the infection to ticks *Amblyomma cajennense*. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 9(1), 109-118. <https://doi.org/10.1089/vbz.2008.0114>
- Jefferies, R., Ryan, U. M., & Irwin, P. J. (2007). PCR-RFLP for the detection and differentiation of the canine piroplasm species and its use with filter paper-based technologies. *Veterinary Parasitology*, 144(1-2), 20-27. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.09.022>
- Jongejan, F., & Uilenberg, G. (2004). The global importance of ticks. *Parasitology*, 129(S1), S3-S14. <https://doi.org/10.1017/s0031182004005967>
- Kawabuchi, T., Tsuji, M., Sado, A., Matoba, Y., Asakawa, M., & Ishihara, C. (2005). *Babesia microti*-Like Parasites Detected in Feral Raccoons (*Procyon lotor*) Captured in Hokkaido, Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, 67(8), 825–827. <https://doi.org/10.1292/jvms.67.825>

Kjemtrup, A. M., & Conrad, P. A. (2000). Human babesiosis: an emerging tick-borne disease. *International Journal for Parasitology*, 30(12), 1323-1337. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(00\)00137-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0020-7519(00)00137-5)

Leigh, J. W., & Bryant, D. (2015). <scp>popart</scp>: full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution*, 6(9), 1110-1116. <https://doi.org/10.1111/2041-210x.12410>

Mehlhorn, H., & Schein, E. (1993). The piroplasms: “A long story in short” or “Robert Koch has seen it”. *European Journal of Protistology*, 29(3), 279-293. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0932-4739\(11\)80371-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0932-4739(11)80371-8)

Melo, A. L., Aguiar, D. M., Spolidorio, M. G., Yoshinari, N. H., Matushima, E. R., Labruna, M. B., & Horta, M. C. (2016). Serological evidence of exposure to tick-borne agents in opossums (*Didelphis* spp.) in the state of Sao Paulo, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet*, 25(3), 348-352. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612016028>

Merino, S., Martínez, J., Martínez-de la Puente, J., Criado-Fornelio, A., Tomás, G., Morales, J., Lobato, E., & García-Fraile, S. (2006). Molecular characterization of the 18S rDNA gene of an avian Hepatozoon reveals that it is closely related to Lankesterella. *The Journal of parasitology*, 92(6), 1330-1335. <https://doi.org/10.1645/GE-860R.1>

Miziara, S. R., Paiva, F., Andreotti, R., Koller, W. W., Lopes, V. A., Pontes, N. T., & Bitencourt, K. (2008). Ocorrência de *Ixodes loricatus* Neumann, 1899 (Acari: Ixodidae) parasitando *Didelphis albiventris* (Lund, 1841), (Didelphimorphia: Didelphidae), em Campo Grande, MS. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 17(3), 158-160. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612008000300008>

Muller, G., Brum, J. G. W., Langone, P. Q., Michels, G. H., Sinkoc, A. L., Ruas, J. L., & Berne, M. E. A. (2005). *Didelphis albiventris* Lund, 1841, parasitado por *Ixodes loricatus* Neumann, 1899, e *Amblyomma aureolatum* (pallas, 1772) (acari: ixodidae) no Rio Grande do Sul. *Arquivos do Instituto Biológico*, 72(3), 319-324. <https://doi.org/10.1590/1808-1657v72p3192005>

Oliveira, Á. F. X. D., Calchi, A. C., Stocco, A. V., Stocco, N. V., Costa, A. C., Mureb, E. N., Pires, J. R., Guimarães, A., Raimundo, J. M., De Almeida Balthazar, D., Machado, R. Z., André, M. R., & Baldani, C. D. (2023). Expanding the universe of Piroplasmids: morphological detection and phylogenetic positioning of putative novel piroplasmids in black-eared opossums (*Didelphis aurita*) from southeastern Brazil, with description of “South American Marsupialia Group” of Piro. *Parasitology Research*, 122(7), 1519-1530. <https://doi.org/10.1007/s00436-023-07852-0>

Oliveira, R. P. A. D., Collere, F. C. M., Ferrari, L. D. R., Coradi, V. D. S., Soares, N. D. A., Leandro, A. D. S., Oliveira, W. F. D., Galvão, S. R., Kafka, R., Delai, R. M., Martini, R., Saldanha, A., Santos, L. P. D., Cubas, Z. S., Lange, R. R., Vieira, T. S. W. J., & Vieira, R. F. D. C. (2021). ‘*Candidatus* Mycoplasma haemoalbiventris’ and tick-borne pathogens screening in white-eared opossums (*Didelphis albiventris*) from Curitiba and Foz do Iguaçu Cities, Paraná State, southern Brazil. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*, 30(4). <https://doi.org/10.1590/s1984-29612021072>

Oosthuizen, M. C. Z. E., Collins, N. E., Troskie, M., Penzhorn, B. L. (2008). Identification of a Novel *Babesia* sp. from a Sable Antelope (*Hippotragus niger* Harris, 1838). *Journal Clinical Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/jcm.00167-08>

Quillfeldt, P., Martínez, J., Bugoni, L., Mancini, P. L., & Merino, S. (2014). Blood parasites in noddies and boobies from Brazilian offshore islands - differences between species and influence of nesting habitat. *Parasitology*, 141(3), 399–410. <https://doi.org/10.1017/S0031182013001649>

Rambaut, A. (2012). *Figtree v1.4. Molecular evolution, phylogenetics and epidemiology*. University of Edinburgh, Institute of Evolutionary Biology.

Schoch, C. L., Ciufo, S., Domrachev, M., Hotton, C. L., Kannan, S., Khovanskaya, R., Leipe, D., Mcveigh, R., O'Neill, K., Robbertse, B., Sharma, S., Soussov, V., Sullivan, J. P., Sun, L., Turner, S., & Karsch-Mizrachi, I. (2020). NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. *Database*, 2020. <https://doi.org/10.1093/database/baaa062>

Soares, J. F., Giroto, A., Brandão, P. E., Da Silva, A. S., França, R. T., Lopes, S. T., & Labruna, M. B. (2011). Detection and molecular characterization of a canine piroplasm from Brazil. *Veterinary parasitology*, 180(3-4), 203–208. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.03.024>

Soares, H. S., Marcili, A., Barbieri, A. R. M., Minervino, A. H. H., Moreira, T. R., Gennari, S. M., & Labruna, M. B. (2017). Novel piroplasmid and *Hepatozoon* organisms infecting the wildlife of two regions of the Brazilian Amazon. *Int J Parasitol Parasites Wildl*, 6(2), 115-121. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2017.05.002>

Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G. M., Grimont, P. A. D., Kämpfer, P., Maiden, M. C. J., Nesme, X., Rosselló-Mora, R., Swings, J., Trüper, H. G., Vauterin, L., Ward, A. C., & Whitman, W. B. (2002). Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(3), 1043-1047. <https://doi.org/10.1099/00207713-52-3-1043>

Thomas, R., Santodomingo, A., Parragué-Migone, C., Portillo, E., Barrios, M., Venzal, J. M., & Muñoz-Leal, S. (2023). A novel *Babesia* sp. of the "Western *Babesia* group", detected in opossums from Guatemala. *Ticks and tick-borne diseases*, 14(6), 102248. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2023.102248>

Wayne, L. G., Moore, W. E. C., Stackebrandt, E., Kandler, O., Colwell, R. R., Krichevsky, M. I., Truper, H. G., Murray, R. G. E., Grimont, P. A. D., Brenner, D. J., Starr, M. P., & Moore, L. H. (1987). Report of the Ad Hoc Committee on Reconciliation of Approaches to Bacterial Systematics. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 37(4), 463-464. <https://doi.org/10.1099/00207713-37-4-463>

Wolf, R. W., Aragona, M., Muñoz-Leal, S., Pinto, L. B., Melo, A. L., Braga, I. A., Costa Jdos, S., Martins, T. F., Marcili, A., Pacheco Rde, C., Labruna, M. B., & Aguiar, D. M. (2016). Novel *Babesia* and *Hepatozoon* agents infecting non-volant small mammals in

1 the Brazilian Pantanal, with the first record of the tick *Ornithodoros guaporensis* in
2 Brazil. *Ticks Tick Borne Dis*, 7(3), 449-456.
3 <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.01.005>
4

5 Zecca, I. B., Hodo, C. L., Slack, S., Auckland, L., & Hamer, S. A. (2020). *Trypanosoma*
6 *cruzi* infections and associated pathology in urban-dwelling Virginia opossums
7 (*Didelphis virginiana*). *Int J Parasitol Parasites Wildl*, 11, 287-293.
8 <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2020.03.004>
9

10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36

1 **Table 1:** Primers frequently used for Piroplasm sequencing.

Gene	Primer name	Primer Sequence	Base pars	Reference
18S Nested PCR	BTF1	5'-GGC TCA TTA CAA CAG TTA TAG-3'	800	Jefferies et al., 2007
	BTR1	5'-CCC AAA GAC TTT GAT TTC TCTC-3'		
	BTF2	5'-CCG TGC TAA TTG TAG GGC TAA TAC -3'		
	BTR2	5'-GGA CTA CGA CGG TAT CTG ATCG-3'		
18S Conventional PCR	Nbab1F	5'AAGCCATGCATGTCTAAGTATAAGCTTTT3'	1500	Oosthuizen et al., 2008
	18SApiR	5'GGATCACTCGATCGGTAGGAG3'		Greay et al. 2018
18S rRNA	NBAB1Bab	5'-GGATAACCGTGCTAATTGT-3'	1484	Quillfeldt et al. 2014
	Hep1615R	5'-AAAGGGCAGGGACGTAATC-3'		Merino et al. 2006
18S rRNA	Piro0F	5'-GCCAGTAGTCATATGCTTGTGTTA3'	1500	Kawabuchi et al. 2005
	Piro1F	5'-CCATGCATGTCTWAGTAYAARCTTTTA-3'		
	Piro5.5R	5'-CCTYTAAGTGATAAGGTTACAAAACTT-3'		
	Piro6R	5'-CTCCTTCCTYTAAGTGATAAGGTTTAC-3'		
hsp70	hsp70 F1	5'-CATGAAGCACTGGCCHTTCAA-3'	700	Soares et al., 2011
	hsp70 R1	5'-GCNCKGCTGATGGTGGTGTGTA-3'		
Cox1 Conventional PCR	Bab_For1	5'-ATWGGATTYATATGAGTAT-3'	924	Gou et al. 2012 modified by Corduneanu et al. 2017
	Bab_Rev1	5'-ATAATCWGGWATYCTCCTTGG-3'		
	Bab_For2	5'-TCTCTWCATGGWTTAATTATGATAT-3'		
	Bab_Rev2	5'-TAGCTCCAATTGAHARWACAAAAGTG-3'		
Cox3 Conventional PCR	Cox3F	5'-ACTGTCAGCTAAAACGTATC-3'	600	Schreeg et al. 2016
	Cox3R	5'-ACAGGATTAGATACCCTGG-3'		
CytB Conventional PCR	CytBF	5'-TTAGTGAAGGAACTTGACAGGT-3'	1Kb	Schreeg et al. 2016
	CytBR	5'-CGGTAAATCTTCTATTCTTACG-3'		

2

3

4

5 **Table 2:** Record *Babesia* sp. in opossums.

Opossum specie	Piroplasmid specie	Tissue or tick	Country	Reference
<i>Didelphis aurita</i>	<i>Babesia</i> sp. and Piroplasmid	Blood	Brazil	Oliveira et al., 2023
<i>D. albiventris</i>	<i>Babesia</i> sp.	Blood and <i>A. dubitatum</i>	Brazil	Gonçalves et al., 2021
<i>D. marsupialis</i>	<i>Babesia</i> sp.	Liver and Spleen	Guatemala	Thomas et al., 2023
<i>D. marsupialis</i>	<i>Babesia</i> sp.	Blood	Brazil	Braga et al., 2023
<i>D. marsupialis</i> and <i>M. domestica</i>	<i>Babesia</i> sp.	Blood	Brazil	Colle et al., 2019

6

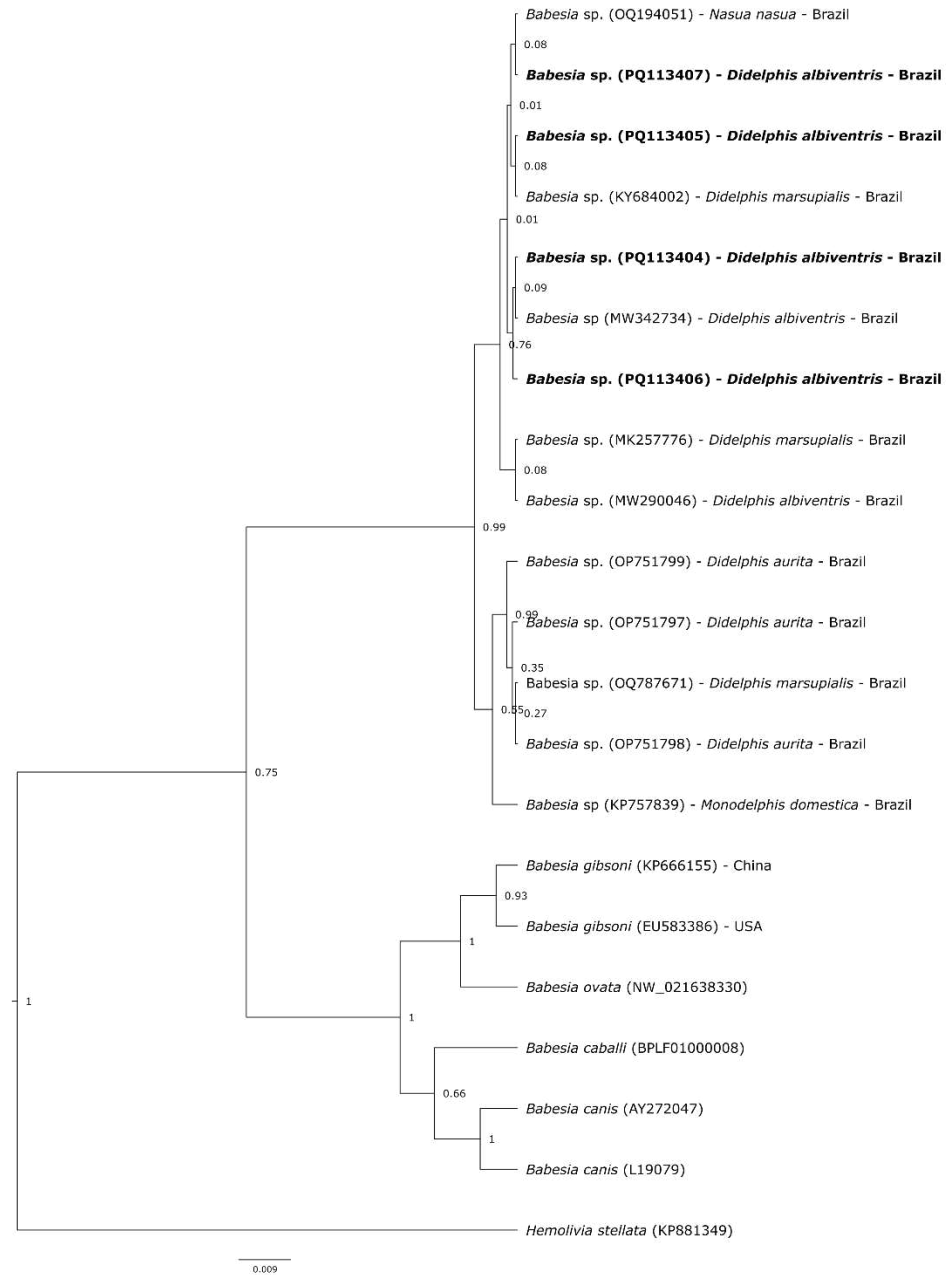


Figure 1. Phylogenetic tree based on partial sequences of the 18S gene (800 bp), showing the relationship between the Piroplasm detected in the White-eared opossums (*Didelphis albiventris*) PQ113404-PQ113407 from this study and other Piroplasm sequences published and deposited on GenBank. *Hemolivia stellata* was the outgroup used. The GenBank sequences were presented by the accession number of each agent. Bayesian inferences were carried out by applying the GTR + G model and 1000 bootstrap replicates for all analyses.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

1. Nosso estudo baseado na caracterização pelos genes 16S, *dsb* e *groEL* reporta uma espécie de *Ehrlichia* circulando em *D. albiventris* no Estado de Alagoas, nordeste do Brasil;
2. A análise molecular de piroplasmídeos baseada no gene 18S mostrou a circulação de *Babesia* sp. do grupo “South American Marsupialia”;
3. Essas descrições merecem maior investigação por meio de outros genes para confirmar molecularmente a existência e circulação de novas espécies.

1 ANEXOS



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “*Deteção de Rickettsia spp., Ehrlichiaspp. e hemoplasmas de interesse em saúde única em carrapatos de mamíferos silvestres no Estado de Alagoas, Brasil.*”, registrada com o nº **21/2021**, sob a responsabilidade do pesquisador **Prof. Dr. Jonatas Campos de Almeida**, que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), **para fins de pesquisa científica**, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Alagoas (CEUA/UFAL), em reunião de 17 de dezembro de 2021.

Vigência da autorização	01.04.2022 a 01.04.2023
Espécie/linhagem/raça	Espécie silvestre brasileira de vida livre
Nº de animais / peso – idade / sexo	Não definidos
Origem / Local de manutenção	Centro de Triagem de Animais Silvestres – Cetas/Al / Não se aplica
Colaboradores	Epitácio Correia de Farias Júnior

Maceió 19 de janeiro de 2022

Documento assinado digitalmente



Elvan Nascimento dos Santos Filho

Data: 19/01/2022 10:40:43-0300

Verifique em <https://verificador.iti.br>

Elvan Nascimento dos Santos Filho
Coordenador da CEUA
SIAPE 1756479



Ministério do Meio Ambiente - MMA

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 79797-1	Data da Emissão: 20/08/2021 12:04:16	Data da Revalidação*: 20/08/2022
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Epitacio Correia de Farias Junior	CPF: 060. [REDACTED]
Título do Projeto: Autorização para coleta de material biológico de animais do Centro de Triagem de Animais Silvestres - CETAS/AL.	
A solicitação se dá em virtude da necessidade de execução de atividades relacionadas ao projeto de pesquisa denominado "Detecção de Rickettsia spp., Ehrlichia spp. e outros hemoplasmas de interesse em saúde única em carrapatos de mamíferos silvestres no Estado de Alagoas, Brasil." vinculado ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, nível Mestrado.	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS	CNPJ: 24.464.109/0001-48

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Revisão Bibliográfica	08/2021	05/2023
2	Treinamento da equipe, padronização das coletas e técnicas laboratoriais.	10/2021	12/2021
3	Coleta de carrapatos e diagnóstico entomológico	01/2022	12/2022
4	Diagnóstico Molecular e Sequenciamento	01/2022	12/2022
5	Tabulação e análise dos Dados	01/2022	06/2023

Observações e ressalvas

1	Deve-se observar as as recomendações de prevenção contra a COVID-19 das autoridades sanitárias locais e das Unidades de Conservação a serem acessadas.
2	Esta autorização NÃO libera o uso da substância com potencial agrotóxico e/ou inseticida e NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de atender às exigências e obter as autorizações previstas em outros instrumentos legais relativos ao registro de agrotóxicos (Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002, entre outros).
3	Esta autorização NÃO libera o uso da substância com potencial agrotóxico e/ou inseticida e NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de atender às exigências e obter as autorizações previstas em outros instrumentos legais relativos ao registro de agrotóxicos (Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002, entre outros).
4	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
5	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
6	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .
8	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.

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

Código de autenticação: 0797970120210820

Página 1/4