



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

NELSON JESSÉ RODRIGUES DOS SANTOS

***Candidatus Mycoplasma haematohydrochoerus*' E
Bartonella spp. EM CAPIVARAS (*Hydrochoerus
hydrochaeris*) DO MUNICÍPIO DE PINHAIS, PARANÁ,
BRASIL**

Londrina
2021

NELSON JESSÉ RODRIGUES DOS SANTOS

***Candidatus Mycoplasma haematohydrochoerus*' E
Bartonella spp. EM CAPIVARAS (*Hydrochoerus
hydrochaeris*) DO MUNICÍPIO DE PINHAIS, PARANÁ,
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. Rafael Felipe da Costa Vieira

Londrina
2021

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

S237 Santos, Nelson Jessé Rodrigues dos.
'Candidatus Mycoplasma haematohydrochoerus' e Bartonella spp. em Capivaras (Hydrochoerus hydrochaeris) do Município de Pinhais, Paraná, Brasil / Nelson Jessé Rodrigues dos Santos. - Londrina, 2021.
66 f. : il.

Orientador: Rafael Felipe da Costa Vieira.
Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2021.
Inclui bibliografia.

1. Doenças infecciosas - Tese. 2. Doenças parasitárias - Tese. 3. Biologia molecular - Tese. 4. Silvestres - Tese. I. Vieira, Rafael Felipe da Costa. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

CDU 619

NELSON JESSÉ RODRIGUES DOS SANTOS

***Candidatus Mycoplasma haematohydrochoerus*' E
Bartonella spp. EM CAPIVARAS (*Hydrochoerus
hydrochaeris*) DO MUNICÍPIO DE PINHAIS, PARANÁ,
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

Prof. Dr. Rafael Felipe da Costa Vieira
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Luiz Daniel de Barros
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Jonatas Campos de Almeida
Universidade Federal de Alagoas - UFAL

Prof. Dr. Marcos Rogério André
Universidade Estadual Paulista - UNESP

Prof. Dr. Ivan Roque de Barros Filho
Universidade Federal do Paraná – UFPR

Londrina, 21 de maio de 2021.

AGRADECIMENTOS

Ao meu Senhor por guiar meus passos e colocar em minha jornada pessoas tão distintas, com quem pude aprender sobre a vida.

Aos meus pais, Sr. Nelson Alves dos Santos e Sra. Edna Rodrigues de Carvalho dos Santos, pessoas dos mais simples costumes, mas de alma nobre, a quem tanto devo que jamais poderei saldar minha dívida. Responsáveis por criar em mim a paixão pelos seres vivos são, certamente, os maiores mestres que poderei ter.

A minha companheira, Srta. Andresa Domingues Scitko da Silva, por apoiar que buscasse minhas realizações, por ser a luz do meu cotidiano, e pelo companheirismo nos momentos alegres e sombrios da vida.

Ao meu professor e amigo, Dr. Rafael Felipe da Costa Vieira, que desde nosso primeiro contato sempre se mostrou receptivo. Profissional de inúmeros adjetivos, e cito aqueles que mais invejo: a proatividade, o foco, a determinação e a humanidade. Personalidade por quem nutro crescente respeito e admiração.

Aos professores Dr. Odilon Vidotto, Dr. João Luis Garcia e Dra. Roberta Lemos Freire por terem me acolhido ainda na iniciação científica e guiado pelos primeiros anos na academia, com quem aprendi sistemática e criticidade.

Aos colegas de laboratório, sem os rotular como ICs, residentes, mestrandos, doutorandos ou técnicos, mas sim como parceiros, com quem pude aprender nas colaborações, discussões e mesmo nas conversas mais informais.

Aos professores e demais servidores da UEL, lugar que reconheço como um lar, por propiciarem um ambiente de formação de elevado padrão e tornarem esse nome motivo de orgulho para toda uma comunidade.

**“A mind that is stretched by new experience
can never go back to its old dimensions.”**

Oliver Wendell Holmes Jr.

SANTOS, Nelson Jessé Rodrigues dos. '**Candidatus Mycoplasma haematohydrochoerus**' e **Bartonella spp.** em Capivaras (**Hydrochoerus hydrochaeris**) do Município de Pinhais, Paraná, Brasil. 2021. 64 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

RESUMO

As capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*), maior espécie de roedor do mundo, estão distribuídas em todos os países da América do Sul que ficam a leste da Cordilheira dos Andes. Os desequilíbrios ecológicos causados pela presença humana provocam o deslocamento e expansão de suas populações, que convivem nos campos de cultivo e em parques urbanos, além das matas nativas. Esta espécie é fortemente associada ao parasitismo por carrapatos, potenciais transmissores de agentes infecciosos a animais e seres humanos. Existe, no entanto, uma lacuna a respeito de dois gêneros de bactérias hemotrópicas nestes roedores, a saber: *Bartonella* spp., reconhecida em várias espécies da mesma ordem, e os micoplasmas hemotrópicos (hemoplasmas), já descritos em capivaras. Neste sentido, o presente estudo objetivou detectar e caracterizar molecularmente hemoplasmas e verificar a ocorrência de *Bartonella* spp. em grupo de capivaras de vida livre. Para execução do estudo foram capturadas 17 capivaras (10 fêmeas e 7 machos) em armadilha tipo curral, instalada às margens de fragmento da Mata Atlântica, no município de Pinhais, Paraná. Após contenção química com uso de zarabatana e dardos contendo associação de anestésicos, foram anotados os dados de cada animal e coletadas amostras de sangue total e carrapatos. Uma alíquota de sangue de cada amostra foi submetida à avaliação de hematócrito e proteínas plasmáticas totais, outra submetida à extração de DNA para testes moleculares. Todos os carrapatos encontrados nos animais foram coletados e identificados por suas características morfológicas. Destes, onze tiveram suas glândulas salivares dissecadas e testadas pela PCR. Todas as amostras de sangue foram inicialmente submetidas à PCR para gene endógeno *gapdh*. Na sequência foram testadas para o gene 16S rRNA de *Mycoplasma coccoides* e 16S rRNA para o grupo dos hemoplasmas por meio de ensaios de PCR convencional. Aquelas que apresentaram resultado positivo foram testadas para o gene 23S rRNA de hemoplasmas. Para investigação de *Bartonella* spp. foi utilizada a PCR em tempo real (qPCR) baseada no gene *nuoG*. Todos os animais apresentavam parasitismo por carrapatos no momento da coleta, os quais foram identificados como *Amblyomma dubitatum* (26 machos, 16 fêmeas, 122 ninfas e 3 larvas; taxa de infestação: 9,82). Todas as amostras de sangue foram positivas para o gene *gapdh* e 16/17 (94,12%; IC 95% 73,02 - 98,95%) foram positivas para hemoplasmas, porém nenhuma foi positiva para *Bartonella* spp. Todas foram positivas para o gene *gapdh* e uma (9,09%) para o gene 16S rRNA. Oito amostras foram sequenciadas pelo método de Sanger em ambos os genes testados e apresentaram *query coverage* entre 97% e 100% para sequência de micoplasmas hemotrópicos depositadas no GenBank. Sequências do gene 16S rRNA dos hemoplasmas detectados demonstraram identidade variando de 99 -100% com hemoplasmas associados às capivaras. As sequências do gene 23S rRNA demonstraram identidade variando de 91,7% a 92,4% com '*Candidatus Mycoplasma haemosphiggurus*'. Os dados indicam a existência de uma nova espécie de hemoplasma em capivaras do Brasil, aqui

proposta como '*Candidatus Mycoplasma haematohydrochaeris*'. Com os achados também não é possível provar a participação das capivaras na epidemiologia de *Bartonella* spp.

Palavras-chave: hemoplasma; *bartonella*; *amblyomma dubitatum*; roedor silvestre; PCR.

SANTOS, Nelson Jessé Rodrigues dos. '*Candidatus Mycoplasma haematohydrochoerus*' and *Bartonella* spp. in Capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) from Municipality of Pinhais, Paraná, Brazil. 2021. 64 p. Thesis (Doctorate degree in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

ABSTRACT

Capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*), largest living rodent in the world, are widely distributed for all South America countries located in East Andes. The ecological imbalances caused by human presence favor the displacement and expansion of its population, who live in cultivated fields and in urban parks, in addition to native habitat. This species is strongly associated with tick parasitism, potential vectors of infectious agents to animals and humans. However there is a gap regarding two genera of hemotropic bacteria in these rodents, *Bartonella* spp., recognized in several species of the same order, and the group of hemotropic mycoplasmas (hemoplasmas), already described in capybaras. Thereby, the present study aimed to detect and molecularly characterize of hemoplasmas and to verify the occurrence of *Bartonella* spp. in a group of free-living capybaras. For the study execution, 17 capybaras (10 females and 7 males) were captured in a corral trap, positioned by side of an Atlantic Forest fragment, in the municipality of Pinhais, Paraná. After chemical restraint with blowguns and darts containing an association of anesthetic, the data of each animal were recorded and whole blood and tick samples were collected. One aliquot of blood of each sample was evaluated for packed cell volume and total plasma proteins, another was subjected to DNA extraction for molecular tests. All ticks found on animals were collected and identified by their morphological characteristics. Of these, eleven had their salivary glands dissected and tested by PCR. All blood samples were initially tested for endogenous gene *gapdh* by PCR. After, the 16S rRNA of *Mycoplasma coccoides* and the 16S rRNA for the group of hemoplasmas were tested by conventional PCR. Those that tested positive were also tested for the 23S rRNA hemoplasma gene. For *Bartonella* spp. screening a quantitative PCR (qPCR) was used based on *nuoG* gene. All animals presented tick parasitism at the time of sampling, which were identified as *Amblyomma dubitatum* (26 males, 16 females, 122 nymphs and 3 larvae; infestation rate: 9.82); All blood samples were positive for *gapdh* gene and 16/17 (94.12; CI: 73.02 - 98.95%) were positive for hemoplasmas, but none were positive for *Bartonella* spp. All salivary glands were positive for *gapdh* gene and one (9.09%) for 16S rRNA gene. Eight samples were sequenced by Sanger method in both tested genes and showed query coverage between 97% and 100% for hemotropic mycoplasma sequences archived on GenBank. Sequences of 16S rRNA gene of hemoplasmas detected showed identity ranging from 99% to 100% with capybaras-associated hemoplasmas. The sequences of 23S rRNA gene showed identity ranging from 91.7% to 92.4% to '*Candidatus Mycoplasma haemosphiggurus*'. The data indicate the existence of a new species of hemoplasma in capybaras from Brazil, here proposed as '*Candidatus Mycoplasma haematohydrochaeris*'. By the findings it is also not possible to prove the participation of capybaras in the epidemiology of *Bartonella* spp.

Key words: hemoplasma; *bartonella*; *amblyomma dubitatum*; wild rodent; PCR.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Phylogenetic relationships within the *Mycoplasma* genus based on a fragment of 800 bp of the *16S rRNA* gene. The phylogenetic tree was inferred by using the maximum likelihood method and GTR+ G + I model. The numbers at the nodes correspond to bootstrap values higher than 60% accessed with 1,000 replicates. *Mycoplasma pneumoniae* was used as outgroup.52
- Figura 2** – Phylogenetic relationships within the *Mycoplasma* genus based on a fragment of 800 bp of the *23S rRNA* gene. The phylogenetic tree was inferred by using the maximum likelihood method and the GTR+ G + I model. The sequences detected in the present study are highlighted in bold. The numbers at the nodes correspond to bootstrap values higher than 60% accessed with 1,000 replicates. *Mycoplasma pneumoniae* was used as outgroup.54
- Figura 3** – Neighbor-Net analysis of *16S rRNA* sequences obtained from capybara sampled in the present study and compared to related hemoplasmas sequences previously deposited in GenBank®55
- Figura 4** – Neighbor-Net analysis of *23S rRNA* sequences obtained from capybara sampled in the present study and compared to related hemoplasmas sequences previously deposited in GenBank®55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BAPGM	<i>Bartonella Alpha-proteobacteria growth medium</i>
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
IFA	<i>Indirect Fluorescent Antibody Assay</i>
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i>
Kg	Quilograma
Km ²	Quilômetros quadrados
LPS	Lipopolissacarídeo
n	Número amostral
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
ddPCR	<i>Droplet Digital Polimerase Chain Reaction</i>
qPCR	<i>Quantitative Polimerase Chain Reaction</i>
rRNA	<i>Ribossomal Ribonucleic Acid</i>
UEL	Universidade Estadual de Londrina
UFPR	Universidade Federal do Paraná
TLR	<i>Toll Like Receptor</i>
µm	Micrômetros
kDa	Quilo Daltons

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1	HEMOPLASMA	14
2.1.1	Transmissão de Hemoplasmas	14
2.1.2	Interação com Hospedeiro.....	15
2.1.3	Diagnóstico.....	16
2.1.4	Distribuição dos Hemoplasmas em Roedores do Brasil.....	17
2.1.5	Distribuição dos Hemoplasmas em Capivaras	19
2.2	BARTONELLA SPP.	19
2.2.1	Transmissão de Bartonella	20
2.2.2	Interação com Hospedeiro	22
2.2.3	Cultivo.....	23
2.2.4	Diagnóstico Sorológico	24
2.2.5	Diagnóstico Molecular	25
2.2.6	Distribuição de Bartonella spp. em Roedores do Brasil.....	25
2.3	ECTOPARASITOS DE CAPIVARAS.....	27
3	REFERÊNCIAS	29
4	HIPÓTESE	37
5	OBJETIVOS	38
5.1	OBJETIVO GERAL.....	38
5.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	38
6	ARTIGO A – ‘<i>Candidatus Mycoplasma haematohydrochoerus</i>’, A NOVEL HEMOPLASMA SPECIES IN CAPIVARAS (<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>) FROM BRAZIL	39
7	ARTIGO B – QUANTITATIVE POLYMERASE CHAIN REACTION FOR SCREENING <i>Bartonella</i> IN FREE-RANGING CAPIVARAS	

	(<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>) FROM PARANÁ STATE, SOUTHERN BRAZIL	56
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS/CONCLUSÃO	62
	APÊNDICES	63
	APÊNDICE A – Certificado da comissão de ética no uso de animais	64

1 1.INTRODUÇÃO

2 As capivaras, nativas da América do Sul e Central, são roedores
3 herbívoros de hábitos semi-aquáticos. Habitam áreas próximas de fontes de água
4 doce, recurso diretamente vinculado à evolução da espécie, que a utiliza como
5 refúgio de predadores, termorregulador e tem em suas margens campos de pastejo.
6 Deslocam-se por quase meio quilômetro (483 m) a partir do corpo d'água a procura
7 de alimento (ALMEIDA; BIONDI, 2014). Duas espécies se distinguem: *Hydrochoerus*
8 *isthmius*, menor representante do gênero, com peso médio próximo de 50 kg,
9 naturais da porção continental da América Central e noroeste da América do Sul; e
10 *Hydrochoerus hydrochaeris*, maior das espécies de roedores da atualidade podendo
11 passar de 80 kg, que habitam quase toda a América do Sul com exceção da faixa
12 oeste da Cordilheira dos Andes (GONZÁLEZ-JIMÉNEZ, 1995).

13 Diversas características comportamentais e ecológicas tornam este
14 animal objeto de estudo. As capivaras são animais gregários e seus grupos podem
15 variar na dependência da disponibilidade de recursos naturais no habitat e pressão
16 de predadores. Estes grupos podem chegar a ter mais de 50 indivíduos, vivendo em
17 uma densidade populacional equivalente a 124 animais/km². Em sua organização
18 social é estabelecida uma hierarquia entre os machos, na qual o alfa pode ser
19 identificado por uma proeminente glândula sebácea sobre o focinho (VERDADE;
20 FERRAZ, 2006). Vivem em grupos fechados com baixa taxa de imigração, porém
21 ocasionalmente alguns indivíduos migram entre os grupos, os chamados *floaters*. A
22 quantidade de *floaters* cresce à medida que a densidade populacional se eleva
23 (HERRERA et al., 2011). Tal fato permite que haja variabilidade genética entre as
24 populações, mas também dispersão de doenças, como àquelas transmitidas por
25 vetores e por contato entre os grupos vizinhos.

26 Os efeitos da antropização já foram comprovados sobre as
27 populações de capivaras. Assim como o desmatamento e construção de
28 reservatórios de água provocam o deslocamento dos grupos, o cultivo de plantas de
29 interesse comercial e redução na população de predadores causa a expansão no
30 número de indivíduos, situações que tornam espaços de ocupação humana
31 interessante a estes animais (VERDADE; FERRAZ, 2006).

32 Tal proximidade gera preocupação, pois as capivaras são
33 comumente associadas ao risco de doenças transmitidas por carrapatos, uma vez

34 que a infestação da espécie por estes artrópodes, em especial espécies do gênero
35 *Amblyomma*, é igualmente comum (LABRUNA et al., 2002). No grupo de doenças
36 transmitidas por carrapatos do gênero *Amblyomma*, pode-se destacar agentes de
37 relativa importância à saúde humana e animal como *Rickettsia* e *Borrelia*, ademais
38 hemoplasmas também são associados (GONÇALVES et al., 2020a; HIGA et al.,
39 2020). Complementarmente, apesar de escassos os estudos que relacionam
40 *Bartonella* spp. com agentes transmissores que não sejam pulgas, o carrapato
41 *Ixodes ricinus* já teve demonstrada sua competência vetorial para este agente (REIS
42 et al., 2011). Com base nisso, mesmo que nem todos os agentes citados
43 anteriormente serem diretamente relacionados à presença das capivaras, é
44 indiscutível que estes roedores promovem a expansão da população de carrapatos e
45 consequente infestação de matas e pastagens, ambientes que podem ser
46 compartilhados com seres humanos e animais de companhia nas áreas de lazer ou
47 animais de criação quando no meio rural.

48 Por entender que a interação humana com animais silvestres faz
49 parte do processo de readaptação cultural que a modernidade nos pede, com
50 especial foco na saúde única, a vigilância sobre as capivaras se faz necessária. Pela
51 relação destes roedores com as bartonelas ainda ser insuficientemente abordada,
52 assim como baseado em indícios de haver uma nova espécie de hemoplasma
53 infectando-os (VIEIRA et al., 2009), o presente estudo contribuirá com o horizonte de
54 informações para melhor compreender a distribuição dos agentes infecciosos e da
55 coevolução que possam ter seguido.

56

57 2. REFERENCIAL TEÓRICO

58 2.1 HEMOPLASMAS

59 Os micoplasmas hemotrópicos caracterizam-se por serem bactérias
60 pleomórficas, desprovidas de parede celular, coradas como Gram-negativas,
61 medindo entre 0,3 a 3 µm de diâmetro e com genoma reduzido, condicionando-as à
62 vida parasitária (MESSICK, 2004). Os micoplasmas hemotrópicos, eram
63 classificados em dois gêneros, *Haemobartonella* e *Eperythrozoon*, compreendidos
64 em um grande grupo de micro-organismos da ordem Rickettsiales, que agrupa as
65 famílias Rickettsiaceae e Anaplasmataceae (NEIMARK et al., 2001). Foram, então,
66 reagrupados com base nas suas características fenotípicas, resistência a antibióticos
67 e, principalmente, na forte semelhança filogenética do gene 16S rRNA. São agora
68 pertencentes ao filo Tenericutes, classe Mollicutes, da ordem Mycoplasmatales,
69 família Mycoplasmataceae e unidos como gênero *Mycoplasma* (NEIMARK et al.,
70 2001). Estes agentes, convencionalmente chamados de hemoplasmas, podem ser
71 encontrados no sangue de mamíferos, evidenciados pela microscopia de luz como
72 corpúsculos arredondados epieritrocitários. Provocam doença denominada
73 micoplasmose hemotrópica ou hemoplasmose (anteriormente denominada de
74 hemobartonelose e eperitrozoonose), caracterizada por anemia hemolítica
75 imunomediada (MESSICK, 2004).

76

77 2.1.1 Transmissão de Hemoplasmas

78 Apesar da complexidade para se determinar vetores biológicos,
79 várias espécies de artrópodes hematófagos já foram relacionadas à transmissão
80 mecânica de hemoplasmas. Em pesquisa experimental já foi sugerida a transmissão
81 de *Mycoplasma haemofelis* e '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*' por pulgas
82 da espécie *Ctenocephalides felis* para gatos domésticos (WOODS et al., 2005).
83 Piolhos da espécie *Polyplax serrata* foram evidenciados capazes de transmitir
84 *Eperythrozoon coccoides* para roedores de laboratório, também sob condições
85 experimentais. O mesmo estudo não identificou possibilidade de transmissão do
86 agente para os roedores por ácaros (BERKENKAMP; WESCOTT, 1988). Mosquitos

87 *Aedes aegypti* e moscas *Stomoxys calcitrans* foram capazes de transmitir
88 mecanicamente o agente, então chamado *Eperythrozoon suis*, para suínos
89 (PRULLAGE; WILLIAMS; GAAFAR, 1993) e carrapatos *Rhipicephalus sanguineus*
90 são considerados os principais vetores de *Mycoplasma haemocanis* para cães
91 domésticos (SENEVIRATNA; WEERASINGHE; ARIYADASA, 1973). Ademais a
92 transmissão transplacentária também já foi comprovada para *Mycoplasma wenyonii*
93 em bovinos (GIROTTO-SOARES et al., 2016) e, em estudos com *Gerbullus*
94 *andersoni* (gerbil), foi descrita a transmissão de *Mycoplasma haemomuris* por meio
95 do contato direto entre os roedores, quando em alta parasitemia estes agentes
96 foram encontrados na mucosa oral e saliva dos roedores. Nesse estudo a
97 transmissão direta ainda foi sugerida como a mais importante do projeto em questão,
98 que também testou transmissão por pulgas *Synosternus cleopatrae*, essa não
99 resultou em roedores positivos no grupo controle nem no experimental (COHEN et
100 al., 2018).

101

102 2.1.2 Interação com Hospedeiro

103 Apesar dos hemoplasmas serem organismos relativamente simples
104 é conhecido que eles possuem fatores de patogenicidade. Além da depleção de
105 precursores biossintéticos do hospedeiro, induzem a formação de autoanticorpos,
106 secretam enzimas líticas e, em casos específicos, podem progredir da adesão para
107 invasão celular (MESSICK, 2004; GROEBEL et al., 2009). Complementarmente,
108 alguns micoplasmas têm a capacidade de secretar superantígenos, macromoléculas
109 que se ligam aos componentes do sistema complemento de maneira que os
110 consomem e reduzem sua participação na resposta inata (COLE; ATKIN, 1991).

111 Os hemoplasmas promovem a ligação entre aglutininas de sua
112 superfície com as glicoproteínas tipo sialyl-L, estruturais da membrana dos
113 eritrócitos. É esperado que este complexo dificulte o reconhecimento pelos linfócitos
114 B e cause, secundariamente, redução da capacidade de reconhecer antígenos
115 próprios. Com este fenômeno, os anticorpos provocam a hemocaterese excessiva e
116 o achado clínico-patológico de anemia imunomediada. Tal reação já foi reportada
117 em roedores, felinos, canídeos e suínos (FEIZI; LOVELESS, 1996; MESSICK, 2004).

118 Adicionalmente, os micoplasmas possuem uma estrutura composta

119 por adesinas e proteínas acessórias. Esse aparato se assemelha em função a um
120 citoesqueleto, que interage com a célula hospedeira promovendo a adesão. Após o
121 contato, as proteínas acessórias deslocam mais adesinas para o local, fortalecendo
122 a ligação. No entanto, da mesma forma como se aderem também podem se
123 desprender de forma estratégica. É sabido que os hemoplasmas podem sofrer
124 alteração fenotípica durante a infecção de um único hospedeiro, fenômeno
125 inicialmente descoberto com *M. haemofelis*. Esta estratégia permite que reinfectem
126 eritrócitos de forma cíclica. Durante a fase livre no plasma eles podem diferenciar
127 sítios dominantes das proteínas de adesão e, até mesmo, tornarem-se aptos a
128 infecção de outros tipos celulares, como as de seus agentes transmissores
129 (BERENT; MESSICK; COOPER, 1998; MESSICK, 2004).

130

131 2.1.3 Diagnóstico

132 O diagnóstico da infecção por hemoplasmas pode ser feito de forma
133 indireta ou direta. Na forma indireta, os testes sorológicos contribuem para oferecer
134 panoramas epidemiológicos com proporcional menor gasto de recursos quando
135 comparado aos métodos moleculares. Os ensaios sorológicos são estudados desde
136 o final do século XX (RIKIHISA et al., 1997), no entanto poucos testes foram
137 padronizados e adotados por grupos de pesquisa, mostrando tendência de serem
138 substituídos por outros meios diagnósticos. Todavia o *Western blot* e o ELISA
139 utilizando antígenos *dnaK* de *M. haemofelis* obtidos por clonagem foram relatados
140 para levantamento epidemiológico (BARKER et al., 2010).

141 Dentre os métodos diretos temos a microscopia de luz, mais
142 acessível, porém que oferece viés de equipamento e operador, o qual pode ser
143 influenciado por artefatos de técnica ou mesmo corpúsculos de Howell-Jolly
144 (NISHIZAWA et al., 2010). Também compreendida nesta categoria, as técnicas
145 moleculares possibilitam maior sensibilidade e especificidade, que conferem
146 informações mais confiáveis para se discriminar as variações genéticas entre as
147 espécies. O gene 16S rRNA, tem sido usado desde o princípio dos estudos
148 moleculares dos hemoplasmas nos anos 90 do século XX. Sua exploração permitiu
149 inúmeras adaptações, e se tornou o mais amplamente utilizado por ser um gene
150 conservado da estrutura do ribossomo e, ao mesmo tempo, apresentar variações

151 pontuais em bases nitrogenadas que diferem espécies filogeneticamente próximas
152 (WEN et al., 1995; RIKIHISA et al., 1997; DE SOUSA et al., 2017). Outros genes,
153 que são utilizados em conjunto com o 16S rRNA, são o RNaseP (COMPTON;
154 MAGGI; BREITSCHWERDT, 2012) e o 23S rRNA (VIEIRA et al., 2015).

155 Em busca de elaborar ferramenta que permitisse o exame de
156 triagem em amostras nas quais não se soubesse a espécie infectante, duas
157 pesquisas produziram técnicas moleculares para este fim, ambas baseadas no gene
158 16S rRNA. Explorando o princípio do SYBR *green* Willi *et al.* (2009) utilizaram 14
159 espécies de hemoplasmas para desenvolver uma qPCR de alvo genérico.
160 Posteriormente, buscando refinar a triagem e baseado no mesmo alvo gênico, uma
161 nova sequencia foi desenhada com menor número de bases degeneradas
162 (HOELZLE et al., 2011). Os produtos destas pesquisas tornaram prática a triagem
163 molecular de animais domésticos, sinantrópicos e silvestres.

164 O isolamento em cultivos *in vitro*, ao se utilizar meios conhecidos e
165 adaptados, até o momento não foi descrito com êxito na literatura internacional,
166 tornando difíceis ensaios experimentais.

167

168 2.1.4 Distribuição dos Hemoplasmas em Roedores do Brasil

169 Estudo desenvolvido com 374 roedores de nove espécies, em três
170 áreas da mata atlântica no Sudeste, demonstrou que os hemoplasmas estão
171 amplamente disseminados. O estudo utilizou esfregaços sanguíneos corados por
172 Giemsa e observados por microscopia de luz. Foram dados como positivos 9/76
173 *Akodon serrensis*, 2/25 *Delomys dorsalis*, 8/34 *Oligorysomys nigripes*, 28/172
174 *Akodon montensis*, 8/42 *Delomys sublineatus*, 2/3 *Nectomys squamipes*. Todavia
175 em *Oxymyterus* sp. (n = 4), *Thaptomys nigrita* (n = 11) e *Trynomys dimedius* (n = 7)
176 não se observaram corpúsculos semelhantes aos hemoplasmas. Apesar deste
177 estudo não ter focado nos ectoparasitos, e, portanto, não os ter quantificado,
178 identificaram a presença de ninfas de Ixodídeos em exemplares de *Akodon serrensis*
179 e *Delomys sublineatus* (SILVA et al., 2007).

180 Em pesquisa realizada em cinco diferentes biomas brasileiros se
181 comprovou que a ocorrência de hemoplasmas em roedores silvestres é influenciada
182 por características regionais que diferem entre os biomas, e a isso pode se incluir a

183 temperatura e a umidade, fatores que influem sobre a variabilidade da entomofauna.
184 Na referida pesquisa encontrou-se a prevalência para *Mycoplasma* spp. hemotrópico
185 de 9,3% (7/75) na Caatinga, 12,5% (4/32) no Pantanal, 24,7% (43/174) no Cerrado,
186 25,8% (8/31) na Amazônia e 26,2% (38/145) na Mata Atlântica, a última se mostra
187 zona de maior risco para infecção. Ao sequenciar as amostras, com foco no gene
188 16S rRNA, encontrou-se similaridade com 'Ca. *M. haemomuris* subsp. *musculi*', 'Ca.
189 *M. haemomuris* subsp. *ratti*', *M. coccoides* e, inclusive, com sequência descrita com
190 possibilidade de ser uma nova espécie infectando capivaras (GONÇALVES et al.,
191 2015).

192 Na pesquisa realizada por de Sousa et al. (2017) na região do
193 Pantanal, foram coletados 110 pequenos roedores silvestres (77 *Thrichomys fosteri*,
194 25 *Oecomys mamorae* e 8 *Clyomys laticeps*). Destes animais, apenas um *O.*
195 *mamorae* foi positivo a PCR do gene 16S rRNA, e, ao sequenciar, revelou 100% de
196 identidade com sequência depositada de hemoplasma obtido de *Thrichomys fosteri*
197 da mesma região.

198 Quando analisamos os pequenos roedores comuns ao ambiente
199 urbano, pesquisa desenvolvida em *Rattus norvegicus* no estado do Paraná com 63
200 animais indicou prevalência de 63,5 %. Neste estudo não houve relação estatística
201 da infecção com peso do animal ou seus valores de hematócrito e proteínas
202 plasmáticas totais, o que indica a considerável coevolução e seu comportamento
203 como reservatório do agente (CONRADO et al., 2015). Adicionalmente, pesquisa
204 realizada no estado do Mato Grosso do Sul revelou prevalências de 30,7% em
205 *Rattus rattus* (n = 39) e zero em *Mus musculus* (n = 9). Tal dado resultou de teste
206 molecular também baseado no gene 16S rRNA. E ao examiná-los para presença de
207 ectoparasitas foram encontrados piolhos *Polyplax spinulosa* e larvas de *Amblyomma*
208 sp., os quais foram analisados em pools pelo mesmo método molecular e
209 apresentaram 100% (2/2 pools) e 22,2% (2/9 pools) de positividade,
210 respectivamente. O sequenciamento das amostras positivas dos ratos agrupou com
211 sequências previamente conhecidas de 'Ca. *M. haemomuris*' (GONÇALVES et al.,
212 2020a).

213

214 2.1.5 Distribuição dos Hemoplasmas em Capivaras

215 Em pesquisa realizada em Foz do Iguaçu, Paraná-BR, foram
216 coletadas 31 capivaras, 10 de cativeiro e 21 de vida livre, que foram testadas por
217 meio da PCR para o gene 16S rRNA de *M. coccoides* e *M. haemomuris*. Destes,
218 20/31 (64%) foram positivos na reação para *M. coccoides*, sendo 80% (17/21) de
219 vida livre e 30% (3/10) de cativeiro. Quando realizada a reação para *M. haemomuris*,
220 nenhuma amostra foi positiva. No entanto, quando foram sequenciadas,
221 apresentaram 91,6–92% de identidade com *M. coccoides* e 91–91,4% com ‘*Ca. M.*
222 *turicensis*’. A significativa diferença estatística encontrada ao se comparar animais
223 de vida livre com aqueles de cativeiro nos revela que o fator ambiental livre
224 influencia positivamente as taxas de infecção das capivaras (VIEIRA et al., 2009). No
225 estudo anteriormente citado com roedores da região do Cerrado do Mato Grosso do
226 Sul, 14 capivaras foram capturadas e 50% delas apresentaram resultado positivo
227 pela PCR, também pelo gene 16S rRNA. Ao sequenciar três amostras, todas
228 formaram clado com a amostra descrita por Vieira *et al.* (2009). Durante a
229 amostragem dos animais foram coletados 42 carrapatos identificados como *A.*
230 *dubitatum*, os quais nenhum foi positivo para hemoplasmas, e 33 *A. sculptum*, dos
231 quais um continha DNA detectável de hemoplasma, equivalente a 3,3%
232 (GONÇALVES et al., 2020a).

233

234 2.2 *BARTONELLA* SPP.

235 O estudo com as bactérias do gênero *Bartonella* começou no início
236 do século XX com Alberto Barton, médico peruano. Motivado em investigar uma
237 doença associada ao mosquito *Lutzomyia verrucarum* que acometia a população
238 dos vales andinos, ele utilizou esfregaços sanguíneos para evidenciar a presença
239 estruturas baciliformes intraeritrocitárias em pacientes com anemia e febre. Aqueles
240 que sobreviviam a esta fase aguda desenvolviam, entre 1 e 2 meses, uma lesão
241 verrucosa secundária na pele, a fase crônica. Nesta alteração tecidual havia
242 colonização no endotélio vascular, que evoluía para erupções cutâneas, as quais
243 poderiam persistir como sequela por meses ou anos (BARTON, 1909). Antes deste
244 primeiro relato, a doença era amplamente conhecida nos atuais territórios do Peru,

245 Equador e Colômbia como febre de Oroya. Acredita-se que a bartonelose tenha
246 causado a morte de aproximadamente 10.000 pessoas durante a exploração das
247 matas para construção de ferrovias (BASS; VINCENT; PERSON, 1997).

248 As bactérias do gênero *Bartonella* são pleomórficas, aeróbicas,
249 coradas como Gram-negativas, e inseridas na classe Alphaproteobacteria, ordem
250 Rhizobiales, família Bartonellaceae. O agente é transmitido por vetores artrópodes
251 aos seus diversos hospedeiros, e causa doença de fase aguda e crônica. Na fase
252 aguda há bacteremia intraeritrocítica persistente, por vezes assintomática, mas
253 normalmente associada à febre. No estado crônico há colonização destas bactérias
254 em células endoteliais, o que pode promover alterações vasculares (DEHIO, 2004).

255 São 45 espécies de *Bartonella* atualmente descritas, vinte e duas
256 delas associadas aos roedores, espécies presentes em todos os continentes
257 habitados por estes mamíferos (OKARO et al., 2017). Adicionalmente, seis variantes
258 entre espécies ou subespécies são consideradas como causadoras de doenças
259 carreadas por roedores aos seres humanos, são elas *Bartonella grahamii*, *B.*
260 *elizabethae*, *B. tribocorum*, *B. vinsonii* subsp. *arupensis*, *B. washoensis* e *B. tamiae*
261 (BUFFET; KOSOY; VAYSSIER-TAUSSAT, 2013).

262

263 2.2.1 Transmissão de *Bartonella*

264 Muitos artrópodes são comprovados como vetores biológicos de
265 *Bartonella* spp. e, outros mais, apontados com potencial vetorial, obedecendo a
266 certa especificidade. Conforme já citado, *Lutzomyia verrucarum* foi o primeiro
267 relacionado com a transmissão de *B. bacilliformis*. No entanto outro flebótomo, o
268 *Lutzomyia peruensis*, também no Peru, foi apontado como transmissor da mesma
269 espécie de *Bartonella* (ELLIS et al., 1999a).

270 As pulgas são, sem dúvida, os vetores mais comumente associados
271 à bartonelose. *Ctenocephalides felis* teve seu potencial vetorial para *B. henselae*
272 comprovado ainda em 1996 ao se investigar a *Cat Scratch Disease*. Estudo
273 comprovou que a bactéria pode permanecer no trato digestivo da pulga por até nove
274 dias e, até mesmo, ser eliminada nas fezes já infectante (HIGGINS et al., 1996). De
275 maneira complementar, *C. canis* fora sugerida, por meio de estudo molecular, como
276 vetor da *B. henselae* em cães do Japão e Espanha (BILLETER et al., 2008).

277 Também em estudo experimental, o potencial vetorial da *Ctenophthalmus nobilis*
278 *nobilis* foi proposto, transmitindo *B. grahamii* e *Bartonella taylorii* para pequenos
279 roedores do Velho Mundo (BOWN; BENNETT; BEGON, 2004). Outras pulgas como
280 *Orchopeas howardi*, *Oropsylla hirsuta*, *Oropsylla tuberculatus cynomuris*, *Xenopsylla*
281 *cheopis*, *Ctenophthalmus pseudagyrtes*, *Sternopsylla texanus*, *Nosopsyllus fasciatus*
282 e *Pulex* spp. também foram relacionadas com a transmissão de bartonelas após
283 estudos moleculares (BILLETER et al., 2008).

284 Os piolhos ganharam destaque ao transmitir a doença para seres
285 humanos em momentos de crise global, como nas guerras. Porém as pessoas
286 menos favorecidas como desabrigados também são acometidos por infestação de
287 *Pediculus humanus humanus*, o qual há muito se sabe possuir habilidade de
288 transmitir *B. quintana*. Outros piolhos foram apontados, também por meio de
289 técnicas moleculares, como potenciais vetores de *Bartonella* spp., tais como
290 *Pediculus humanus capitis*, *Neohaematopinus sciuri*, *Hoplopleura sciuricola*,
291 *Polyplax spinulosa* e *Hoplopleura pacifica* (FOURNIER et al., 2002; BILLETER et al.,
292 2008).

293 Estudo desenvolvido com moscas parasitas de ruminantes da
294 Europa identificou que as espécies *Lipoptena cervi*, *Lipoptena mazamae*,
295 *Melophagus ovinus* e *Hippobosca equine* continham evidências moleculares de
296 *Bartonella schoenbuchensis* e *Bartonella chomelii* (HALOS et al., 2004). Em estudo
297 semelhante foi detectado DNA de *Bartonella bovis* no trato gastrointestinal de
298 *Haematobia* sp. e *Stomoxys* sp. coletadas em bovinos (CHUNG et al., 2004). E
299 mesmo em *Trichobius major*, uma espécie de moscas que vive em cavernas
300 parasitando morcegos, já foi verificado DNA de *Bartonella* spp. No mesmo trabalho,
301 o percevejo *Cimex adjunctus* também se mostrou positivo quando submetido ao
302 mesmo método molecular (REEVES et al., 2005).

303 Muitos carrapatos já foram associados à bartonelose ao redor do
304 mundo, porém com foco investigativo nos fatores epidemiológicos, sem que fosse
305 comprovada a competência vetorial (BILLETER et al., 2008; ANGELAKIS et al.,
306 2010; KAMANI et al., 2013). A primeira demonstração *in vivo* dessa capacidade
307 ocorreu ao submeter, sob condições controladas, *Ixodes ricinus* infectados com
308 *Bartonella birtlesii* ao parasitismo de camundongos, que vieram a desenvolver a
309 infecção (REIS et al., 2011). No entanto, para os carrapatos do meio silvestre do
310 Brasil, ainda há escassos trabalhos. Em pesquisa comparativa entre ectoparasitos

311 de roedores nativos do Brasil, larvas de *Amblyomma* sp., ninfas de *A. auricularium* e
312 *A. dubitatum*, larvas Argasidae e adultos de *Rhipicephalus sanguineus* não
313 demonstram resultado positivo à PCR do gene *gltA* de *Bartonella* spp., ao passo que
314 até 100% das pulgas amostradas nos mesmos animais foram positivas (FONTALVO
315 et al., 2017). Há uma aparente concordância entre os autores de que os carrapatos
316 possuem importância na transmissão da *Bartonella*, mas não suficiente para colocá-
317 los como principais vetores nas espécies estudadas.

318

319 2.2.2 Interação com Hospedeiro

320 As bartonelas são conhecidas por provocarem períodos prolongados
321 de parasitemia. Para compreender a dinâmica de infecção deste agente foi proposto
322 um experimento *in vivo* utilizando um isolado de *Bartonella tribocorum*, testado em
323 ratas Wistar. Após a inoculação de $3,5 \times 10^7$ bactérias por via intravenosa houve
324 queda na bacteremia em questão de horas, e o sangue dos animais permaneceu
325 estéril por 3 a 4 dias. Já com 4 a 5 dias a bacteremia, se elevou e atingiu pico entre
326 10 a 14 dias pós-inoculação, com quantidades superiores a 10^7 UFC/mL de sangue,
327 condição que se manteve de forma comum nos animais por mais de 28 dias. A partir
328 deste momento a quantidade de bactérias circulantes caíram até chegar a níveis
329 indetectáveis com 9 semanas após inoculação (SCHÜLEIN et al., 2001). Atualmente
330 sabe-se que o sítio do primeiro ciclo de replicação acontece em células endoteliais,
331 linhagens imaturas de eritrócitos e hepatócitos, justificando a acentuada queda na
332 contagem de bactérias circulantes pós-inoculação (DENG et al., 2018).

333 O processo de invasão celular executado pelas bartonelas se mostra
334 diferente quando em células nucleadas ou nos eritrócitos, uma vez que as células
335 vermelhas maduras não possuem citoesqueleto ativo. Para tanto, as espécies de
336 *Bartonella* precisam invadir os eritrócitos de forma ativa. Sabe-se que nas células
337 nucleadas na fase de adesão de *Bartonella* há interação com as glicoforinas A e B.
338 Assim como o Pili e o Omp43 são fatores de virulência associados à adesão
339 (DEHIO, 2001). Acredita-se que no primeiro momento, durante a replicação na
340 parede vascular ou tecidos extravasculares, as bactérias adquiram competência
341 para infectar eritrócitos.

342 Após infecção no primeiro sítio, a dispersão das bactérias na

343 corrente sanguínea provoca aglutinação e formação de biofilme. No primeiro ciclo de
344 replicação há a exposição das bartonelas na corrente sanguínea, que se tornam
345 acessíveis para linfócitos e monócitos que dispõem dos Receptores Tipo Toll (TLR)
346 para promover interação com os antígenos de superfície da bactéria. O ponto crucial
347 na estratégia de evasão está na conformação do LPS e das flagelinas. É conhecido
348 que o LPS da *B. henselae* e *B. bacilliformis* possuem adaptação que o torna
349 incomum aos demais encontrados na natureza. A estrutura do Lipídeo A com uma
350 cadeia de ácido graxo longa e a ausência de um polissacarídeo de cadeia O o torna
351 “exótico” e de difícil reconhecimento. Já as flagelinas apresentam aminoácidos
352 distintos daqueles encontrados na mesma proteína de *Salmonella*, disposição que
353 as torna incompatíveis ao sítio de ligação do TLR5 e, por tanto, reduzindo os
354 mecanismos disponíveis para a pronta resposta imunológica (DENG et al., 2018).
355 Adicionalmente a proteína externa de membrana *BadA* (*Bartonella adhesion A*),
356 responsável pela auto-agregação das bactérias, possui em seu gene repetições em
357 *tandem* que variam a tradução dos sítios expostos dificultando adaptação do sistema
358 imune do hospedeiro (RIESS et al., 2004).

359

360 2.2.3 Cultivo

361 A possibilidade de isolamento de *Bartonella* spp. em meios de cultivo
362 proporciona maior detalhamento de sua natureza com a amplificação das bactérias
363 *in vitro*. O grande número de células ainda colabora com técnicas que venham a ser
364 utilizadas posteriormente como a PCR. As bartonelas possuem crescimento
365 fastidioso e, logo, demandam adequados padrões laboratoriais com controle de
366 contaminação e saturação do ar em água e de dióxido de carbono (CO₂). Ainda
367 disso, para destinar uma amostra viável ao cultivo é necessário se fazer a coleta de
368 sangue em recipiente com *Ácido Etilenodiamino Tetraacético* (EDTA), mantê-lo sob
369 temperatura ambiente para pronta remessa ao laboratório. Salvas exceções, o
370 cultivo da bactéria no *Bartonella Alpha-proteobacteria growth medium* (BAPGM)
371 enriquecido com sangue inicia a fase de incubação ajustando-se o termostato a 35 a
372 37°C, regulando-se o teor de CO₂ para 5% e com atmosfera saturada de umidade
373 por 14 a 21 dias. Formulações são admitidas com uso de infusão de coração, ágar
374 brucella, e ágar Columbia suplementado com 5% de sangue de coelho ou 5% de

375 hemoglobina (OKARO et al., 2017). De forma geral a suplementação do meio com
376 biomoléculas de ferro se faz necessária. Oportunamente, já é possível encontrar
377 meios de cultura disponíveis comercialmente, como o da Galaxy Diagnostics Inc.
378 (USA) (OTEO et al., 2017).

379

380 2.2.4 Diagnóstico Sorológico

381 A sorologia para *Bartonella* é uma importante ferramenta diagnóstica
382 aplicável a laboratórios que não dispõem de recursos para proceder a técnicas
383 moleculares. Todavia, equipamentos e operadores capacitados são necessários
384 como microscópios e espectrofotômetros. Para a Imunofluorescência Indireta (IFA) o
385 preparo da técnica não difere dos demais, senão por utilizar produto de cultivo com
386 células Vero como antígeno. Outros formatos de cultivo e de preparo do antígeno já
387 foram relatados, porém com grande variação de especificidade e sensibilidade.
388 Adicionalmente, a imunofluorescência indireta não é indicada para estudos que
389 objetivem diferenciação de espécies por haver possibilidade de reações cruzadas,
390 como já comprovado entre *B. henselae* e *B. quintana*, mas tão somente
391 levantamentos epidemiológicos (DALTON et al., 1995; OKARO et al., 2017).

392 O ELISA, uma técnica válida há anos, é acompanhada das mesmas
393 desvantagens que a IFA. O relativo baixo custo permite emprego da técnica de
394 forma ampla, no entanto a possibilidade de reação cruzada deve ser previstas na
395 idealização do seu uso (BARKA et al., 1993). Tal desvantagem pode ser reduzida ao
396 se substituir o conjunto total de antígenos do agente pelos antígenos particulados
397 (OKARO et al., 2017).

398 Uma alternativa aos demais testes é o *Western Immunoblotting*,
399 método que confere especificidade e sensibilidade elevadas para o padrão
400 sorológico. Em pesquisa com *B. henselae* infectando cães foi observado que a
401 especificidade de 96% se assemelha a IFA, ao passo que as sensibilidade foram de
402 53% e 22%, respectivamente. Este estudo concluiu que as proteínas de 13, 17, 29,
403 50, 56, e 150 kDa são os antígenos imunodominantes para *Bartonella* (NEUPANE et
404 al., 2020).

405

406 2.2.5 Diagnóstico Molecular

407 O advento das técnicas moleculares revolucionou o diagnóstico da
408 bartonelose, correlacionando-a com achados clínicos que eram de difícil
409 investigação. A possibilidade de utilizar sangue total, plasma e tecidos vasculares
410 como amostras, independente da delicada preservação que as amostras para cultivo
411 necessitam, tornam a coleta prática aumentam sensibilidade e especificidade
412 (OKARO et al., 2017). As bartonelas possuem genoma organizado em um único
413 cromossomo circular, que pode variar de 1,45 Mbp para *B. bacilliformis* até 2,64 Mbp
414 para *B. tribocorum*, além deste, informações genéticas também podem ser
415 encontradas em seus plasmídeos (OKARO et al., 2017). Logo, para se estudar o
416 gênero, foi proposta uma pesquisa para comparar genes como potenciais alvos para
417 a PCR convencional e determinar aqueles com melhores características diferenciais
418 entre espécies. Como resultado, dos sete testados (16S rRNA, *gltA*, *rpoB*, *groEL*,
419 *ftsZ*, *ribC* e o ITS), apesar de validade dos demais genes, apenas o *rpoB* e *gltA*
420 foram apontados com melhores para esta finalidade (LA SCOLA et al., 2003). No
421 entanto, em busca de refinar ainda mais o diagnóstico, novas tecnologias foram
422 empregadas. Ao testar a qPCR com o gene *nuoG* contra a PCR convencional com
423 fragmentos gênicos do ITS 16S-23S rRNA, *rpoB*, *pap 31*, *ribC* e *gltA*, o *nuoG* em
424 qPCR apresentou elevada sensibilidade e repetibilidade, com diferença significativa
425 entre todos os demais (ANDRÉ et al., 2015).

426 Variação de técnicas moleculares resultou na *Droplet Digital* PCR,
427 um método de substancial capacidade diagnóstica. Este teste foi empregado em
428 comparação a qPCR para o diagnóstico da bartonelose humana e apresentou maior
429 sensibilidade para o gene ITS 16S-23S (BREITSCHWERDT et al., 2020). Este
430 trabalho também reforça que a associação de técnicas, como cultura em BAPGM e
431 técnicas moleculares, potencializam a sensibilidade do diagnóstico agregando
432 qualidade à pesquisa da *Bartonella* spp.

433

434 2.2.6 Distribuição de *Bartonella* spp. em Roedores do Brasil

435 É hipotetizado que a distribuição da *Bartonella* spp. nos roedores do
436 Novo Mundo ainda seja maior nas regiões costeiras do que no interior do continente.

437 A ideia surge da maior ancestralidade do grupo de bartonelas associadas a roedores
438 na Europa e Ásia do que nas Américas. Por conseguinte, o patógeno haveria se
439 disseminado nas populações nativas a partir dos ratos e camundongos que aqui
440 foram inseridos durante as grandes navegações. Um estudo comparou a perspectiva
441 espacial entre zona portuária e interior na Europa e notou não haver diferença na
442 distribuição naqueles roedores (MARDOSAITĖ-BUSAITIENĖ et al., 2019). Já nos
443 Estados Unidos, cidades do interior (Reno e Spencer) tinham seus roedores livres da
444 infecção, enquanto as cidades litorâneas (Baltimore, Miami e Los Angeles)
445 apresentavam prevalência variada nos roedores (ELLIS et al., 1999b). No Brasil o
446 referido fenômeno também se mostrou plausível ao comparar roedores de sítios de
447 coleta na Mata Atlântica e no Cerrado. Por meio da PCR, no primeiro bioma houve
448 prevalência de 3,6% em *Rattus rattus*, no segundo não houveram animais positivos
449 entre *R. rattus*, *Mus musculus* e *H. hydrochaeris* (GONÇALVES et al., 2020b).

450 Corroborando, estudo com 26 *R. norvegicus* capturados em
451 Salvador apresentou 19,2% (5/26) de prevalência. Isolou-se em cultivo *B.*
452 *queenslandensis* de quatro dos animais e *B. tribocorum* do outro restante. Dado
453 interessante que houve correlação entre a infecção por *Bartonella* spp. e a massa
454 corporal dos animais (COSTA et al., 2014). A correlação da massa, em si, pode
455 estar intimamente relacionada com a idade dos animais. Uma vez que é admissível
456 que roedores mais velhos tenham tido mais contato com vetores e outros roedores.
457 Em outra pesquisa desenvolvida no mesmo sentido foram coletados 131 animais de
458 18 espécies diferentes de pequenos roedores no estado do Rio de Janeiro, todos
459 endêmicos da Mata Atlântica. O resultado molecular indicou 17,6% de positivos para
460 uma espécie de *Bartonella* filogeneticamente semelhante à *Bartonella vinsonii*, e
461 apenas uma amostra foi agrupada no clado de *Bartonella doshiae* (ROZENTAL et
462 al., 2017).

463 Contradizendo a hipótese de distribuição espacial anteriormente
464 exposta, Favacho et al. (2015) investigaram a infecção em 42 roedores silvestres de
465 oito gêneros (*Calomys callosus* n = 19, *Cerradomys maracajuensis* n = 4, *Hylaeamus*
466 *megacephalus* n = 1, *Necromys lasiurus* n = 13, *Nectomys aquamipes* n = 1,
467 *Oecomys catherinae* n = 2, *Oxymycterus delator* n = 1, *Thrichomys fosteri* n = 1) em
468 áreas vizinhas de Campo Grande, cidades de Sidrolândia e Dois Irmãos do Buriti.
469 Utilizando a PCR, obtiveram 42,9% de positivos, sem diferença entre as duas áreas,
470 sendo que somente a espécie *Thrichomys fosteri* foi negativa. Ao sequenciar os

471 genes *gltA* e ITS 16S-23S os fragmentos gerados foram similares à espécie *B.*
472 *vinsonii* subsp. *arupensis*, todos com 98% de identidade.

473 Apesar das possíveis abordagens sobre o tema, um dos estudos
474 mais abrangentes já realizados no Brasil indicou prevalências regionalizadas por
475 biomas. Utilizando a qPCR para o gene *nuoG* foi verificada uma positividade de
476 3,2% (1/31) na Floresta Amazônica, 35,9% (52/145) na Floresta Atlântica, 6,7%
477 (5/75) na Caatinga, 27,6% (48/174) no Cerrado, e 34,4% (11/32) no Pantanal,
478 totalizando 25,6% (117/457). Todas as amostras sequenciadas foram
479 filogeneticamente associadas ao clado de *Bartonella vinsonii*, indicando regularidade
480 na especificidade dos roedores brasileiros (GONÇALVES et al., 2016). A distribuição
481 apresentada neste estudo demonstra maior associação com a presença humana e,
482 provavelmente, com os roedores sinantrópicos que nos acompanham em regiões
483 urbanas e de produção e uso de cereais (IBGE, 2021).

484

485 2.3 ECTOPARASITOS DE CAPIVARAS

486 Devido ao habitat em que vivem e ao comportamento semiaquático
487 somente alguns poucos ectoparasitas conseguem desenvolver seus ciclos tendo as
488 capivaras como hospedeiras. Os carrapatos são aqueles que obtiveram maior êxito
489 nesse sentido, coadaptando-se. É relatado que os carrapatos mais comumente
490 encontrados em capivaras no Brasil são do gênero *Amblyomma*, e na região sul e
491 sudeste especificamente o *A. sculptum*, *A. cooperi* (LABRUNA et al., 2002) e o *A.*
492 *dubitatum*, este último tão vinculado a espécie que é conhecido popularmente como
493 carrapato-de-capivaras (LABRUNA et al., 2007).

494 Em estudo desenvolvido no estado do Pernambuco, nordeste
495 brasileiro, as capivaras de três áreas de coleta na mata atlântica apresentaram *A.*
496 *dubitatum* e *A. sculptum*, enquanto as da caatinga apenas apresentaram *A.*
497 *sculptum*. Importante destacar que o ponto de coleta na mata atlântica mais próxima
498 da caatinga apenas continha *A. sculptum* enquanto os dois pontos mais próximos do
499 litoral, apenas *A. dubitatum* (SOUZA et al., 2021).

500 Além dos carrapatos, há escassos relatos de infestação por outros
501 ectoparasitas. Apenas uma única pesquisa publicada considera a associação das
502 capivaras com a infestação por pulgas. Linardi, de Avelar e Facury Filho (2013)

503 expuseram dado não publicado de Rodrigues e Daemon, os quais haveriam extraído
504 *Tunga trimamillata*, no seu estado clássico de parasitismo, anexada
505 intradermicamente nas patas dos animais. O trabalho ainda levanta a hipótese das
506 capivaras serem hospedeiras primárias de *T. trimamillata*, apesar desta espécie já
507 ser correlacionada a seres humanos, suínos, ovinos e bovinos, animais que
508 eventualmente podem coabitar com capivaras e viabilizar essa transmissão
509 (FIORAVANTI et al., 2006). Em suma, a escassa fonte de informação que dispomos
510 sobre a relação das capivaras com as pulgas impede que afirmações categóricas
511 sejam feitas neste sentido.
512

513 **3. REFERÊNCIAS**

- 514 ALMEIDA, A. R.; BIONDI, D. Área de uso de *Hydrochoerus hydrochaeris* L. em
515 ambiente urbano. **Ciencia Animal Brasileira**, v. 15, n. 3, p. 369–376, 2014.
- 516 ANDRÉ, M. R. et al. Assessment of a quantitative 5' nuclease real-time polymerase
517 chain reaction using the nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase gamma
518 subunit (*nuoG*) for *Bartonella* species in domiciled and stray cats in Brazil. **Journal of**
519 **Feline Medicine and Surgery**, v. 18, n. 10, p. 783–790, 10 out. 2015. Disponível
520 em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1098612X15593787>>.
- 521 ANGELAKIS, E. et al. Potential for Tick-borne Bartonellosis. **Emerging Infectious**
522 **Diseases**, v. 16, n. 3, p. 385–391, 2010.
- 523 BARKA, N. E. et al. EIA for Detection of *Rochalimaea henselae*-Reactive IgG, IgM,
524 and IgA Antibodies in Patients with Suspected Cat-Scratch Disease. **The Journal of**
525 **Infectious Diseases**, v. 167, p. 1503–1504, 1993.
- 526 BARKER, E. N. et al. Detection of humoral response using a recombinant heat shock
527 protein 70, DnaK, of *Mycoplasma haemofelis* in experimentally and naturally
528 hemoplasma-infected cats. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 17, n. 12, p.
529 1926–1932, 2010.
- 530 BARTON, A. Descripción de elementos endo-globulares hallados en las enfermos de
531 fiebre verrucosa. **La Crónica Médica de Lima**, v. 26, p. 7–10, 1909.
- 532 BASS, J. W.; VINCENT, J. M.; PERSON, D. A. The expanding spectrum of
533 *Bartonella* infections: I. Bartonellosis and trench fever. **The Pediatric Infectious**
534 **Disease Journal**, v. 16, n. 1, 1997. Disponível em:
535 <[https://journals.lww.com/pidj/Fulltext/1997/01000/The_expanding_spectrum_of_Bart](https://journals.lww.com/pidj/Fulltext/1997/01000/The_expanding_spectrum_of_Bartonella_infections_.3.aspx)
536 [onella_infections_.3.aspx](https://journals.lww.com/pidj/Fulltext/1997/01000/The_expanding_spectrum_of_Bartonella_infections_.3.aspx)>.
- 537 BERENT, L. M.; MESSICK, J. B.; COOPER, S. K. Detection of *Haemobartonella*
538 *Felis* in Cats with Experimentally Induced Acute and Chronic Infections, Using a
539 Polymerase Chain Reaction Assay. **American journal of veterinary research**, v.
540 59, n. 10, p. 1215–1220, out. 1998.
- 541 BERKENKAMP, S. D.; WESCOTT, R. B. Arthropod Transmission of *Eperythrozoon*
542 *Coccoides* in Mice. **Laboratory Animal Science**, v. 38, n. 4, p. 398–401, ago. 1988.

- 543 BILLETTER, S. A. et al. Vector transmission of *Bartonella* species with emphasis on
544 the potential for tick transmission. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 22, n. 1,
545 p. 1–15, 2008.
- 546 BOWN, K. J.; BENNETT, M.; BEGON, M. Flea-borne *Bartonella grahamii* and
547 *Bartonella taylorii* in Bank Voles. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, n. 4, p. 6–9,
548 2004.
- 549 BREITSCHWERDT, E. B. et al. *Bartonella* Associated Cutaneous Lesions (BACL) in
550 People with Neuropsychiatric Symptoms. **Pathogens**, v. 9, n. 12, p. 1023, 4 dez.
551 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2076-0817/9/12/1023>>.
- 552 BUFFET, J. P.; KOSOY, M.; VAYSSIER-TAUSSAT, M. **Natural history of**
553 ***Bartonella*-infecting rodents in light of new knowledge on genomics, diversity**
554 **and evolution** *Future Microbiology*, set. 2013. .
- 555 CHUNG, C. Y. et al. *Bartonella* spp. DNA associated with biting flies from California.
556 **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, n. 7, p. 1311–1313, 2004.
- 557 COHEN, C. et al. Haemoplasmas in wild rodents: Routes of transmission and
558 infection dynamics. **Molecular Ecology**, v. 27, n. 18, p. 3714–3726, set. 2018.
559 Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/mec.14826>>.
- 560 COLE, B. C.; ATKIN, C. L. The *Mycoplasma arthritidis* T-cell mitogen MAM: a model
561 superantigen. **Immunology Today**, v. 12, n. 8, p. 271–276, ago. 1991. Disponível
562 em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/016756999190125D>>.
- 563 COMPTON, S. M.; MAGGI, R. G.; BREITSCHWERDT, E. B. *Candidatus*
564 *Mycoplasma haematoparvum* and *Mycoplasma haemocanis* infections in dogs from
565 the United States. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious**
566 **Diseases**, v. 35, n. 6, p. 557–562, 2012. Disponível em:
567 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cimid.2012.06.004>>.
- 568 CONRADO, F. D. O. et al. Occurrence and identification of hemotropic mycoplasmas
569 (Hemoplasmas) in free ranging and laboratory rats (*Rattus norvegicus*) from two
570 Brazilian zoos. **BMC Veterinary Research**, v. 11, n. 1, p. 286, 2015. Disponível em:
571 <<http://dx.doi.org/10.1186/s12917-015-0601-8>>.
- 572 COSTA, F. et al. Infections by *Leptospira interrogans*, Seoul Virus, and *Bartonella*
573 spp. Among Norway Rats (*Rattus norvegicus*) from the Urban Slum Environment in

- 574 Brazil. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, v. 14, n. 1, p. 33–40, 2014.
- 575 DALTON, M. J. et al. Use of *Bartonella* Antigens for Serologic Diagnosis of Cat-
576 scratch Disease at a National Referral Center. **Archives of Internal Medicine**, v.
577 155, n. 15, p. 1670, 7 ago. 1995. Disponível em:
578 <<http://archinte.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/archinte.1995.00430150>
579 164017>.
- 580 DE SOUSA, K. C. M. et al. Occurrence and molecular characterization of
581 hemoplasmas in domestic dogs and wild mammals in a Brazilian wetland. **Acta**
582 **Tropica**, v. 171, p. 172–181, 2017. Disponível em:
583 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.03.030>>.
- 584 DEHIO, C. *Bartonella* interactions with endothelial cells and erythrocytes. **Trends in**
585 **Microbiology**, v. 9, n. 6, p. 279–285, 2001.
- 586 DEHIO, C. **Molecular and cellular basis of Bartonella pathogenesis** **Annual**
587 **Review of Microbiology**, 2004. .
- 588 DENG, H. et al. Molecular Mechanisms of *Bartonella* and Mammalian Erythrocyte
589 Interactions: A Review. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 8, n.
590 December, p. 431, 2018.
- 591 ELLIS, B. A. et al. An outbreak of acute Bartonellosis (Oroya fever) in the Urubamba
592 region of Peru, 1998. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 61,
593 n. 2, p. 344–349, 1999a.
- 594 ELLIS, B. A. et al. Rats of the Genus *Rattus* are Reservoir Hosts for Pathogenic
595 *Bartonella* Species: An Old World Origin for a New World Disease ? **The Journal of**
596 **Infectious Diseases**, v. 180, n. 1, p. 220–224, 1999b.
- 597 FAVACHO, A. R. de M. et al. Zoonotic *Bartonella* species in wild rodents in the state
598 of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Microbes and Infection**, v. 17, n. 11–12, p. 889–892,
599 2015.
- 600 FEIZI, T.; LOVELESS, R. W. Carbohydrate Recognition by *Mycoplasma pneumoniae*
601 and Pathologic Consequences. **American Journal of Respiratory and Critical**
602 **Care Medicine**, v. 154, n. 4pt2, p. 133–136, out. 1996. Disponível em:
603 <http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1164/ajrccm/154.4_Pt_2.S133>.
- 604 FIORAVANTI, M. I. et al. **Presence of Tunga trimamillata (Insecta, Siphonaptera)**

- 605 in PeruParasiteParis, France, mar. 2006. .
- 606 FONTALVO, M. C. et al. *Bartonella* species pathogenic for humans infect pets, free-
607 ranging wild mammals and their ectoparasites in the Caatinga biome, Northeastern
608 Brazil: a serological and molecular study. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**,
609 v. 21, n. 3, p. 290–296, 2017.
- 610 FOURNIER, P. E. et al. Human pathogens in body and head lice. **Emerging**
611 **Infectious Diseases**, v. 8, n. 12, p. 1515–1518, 2002.
- 612 GIROTTO-SOARES, A. et al. ‘Candidatus Mycoplasma haemobos’: Transplacental
613 transmission in dairy cows (*Bos taurus*). **Veterinary Microbiology**, v. 195, p. 22–24,
614 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.08.020>>.
- 615 GONÇALVES, L. R. et al. Diversity and molecular characterization of novel
616 hemoplasmas infecting wild rodents from different Brazilian biomes. **Comparative**
617 **Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 43, p. 50–56, 2015.
- 618 GONÇALVES, L. R. et al. Association of *Bartonella* species with wild and
619 synanthropic rodents in different Brazilian biomes. **Applied and Environmental**
620 **Microbiology**, v. 82, n. 24, p. 7154–7164, 2016.
- 621 GONÇALVES, L. R. et al. Genetic diversity and lack of molecular evidence for
622 hemoplasma cross-species transmission between wild and synanthropic mammals
623 from Central-Western Brazil. **Acta Tropica**, v. 203, p. 105303, 2020a.
- 624 GONÇALVES, L. R. et al. Low occurrence of *Bartonella* in synanthropic mammals
625 and associated ectoparasites in peri-urban areas from Central-Western and Southern
626 Brazil. **Acta Tropica**, v. 207, n. May, p. 105513, 2020b.
- 627 GONZÁLEZ-JIMÉNEZ, E. **El capibara (*Hydrochoerus hydrochaeris*). Estado**
628 **actual de su producción**. Rome: Organización de las Naciones Unidas para la
629 Agricultura y la Alimentación, 1995.
- 630 GROEBEL, K. et al. *Mycoplasma suis* Invades Porcine Erythrocytes □. **Infection**
631 **and Immunity**, v. 77, n. 2, p. 576–584, 2009.
- 632 HALOS, L. et al. Role of Hippoboscidae flies as potential vectors of *Bartonella* spp.
633 infecting wild and domestic ruminants. **Applied and Environmental Microbiology**,
634 v. 70, n. 10, p. 6302–6305, 2004.

- 635 HERRERA, E. A. et al. Capybara social structure and dispersal patterns: variations
636 on a theme. **Journal of Mammalogy**, v. 92, n. 1, p. 12–20, 16 fev. 2011. Disponível
637 em: <[https://academic.oup.com/jmammal/article-lookup/doi/10.1644/09-MAMM-S-](https://academic.oup.com/jmammal/article-lookup/doi/10.1644/09-MAMM-S-420.1)
638 420.1>.
- 639 HIGA, L. de O. S. et al. Spotted fever group *Rickettsia* and *Borrelia* sp. cooccurrence
640 in *Amblyomma sculptum* in the Midwest region of Brazil. **Experimental and Applied**
641 **Acarology**, v. 81, n. 3, p. 441–455, 2020. Disponível em:
642 <<https://doi.org/10.1007/s10493-020-00513-2>>.
- 643 HIGGINS, J. A. et al. Acquisition of the Cat Scratch Disease Agent *Bartonella*
644 *henselae* by Cat Fleas (Siphonaptera: Pulicidae). **Entomological Society of**
645 **America**, v. 33, n. 3, p. 490–495, 1996.
- 646 HOELZLE, K. et al. Detection of “*Candidatus Mycoplasma haemobos*” in cattle with
647 anaemia. **The Veterinary Journal**, v. 187, n. 3, p. 408–410, 2011. Disponível em:
648 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.01.016>>.
- 649 IBGE. **Atlas Escolar - Mapas - Mapas do Brasil - Espaços Econômicos.**
650 Disponível em: <<https://atlasescolar.ibge.gov.br/mapas-atlas/mapas-do-brasil.html>>.
651 Acesso em: 30 jan. 2021.
- 652 KAMANI, J. et al. Prevalence and Diversity of *Bartonella* Species in Commensal
653 Rodents and Ectoparasites from Nigeria , West Africa. **PLoS Neglected Tropical**
654 **Diseases**, v. 7, n. 5, p. e2246, 2013.
- 655 LA SCOLA, B. et al. Gene-sequence-based criteria for species definition in
656 bacteriology : the *Bartonella* paradigm. v. 11, n. 7, p. 318–321, 2003.
- 657 LABRUNA, M. B. et al. Ticks (Acari: Ixodidae) on Wild Animals from the Porto-
658 Primavera Hydroelectric Power Station Area , Brazil. **Memorias do Instituto**
659 **Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 8, p. 1133–1136, 2002.
- 660 LABRUNA, M. B. et al. Human Parasitism By the Capybara Tick, *Amblyomma*
661 *dubitatum* (Acari: Ixodidae). **Entomological News**, v. 118, n. 1, p. 77–80, 2007.
662 Disponível em: <[http://www.bioone.org/doi/abs/10.3157/0013-](http://www.bioone.org/doi/abs/10.3157/0013-872X%282007%29118%5B77%3AHPBTCT%5D2.0.CO%3B2)
663 872X%282007%29118%5B77%3AHPBTCT%5D2.0.CO%3B2>.
- 664 LINARDI, P. M.; DE AVELAR, D. M.; FACURY FILHO, E. J. Establishment of *Tunga*
665 *trimamillata* (Siphonaptera: Tungidae) in Brazil. **Parasitology Research**, v. 112, n. 9,

- 666 p. 3239–3242, 2013.
- 667 MARDOSAITĖ-BUSAITIENĖ, D. et al. Prevalence and diversity of *Bartonella* species
668 in small rodents from coastal and continental areas. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p.
669 1–10, 2019.
- 670 MESSICK, J. B. Hemotropic mycoplasmas (hemoplasmas): a review and new
671 insights into pathogenic potential. **Veterinary clinical pathology / American**
672 **Society for Veterinary Clinical Pathology**, v. 33, n. 1, p. 2–13, 2004.
- 673 NEIMARK, H. et al. Proposal to Transfer Some Members of the Genera
674 *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* to the Genus *Mycoplasma* with Descriptions of
675 “*Candidatus Mycoplasma Haemofelis*”, “*Candidatus Mycoplasma Haemomuris*”,
676 “*Candidatus Mycoplasma Haemosuis*” and ‘*Candidatus Mycopl.* **International**
677 **journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 51, n. 3, p. 891–899,
678 maio 2001.
- 679 NEUPANE, P. et al. Validation of *Bartonella henselae* Western Immunoblotting for
680 Serodiagnosis of Bartonellosis in Dogs. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 58, n.
681 4, p. 1–14, 15 jan. 2020. Disponível em: <[https://jcm.asm.org/content/58/4/e01335-](https://jcm.asm.org/content/58/4/e01335-682)
682 19>.
- 683 NISHIZAWA, I. et al. Differential detection of hemotropic mycoplasma species in
684 cattle by melting curve analysis of PCR products. **Journal Veterinary Medical**
685 **Science**, v. 72, n. 1, p. 77–79, 2010.
- 686 OKARO, U. et al. *Bartonella* Species, an Emerging Cause of Blood-Culture-Negative
687 Endocarditis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 30, n. 3, p. 709–746, 10 jul. 2017.
688 Disponível em: <<https://cmr.asm.org/content/30/3/709.full#T1>>.
- 689 OTEO, J. A. et al. Prevalence of *Bartonella* spp. By culture, PCR and serology, in
690 veterinary personnel from Spain. **Parasites and Vectors**, v. 10, n. 1, p. 1–9, 2017.
- 691 PRULLAGE, J. B.; WILLIAMS, R. E.; GAAFAR, S. M. On the transmissibility of
692 *Eperythrozoon suis* by *Stomoxys calcitrans* and *Aedes aegypti*. **Veterinary**
693 **Parasitology**, v. 50, p. 125–135, 1993.
- 694 REEVES, W. K. et al. Molecular evidence for novel *Bartonella* species in *Trichobius*
695 *major* (Diptera: Streblidae) and *Cimex adjunctus* (Hemiptera: Cimicidae) from two
696 southeastern bat caves, U.S.A. **Journal of Vector Ecology**, v. 30, n. 2, p. 339–41,

- 697 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16599175>>.
- 698 REIS, C. et al. Vector competence of the tick *Ixodes ricinus* for transmission of
699 *Bartonella birtlesii*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 5, p. 1–6, 2011.
- 700 RIESS, T. et al. *Bartonella* adhesin A mediates a proangiogenic host cell response.
701 **Journal of Experimental Medicine**, v. 200, n. 10, p. 1267–1278, 2004.
- 702 RIKIHISA, Y. et al. Western immunoblot analysis of *Haemobartonella muris* and
703 comparison of 16S rRNA gene sequences of *H. muris*, *H. felis*, and *Eperythrozoon*
704 *suis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 823–829, 1997.
- 705 ROZENTAL, T. et al. Zoonotic pathogens in Atlantic Forest wild rodents in Brazil:
706 *Bartonella* and *Coxiella* infections. **Acta Tropica**, v. 168, n. 16, p. 64–73, 2017.
- 707 SCHÜLEIN, R. et al. Invasion and persistent intracellular colonization of erythrocytes:
708 A unique parasitic strategy of the emerging pathogen *Bartonella*. **Journal of**
709 **Experimental Medicine**, v. 193, n. 9, p. 1077–1086, 2001.
- 710 SENEVIRATNA, P.; WEERASINGHE; ARIYADASA, S. Transmission of
711 *Haemobartonella Canis* by the Dog Tick, *Rhipicephalus Sanguineus*. **Research in**
712 **Veterinary Science**, v. 14, n. 1, p. 112–114, jan. 1973.
- 713 SILVA, M. A. M. L. et al. Blood parasites, total plasma protein and packed cell
714 volume of small wild mammals trapped in three mountain ranges of the Atlantic
715 Forest in Southeastern Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 67, n. 3, p. 531–535,
716 2007.
- 717 SOUZA, S. et al. Parasites and health status of free-ranging capybaras
718 (*Hydrochoerus hydrochaeris*) in the Atlantic Forest and Caatinga biomes of Brazil.
719 **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 23, n. November 2020,
720 2021.
- 721 VERDADE, L. M.; FERRAZ, K. M. P. M. B. Capybaras in an anthropogenic habitat in
722 Southeastern Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 66, n. 1 B, p. 371–378, 2006.
- 723 VIEIRA, R. F. C. et al. Detection of a novel hemoplasma based on 16S rRNA gene
724 DNA in captive and free-ranging capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*). **Veterinary**
725 **Microbiology**, v. 139, n. 3–4, p. 410–413, 2009.
- 726 VIEIRA, R. F. da C. et al. Molecular investigation of hemotropic mycoplasmas in

- 727 humans beings, dogs and horses in a rural settlement in southern Brazil. **Revista do**
728 **Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57, n. 4, p. 353–357, 2015.
- 729 WEN, B. et al. *Ehrlichia muris* sp. nov., identified on the basis of 16S rRNA base
730 sequences and serological, morphological, and biological characteristics.
731 **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 45, n. 2, p. 250–254, 1995.
- 732 WILLI, B. et al. Development and application of a universal hemoplasma screening
733 assay based on the SYBR green PCR principle. **Journal of clinical microbiology**,
734 v. 47, n. 12, p. 4049–4054, 2009.
- 735 WOODS, J. E. et al. Evaluation of Experimental Transmission of Candidatus
736 *Mycoplasma Haemominutum* and *Mycoplasma Haemofelis* by *Ctenocephalides Felis*
737 to Cats. **American Journal of Veterinary Research**, v. 66, n. 6, p. 1008–1012, jun.
738 2005.
- 739

740 **4.HIPÓTESE**

741 As capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) são hospedeiras
742 de *Bartonella* spp. e hemoplasmas, para essa última como hospedeira de
743 uma espécie específica.

744

745

746

747 **5. OBJETIVOS**

748

749 5.1 OBJETIVO GERAL.....

750 Investigar a ocorrência e caracterizar molecularmente
751 hemoplasmas e *Bartonella* spp. em um grupo de capivaras de vida livre do
752 município de Pinhais, Paraná, Brasil.

753

754

755 5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

756 Determinar a ocorrência de hemoplasmas em capivaras;
757 Determinar a ocorrência de *Bartonella* spp. em capivaras;
758 Caracterizar molecularmente os agentes detectados;
759 Identificar os ectoparasitas infestando as capivaras.

760

761 **6. ARTIGO A – ‘*Candidatus Mycoplasma haematohydrochoerus*’, A NOVEL**
762 **HEMOPLASMA SPECIES IN CAPYBARAS (*Hydrochoerus hydrochaeris*)**
763 **FROM BRAZIL**

764 Artigo formatado sob padrões do Periódico *Infection, Genetics and Evolution*

765

766

767

ABSTRACT

768 Three different species of hemoplasmas have been described in rodents, *Mycoplasma*
769 *coccoides*, ‘*Candidatus Mycoplasma haemomuris*’ and ‘*Candidatus Mycoplasma*
770 *haemosphiggurus*’. Additionally, potentially novel hemoplasma species have been detected in
771 wild rodents from Brazil, including capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*). Capybaras are
772 the largest rodent in the world and are well adapted to live within close proximity to humans,
773 which increases the risk to spread of zoonotic pathogens. Herein, we investigate the
774 occurrence and genetic diversity of hemoplasmas infecting free-ranging capybaras from
775 southern Brazil. Blood samples and ticks from 17 capybaras were collected. Packed cell
776 volume and total plasma protein were measured, DNA was extracted, and further screened by
777 species-specific and pan-hemoplasma PCR assays. Sixteen out of 17 (94.12%; 95% CI: 73.02
778 – 98.95%) were anemic. Only one young female was hypoproteinemic. All capybaras were
779 infested by adults and nymphs of *Amblyomma dubitatum* ticks. Using the PCR assay targeting
780 the 16S rRNA gene of *M. coccoides*, 13/17 (76.47%; 95% CI: 52.74 – 90.44%) capybaras
781 were positive for hemoplasmas. When DNA samples were tested by the pan-hemoplasma
782 PCR, 16/17 (94.12%; 95% CI: 73.02 – 98.95%) animals were positive. One out of 11 (9.09%)
783 adult ticks salivary glands tested positive for hemoplasma by the pan-hemoplasma PCR assay.
784 Sequencing and phylogenetic analysis of the 16S and 23S rRNA gene fragments confirmed
785 that animals were infected by a novel hemotropic *Mycoplasma* sp. previously reported in
786 capybaras from Brazil. Based on phylogenetic and Neighbor-Net network analysis of the 16S
787 rRNA and 23S rRNA genes, the name ‘*Candidatus Mycoplasma haematohydrochoerus*’ is
788 proposed for this novel organism.

789

790

791 **Keywords:** Hemotropic mycoplasmas, wild rodents, *Amblyomma dubitatum*

792

793

794 1. Introduction

795 Hemotropic mycoplasmas (hemoplasmas) are uncultivable bacteria lacking cell-wall
796 that attach to erythrocyte's surface of mammals and may cause infectious anemia (Messick,
797 2004). In rodents, three species have been described *Mycoplasma coccoides* (Neimark et al.,
798 2005), '*Candidatus Mycoplasma haemomuris*' (Neimark et al., 2001) and '*Candidatus*
799 *Mycoplasma haemosphiggurus*' (Valente et al., 2020a). Additionally, potentially novel
800 hemoplasma species have been detected in wild rodents from different Brazilian biomes
801 (Vieira et al., 2009; de Sousa et al., 2017; Gonçalves et al., 2015, 2020).

802 Capybaras are the largest rodents in the world and live-in forests, seasonally flooded
803 savannas and wetlands in the east of the Andes, from Venezuela to the mouth of the de la
804 Plata River in Argentina (Moreira et al., 2013). These large rodents are well adapted to live
805 within close proximity to humans and are continuously linked to conflicts in human-modified
806 landscapes and to the spread of zoonotic pathogens (Dias et al., 2020). On this pattern,
807 hemoplasma species from animals have already been found infecting and causing infectious
808 anemia in humans (Dos Santos et al. 2008; Yuan et al., 2009; Sykes et al., 2010; Maggi et al.,
809 2013a; Maggi et al., 2013b). Moreover, it has been hypothesized that '*Candidatus*
810 *Mycoplasma haematomominis*', that causes disease in humans, probably has its natural host in
811 bats (Millán et al., 2020; Descloux et al., 2020). Therefore, monitoring the health status of
812 capybaras is of public health one health concern. Accordingly, this study aimed to investigate
813 the occurrence and genetic diversity of hemoplasmas infecting capybaras and associated tick
814 species in southern Brazil.

815

816 2. Methods

817

818 2.1. Study area

819 The study was carried out at the Canguiri Experimental Farm (49°7'41.897" W
820 25°23'12.278" S) located in Pinhais municipality, Paraná State, southern Brazil. The Canguiri
821 Farm comprises an area of 440 ha inside the Environment Preservation Area (EPA) of the Iraí
822 River to protect the water sources of the Iraí River basin. This farm belongs to the UFPR and
823 is used to develop agriculture, cattle-raising, and silviculture activities (Nascimento, 2007).
824 Pinhais municipality is characterized by semideciduous Atlantic Forest fragments and has a
825 subtropical climate, category Cfb by Köppen and Geiger, with an average temperature of 17.2
826 °C and average rainfall of 1,349 mm/year, with 73 mm in August, the driest month (Merkel,
827 2019). The area has a diverse fauna, with populations of capybaras, wild rodents and white-

828 eared opossums (*Didelphis albiventris*), as well as a wide variety of birds and fishes.

829

830 2.2. *Sampling*

831 A total of 17 capybaras (10 females and 7 males) were captured by using a 72 m²
832 corral-trap baited with cabbage, sweet potatoes, and native grasses. Once closed in the corral,
833 every animal was anaesthetized with an intramuscular injection, using darts, of a combination
834 of azaperone (1mg/kg), midazolam (0.2mg/kg), methadone (0.3mg/kg) and ketamine (5
835 mg/kg). Under anesthesia, animals were weighted and identified with ear tagging. Capybaras
836 were sexed and aged as follows: young (<10 Kg), juvenile (10–35 Kg), and adult (>35 Kg)
837 (Vargas et al., 2007).

838 Capybara blood samples (up to 10 mL) were collected through the femoral artery
839 using commercial tubes containing EDTA (BD Vacutainer[®], Franklin Lakes, NJ, USA) and
840 stored at 4.0 °C for 2 h until hematological analyses. Thereafter, samples were stored at -20 °C
841 until molecular procedures were run. Giemsa-stained thin blood smears were made
842 immediately after peripheral blood collection. Additionally, tick specimens infesting the
843 animals were removed using a commercial hook (O'Tom/Tick Twister, H3D Inc., Lavancia,
844 France), and kept in absolute ethanol-labeled tubes for identification according to previously
845 described morphological taxonomic keys (Barros-Battesti et al., 2006).

846

847 2.3. *Packed cell volume and total plasma protein*

848 The packed cell volume (PCV) and total plasma protein (TPP) were measured by
849 routine centrifugation and refractometry techniques; a PCV of ≤ 0.44 L/L and a TPP of ≤ 60
850 g/dL were used as indicators of anemia and hypoproteinemia, respectively, in the capybaras
851 (Arouca et al., 2000; Vieira et al., 2009).

852

853 2.4. *DNA extraction*

854 DNA was extracted from 200 μ L whole blood using a commercial kit (Illustra[™]
855 Blood Genomic Prep Mini Spin Kit, GE Healthcare, Little Chalfont, UK), according to the
856 manufacturer's instructions. Additionally, adult ticks (n = 11) were dissected under a Leica
857 EZ4 stereomicroscope in Petri dishes containing sterile ice-cold phosphate-buffered saline
858 (PBS) solution (NaCl 0.13 M, Na₂HPO₄ 0.017 M, KH₂PO₄ 0.02 M, pH 7.2) for withdrawal of
859 salivary glands samples, as described elsewhere (Edwards et al., 2009). Negative controls
860 (ultra-pure water) were included in the DNA purification procedure to monitor cross-
861 contamination in each batch of 10 samples.

862

863 *2.5. PCR assays*

864 A conventional PCR for the mammalian endogenous gene glyceraldehyde-3-
865 phosphate dehydrogenase (*gapdh*) was performed for all samples to monitor the DNA
866 extraction, as previously described (Birkenheuer et al., 2003). Thereafter, DNA samples were
867 tested by a previously described species-specific PCR assay targeting a fragment (305 bp) the
868 16S rRNA gene of *M. coccoides* (Vieira et al., 2009). Additionally, all samples were also
869 tested using a conventional pan-hemoplasma PCR assay targeting a fragment (900 bp) of the
870 16S rRNA gene of hemoplasmas (Hoelzle et al., 2011; Machado et al., 2017). Samples which
871 tested positive by the above PCR assays were also tested by a PCR assay targeting a fragment
872 (800 bp) of the 23S rRNA gene of hemoplasmas (Mongruel et al., 2020). Blood DNA of a
873 dog (*Canis familiaris*) known to be naturally infected with *M. haemocanis* and nuclease-free
874 water were used as positive and negative controls, respectively. The amplified PCR products
875 were subjected to gel electrophoresis on 1.5% agarose gels for 1 h at 100 V, and the gels were
876 stained with SYBR (0.1 µL/mL gel) (SYBR™ Safe, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA),
877 and visualized under a 312 nm UV light transilluminator (LTB HE, Loccus do Brasil, São
878 Paulo, BR).

879 Additionally, DNA from hemoplasma-positive capybaras samples from a previous
880 study performed in midwestern Brazil (Gonçalves et al., 2020) were also submitted to a PCR
881 assay targeting the 23S rRNA gene of hemoplasmas (Mongruel et al., 2020).

882

883 *2.6. Sequencing*

884 Amplicons (~ 800 bp) of the 16S rRNA and 23S rRNA genes obtained from eight
885 hemoplasma-positive samples were sequenced in both directions by Sanger method. Partial
886 nucleotide sequences of the 16S rRNA and 23S rRNA genes of hemoplasmas were deposited
887 in GenBank® database (accession nos. MW616875- MW616882 and MW617210-
888 MW617219, respectively).

889

890 *2.7. Phylogenetic analysis and genotype analysis of hemoplasmas*

891 Consensus sequences were obtained through the analysis of electropherograms using
892 the Phred-Phrap program (Ewing et al., 1998). Hemoplasma-16S and 23S rRNA sequences
893 were identified by BLASTn using the Megablast (following default parameters), aligned with
894 sequences available in GenBank using Clustal/W (Thompson et al., 1994), and adjusted in
895 Bioedit v. 7.0.5.3 (Hall, 1999). The phylogenetic analysis was performed using the Maximum

896 Likelihood (ML) method, inferred with RAxML-HPC BlackBox (7.6.3.) (Stamatakis et al.,
897 2008) and performed in CIPRES Science Gateway (Miller et al., 2010). GTR+ G + I model
898 was chosen as the most appropriate for the phylogenetic analysis of the 16S and 23S rRNA
899 alignments. In addition, to investigate the genetic relationship among hemoplasmas genotypes
900 detected in the current study and those previously deposited at GenBank, the Neighbor-Net
901 network was constructed, using the pairwise genetic distances with SplitsTree v4.14.6 (Huson
902 and Bryant, 2006).

903

904 3. Results

905 The mean PCV for capybaras was 0.39 L/L. Sixteen out of 17 (94.12%; 95% CI: 73.02
906 – 98.95%) were anemic. The mean TPP was 67.73 g/dL. Only one young female was
907 hypoproteinemic (TPP = 58 g/dL). All capybaras were infested by ticks at the time of
908 sampling. A total of 167 (26 M, 16 F, 122 nymphs and 3 larvae) tick specimens were
909 collected from all animals. All adults and nymphs were identified as *A. dubitatum*.

910 All samples consistently amplified the *gapdh* gene. Using the PCR assay targeting the
911 16S rRNA gene of *M. coccoides*, 13/17 (76.47%; 95% CI: 52.74 – 90.44%) capybaras were
912 positive for hemoplasmas. When DNA samples were tested by the pan-hemoplasma PCR,
913 16/17 (94.12%; 95% CI: 73.02 – 98.95%) animals were positive. One out of 11 (9.09%) adult
914 ticks salivary glands tested positive for hemoplasma by the pan-hemoplasma PCR assay.
915 Unfortunately, multiple attempts to sequence the 16S rRNA gene were unsuccessful due to
916 the low DNA concentration (4.6 ng/ μ L).

917 The BLASTn analysis showed that hemoplasma-16S rRNA sequences detected in
918 capybaras shared identity ranging from 99% to 100% with other capybara-related
919 hemoplasma sequences (FJ667774 and MN423255) previously detected in Brazil. Likewise,
920 the 23S sequences herein amplified showed identity ranging from 91.7% to 92.4% with '*Ca.*
921 *M. haemosphiggurus*' sequences (MN692881 and MN164485) previously reported in
922 *Sphiggurus villosus* in Brazil. The sequences amplified in the present study showed query
923 coverage ranging from 97% to 100%.

924 In accordance with BLASTn analysis, the 16S rRNA capybara-related hemoplasma
925 sequences grouped with other hemoplasma sequences previously detected in capybaras from
926 Brazil and supported by a high bootstrap value (99%) (Figure 1). The 16S rRNA capybara-
927 related hemoplasma sequences were phylogenetically positioned near to *Mycoplasma* sp.
928 (KY002651) detected in *Nasua nasua* trapped in the central region of Pantanal, Mato Grosso
929 do Sul, Brazil. Additionally, the 23S rRNA capybara-related hemoplasma sequences clustered

930 in a separated branch – supported by 94% bootstrap value – and near to ‘*Ca. M.*
931 *haemosphiggurus*’ sequences (Figure 2). Finally, the phylogenetic findings were supported by
932 the Neighbor-Net network results (Figures 3 and 4). These results support the evidence of a
933 novel hemoplasma species in capybaras in Brazil, which were herein named ‘*Candidatus*
934 *Mycoplasma haematohydrochaeris*’.

935

936 **4. Discussion**

937 Herein, 94.12% capybaras were positive for hemotropic *Mycoplasma* sp. The 16S
938 rRNA and 23S rRNA gene sequences showed that animals were infected by a novel
939 hemoplasma species previously identified in capybaras from two regions of Brazil (Vieira et
940 al., 2009; Gonçalves et al., 2020) and closely related to hemotropic *Mycoplasma* sp. detected
941 in carnivores from Brazil.

942 Phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene sequences showed that the capybara
943 hemoplasma grouped with hemotropic *Mycoplasma* sp. previously detected in capybaras from
944 Brazil, and clustered apart from hemoplasma species detected in *Nasua nasua* and *Cerdocyon*
945 *thous* from Brazil, supported by a bootstrap of 83% (Figure 1). The Neighbor-Net network
946 analysis evidenced the genetic distinction between the hemoplasma species circulating in
947 capybaras, carnivores and other rodents from Brazil (Figure 3). Additionally, phylogenetic
948 analysis of the 23S rRNA gene sequences showed that the capybara hemoplasma detected
949 herein grouped with hemotropic *Mycoplasma* sp. previously detected in capybaras from Mato
950 Grosso do Sul State, midwestern Brazil, and clustered separated from ‘*Ca. M.*
951 *haemosphiggurus*’, supported by a bootstrap of 76% (Figure 2). Corroborating this finding,
952 the Neighbor-Net network analysis evidenced the genetic distinction between the hemoplasma
953 species circulating in capybaras and orange-spined hairy dwarf porcupines (*Sphiggurus*
954 *villosus*) from Brazil (Figure 4). Accordingly, based on phylogenetic analysis of the 16S
955 rRNA and 23S rRNA genes, the name ‘*Ca. M. haematohydrochaeris*’ is proposed for this
956 novel organism.

957 In the present study, two PCR protocols were used. Using a previously described *M.*
958 *coccoides* species-specific PCR assay, 76.47% capybaras were positive for hemoplasmas,
959 while the use of a pan-hemoplasma PCR assay has increased the positivity to hemoplasmas to
960 94.12% capybaras. To date, only two studies on hemoplasma in capybaras have been
961 performed and found prevalence of 50% and 64% in animals from Foz do Iguaçu, Paraná
962 State, southern Brazil (Vieira et al., 2009) and Campo Grande, Mato Grosso do Sul,
963 midwestern Brazil (Gonçalves et al., 2020), respectively. On this pattern, considering that the

964 ‘Ca. *M. haematohydrochaeris*’ showed only 92% identity to *M. coccoides*, differences
965 between prevalence rates were be due to the PCR assay used. Moreover, the hemoplasma
966 prevalence in capybaras found by Vieira et al. (2009) may be higher since the same *M.*
967 *coccoides* PCR assay was used to screen animals.

968 Capybaras are frequently found infested by *A. sculptum* and *A. dubitatum* ticks in
969 southeastern Brazil (Labruna, 2013), particularly on those living in the Cerrado Biome.
970 Herein, all animals were solely infested by *A. dubitatum* ticks. Pinhais municipality, Paraná
971 State, southern Brazil, is in the Atlantic Forest Biome with an average temperature of 17.2 °C
972 and average rainfall of 1,349 mm/year, which may preclude the establishment of *A. sculptum*
973 ticks. Moreover, *A. sculptum* ticks have never been described infesting capybaras from that
974 region (Valente et al., 2020b). A previous study has failed to detect hemoplasma in *A.*
975 *dubitatum* ticks, while found hemoplasmas in 1/33 (3.33%) *A. sculptum* adult ticks
976 parasitizing hemotropic *Mycoplasma*-infected capybaras from midwestern Brazil (Gonçalves
977 et al., 2020). In the present study, one/11 (9.09%) adult ticks’ salivary glands tested positive
978 for hemoplasma. Unfortunately, multiple attempts to sequence the 16S rRNA gene were
979 unsuccessful due to the low DNA concentration (4.6 ng/μL). However, our data highlights
980 that *A. dubitatum* ticks may be involved in the transmission of ‘Ca. *M. haematohydrochaeris*’.
981 Further studies are needed to elucidate this hypothesis.

982 Finally, 16/17 (94.12%) capybaras we anemic, being 15/16 animals infected by
983 hemoplasmas. A previous study has found an association between anemia and infection by
984 hemoplasmas in capybaras (Vieira et al., 2009). Considering the low number of animals
985 evaluated herein, and that the majority were anemic, further studies are needed to evaluate the
986 anemic status of hemoplasma-infected capybaras.

987

988 **5. Conclusion**

989 A novel hemoplasma species is highly prevalent in anemic capybaras infested by *A.*
990 *dubitatum* ticks from Pinhais municipality, Paraná State, southern Brazil. Based on
991 phylogenetic and Neighbor-Net network analysis of the 16S rRNA and 23S rRNA genes, the
992 name ‘*Candidatus Mycoplasma haematohydrochaeris*’ is proposed for this novel organism.

993

994 **ACKNOWLEDGMENTS**

995 The authors are grateful to the Fundação Araucária (grant no. 09/2016) for financial
996 aid and support to carry out this research. This study is part of a PhD degree for Nelson
997 Santos at the Universidade Estadual de Londrina. Nelson Santos and Flavia Collere were

998 sponsored by a fellowship from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível
999 Superior (CAPES) at the time of this study. The Brazilian National Council of Scientific and
1000 Technological Development (CNPq) provided a Research Productivity (PQ) fellowship to
1001 Drs. Marcos André (CNPq - 309520/2017-7) and Rafael Vieira (CNPq - 313161/2020-8).
1002 Authors also thank Hubert D. Fanien for providing O'TOM[®]/Tick Twister[®].

1003

1004 **CONFLICT OF INTEREST**

1005 The authors declare no conflicts of interest.

1006

1007 **ETHICAL APPROVAL**

1008 This study was approved by the Ethics Committee in Animal Experimentation and Animal
1009 Welfare at the Universidade Federal do Parana (UFPR) (protocol number 45/16). Animal and
1010 laboratory procedures were approved and performed under regulations of the Chico Mendes
1011 Institute for Biodiversity Conservation (ICMBio, protocol number 69426-1).

1012

1013 **REFERENCES**

1014 Arouca, M.E., Miranda, L.B., Lopes, R.S., Takahira, R.K., Kohayagawa, A., Ciarlini, P.C.,
1015 Oba, E., 2000. Valores hematológicos de capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) criadas em
1016 cativeiro no município de Botucatu, SP. *Ciência Rural*. 30(5), 813-817.

1017 <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782000000500012>.

1018

1019 Barros-Battesti, D.M., Arzua, M., Bechara, G.H., 2006. Carrapatos de importância médico-
1020 veterinária da região neotropical: Um guia ilustrado para identificação de espécies.
1021 *Vox/ICTTD-3/Butantan*, São Paulo.

1022

1023 Birkenheuer, A.J., Levy, M.G., & Breitschwerdt, E.B., 2003. Development and evaluation of
1024 a seminested PCR for detection and differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) and
1025 *B. canis* DNA in canine blood samples. *J. Clin. Microbiol.* 41(9), 4172–4177.
1026 <https://doi.org/10.1128/jcm.41.9.4172-4177.2003>

1027

1028 de Sousa, K.C. M., Herrera, H.M., Secato, C.T., Oliveira, A.D.V., Santos, F.M., Rocha, F.L.,
1029 Barreto, W.T.G., Macedo, G.C., de Andrade Pinto, P.C.E., Machado, R.Z., Costa, M.T.,
1030 André, M. R., 2017. Occurrence and molecular characterization of hemoplasmas in domestic
1031 dogs and wild mammals in a Brazilian wetland. *Acta Tropica*. 171, 172–181.

- 1032 <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.03.030>
1033
- 1034 Descloux, E., Mediannikov, O., Gourinat, A.C., Colot, J., Chauvet, M., Mermoud, I., ...
1035 Raoult D., 2020. Flying fox haemolytic fever, description of a new zoonosis caused by
1036 "*Candidatus* Mycoplasma haemohominis". Clin. Infect. Dis. 29, ciaa1648.
1037 <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1648>.
1038
- 1039 dos Santos, A.P., dos Santos, R.P., Biondo, A.W., Dora, J.M., Goldani, L.Z., de Oliveira,
1040 S.T., ... Messick, J.B., 2008. Hemoplasma infection in HIV-positive patient, Brazil. Emerg.
1041 Infect. Dis. 14(12), 1922-4. <https://doi.org/10.3201/eid1412.080964>.
1042
- 1043 Dias, T.C., Stabach, J.A., Huang, Q., Labruna, M.B., Leimgruber, P., Ferraz, K.M.P.M.B., ...
1044 Rocha, V.J., 2020. Habitat selection in natural and human-modified landscapes by capybaras
1045 (*Hydrochoerus hydrochaeris*), an important host for *Amblyomma sculptum* ticks. PLoS One.
1046 15(8), e0229277. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229277>
1047
- 1048 Edwards, K.T., Goddard, J., Varela-Stokes, A.S., 2009. Examination of the internal
1049 morphology of the Ixodid tick *Amblyomma maculatum* koch, (Acari:Ixodidae); a "How-to"
1050 pictorial dissection guide. Midsouth Entomol. 2, 28–39.
1051
- 1052 Gonçalves, L.R., Roque, A.L., Matos, C.A., Fernandes, S.J., Olmos, I.D., Machado, R.Z.,
1053 André, M.R., 2015. Diversity and molecular characterization of novel hemoplasmas infecting
1054 wild rodents from different Brazilian biomes. Comp. Immunol. Microbiol. and Infect. Dis. 43,
1055 50-6. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2015.10.006>.
1056
- 1057 Gonçalves, L.R., Herrera, H.M., Nantes, W.A.G., Santos, F.M., Porfírio, G.E.O., Barreto,
1058 W.T.G., ... André, M.R., 2020. Genetic diversity and lack of molecular evidence for
1059 hemoplasma cross-species transmission between wild and synanthropic mammals from
1060 Central-Western Brazil. Acta Tropica. 203, 105303. [https://doi.org/](https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105303)
1061 [10.1016/j.actatropica.2019.105303](https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105303).
1062
- 1063 Hoelzle, K., Winkler, M., Kramer, M. M., Wittenbrink, M. M., Dieckmann, S. M., & Hoelzle,
1064 L. E., 2011. Detection of *Candidatus* Mycoplasma haemobos in cattle with anaemia. Vet. J.
1065 187(3), 408–410. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.01.016>

1066

1067 Labruna, M.B., 2013. Brazilian spotted fever: the role of capybaras. In: Moreira, J.R., Ferraz,
1068 K.M.P.M.B., Herrera, E.A., Macdonald, D.W. editors. Capybara: Biology, Use and
1069 Conservation of an Exceptional Neotropical Species. New York: Springer; pp. 371–383.

1070

1071 Machado, C., Vidotto, O., Conrado, F. O., Santos, N., Valente, J., Barbosa, I. C., ... Vieira, R.,
1072 2017. *Mycoplasma ovis* infection in goat farms from northeastern Brazil. Comparative
1073 Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 55, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2017.08.004>

1074

1075 Maggi, R.G., Compton, S.M., Trull, C.L., Mascarelli, P.E., Mozayeni, B.R., Breitschwerdt,
1076 E.B., 2013a.. Infection with hemotropic *Mycoplasma* species in patients with or without
1077 extensive arthropod or animal contact. Clin. Microbiol. 51(10), 3237-41.
1078 <https://doi.org/10.1128/JCM.01125-13>.

1079

1080 Maggi, R.G., Mascarelli, P.E., Havenga, L.N., Naidoo, V., Breitschwerdt, E.B., 2013b. Co-
1081 infection with *Anaplasma platys*, *Bartonella henselae* and *Candidatus Mycoplasma*
1082 *haematoparvum* in a veterinarian. Parasites & Vectors. 6, 103. [https://doi.org/10.1186/1756-](https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-103)
1083 [3305-6-103](https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-103).

1084

1085 Merkel, A., 2020. Climate-Data. Disponível em: <[https://en.climate-data.org/south-](https://en.climate-data.org/south-america/brazil/parana/pinhais-4494/)
1086 [america/brazil/parana/pinhais-4494/](https://en.climate-data.org/south-america/brazil/parana/pinhais-4494/)>. Assessed in April 23rd, 2020.

1087

1088 Mongruel, A.C.B, Spanhol, V.C., Valente, J.D.M., Porto, P.P., Ogawa, L., Otomura, F.H., ...
1089 Vieira, R.F.C., 2020. Survey of vector-borne and nematode parasites involved in the etiology
1090 of anemic syndrome in sheep from Southern Brazil. Rev. Bras. Parasito. Vet.. 29(3), e007320.
1091 <https://doi.org/10.1590/S1984-296120200062>.

1092

1093 Messick, J.B., 2004. Hemotropic mycoplasmas (hemoplasmas): a review and new insights
1094 into pathogenic potential. Vet. Clin. Pathol. 33, 2–13. [https://doi.org/10.1111/j.1939-](https://doi.org/10.1111/j.1939-165x.2004.tb00342.x)
1095 [165x.2004.tb00342.x](https://doi.org/10.1111/j.1939-165x.2004.tb00342.x)

1096

1097 Millán, J., Di Cataldo, S., Volokhov, D.V., Becker, D.J., 2020. Worldwide occurrence of
1098 hemoplasmas in wildlife: insights into the patterns of infection, transmission, pathology, and
1099 zoonotic potential. Transbound. Emerg. Dis. in press. <https://doi.org/10.1111/tbed.13932>.

- 1100
- 1101 Moreira, J.R., Alvarez, M.R., Tarifa, T., Pacheco, V., Taber, A., Tirira, D.G., ... Macdonald,
1102 D.W., 2013. Taxonomy, Natural History and Distribution of the Capybara. In: Moreira, J.R.,
1103 Herrera, E.A., Ferraz, K.M.P.M.B., Macdonald, D.W. editors. Capybara: Biology, use and
1104 conservation of an exceptional neotropical species. New York: Springer; pp. 3-38.
- 1105
- 1106 Nascimento, L.A.D., Lingnau, C. Stolle, L., 2007. Diagnóstico da Reserva Legal e Área de
1107 Preservação Permanente em uma propriedade rural Estação Experimental Canguiri da
1108 Universidade Federal do Paraná. Anais XIII Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto.
1109 Anais...Florianopolis: INPE.
- 1110
- 1111 Neimark, H., Johansson, K.E., Rikihisa, Y., Tully, J.G., 2001. Proposal to transfer some
1112 members of the genera *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* to the genus *Mycoplasma* with
1113 the descriptions of ‘*Candidatus Mycoplasma haemofelis*’, ‘*Candidatus Mycoplasma*
1114 *haemomuris*’, ‘*Candidatus Mycoplasma haemosuis*’ and ‘*Candidatus Mycoplasma*
1115 *wenyonii*’. International J. of Systematic and Evolutionary Microbiol. 51, 891–899.
1116 <https://doi.org/10.1099/00207713-51-3-891>.
- 1117
- 1118 Neimark, H., Peters, W., Robinson, B.L., Stewart, L.B., 2005. Phylogenetic analysis and
1119 description of *Eperythrozoon coccoides*, proposal to transfer to the genus *Mycoplasma* as
1120 *Mycoplasma coccoides* comb. nov. and request for an opinion. International J. of Systematic
1121 and Evolutionary Microbiol. 55, 1385–1391. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.63437-0>
- 1122
- 1123 Sykes, J.E., Lindsay, L.L., Maggi, R.G., Breitschwerdt, E.B., 2010. Human coinfection with
1124 *Bartonella henselae* and two hemotropic mycoplasma variants resembling *Mycoplasma ovis*.
1125 J. Clin. Microbiol. 48(10), 3782-5. <https://doi.org/10.1128/JCM.01029-10>.
- 1126
- 1127 Valente, J.D., Saldanha, A., Martini, R., Lange, R.R., Baggio, R.A., Martins, T.F., Vieira,
1128 R.F., 2020a. ‘*Candidatus Mycoplasma haemosphiggurus*’ a novel haemoplasma species in
1129 orange-spined hairy dwarf porcupines (*Sphiggurus villosus*) from Southern Brazil.
1130 Transbound. Emerg. Dis. in press. <https://doi.org/10.1111/tbed.13801>
- 1131
- 1132 Valente, J.D.M., Silva, P.W., Arzua, M., Barros-Battesti, D.M., Martins, T.F., ... Vieira,
1133 R.F.C., 2020b. Records of ticks (Acari: Ixodidae) on humans and distribution of spotted-fever

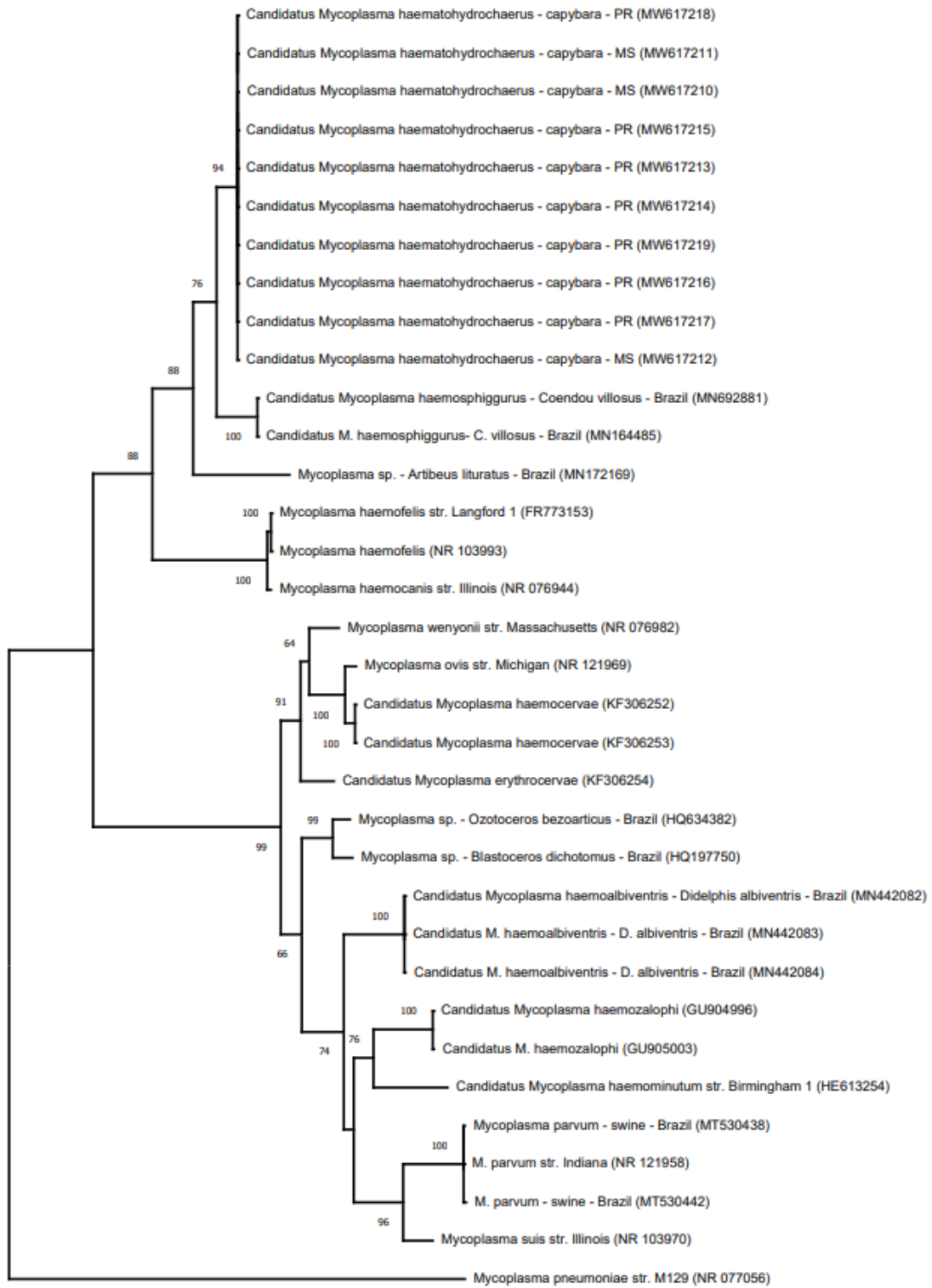
- 1134 cases and its tick vectors in Paraná State, southern Brazil. *Ticks and Tick-borne Diseases*. 11,
1135 101510. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2020.101510>
- 1136
- 1137 Vargas, F.C., Vargas, S.C., Moro, M.E.G., Silva, V., Carrer, C.R.O., 2007. Monitoramento
1138 populacional de capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris* Linnaeus, 1766) em Pirassununga, SP,
1139 Brasil. *Ciência Rural*, 37(4), 1104-1108. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782007000400030>.
- 1140
- 1141 Vieira, R.F., Molento, M.B., dos Santos, L.C., Moraes, W., Cubas, Z.S., Santos, A.P., ...
1142 Messick, J.B., 2009. *Vet. Microbiol.* 139(3-4), 410-3.
1143 <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.06.018>.
- 1144
- 1145 Yuan, C.L., Liang, A.B., Yao, C.B., Yang, Z.B., Zhu, J.G., Cui, L., ... Hua, X.G., 2009.
1146 Prevalence of *Mycoplasma suis* (*Eperythrozoon suis*) infection in swine and swine-farm
1147 workers in Shanghai, China. *Am. J. Vet. Res.* 70(7), 890-4.
1148 <https://doi.org/10.2460/ajvr.70.7.890>.
- 1149
- 1150
- 1151
- 1152
- 1153
- 1154
- 1155
- 1156
- 1157
- 1158
- 1159
- 1160
- 1161
- 1162
- 1163
- 1164
- 1165

1166 **Figure 1.** Phylogenetic relationships within the *Mycoplasma* genus based on a fragment of
1167 800 bp of the 16S rRNA gene. The phylogenetic tree was inferred by using the maximum
1168 likelihood method and GTR+ G + I model. The numbers at the nodes correspond to bootstrap
1169 values higher than 60% accessed with 1,000 replicates. *Mycoplasma pneumoniae* was used as
1170 outgroup.
1171



0.05

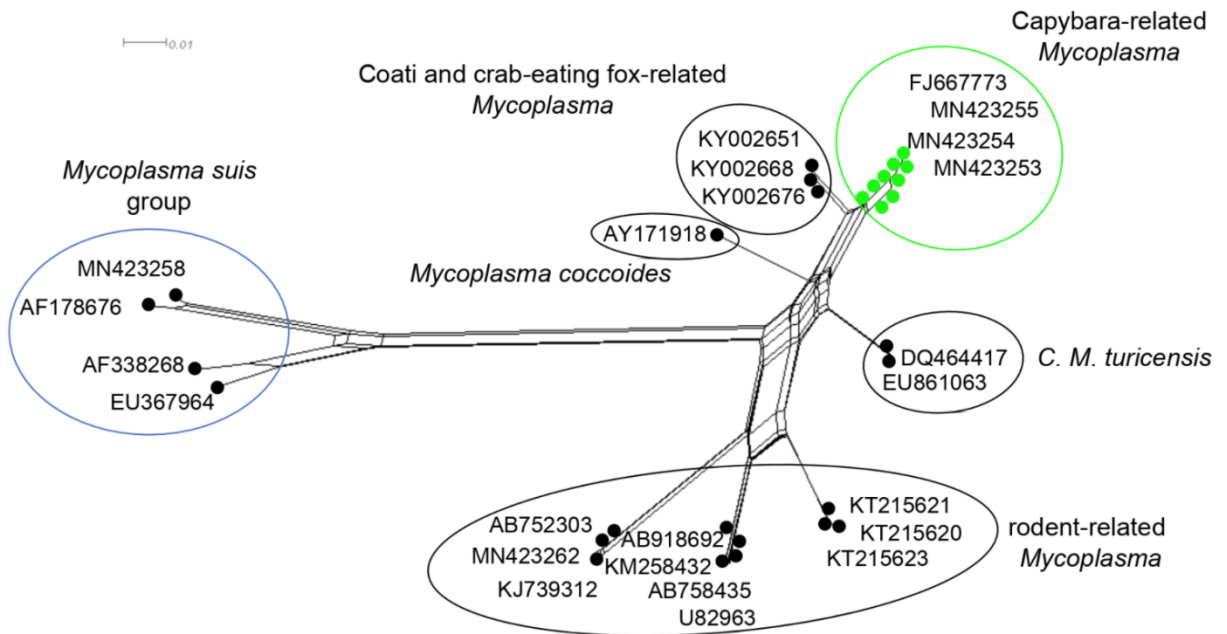
1173 **Figure 2.** Phylogenetic relationships within the *Mycoplasma* genus based on a fragment of
1174 800 bp of the 23S rRNA gene. The phylogenetic tree was inferred by using the maximum
1175 likelihood method and the GTR+ G + I model. The sequences detected in the present study
1176 are highlighted in bold. The numbers at the nodes correspond to bootstrap values higher than
1177 60% accessed with 1,000 replicates. *Mycoplasma pneumoniae* was used as outgroup.
1178



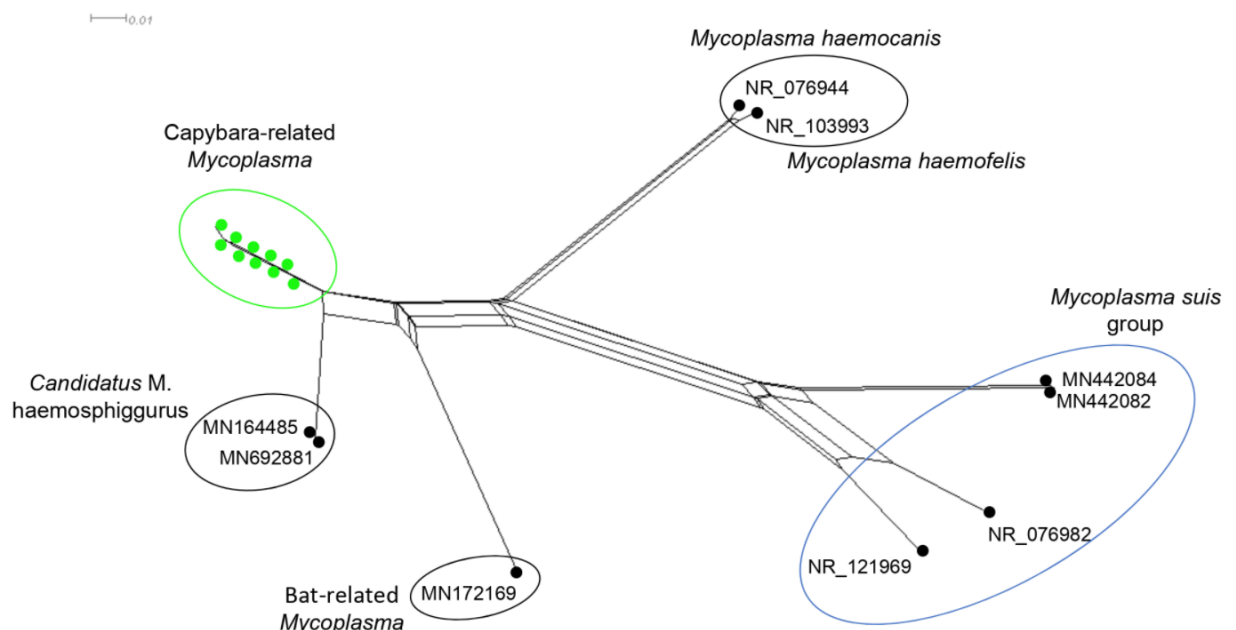
0.05

1179
1180

1181 **Figure 3.** Neighbor-Net analysis of 16S rRNA sequences obtained from capybara sampled in
 1182 the present study and compared to related hemoplasmas sequences previously deposited in
 1183 GenBank®.



1184
 1185 **Figure 4.** Neighbor-Net analysis of 23S rRNA sequences obtained from capybara sampled in
 1186 the present study and compared to related hemoplasmas sequences previously deposited in
 1187 GenBank®.



1188
 1189

1190 7. ARTIGO B - QUANTITATIVE POLYMERASE CHAIN REACTION FOR
1191 SCREENING *Bartonella* IN FREE-RANGING CAPYBARAS (*Hydrochoerus*
1192 *hydrochaeris*) FROM PARANÁ STATE, SOUTHERN BRAZIL

1193

1194 Artigo formatado sob padrões da Revista Semina: Ciências Agrárias.

1195

1196

ABSTRACT

1197

1198

1199 *Bartonella* is an emerging group of facultative intracellular bacteria causing circulatory and
1200 systemic disorders. Hosts for *Bartonella* are mostly mammals, specifically rodents, having a
1201 growing number of *Bartonella* species related to their infection. Capybaras (*Hydrochoerus*
1202 *hydrochaeris*) are abundant native rodents of Brazil, commonly found in urban parks. In the
1203 present study, we aimed to perform molecular screening of capybaras for *Bartonella* spp.
1204 Blood samples were collected from 17 free-ranging animals captured in Paraná State,
1205 Southern Brazil. None of the collected samples tested positive for the *Bartonella-nuoG* gene
1206 by quantitative polymerase chain reaction (qPCR), although all of them successfully
1207 amplified the mammal endogenous glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*gapdh*) gene.
1208 Additionally, all animals were infested exclusively by *Amblyomma dubitatum* ticks at the time
1209 of sampling. This study was part of an active surveillance program, which is critical for
1210 monitoring animal health status, particularly in capybaras.

1211

1212

1213

1214 **Keywords:** *Amblyomma dubitatum*; bartonellosis; wild rodents.

1215

1216

1217

1218

1219

1220

1221

1222

1223

1224

1225 The *Bartonella* genus is composed of emerging, facultative intracellular, Gram-negative
1226 bacteria showing fastidious growth in the culture medium. Multiplication of this bacteria in a
1227 specific host occurs by adhering to the erythrocyte membrane for a long period (Dehio, 2004).
1228 While infecting a mammalian host, it can invade erythrocytes and endothelial cells, a strategy
1229 to evade the immune system of the host (Breitschwerdt & Kordick, 2000). Their transmission
1230 among animals is carried out mainly through bloodsucking vectors. These abilities contribute
1231 to the successful propagation of *Bartonella* worldwide, especially in many rodent species
1232 (Gutiérrez et al., 2015). When the agent is inoculated in any host, the latter can develop
1233 variable disease, acute or chronic, or even no perceptible in refractory hosts depending on the
1234 degree of adaptation (Breitschwerdt & Kordick, 2000).

1235 Despite many rodents being identified as a host for *Bartonella* spp. (Gutiérrez et al.,
1236 2015), the role of capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*), the biggest rodent in the world,
1237 have been scarcely investigated (Gonçalves et al., 2020). These mammal species inhabit
1238 wetlands from South America in conserved environments to urban parks, where they coexist
1239 with humans (Queirogas et al., 2012). Accordingly, the present study aimed to screen free-
1240 ranging capybaras for the presence of *Bartonella* spp.

1241 This study was approved by the Ethics Committee in Animal Experimentation and
1242 Animal Welfare at the Universidade Federal do Paraná (UFPR) (protocol number 45/16).
1243 Animal and laboratory procedures were approved and performed under the regulations of the
1244 Chico Mendes Institute for Biodiversity Conservation (ICMBio, protocol number 69426-1).

1245 A total of 17 capybara DNA samples from a previous study were retrieved and used
1246 (Vieira et al., 2021). To evaluate the presence of *Bartonella* DNA in the samples of
1247 capybaras, quantitative PCR (qPCR) targeting the nicotinamide adenine dinucleotide
1248 dehydrogenase gamma subunit (*nuoG*) was used, as described elsewhere (André et al., 2015).

1249 All 17 capybara DNA samples tested negative for *Bartonella* spp. by qPCR, although
1250 all samples have consistently amplified the *gapdh* gene. Additionally, we found at the time of
1251 sampling that each of the animals was infested by ticks (adults, nymphs, and larvae)
1252 (infestation rate, 9.82), all morphologically identified as *Amblyomma dubitatum* (*A.*
1253 *dubitatum*) (Barros-Battesti et al., 2006).

1254 Although the present study failed to detect *Bartonella* DNA in capybaras, several
1255 studies have reported an increasing number of wild rodent-associated *Bartonella* infections in
1256 different Brazilian biomes. In the Pantanal region, midwestern Brazil, 110 small rodents of
1257 three species, 77 *Thrichomys fosteri*, 25 *Oecomys mamorae*, and eight *Clyomys laticeps* were
1258 tested for the bacteria. Thirty-five animals (31.8%) belonging to *Thrichomys fosteri* and

1259 *Oecomys mamorae* species, infested only by fleas, were positive for *Bartonella* spp. (De
1260 Sousa et al., 2018). In Mato Grosso do Sul State, midwestern Brazil, seven out of eight rodent
1261 species collected from farm fields [*Callomys callosus* (4/19), *Cerradomys maracajuensis*
1262 (4/4), *Hylaeamus megacephalus* (1/1), *Necomys lasiurus* (6/13), *Nectomys squamipes* (1/1),
1263 *Oecomys catherinae* (1/2), *Oxymycterus delator* (1/1), and *Thrichomys fosteri* (0/1)] presented
1264 42.9% positivity and in Rio de Janeiro State, southeastern Brazil, 23/131 small rodents
1265 belonging to 18 different species presented 17.6% positivity to *Bartonella* spp. (Favacho et
1266 al., 2015; Rozental et al., 2017). In five Brazilian biomes, 117/457 (25.6%) small rodents
1267 from 52 different species were positive for the bacteria (Gonçalves et al., 2016).

1268 A study demonstrated that rodent populations that live far from the coast showed a
1269 lower infection rate for *Bartonella* spp. than those near coastline (Gonçalves et al., 2020). In
1270 that study, capybaras from Campo Grande municipality, Mato Grosso do Sul State,
1271 midwestern Brazil, were infested with ticks (*Amblyomma* sp. larvae, *A. dubitatum*, and
1272 *Amblyomma sculptum*), and all animals and ticks tested negative for *Bartonella* spp. by the
1273 same qPCR targeting the *nuoG* gene used herein. Capybaras are favored for their amphibian
1274 lifestyle, which blocks parasitism by ectoparasites that are not adapted to semi-aquatic
1275 habitats, such as fleas and lice, commonly found in other wild rodents species (Lord, 1994).
1276 This adaptation may make the capybaras a difficult host for *Bartonella* spp., which may
1277 explain the negative results found herein.

1278 Although there is evidence of the vector competence of the tick *Ixodes ricinus* to
1279 transmit *Bartonella* spp. (Reis et al., 2011), to date these arthropods are not epidemiologically
1280 important for rodents. In Northeastern Brazil, a study focusing on *Bartonella* and its possible
1281 vectors for free-ranging and pet animals was conducted. In that study, all ticks (*A. dubitatum*,
1282 *Amblyomma auricularium*, *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato, and Argasidae) were PCR-
1283 negative for *Bartonella*, while flea and lice species (*Pulex irritans*, *Ctenocephalides felis*, and
1284 *Polyplax* spp.) have tested PCR-positive for *Bartonella* (Fontalvo et al., 2017). Similarly,
1285 ticks (*A. dubitatum*, *Amblyomma sculptum*, and *Amblyomma* sp. larvae) parasitizing *Mus*
1286 *musculus*, *Rattus rattus*, capybaras, and opossums (*Didelphis albiventris*), also tested negative
1287 for *Bartonella* (Gonçalves et al., 2020). It is a notorious evolutionary adaptation that some
1288 bacterial agents are developed as tick-borne pathogens, like *Ehrlichia*, *Anaplasma*, and
1289 *Rickettsia* (Mccoy, Léger & Dietrich, 2013). However, rodent-associated *Bartonella* appears
1290 to be less adapted to ticks than other hematophagous ectoparasites. Rodents are known to
1291 exhibit greater diversity of *Bartonella* genotypes among mammals, with this phenomenon
1292 being related to their fleas parasitism (Gutiérrez et al., 2015).

1293 In the present study, tick-infested capybaras were negative for *Bartonella* spp. At this
 1294 moment, it may be premature to state that capybaras do not harbor *Bartonella* spp. Further
 1295 studies, involving capybaras and their ectoparasites from different Brazilian biomes, are
 1296 needed to confirm our hypothesis.

1297

1298 **Acknowledgements**

1299 The authors are grateful to the Fundação Araucária (grant no. 09/2016) for financial aid and
 1300 support to carry out this research. This study is part of a PhD degree for Nelson Santos at the
 1301 Universidade Estadual de Londrina. Nelson Santos was sponsored by a fellowship from the
 1302 Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) at the time of this
 1303 study. The Brazilian National Council of Scientific and Technological Development (CNPq)
 1304 provided a Research Productivity (PQ) fellowship to Drs. Marcos André (CNPq -
 1305 309520/2017-7) and Rafael Vieira (CNPq - 313161/2020-8). Authors also thank Hubert D.
 1306 Fanien for providing O'TOM[®]/Tick Twister[®].

1307

1308 **References**

- 1309 André, M. R., Dumler, J. S., Herrera, H. M., Gonçalves, L. R., de Sousa, K. C. M., Scorpio,
 1310 D. G., de Santis, A. C. G. A., Domingos, I. H., Macedo, G. C., & Machado, R. Z..
 1311 (2015). Assessment of a Quantitative 5' Nuclease Real-Time Polymerase Chain Reaction
 1312 Using the Nicotinamide Adenine Dinucleotide Dehydrogenase Gamma Subunit (*NuoG*)
 1313 for *Bartonella* Species in Domiciled and Stray Cats in Brazil. *Journal of Feline Medicine*
 1314 *and Surgery* 18 (10): 783–90. <https://doi.org/10.1177/1098612X15593787>.
- 1315 Barros-Battesti, D. M., Arzua, M., Bechara, G. H., Onofrio, V. C., Labruna, M. B., Pinter, A.,
 1316 & Giacomini, F. G. (2006). *Carrapatos de Importancia Medico-Veterinária Da Região*
 1317 *Neotropical. Um Guia Ilustrado Para Identificação de Espécies. Vox/ICTTD-*
 1318 *3/Butantan*. 1st ed. São Paulo: Integrated Consortium on Ticks and Tick-borne Diseases-
 1319 ICTTD.
- 1320 Breitschwerdt, E. B., & Kordick, D. L.. (2000). *Bartonella* Infection in Animals: Carriership,
 1321 Reservoir Potential, Pathogenicity, and Zoonotic Potential for Human Infection. *Clinical*
 1322 *Microbiology Reviews* 13 (3): 428–38. <https://doi.org/10.1128/CMR.13.3.428-438.2000>.
- 1323 Dehio, C. (2004). Molecular and Cellular Basis of *Bartonella* Pathogenesis. *Annual Review of*
 1324 *Microbiology*. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.58.030603.123700>.
- 1325 Favacho, A. R. M., Andrade, M. N., Oliveira, R. C., Bonvicino, C. R., D'Andrea, P. S., &
 1326 Lemos, E. R. S.. (2015). Zoonotic *Bartonella* Species in Wild Rodents in the State of

- 1327 Mato Grosso Do Sul, Brazil. *Microbes and Infection* 17 (11–12): 889–92.
1328 <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2015.08.014>.
- 1329 Fontalvo, M. C., Favacho, A. R. M., Araujo, A.C., Santos, N. M., Oliveira, G. M. B., Aguiar,
1330 D. M., Lemos, E. R. S., & Horta, M. C.. (2017). *Bartonella* Species Pathogenic for
1331 Humans Infect Pets, Free-Ranging Wild Mammals and Their Ectoparasites in the
1332 Caatinga Biome, Northeastern Brazil: A Serological and Molecular Study. *Brazilian*
1333 *Journal of Infectious Diseases* 21 (3): 290–96.
1334 <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2017.02.002>.
- 1335 Gonçalves, L. R., Favacho, A. R. M., Roque, A. L. R., Mendes, N. S., Fidelis, O. L.,
1336 Benevenuto, J. L., Herrera, H. M., D'Andrea, P. S., Lemos, E. R. S., Machado, R. Z., &
1337 André, M. R. (2016). Association of *Bartonella* Species with Wild and Synanthropic
1338 Rodents in Different Brazilian Biomes. *Applied and Environmental Microbiology* 82
1339 (24): 7154–64. <https://doi.org/10.1128/AEM.02447-16>.
- 1340 Gonçalves, L. R., Harrus, S., Herrera, H. M., Gutiérrez, R., Pedrassani, D., Nantes, W. A. G.,
1341 Santos, F.M., Porfírio, G. E. O., Barreto, W. T. G., Macedo, G. C., Assis, W. O.,
1342 Campos, J. B. V., Silva, T. M. V., Biolchi, J., Sousa, K. C. M., Nachum-Biala, Y.,
1343 Barros-Battesti, D. M., Machado, R. Z., & André, M. R.. 2020. “Low Occurrence of
1344 *Bartonella* in Synanthropic Mammals and Associated Ectoparasites in Peri-Urban Areas
1345 from Central-Western and Southern Brazil.” *Acta Tropica* 207 (May): 105513.
1346 <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105513>.
- 1347 Gutiérrez, R., Krasnov, B., Morick, D., Gottlieb, Y., Khokhlova, I. S., & Harrus, S.. (2015).
1348 *Bartonella* Infection in Rodents and Their Flea Ectoparasites: An Overview. In *Vector-*
1349 *Borne and Zoonotic Diseases*, 15:27–39. <https://doi.org/10.1089/vbz.2014.1606>.
- 1350 Lord, R. D. (1994). A Descriptive Account of Capybara Behaviour. *Studies on Neotropical*
1351 *Fauna and Environment* 29 (1): 11–22. <https://doi.org/10.1080/01650529409360912>.
- 1352 McCoy, K. D., Léger, E., & Dietrich, M.. (2013). Host Specialization in Ticks and
1353 Transmission of Tick-Borne Diseases: A Review. *Frontiers in Cellular and Infection*
1354 *Microbiology* 4 (OCT): 1–12. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00057>.
- 1355 Queirogas, V. L., Del Claro, K., Nascimento, A. R.T., & Szabó, M. P.J.. (2012). Capybaras
1356 and Ticks in the Urban Areas of Uberlândia, Minas Gerais, Brazil: Ecological Aspects
1357 for the Epidemiology of Tick-Borne Diseases. *Experimental and Applied Acarology* 57
1358 (1): 75–82. <https://doi.org/10.1007/s10493-012-9533-1>.
- 1359 Reis, C., Cote, M., Le Rhun, D., Lecuelle, B., Levin, M. L., Vayssier-Taussat, M., & Bonnet,
1360 S. I.. (2011). Vector Competence of the Tick *Ixodes ricinus* for Transmission of

- 1361 *Bartonella birtlesii*. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 5 (5): 1–6.
1362 <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001186>.
- 1363 Rozental, T., Ferreira, M. S., Guterres, A., Mares-Guia, M.A., Teixeira, B. R., Gonçalves, J.,
1364 Bonvicino, C. R., D’Andrea, P. S., & Lemos, E. R. S.. (2017). Zoonotic Pathogens in
1365 Atlantic Forest Wild Rodents in Brazil: *Bartonella* and *Coxiella* Infections. *Acta Tropica*
1366 168 (16): 64–73. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.01.003>.
- 1367 Sousa, K. C. M., Amaral, R. B., Herrera, H. M., Santos, F. M., Macedo, G. C., Andrade Pinto,
1368 P.C. E., Barros-Battesti, D. M., Machado, R. Z., & André, M. R.. (2018). Genetic
1369 Diversity of *Bartonella* spp. in Wild Mammals and Ectoparasites in Brazilian Pantanal.
1370 *Microbial Ecology* 76 (2): 544–54. <https://doi.org/10.1007/s00248-017-1138-0>.
- 1371 Vieira, R. F. C., Santos, N. J. R., Valente, J. D. M., Santos, L. P., Lange, R. R., Duque, J. C.
1372 M., Ferrari, M. V., Gonçalves, L. R., Sanches, G. S., André, M. R., & Vieira, T. S. W. J.
1373 (2021). ‘*Candidatus Mycoplasma Haematohydrochoerus*’, a Novel Hemoplasma Species
1374 in Capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) from Brazil. *Infection, Genetics and*
1375 *Evolution* 93: 104988. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.104988>.
- 1376
- 1377
- 1378
- 1379
- 1380
- 1381
- 1382
- 1383
- 1384
- 1385
- 1386
- 1387
- 1388
- 1389
- 1390
- 1391
- 1392

1393 8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

1394 O crescente interesse por atividades ao ar livre que resultem em
1395 contato com o ambiente silvestre faz com que nos preocupemos com doenças que
1396 não mais afetavam os seres humanos protegidos pelos ambientes antropizados. A
1397 exclusão do ser humano deste meio também o excluiu das coevoluções que os
1398 agentes infecciosos e parasitários seguem na via natural. Por isso, o monitoramento
1399 das doenças emergentes, como a hemoplasrose e a bartonelose, ganha
1400 importância a fim de proporcionarmos uma interação menos nociva ao ser humano,
1401 aos animais e mesmo ao ambiente.

APÊNDICES

APÊNDICE A



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo número 045/2016, referente ao projeto “Capivaras como sentinelas para zoonoses transmitidas por vetores em parques em Curitiba e Foz do Iguaçu, Paraná”, sob a responsabilidade de Rafael Felipe da Costa Vieira – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 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 aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DO SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ - BRASIL, com grau 2 de invasividade, em reunião de 06/07/2016.

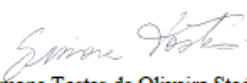
Vigência do projeto	Agosto/2016 até Agosto/2018
Espécie/Linhagem	<i>Hydrochaeris hydrochaeris</i> (capivara, espécie silvestre brasileira)
Número de animais	80
Peso/Idade	> 30 kg / Não verificado
Sexo	Não verificado
Origem	Parques públicos e reservas biológicas de Curitiba e Foz do Iguaçu, Paraná

CERTIFICATE

We certify that the protocol number 045/2016, regarding the project “Capybaras as sentinels for zoonoses transmitted by vectors in parks of Curitiba and Foz do Iguaçu, Paraná” under Rafael Felipe da Costa Vieira supervision – which includes the production, maintenance and/or utilization of animals from Chordata phylum, Vertebrata subphylum (except Humans), for scientific or teaching purposes – is in accordance with the precepts of Law nº 11.794, of 8 October, 2008, of Decree nº 6.899, of 15 July, 2009, and with the edited rules from Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), and it was approved by the ANIMAL USE ETHICS COMMITTEE OF THE AGRICULTURAL SCIENCES CAMPUS OF THE UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ (Federal University of the State of Paraná, Brazil), with degree 2 of invasiveness, in session of 07/06/2016.

Duration of the project	August/2016 until August/2018
Specie/Line	<i>Hydrochaeris hydrochaeris</i> (capybara, brazilian wild species)
Number of animals	80
Wheight/Age	> 30 kg / Not verified
Sex	Not verified
Origin	Public parks and biological reserves of Curitiba and Foz do Iguaçu, Paraná

Curitiba, 6 de julho de 2016.


Simone Tostes de Oliveira Stedile
Coordenadora CEUA-SCA