BÁRBARA CONTE WECK

Pesquisa de hemoparasitas transmitidos por carrapatos em pequenos mamíferos nos estados de São Paulo e Mato Grosso do Sul

São Paulo
2022

BÁRBARA CONTE WECK

Pesquisa de hemoparasitas transmitidos por carrapatos em pequenos mamíferos nos estados de São Paulo e Mato Grosso do Sul

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutora em Ciências

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna

Coorientador:

Prof. Dr. Sebástian Muñoz Leal

São Paulo
2022

VERSÃO CORRIGIDA

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 4161
FMVZ

Weck, Bárbara Conte
Pesquisa de hemoparasitas transmitidos por carrapatos em pequenos mamíferos nos estados de São Paulo e Mato Grosso do Sul / Bárbara Conte Weck. – 2022.
75 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2022.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna.
Coorientador: Prof. Dr. Sebastián Muñoz Leal.

1. Anaplasmataceae. 2. Piroplasmida. 3. Hepatozoon. 4. Borrelia. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela bibliotecária Camila Molgara Gamba CRB 7070-8, da FMVZ/USP.

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: WECK, Bárbara Conte

Título: **Pesquisa de hemoparasitas transmitidos por carrapatos em pequenos mamíferos nos estados de São Paulo e Mato Grosso do Sul.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Data: ____/____/_____

Banca Examinadora

Prof. Dr._____

Instituição:_____Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____Julgamento:_____

Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Capivaras, carrapatos e febre maculosa", protocolada sob o CEUA nº 5948070314 (ID 000706), sob a responsabilidade de **Marcelo Bahia Labruna** *e equipe; Adriano Pinter dos Santos* - 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 - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 27/08/2014.

We certify that the proposal "Capybaras, ticks, and Brazilian spotted fever", utilizing 8 Brazilian wild species (8 males), 80 Guinea pigs (80 males), 40 Rabbits (40 males), protocol number CEUA 5948070314 (ID 000706), under the responsibility of **Marcelo Bahia Labruna** *and team; Adriano Pinter dos Santos* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 08/27/2014.

Finalidade da Proposta: Pesquisa

Vigência da Proposta: de 07/2015 a 06/2019 Área: Medicina Veterinária Preventiva E Saúde Animal

Origem:	Animais provenientes de estabelecimentos comerciais						
Espécie:	Espécies silvestres brasileiras	sexo:	Machos	idade:	a	N:	8
Linhagem:	Capivara			Peso:	a		
Origem:	Animais provenientes de estabelecimentos comerciais						
Espécie:	Cobaias	sexo:	Machos	idade:	a	N:	80
Linhagem:	Albina			Peso:	a		
Origem:	Animais provenientes de estabelecimentos comerciais						
Espécie:	Coelhos	sexo:	Machos	idade:	a	N:	40
Linhagem:	Nova Zelândia Branco			Peso:	a		

Local do experimento:

São Paulo, 26 de dezembro de 2021

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Camilla Mota Mendes
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Carrapatos e rickettsias associados a pequenos mamíferos de áreas endêmicas e não endêmicas para febre maculosa brasileira", protocolada sob o CEUA nº 6162060317 (ID 003501), sob a responsabilidade de **Marcelo Bahia Labruna** *e equipe; Maria Carolina de Azevedo Serpa* - 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 - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 06/04/2017.

We certify that the proposal "Ticks and rickettsiae associated to small mammals in endemic and non-endemic areas for Brazilian spotted fever", utilizing 500 Brazilian wild species (males and females), protocol number CEUA 6162060317 (ID 003501), under the responsibility of **Marcelo Bahia Labruna** *and team; Maria Carolina de Azevedo Serpa* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 04/06/2017.

Finalidade da Proposta: Pesquisa

Vigência da Proposta: de 03/2017 a 02/2019 Área: Medicina Veterinária Preventiva E Saúde Animal

Origem:	Não aplicável biotério						
Espécie:	Espécies silvestres brasileiras	sexo:	Machos e Fêmeas	idade:	60 a 1000 dias	N:	500
Linhagem:	Não se aplica			Peso:	30 a 3000 g		

Registro IBAMA/Sisbio/Etc: Licença SISBIO 43259-3

Método de Captura: Em cada uma das seis áreas do estudo, durante três anos consecutivos, capturas de pequenos mamíferos serão realizadas semestralmente, contemplando seis campanhas no total. Em cada campanha, 200 armadilhas do tipo livetrap, como gaiolas e Sherman s serão instaladas por cinco noites consecutivas, conforme previamente descrito (Szabó et al. 2013).

Local do experimento: O experimento será realizado em seis áreas - ÁREA 1 - Campus Luiz de Queiroz (ESALQ), Piracicaba, SP; - ÁREA 2 - Estação de tratamento de esgoto Carioba, Americana, SP; - ÁREA 3 Campus da Universidade Federal de São Carlos em Araras, SP; - ÁREA 4 Campus da Universidade de São Paulo em Pirassununga, SP; - ÁREA 5 Campus da Universidade de São Paulo em Ribeirão Preto, SP; - ÁREA 6 Parque Estadual Alberto Löfgren (Horto Florestal), São Paulo, SP.

São Paulo, 26 de dezembro de 2021

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Camilla Mota Mendes
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Agentes transmitidos por carrapatos (Anaplasma spp, Babesia spp, Borrelia spp, Ehrlichia spp e Hepatozoon spp) em pequenos mamíferos e seus carrapatos em áreas endêmicas e não endêmicas para febre maculosa no estado de São Paulo, Brasil.", protocolada sob o CEUA nº 9531121015 (ID 001872), sob a responsabilidade de **Bárbara Conte Weck** - 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 - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 09/12/2015.

We certify that the proposal "Tick-borne agents (Anaplasma spp, Babesia spp, Borrelia spp, Ehrlichia spp and Hepatozoon spp) in small mammals and their ticks in endemic and non-endemic areas for Brazilian spotted fever in the state of São Paulo, Brazil.", utilizing 1 Brazilian wild species (males and females), protocol number CEUA 9531121015 (ID 001872), under the responsibility of **Bárbara Conte Weck** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 12/09/2015.

Finalidade da Proposta: Pesquisa

Vigência da Proposta: de 12/2015 a 12/2019 Área: Medicina Veterinária Preventiva E Saúde Animal

Origem:	Não aplicável biotério						
Espécie:	Espécies silvestres brasileiras	sexo:	Machos e Fêmeas	idade:	a	N:	1
Linhagem:	N/A			Peso:	a		

Local do experimento:

São Paulo, 26 de dezembro de 2021

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Camilla Mota Mendes
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Este trabalho é dedicado a Danilo Gonçalves Saraiva (in memorian), jovem pesquisador e idealizador inicial desse projeto, que teve sua partida precoce, mas de alguma maneira esteve presente durante cada etapa dessa jornada.

AGRADECIMENTOS

Esse trabalho só pode ser realizado pelo esforço de uma equipe muito bem estruturada, então o agradecimento vai a todos os participantes do projeto temático, desde pesquisadores, alunos e demais funcionários.

Agradeço com muita honra a todos os animais que de alguma maneira se doaram na participação desse projeto.

Agradeço a todos os funcionários do VPS, por serem sempre tão solícitos em nos apoiar nos mais diversos desafios. Em especial ao Renato e Márcio, por todo apoio laboratorial, Pedrinho por sua gentileza e carinho com os animais do biotério, e ao Danival por ser sempre tão generoso e não medir esforços em nos ajudar nas burocracias.

Agradeço a todos os colegas e amigos, essa jornada durou bons anos e contar com o apoio de todos foi imprescindível. Agradeço especialmente ao apoio de Amália, Felipe K, Herbert e Piauí no inicio do processo.

A Carolina que acompanhou o início e o fim, pela parceria, pela ajuda desde o primero até o último dia, risadas, campos, perrengues e desabafos. Enfim, por ser a referência que ela é, rs.

A Mara, Ana, Lina, Bruna, Isabela, Jaciara e Yara pelas boas risadas e suporte sempre que necessário. Glauber, Catunda, Tiaguinho e Jonas por toda ajuda e amizade.

Agradeço ao meu co-orientador Sebastián, pela amizade, paciência, suporte, risadas e papos filosóficos.

Agradeço ao Marcelo, pela oportunidade, orientação, paciência, impaciência também, rs, e por confiar no meu trabalho.

Agradeço a minha base (Marlize, Luiz, Rafael e a todos que vieram antes), por todo suporte e amor. Ao Franscisco, Juliana e Lavínia pela presença, apoio e diversão.

O agradecimento especial vai para o projeto paralelo que surgiu no ínicio desse doutorado: a minha família. Namukar, agradeço pela gigantesca parceria; e Ísis, agradeço imensamente pela sua existência e pela sua audácia e coragem de ter me escolhido para ser sua mãe em um momento tão ilustre da minha vida, rs, te amo.

Agradeço à FAPESP pela Bolsa de Doutorado concedida através do processo nº 2017/04249-4, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

RESUMO

WECK, B.C.**Pesquisa de hemoparasitas transmitidos por carrapatos em pequenos mamíferos nos estados de São Paulo e Mato Grosso do Sul.** 2022. 75f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

Pequenos mamíferos (roedores e marsupiais) podem ser hospedeiros de muitas espécies de carrapatos e também podem atuar como reservatórios e/ou hospedeiros amplificadores de patógenos transmitidos por esses vetores. No Brasil já foram realizados estudos em animais silvestres, porém os trabalhos com foco em pequenos mamíferos são escassos. Assim, este estudo investigou a ocorrência de agentes *Hepatozoon* spp., *Babesia* spp., *Borrelia* spp. e agentes da família Anaplasmataceae em pequenos mamíferos em sete fragmentos florestais no Brasil. Entre os anos de 2015 e 2021, pequenos mamíferos foram capturados em seis fragmentos florestais do Estado de São Paulo (biomas Cerrado e Mata Atlântica) e um fragmento no Estado de Mato Grosso do Sul (bioma Pantanal). Amostras de sangue, fígado, baço e pulmão foram coletadas e testadas molecularmente para a presença de DNA de *Hepatozoon*, *Babesia*, *Borrelia* e agentes da família Anaplasmataceae. Um total de 524 mamíferos foram capturados. Quatro novos haplótipos (1, 2, 3, 4) de *Hepatozoon* spp. foram detectados em pequenos mamíferos de diferentes biomas e espécies animais. Apesar dessas diferenças geográficas e associações de hospedeiros, as análises filogenéticas indicaram que os quatro haplótipos pertencem a um mesmo clado com quase todos os haplótipos já relatados em roedores e marsupiais, além de vários haplótipos associados a répteis de diferentes partes do mundo. Nenhuma amostra de mamífero produziu DNA detectável para *Babesia* spp. Por outro lado, o ensaio de PCR direcionado a Anaplasmataceae amplificou uma sequência com 100% de similaridade ao endosimbionte *Wolbachia pipientis* do filarídeo *Litomosoides galizai* de roedores. Amostras de pulmão de dois roedores *Oligoryzomys matogrossae* apresentaram DNA de *Borrelia* do grupo Lyme. Dessas amostras positivas, foi feita uma caracterização molecular de 10 genes borreliais. Essas evidencias sugerem uma nova genoespécie de *Borrelia burgdorferi* sensu lato que aqui foi denominada de "*Candidatus* Borrelia paulista" Rp42. Amostras de sangue de oito *Didelphis albiventris* apresentaram DNA de *Borrelia*, que nos genes *flaB* e *16s* com 100% de similaridade a uma nova espécie descrita em *Ornithodoros mimon* no Brasil. Foi realizada a caracterização molecular com mais seis genes. Estudos futuros são necessários para determinar melhor a competência dos pequenos mamíferos em relação a agentes transmitidos por carrapatos, bem como determinar os vetores associados.

Palavras-chave: Anaplasmataceae. Piroplasmida. *Hepatozoon*. *Borrelia.*

ABSTRACT

WECK, B.C. **Research of tick-borne hemoparasites in small mammals in the states of São Paulo and Mato Grosso do Sul.** 2022. 75f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

Small mammals (rodents and marsupials) are hosts of many species of ticks and also act as reservoirs and/or amplifying hosts of pathogens transmitted by these vectors. In Brazil, studies on wild animals have already been carried out, but the focus on small mammals is still insufficient. This study investigated the occurrence of *Hepatozoon*, *Babesia*, *Borrelia* and Anaplasmataceae agents in small mammals in seven forest fragments in Brazil. Between 2015 and 2021, animals were captured in six forest fragments in the State of São Paulo (Cerrado and Atlantic Rainforest biomes) and one fragment in the State of Mato Grosso do Sul (Pantanal biome). Blood, liver, spleen and lung samples were collected and molecularly screened for *Hepatozoon*, *Babesia*, *Borrelia* and Anaplasmataceae agents. A total of 524 mammals were captured, comprising seven species of marsupials, 14 rodents, two carnivores and one Cingulata. Four new haplotypes (1, 2, 3, 4) of *Hepatozoon* spp. were detected in small mammals from different biomes and animal species. Despite these distinct geographical and host associations, our phylogenetic analyses indicated that the four *Hepatozoon* haplotypes belonged to a same clade that contained nearly all haplotypes previously reported on rodents and marsupials, in addition to several reptile-associated haplotypes from different parts of the world. None mammal samples yielded detectable DNA to *Babesia* spp.. On the other hand, the Anaplasmataceae-targeted PCR assay amplified a sequence 100% identical to the *Wolbachia pipientis* endosymbiont of the rodent filarid *Litomosoides galizai*. Lung samples from two *Oligoryzomys mattogrossae* rodents showed DNA of Lyme group *Borrelia*. From these samples we performed a molecular characterization of 10 borrelial genes to achieve a robust analysis. The retrieved genetic evidence supports the finding of a novel genospecies of Bbsl that we herein name "*Candidatus* Borrelia paulista" Rp42. Blood samples from eight *Didelphis albiventris* showed Borrelia DNA from the Relapsing Fever group. Sequences from *flaB* and *16s* genes showed 100% of identity with a new *borrelia* specie described in *Ornithodoros mimon* in Brazil. A molecular characterization was performed with 6 more genes. Further studies are needed to better determine the competence of small mammals in relation to tick-borne agents, as well as to determine they associated vectors.

Keywords: Anaplasmataceae. Piroplasmida. *Hepatozoon*. *Borrelia.*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa representando as áreas amostradas no projeto **24**

Figura 2. Área de armadilhamento no campus “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, SP **25**

Figura 3. Área de armadilhamento na Estação de Tratamento de Esgoto da Carioba, Americana, SP..... **26**

Figura 4. Área de armadilhamento no campus da Universidade Federal de São Carlos, Araras, SP.....**27**

Figura 5. Área de armadilhamento no campus “Fernando Costa”, Pirassununga, SP. Painel A: área de armadilhamento na Lagoa da Captação. Painel B: área de armadilhamento na Lagoa do Risca Faca..... **28**

Figura 6. Área de armadilhamento no campus da USP de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, SP. Painel A: área de armadilhamento no Biotério. Painel B: área de armadilhamento na Lagoa da conquista. **30**

Figura 7. Área de armadilhamento no Parque Estadual Alberto Löfgren (Horto Florestal), São Paulo, SP..... **31**

Figura 8. Área de armadilhamento Pantanal da Nhecolândia, Corumbá, MS..... **32**

Figura 9. Árvore filogenética baseada nas sequências de 574pb do gene 18S rRNA de *Hepatozoon* spp.. A posição dos haplótipos encontrados nesse trabalho está destacada em negrito. **45**

Figura 10. Árvore filogenética baseada nas sequências de ≈1700 bp do gene 18S rRNA de *Hepatozoon* spp.. A posição dos haplótipos encontrados nesse trabalho está destacada em negrito. **46**

Figura 11. Árvores filogenéticas de *Borrelia* spp. usando os genes *16S rRNA* (1419 pb) (A) e *flaB* (523 pb) (B). A espécie descrita nesse trabalho, “Candidatus Borrelia paulista” RP42 está destacada em negrito. **48**

Figura 12. Árvores filogenéticas de *Borrelia* spp. usando os genes do esquema MLST (4,186 pb) (A), e o gene *ospC* (686 pb) (B). A espécie descrita nesse trabalho, “Candidatus Borrelia paulista” RP42 está destacada em negrito..... **49**

Figura 13. Árvore filogenética de *Borrelia* spp. usando os genes do esquema MLST para o grupo Febre Recorrente. *Borrelia* sp. BW2 está indicada em negrito..... **51**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Número de linhas de armadilhas para captura de pequenos mamíferos, montadas em cada área a cada campanha (15 armadilhas por linha X 4 noites consecutivas X número de “linhas de armadilhas”), entre os anos de 2015 e 2021.....**33**

Tabela 2. Lista dos *primers* utilizados nas Reações em Cadeia pela Polimerase (PCR) para pesquisa de *Borrelia.* **.....36**

Tabela 3. Lista dos *primers* utilizados na Reações em Cadeia pela Polimerase (PCR) para pesquisa em Multilocus de espécies de *Borrelia* sp. do Grupo Lyme.**.....38**

Tabela 4. Lista dos primers utilizados na Reações em Cadeia pela Polimerase (PCR) para pesquisa em Multilocus de espécies de *Borrelia* sp. do Grupo Febre Recorrente.....**39**

Tabela 5. Número de pequenos mamíferos capturados no presente estudo (2015-2018)*, de acordo com Ordem, espécie, área de estudo e tipo de amostra (sangue e tecido).....**41**

Tabela 6. Dados dos 21 pequenos mamíferos que apresentaram DNA de *Hepatozoon* nos dois protocolos de PCR executados, um direcionado a um pequeno fragmento (≈540 pb) e o outro direcionado a um grande fragmento (≈1700 pb) do gene 18S RNA de *Hepatozoon*.....**43**

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 15
1.1 *Hepatozoon* spp..... 16
1.2 *Babesia* spp. 17
1.3 FAMÍLIA ANAPLASMATACEAE 18
1.4 *Borrelia* spp..... 20
2. OBJETIVO..... 23
3. MATERIAIS E MÉTODOS 24
3.1 ÁREAS DE ESTUDO 24
3.1.1 Área 1 (A1) - Campus “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, SP 25
3.1.2 Área 2 (A2) - Estação de tratamento de esgoto “Carioba”, Americana, SP 25
3.1.3. Área 3 (A3) - Campus da Universidade Federal de São Carlos em Araras, SP..... 26
3.1.4 Área 4 (A4) - Campus da Universidade de São Paulo em Pirassununga, SP..... 27
3.1.5 Área 5 (A5) - Campus da Universidade de São Paulo em Ribeirão Preto, SP..... 29
3.1.6 Área 6 (A6) - Parque Estadual Alberto Löfgren (Horto Florestal), São Paulo, SP..... 31
3.1.7 Área 7 (A7) - Fazenda Nhumirim, Pantanal da Nhecolândia, Corumbá, MS..... 31
3.2. CAPTURA DE PEQUENOS MAMÍFEROS 32
3.3 ANÁLISES MOLECULARES 34
3.3.1 Pesquisa de *Hepatozoon* spp. 35
3.3.2 Pesquisa de *Babesia* spp..... 35
3.3.3 Pesquisa de agentes da Família Anaplasmataceae 35
3.3.4 Pesquisa de *Borrelia* spp. 36
3.4 ANÁLISES DAS SEQUÊNCIAS 40
3.5 ANÁLISES FILOGENÉTICAS 40
4. RESULTADOS 40
4.1 PESQUISA DE *Hepatozoon* spp., *Babesia* spp. E AGENTES DA FAMÍLIA ANAPLASMATACEAE..... 42
4.2 PESQUISA DE *Borrelia* spp..... 46
4.2.1 Pesquisa de *Borrelia* sp. Grupo Lyme 47
4.2.2 Pesquisa de *Borrelia* sp. Grupo Febre Recorrente 49
5. DISCUSSÃO 52
5.1 *Hepatozoon* spp., *Babesia* spp. E AGENTES DA FAMÍLIA ANAPLASMATACEAE 52
5.2 *Borrelia* sp. GRUPO LYME 54
5.3 *Borrelia* sp. GRUPO FEBRE RECORRENTE 57
6. CONCLUSÕES 60
7. BIBLIOGRAFIA 61

1. INTRODUÇÃO

Doenças transmitidas por vetores provaram ser inquestionáveis fatores da saúde global nos últimos anos, devido a esse fato o conhecimento das distribuições atuais de patógenos e hospedeiros torna-se cada vez mais necessário (OLIVEIRA et al., 2020; HAN et al., 2016).

Os carrapatos são os mais importantes vetores de patógenos aos animais, entre os seres invertebrados, depois dos mosquitos, e o segundo grupo de ectoparasitas a transmitirem maior variedade de patógenos aos seres humanos (MEDIANNIKOV e FENOLLAR, 2014). Esses vetores podem transmitir um vasto número de bactérias patogênicas, hemoparasitas e vírus, afetando assim, significativamente, a saúde de humanos, de animais de produção e de animais de companhia em todo o mundo (DANTAS-TORRES et al. 2012).

Os pequenos mamíferos por sua vez, são um grupo interessante para se estudar esses agentes, uma vez que apresentam uma ampla diversidade taxonômica, são encontrados em quase todos os ecossistemas terrestres e também são hospedeiros de inúmeras espécies de carrapatos em algum estágio (larva, ninfa e/ou adulto) de seu ciclo de vida (NAVA e LARESCHI, 2012; HORAK et al., 2002, SARAIVA et al., 2012). Além do papel de hospedeiros para várias espécies carrapatos, eles também podem atuar como reservatórios e/ou hospedeiros amplificadores de patógenos transmitidos por esses artrópodes (GUGLIELMONE E NAVA, 2010; 2011).

No Brasil, Paglia *et al*. (2012) descreve 234 espécies de roedores (Rodentia) e 55 espécies de marsupiais (Didelphimorphia) que se apresentam em abundância nos diversos hábitats do país. Estes animais já foram encontrados parasitados por várias espécies de carrapatos dos gêneros *Ixodes*, *Amblyomma* e *Ornithodoros* (BARROS-BATTESTI et al., 2006; SARAIVA et al., 2012; SERPA et al., 2021).

Estudos em busca de patógenos transmitidos por carrapatos já foram realizados em animais de vida livre, bem como em seus ectoparasitas no Brasil (MERINO et al., 2008; WIDMER et al., 2011; ALMEIDA et al., 2013; WOLF et al., 2016; SOARES et al., 2017a,b; MONGRUEL et al., 2017, COLLE et al., 2019, PERLES et al., 2019, MUNÕZ-LEAL et al., 2019; DE OLIVEIRA et al., 2020; MUÑOZ-LEAL et al., 2021a), porém o foco em pequenos mamíferos tem sido muito menor.

1.1 *Hepatozoon* spp.

Protozoários *Hepatozoon* spp. são parasitos apicomplexa caracterizados por um ciclo de vida heteroxeno, no qual os hospedeiros intermediários (vertebrados) são infectados principalmente pela ingestão de artrópodes hematófagos (como carrapatos e mosquitos) contendo oocistos maduros que se rompem no trato digestivo do animal liberando os esporozoítos (SMITH et al., 1999). Rotas alternativas de transmissão, como a predação de vertebrados infectados contendo cistos de *Hepatozoon* em seus tecidos, também são descritas e parecem ser uma rota importante de infecção, principalmente para hospedeiros carnívoros (JOHNSON et al., 2007; 2009).

O carrapato se infecta ao se alimentar de sangue contendo gamontes de *Hepatozoon*, no interior de neutrófilos e monócitos circulantes no hospedeiro, os gamontes são liberados em seu intestino, no qual há formação dos gametas, que por um processo de singamia dão origem ao zigoto. Este atravessa a parede intestinal, indo localizar-se na hemocele do carrapato onde ocorre a formação do oocisto. O hospedeiro vertebrado ingere o carrapato com oocisto, esse vai pro intestino onde são liberados os esporozoítos, que atravessam a parede intestinal e atingem os tecidos. Outro vertebrado ao se alimentar desse primeiro hospedeiro também pode se infectar (BANETH et al., 2007; JOHNSON et al., 2007; 2009)

No Brasil, a hepatozoonose canina é a principal enfermidade relacionada a esse gênero, na qual o agente etiológico envolvido é *Hepatozoon canis*. Estudos realizados sugerem uma maior prevalência da infecção por *Hepatozoon* spp. em cães de áreas rurais (O'DWYER et al., 2001; DEMONER et al., 2013), onde os vetores associados são *Amblyomma ovale* (FORLANO et al., 2005) e *R. microplus* (MIRANDA et al., 2011), do que em áreas urbanas, onde o carrapato *R. sanguineus* atua como vetor (SPOLIDORIO et al., 2009; MIRANDA et al., 2014).

Pequenos animais silvestres, como roedores, podem estar agindo como hospedeiros intermediários ou paratênicos para esse protozoário em áreas de mata (SOUSA et al., 2017b; DEMONER et al., 2016; ALABÍ et al., 2021), porém a transmissão de *Hepatozoon* por predação parece ser um evento raro no contexto dos canídeos e não contribui efetivamente para a disseminação do protozoário nesse grupo no Brasil (MAIA et al. 2014; DEMONER et al. 2016).

Por outro lado, existem muitos estudos relatando a ocorrência de espécies de

Hepatozoon em carnívoros, marsupiais, roedores, répteis e anfíbios, (ANDRE et al., 2010; PERLES et al., 2019; SANTOS et al., 2020; MAIA et al., 2014; DEMONER et al., 2016). Estudos recentes em roedores e marsupiais encontraram haplótipos que nas suas análises filogenéticas aparecem em um grande clado composto por haplótipos associados a roedores, marsupiais e répteis, inferindo assim que essas espécies provavelmente estejam sim relacionadas como hospedeiros paratênicos, e se infectem através da predação (WOLF et al., 2016; COLLE et al., 2019; DEMONER et al., 2019; SILVA et al., 2017; DEMONER et al., 2016).

1.2 *Babesia* spp.

O gênero *Babesia* é composto por protozoários intraeritrocitários da ordem Piroplasmida que são transmitidos para uma variedade de hospedeiros através da picada de carrapatos do complexo *Ixodes ricinus* infectados (BILIÉ et al., 2018). Os protozoários desse gênero são subdivididos em dois grandes grupos filogenéticos: *Babesia* sensu stricto (s.s.) e grupo *Babesia microti* (GRAY et al., 2010; YABSLEY e SHOCK., 2013) e ambos os grupos contêm agentes causadores de babesiose de importância veterinária e humana. Nas Américas *B. microti* é o principal agente etiológico, causador de doença em humanos nos EUA (GRAY et al., 2010; YABSLEY e SHOCK, 2013). *Babesia microti* é mantido na natureza através de um ciclo enzoótico envolvendo carrapatos ixodídeos e pequenos mamíferos (GRAY et al., 2010; VANNIER e KRAUSE, 2012).

No Brasil esses protozoários estão mais associados a veterinária, atingindo animais de companhia, de produção e selvagens (CLARK et al., 2012). Nos cães a doença é conhecida como babesiose canina, é predominantemente causada por *B. vogeli* e transmitida pelo carrapato *R. sanguineus*. Relatos de infecção por outras espécies de *babesia*, como *Babesia gibsoni*, já foram descritos, mas aparentam ser incomuns (MAGGI e KRÄMER, 2019; PANTI-MAY e RODRÍGUEZ-VIVAS, 2020; DOS SANTOS et al., 2021). Em relação aos animais de produção, os bovinos são os mais atingidos através da babesiose bovina, enfermidade causada pelos protozoários *Babesia bovis* e *Babesia bigemina*, que são transmitidos aos animais pelo carrapato *R. microplus* (GUGLIELMONE, 1995; BAHIA et al., 2020). A babesiose bovina é uma das doenças bovinas que mais apresenta impactos econômicos nas fazendas (CLARK et al., 2012, BARBOSA et al., 2020; WOLF et al., 2016; SOUSA et al., 2017a).

Existem relatos citológicos e moleculares desses agentes em animais silvestres (SOARES et al., 2017b; RUAS et al., 2003; GAZETA et al., 2004; SILVA et al., 2007), e há pouco tempo os primeiros registros moleculares de *Babesia* spp em pequenos mamíferos. Em 2016, Wolf *et al.* (2016) relataram esse agente em roedores *Thrichomys pachyurus* e marsupiais *Monodelphis domestica* e no ano seguinte Sousa *et al*. (2017b) fizeram o relato em cinco espécimes de roedores *Thrichomys fosteri*.

1.3 FAMÍLIA ANAPLASMATACEAE

A família Anaplasmataceae é composta por alfa-proteobactérias, que são pequenas bactérias parasitas de células eucarióticas e que se replicam dentro de vacúolos derivados da célula hospedeira (KERSTERS et al., 2006). Os carrapatos ixodídeos constituem os principais vetores invertebrados deste grupo, e é durante sua alimentação no hospedeiro vertebrado que ele transmite esses agentes através da saliva (FUTSE et al., 2003). Dessa maneira, após a picada, a bactéria entra na corrente sanguínea e infecta tipos específicos de células hospedeiras, como neutrófilos, monócitos e macrófagos, plaquetas, eritrócitos ou células endoteliais, dependendo do agente (MAGGI et al., 2019; PRUNEAU et al., 2012).

Esta família apresenta cinco gêneros, que foram organizados com base em evidências moleculares: *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Neoehrlichia, Neorickettsia,* e *Wolbachia*, os três primeiros abrangem agentes transmitidos por carrapatos de importância veterinária e de saúde pública, e são os agentes causadores de Anaplasmose e Erliquiose, doenças reconhecidas em todo o mundo (DUMLER et al., 2001; RAR e GOLOVLJOVA, 2011).

No Brasil, estudos têm implicado *Ehrlichia canis*, como principal agente erliquial presente (DE OLIVEIRA et al., 2020). Esse agente causa a erliquiose monocítica canina (EMC) em cães domésticos que se infectam através da picada do carrapato *Rhipicephalus sanguineus* (linhagem tropical) (SANCHES et al., 2016; MORAES-FILHO et al., 2015). Como os cães do país costumam ser altamente expostos à carrapatos, a erliquiose monocítica canina acaba se tornando uma doença muito comum (VIEIRA et al., 2011).

Outras espécies de *Ehrlichia* spp. também já foram relatadas no país, como *E. ewingii* e *E. chaffeensis* (OLIVEIRA et al., 2009; MACHADO et al., 2006), *Ehrlichia minasensis* em bovinos (AGUIAR et al., 2014; CABEZAS-CRUZ et al., 2016), e

haplótipos em animais silvestres (WIDMER et al., 2011; ALMEIDA et al., 2012; VIEIRA et al., 2016; SOARES et al., 2017a; BRAGA et al., 2018; GUIMARÃES et al., 2019).

Em relação a doenças de humanos, três espécies de *Ehrlichia* são reconhecidas: *E. chaffeensis*, causando erliquiose monocítica humana (HME), *E. ewingii* causando erliquiose granulocítica humana (HGE) (OLANO e WALKER., 2002), e recentemente Candidatus *Neoehrlichia mikurensis* também foi associada como agente de doenças em humanos na Europa e Ásia (PORTILLO et al., 2018). No Brasil, há relatos de seres humanos positivos em sorodiagnóstico (CALIC et al., 2004; SPOLIDORIO et al., 2010; BEZERRA et al., 2017), porém não existem evidências moleculares.

Em relação ao gênero *Anaplasma*, a espécie *Anaplasma phagocytophilum* é a frequentemente relatada em humanos e animais na América do Norte, Europa e Ásia (MADISON-ANTENUCCI et al., 2020), outras espécies como *A. capra* e *A. ovis*. também apresentam relatos em humanos na Ásia (LI et al., 2015). No Brasil, espécies próximas a esta já foram detectadas em análises moleculares de cães, aves e animais silvestres (SANTOS et al., 2009; MACHADO et al., 2012; MONGRUEL et al., 2017; SOARES et al., 2017a, WOLF et al., 2016), mas não existem relatos da doeça em humanos.

A espécie que mais afeta economicamente o país é *Anaplasma marginale*, ela acomete principalmente bovinos e é causadora da anaplasmose, doença que traz grandes prejuízos financeiros ao atingir os rebanhos (KESSLER., 2001). As evidências epidemiológicas sugerem o carrapato *Rhipicephalus microplus* como principal vetor dessa espécie, já que no Brasil ele ocorre de forma endêmica nos bovinos (GUGLIELMONE., 1995; KESSLER., 2001).

Em relação a animais domésticos, *Anaplasma platys* é o principal agente causador de doenças, principalmente em cães nos quais causa a chamada trombocitopenia cíclica canina (MAGGI et al., 2013). Os cães são os hospedeiros reservatórios primários para *A. platys*, embora este organismo tenha demonstrado infectar humanos e outros animais (ARRAGA-ALVARADO et al., 2014).

No Brasil essa bactéria já foi identificada molecularmente em várias regiões, infectando cães principalmente, (FERREIRA et al., 2007; DAGNONE et al., 2009; RAMOS et al., 2009; VIEIRA et al., 2018) mas também é relatada em gatos (GUIMARAES et al., 2019). Existe a possibilidade de coinfecção de *E. canis* com *Anaplasma* sp. em cães, que também é frequente. (DAGNONE et al. 2009, RAMOS

et al. 2010) OLIVEIRA et al., 2018; SOARES et al., 2017). Já em humanos, apesar dos relatos na América do Sul (BREITSCHWERDT et al., 2014; ARRAGA-ALVARADO et al., 2014), no Brasil ainda não existem casos confirmados.

Por fim, roedores de vida livre foram recentemente investigados sobre sua importância para manutenção de patógenos da família Anaplasmataceae no ambiente. Esses mamíferos atuam como hospedeiros para os estágios imaturos dos carrapatos vetores desses agentes, bem como desempenham papel como reservatórios para patógenos dessa família (FOLEY et al., 2002; OBIEGALA et al., 2014; BRAGA et al., 2018).

1.4 *Borrelia* spp.

O gênero *Borrelia* é composto por bactérias espiroquetas, que se movem em forma helicoidal, seus ciclos de transmissão envolvem vertebrados e seus carrapatos associados em ecossistemas selvagens (KURTENBACH et al., 1995; TALAGRAND-REBOUL et al., 2018).

As espécies do gênero *Borrelia* são classificadas em dois grandes grupos evolutivos, o da Borreliose de Lyme (BL) e o grupo da Febre Recorrente (FR). Os membros do clado da borreliose de Lyme são vetorados exclusivamente por carrapatos do gênero *Ixodes* e foram investigados com uma profundidade muito maior do que os membros do clado da febre recorrente, a maioria dos quais são vetorados por carrapatos Argasídeos (OPPLER et al., 2021).

Borrelia burgdorferi sensu lato (Bbsl) é o principal complexo de espiroquetas do grupo BL e inclui pelo menos sete genoespécies patogênicas para humanos (*Borrelia afzelii*, *Borrelia bavarensis*, *B. burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii*, *Borrelia mayonii*, *Borrelia lusitaniae* e *Borrelia spielmannii*) (PRITT et al., 2016; MARGOS et al., 2018).

O complexo de carrapatos *Ixodes ricinus* são os principais vetores de Bbsl no Hemisfério Norte (RUDENKO et al., 2011). Contudo, espécies de *Ixodes* nas latitudes do sul do globo também mantêm infecções por *Borrelia* na natureza (MARGOS et al., 2015; MUÑOZ-LEAL et al., 2020). Os carrapatos adquirem espiroquetas após se alimentarem, permanecem cronicamente infectados e, após inocularem saliva na pele de seus hospedeiros, transmitem a bactéria (STEERE et al., 2016). Roedores são importantes reservatórios de Bbsl na natureza (RUDENKO et al., 2011), e hospedeiros

comuns para carrapatos do gênero *Ixodes* (DURDEN et al., 2016). Embora evidências robustas de *B. burgdorferi* s.s. não existirem na América do Sul, genoespécies do grupo foram detectadas em carrapatos associados a roedores, e roedores da Argentina (SEBASTIAN et al., 2016), Chile (IVANOVA et al., 2014; MUÑOZ-LEAL et al., 2019; THOMAS et al., 2020).

No Brasil evidências sorológicas e moleculares para uma doença semelhante à doença de Lyme, denominada síndrome de Baggio-Yoshinari, foram publicadas (MIZIARA et al., 2018); no entanto, a evidência é considerada inconsistente atualmente (DE OLIVEIRA et al., 2018). Até o momento, duas genoespécies do grupo foram detectadas no país, em carrapatos associados a roedores e aves (DALL'AGNOL et al., 2017. MUÑOZ-LEAL et al., 2021a).

Espiroquetas do grupo FR ocorrem em ciclos de transmissão silvestre em áreas tropicais e subtropicais do mundo infectando vertebrados selvagens e principalmente carrapatos do gênero *Ornithodoros* (MARGOS et al., 2008). Os carrapatos se infectam enquanto se alimentam de vertebrados espiroquetêmicos (por exemplo, mamíferos e aves) e mantêm a infecção por várias semanas a anos (BARBOUR et al., 2005). Os seres humanos são acidentalmente expostos ao frequentar ambientes onde carrapatos *Ornithodoros* spp. ocorrem, como entrar em cavernas, habitar em moradias precárias com rachaduras nas paredes (BARBOUR et al., 2005). Quando picados por carrapatos infectados, humanos podem apresentar episódios febris recorrentes, que são típicos dessa doença, acompanhados de sintomas inespecíficos (MADISON-ANTENUCI et al., 2020).

No Brasil, oito espécies de carrapatos *Ornithodoros* são relatadas como parasitas de humanos: *Ornithodoros brasiliensis, Ornithodoros rostratus*, *Ornithodoros fonsecai, Ornithodoros mimon, Ornithodoros rietcorreai, Ornithodoros rudis, Ornithodoros tabajara* e *Ornithodoros hasei* (ARAGÃO, 1923; CANÇADO et al., 2008; LABRUNA e VENZAL, 2009; LABRUNA et al., 2014; DE OLIVEIRA et al., 2018; MUÑOZ-LEAL et al., MUÑOZ-LEAL et al., 2018.; 2021b; MUÑOZ-LEAL et al., 2021a) e pássaros, morcegos ou roedores podem atuar como seus hospedeiros naturais (TALAGRAND-REBOUL et al., 2018).

Dessas oito espécies de Argasídeos, cinco já foram encontradas infectadas por espiroquetas (*O. hasei, O. mimon, O. rietcorreai, O. rudis e Ornithodoros tabajara*) (MUÑOZ-LEAL et al., 2021a), e de uma delas (*Ornithodoros rudis*) obteve-se o primeiro isolamento de *Borrelia* no país (*Borrelia venezuelensis*) (MUÑOZ-LEAL et al.,

2018). Apesar desses achados, atualmente, as espiroquetas da febre recorrente são negligenciadas como agente causador de doença no Brasil, provavelmente porque os sintomas da Febre Recorrente se sobrepõem a outras doenças (Chagas, malária e arbovírus transmitidos por mosquitos). Assim, o diagnóstico é muitas vezes mascarado por etiologias com manifestações semelhantes (FACCINI-MARTINEZ et al., 2021).

Vale ressaltar que todos esses achados são em vetores, portanto apesar de roedores serem sabidamente reservatórios, existem poucos estudos em potenciais reservatórios vertebrados.

2. OBJETIVO

Verificar a ocorrência de bactérias (Família Anaplasmataceae, *Borrelia* spp., *Ehrlichia* spp.) e protozoários (*Babesia* spp. e *Hepatozoon* spp.) em amostras biológicas de pequenos mamíferos de diferentes espécies, colhidas em seis diferentes áreas do estado de São Paulo e uma área do estado do Mato Grosso do Sul.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ÁREAS DE ESTUDO

A captura de pequenos mamíferos foi realizada em sete áreas distintas, seis no Estado de São Paulo e uma no Estado de Mato Grosso do Sul, previamente escolhidas para outro projeto (SERPA et al., 2021) e com amostras direcionadas a esse trabalho. As áreas foram identificadas conforme descrito (figura 1):

- **ÁREA 1 -** Campus “Luiz de Queiroz” (ESALQ), Piracicaba, SP;
- **ÁREA 2 -** Estação de tratamento de esgoto “Carioba”, Americana, SP;
- **ÁREA 3 –** Campus da Universidade Federal de São Carlos em Araras, SP;
- **ÁREA 4 –** Campus da Universidade de São Paulo em Pirassununga, SP;
- **ÁREA 5 –** Campus da Universidade de São Paulo em Ribeirão Preto, SP;
- **ÁREA 6 –** Parque Estadual Alberto Löfgren (Horto Florestal), São Paulo, SP.
- **ÁREA 7 –** Fazenda Nhumirim, Pantanal da Nhecolândia, Corumbá, MS.

Figura 1. Mapa representando as áreas amostradas no projeto

Fonte: Elaborado pelo autor

3.1.1 Área 1 (A1) - Campus “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, SP

O campus ”Luiz de Queiroz” (ESALQ) da Universidade de São Paulo (USP), situado na cidade de Piracicaba, no centro do estado de São Paulo, possui cerca de 915 hectares divididos entre área construída, cultivo, pastagens, locais de mata primária e secundária, além de cursos de água como do Rio Piracicaba que margeia o campus (ESALQ, 2019). Altitude em torno de 586 m. A cidade de Piracicaba se localiza em área de transição entre os biomas Mata Atlântica e Cerrado (IBGE, 2017). A área que foi abordada é altamente antrópica, composta por cana-de-açúcar e culturas de milho interpostas por pastagens artificiais de gado e matas ciliares degradadas ao longo do rio Piracicaba (LUZ et al.,2019). A figura 2 mostra em amarelo a área onde foram colocadas as linhas de armadilha nesse local.

Figura 2. Área de armadilhamento no campus “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, SP

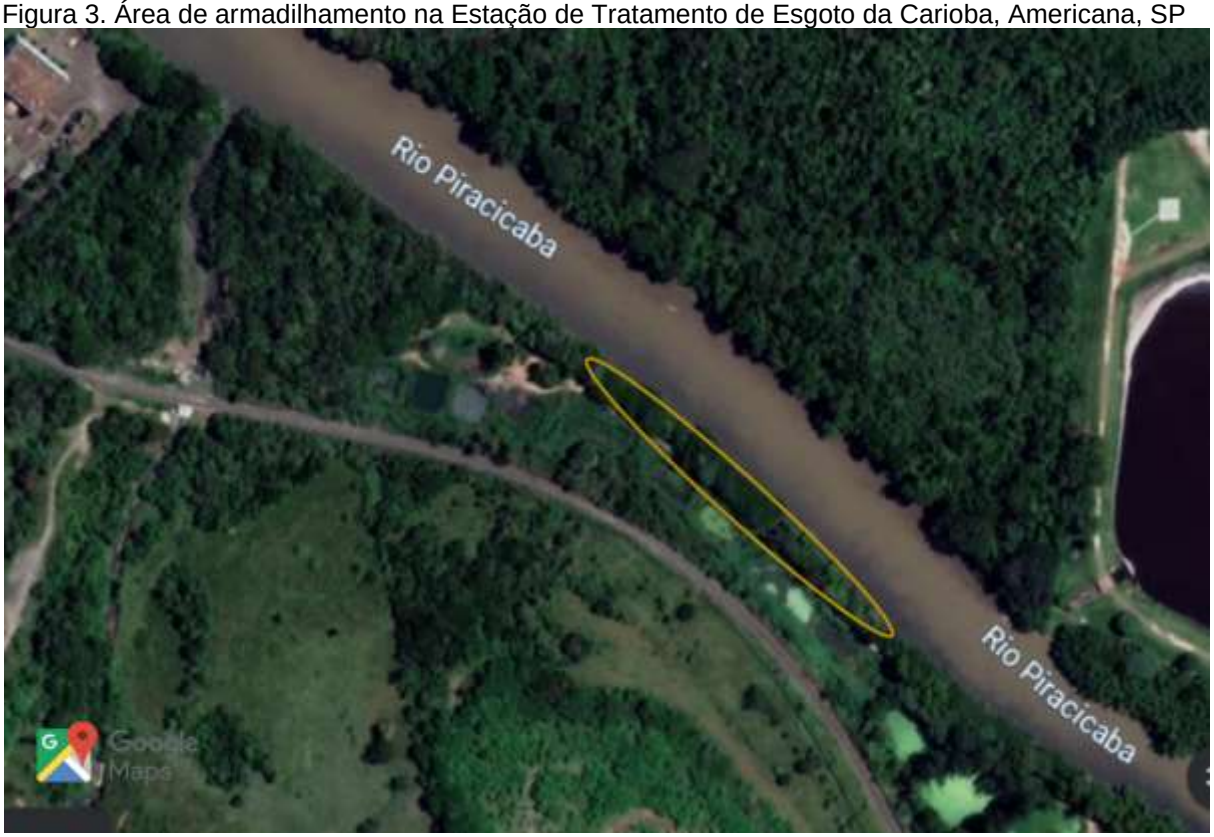
Fonte: Google Maps, 2022

3.1.2 Área 2 (A2) - Estação de tratamento de esgoto “Carioba”, Americana, SP

A Estação de Tratamento de Esgoto da Carioba está localizada no município de Americana, região de Campinas, ao leste do Estado de São Paulo, e tem sua área

delimitada pelas margens do Rio Piracicaba e do Ribeirão Colombo, e pela linha férrea América Latina Logística – ALL. A cidade de Americana se localiza em área de transição entre os biomas Mata Atlântica e Cerrado (IBGE, 2017). A área que foi abordada é altamente antrópica, composta por campos de grama abandonados (sem gado) e matas ciliares degradadas ao longo do Rio Piracicaba (LUZ et al., 2019). A figura 3 mostra a área onde foram colocadas as linhas de armadilha nesse local.

Figura 3. Área de armadilhamento na Estação de Tratamento de Esgoto da Carioba, Americana, SP



Fonte: Google Maps, 2022

3.1.3. Área 3 (A3) - Campus da Universidade Federal de São Carlos em Araras, SP

O campus da Universidade Federal de São Carlos, na cidade de Araras, possui 230 hectares, sendo mais da metade constituído de área de cultivo experimental de cana-de-açúcar; o restante do campus é formado de uma pequena área construída, três lagos, pastos e áreas de mata secundária (ROCHA et. Al, 2017). A cidade está localizada ao centro-norte do estado de São Paulo em área de transição entre os biomas Mata Atlântica e Cerrado (IBGE, 2017). A área abordada é altamente antrópica com matas ciliares em regeneração (LUZ et al., 2019). A figura 4 mostra e amarelo a área onde foram colocadas as linhas de armadilha nesse local.

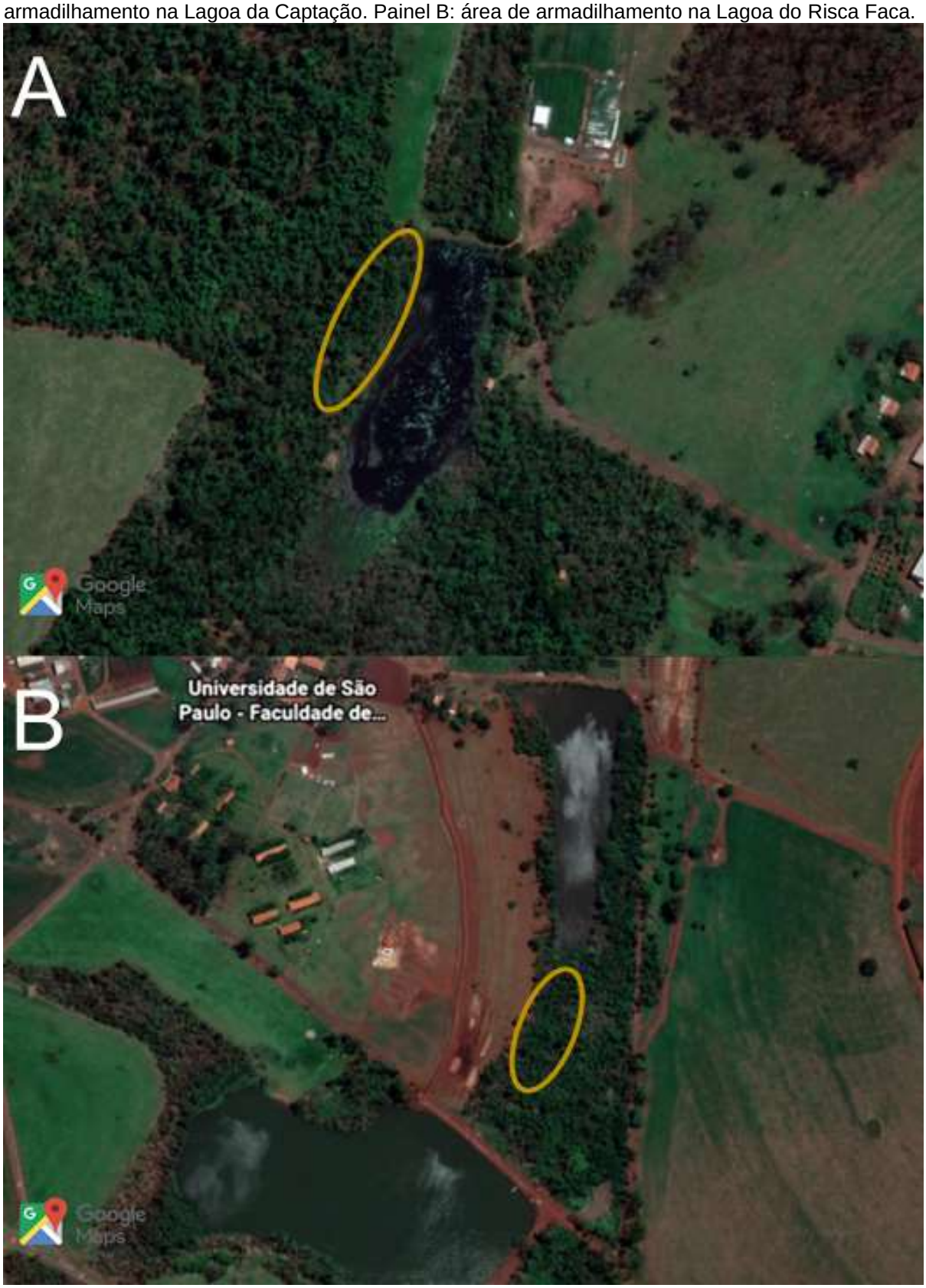
Figura 4. Área de armadilhamento no campus da Universidade Federal de São Carlos, Araras, SP

Fonte: Google Maps, 2022

3.1.4 Área 4 (A4) - Campus da Universidade de São Paulo em Pirassununga, SP

O campus “Fernando Costa”, da USP de Pirassununga, situado na cidade de mesmo nome, possui cerca de 2200 hectares de área, desse total 1000 hectares são destinados a pastagens, 300 hectares para área de cultivo e o restante é dividido em área construída, reservas florestais com mata secundária, além de represas e um sistema de captação de água (FZEA, 2015). A cidade está localizada ao centro-norte do estado de São Paulo em área de transição entre os biomas Mata Atlântica e Cerrado (IBGE, 2017). A área abordada é altamente antrópica, composta por culturas de milho interpostas por pastagens artificiais de gado e matas ciliares degradadas ao longo de dois lagos artificiais (LUZ et al., 2019). A figura 5 mostra em amarelo as áreas onde foram colocadas as linhas de armadilhas nesse local.

Figura 5. Área de armadilhamento no campus “Fernando Costa”, Pirassununga, SP. Painel A: área de armadilhamento na Lagoa da Captação. Painel B: área de armadilhamento na Lagoa do Risca Faca.

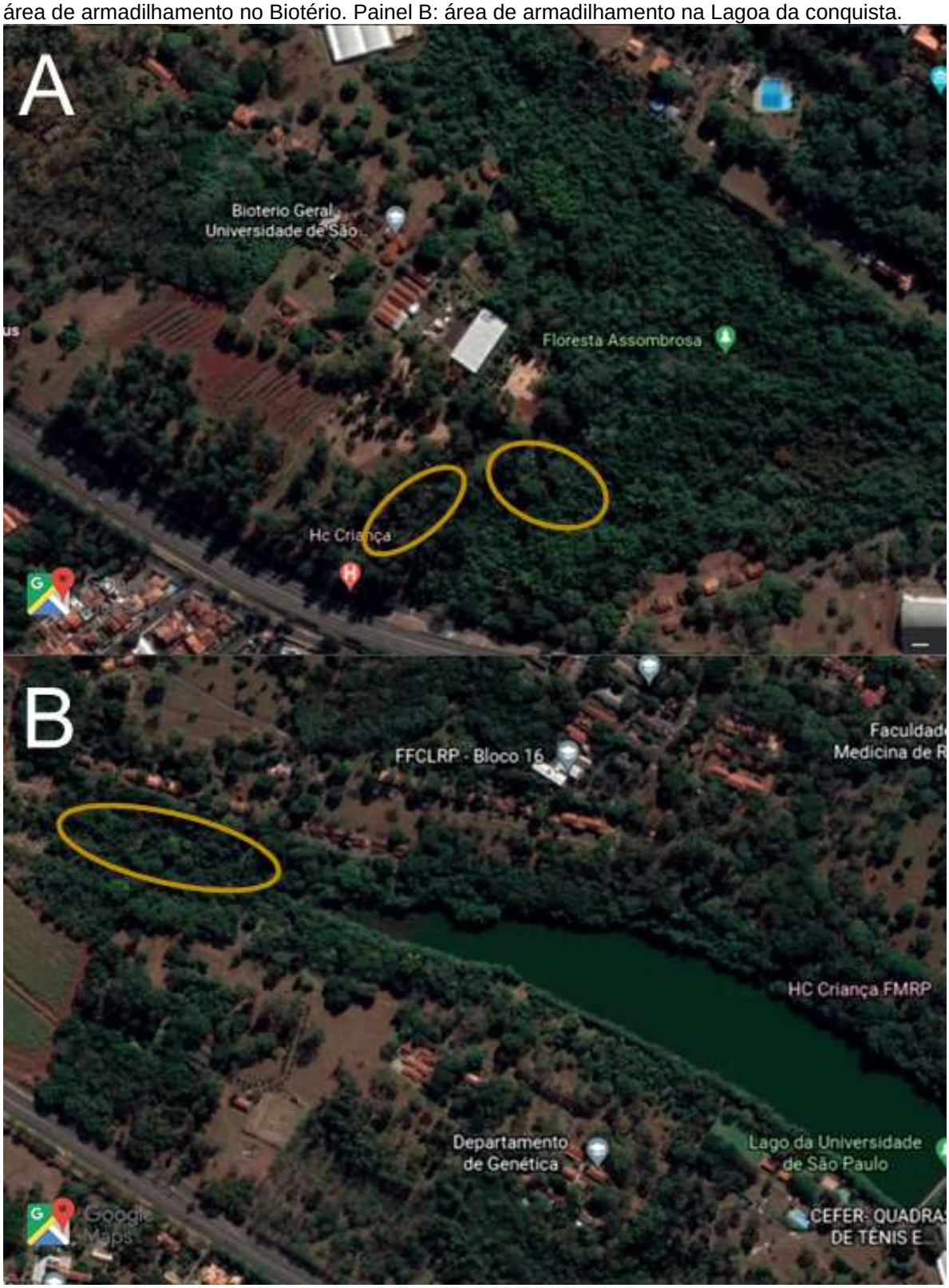


Fonte: Google Maps, 2022

3.1.5 Área 5 (A5) - Campus da Universidade de São Paulo em Ribeirão Preto, SP

O campus da USP na cidade de Ribeirão Preto tem uma área total de 586 hectares, e destes, 470 hectares são de área de mata secundária e o restante do campus, de área construída, além de represas e lagos (FEA-RP, 2012). As figuras 6 e 7 mostram as áreas onde foram colocadas as linhas de armadilhas nesse local. A cidade de Ribeirão Preto se localiza no bioma Cerrado (IBGE, 2017). A área abordada é altamente antrópica, com campos de grama (sem gado) e florestas degradadas ao longo de dois córregos. A figura 6 mostra as áreas onde foram colocadas as linhas de armadilhas nesse local.

Figura 6. Área de armadilhamento no campus da USP de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, SP. Painel A: área de armadilhamento no Biotério. Painel B: área de armadilhamento na Lagoa da conquista.



Fonte: Google Maps, 2022

3.1.6 Área 6 (A6) - Parque Estadual Alberto Löfgren (Horto Florestal), São Paulo, SP

O Parque Estadual Alberto Löfgren (Horto Florestal) é uma Área de Preservação Permanente (APP), situa-se na zona norte da cidade de São Paulo e possui 187 hectares, sendo 174 hectares de mata, incluindo áreas remanescentes de Mata Atlântica. Existem no local lagos que são abastecidos por córregos pertencentes às microbacias da região como, por exemplo, da microbacia da Pedra Branca (INSTITUTO FLORESTAL DE SÃO PAULO, 2018). A figura 7 mostra a área onde foram colocadas as linhas de armadilha nesse local.

Figura 7. Área de armadilhamento no Parque Estadual Alberto Löfgren (Horto Florestal), São Paulo, SP

Fonte: Google Maps, 2022

3.1.7 Área 7 (A7) - Fazenda Nhumirim, Pantanal da Nhecolândia, Corumbá, MS

O Pantanal da Nhecolândia tem a grande maioria da sua área inserida na cidade de Corumbá, estado do Mato Grosso do Sul; a base de trabalho do projeto foi fixada na estação experimental da Embrapa Pantanal, na Fazenda Nhumirim, e as coletas foram realizadas nas fazendas São José e Retiro Manduvi, com vegetação caraterística de Cerrado e Cerradão sem alagamento periódico, campos inundáveis e

ambientes aquáticos, como lagoas de água doce ou salobra, rios, vazantes e canais para escoamento da água; além das áreas construídas das sedes das fazendas (EMBRAPA PANTANAL, [s.d.]). A figura 8 mostra a área onde foram colocadas as linhas de armadilha nesse local.

Figura 8. Área de armadilhamento Pantanal da Nhecolândia, Corumbá, MS.

Fonte: Google Maps, 2022

3.2. CAPTURA DE PEQUENOS MAMÍFEROS

A captura dos pequenos mamíferos ocorreu semestralmente no período de 2015 a 2018, sendo uma campanha realizada na estação seca e outra na estação chuvosa. No ano de 2021 também foi realizada uma campanha excedente na Área 5 do projeto (Ribeirão Preto – SP). Nas áreas 1 a 5 as campanhas iniciaram na estação seca de 2015 e terminaram na estação seca de 2018, totalizando três anos consecutivos de coleta de dados. Por questões logísticas, na área 6 em São Paulo foi realizada apenas uma coleta no início do projeto, e na área 7 que está localizada no bioma Pantanal, foi realizada apenas uma campanha nos anos 2016 e 2017.

O esforço de captura médio empregado nas áreas variou de acordo com o

número de armadilhas montadas em cada localidade. Cada “linha de armadilha” foi composta por cinco pontos de captura com distância de 10 metros entre si, totalizando uma linha de 50 metros. Em cada ponto de captura foram colocadas três armadilhas, sendo duas no solo (uma do tipo Tomahawk e uma tipo Shermann), e uma no alto (tipo Shermann), geralmente colocada em árvores ou cipós, somando 15 armadilhas por linha.

As armadilhas foram iscadas com uma rodela de banana e uma mistura de paçoca, aveia e sardinha, que era substituída após 48 horas ou sempre que necessário e ficaram abertas durante quatro noites consecutivas, sendo vistoriadas toda manhã.

O esforço de captura médio empregado nas áreas variou de acordo com o número de “linhas de armadilhas” montadas em cada localidade, e esse número variou de acordo com o espaço e questões logísticas de cada campanha. O número de “linhas de armadilhas” por área e por campanha, bem como o esforço amostral por área está descrito na tabela 1.

Tabela 1. Número de linhas de armadilhas para captura de pequenos mamíferos, montadas em cada área a cada campanha (15 armadilhas por linha X 4 noites consecutivas X número de “linhas de armadilhas”), entre os anos de 2015 e 2021

Área	Número de “linhas de armadilha” por campanha								Esforço total de captura
	Seca 2015	Chuva 2015-2016	Seca 2016	Chuva 2016-2017	Seca 2017	Chuva 2017-2018	Seca 2018	Extra 2021	
A1	5	13	13	13	11	13	13	-	4860
A2	10	-	10	10	9	10	10	-	3540
A3	10	-	10	10	11	11	11	-	3780
A4	13	13	13	13	13	13	13	-	5460
A5	10	13	13	13	13	6	13	13	5640
A6	9	-	-	-	-	-	-	-	540
A7	18	12	-	12	12	-	6	-	3600

Os animais capturados foram sedados com aproximadamente 100mg/kg de cloridrato de quetamina mais 10mg/kg de cloridrato de xilazina por via intramuscular para realização da triagem. Sob efeito de sedação, os pequenos mamíferos foram

identificados morfologicamente e biometricamente. A identificação foi realizada com o auxílio de chaves contidas nos guias de mamíferos de Reis *et al*. (2006) para roedores e marsupiais, e Bonvicino (2008) para roedores.

Com os animais ainda sedados foi coletado sangue venoso, por punção da veia lateral caudal ou punção intracardíaca, o qual foi armazenado em microtubos identificados. Alguns indivíduos de cada espécie amostrada foram submetidos ao procedimento de eutanásia, fixados e enviados a Coleção Zoológica do Laboratório de Zoologia dos Vertebrados da ESALQ-USP, em Piracicaba, para tombamento e confirmação da identificação taxonômica, servindo assim de espécime testemunho. Nesses casos, amostras de órgãos internos (baço, fígado e pulmão) foram colhidas, acondicionadas em microtubos identificados e congeladas a -20ºC. Por fim, após a realização da triagem os animais não-coletados foram marcados com brincos numerados e, após recuperação anestésica, soltos no mesmo local da captura. Em caso de recaptura em outra campanha, os mesmos procedimentos seriam realizados.

3.3 ANÁLISES MOLECULARES

Nas amostras de tecidos (sangue e órgãos) a extração de DNA foi realizada através do kit comercial da Qiagen (DNeasy Tissue and Blood Kit, Qiagen, Chatsworth, CA), conforme instruções do fabricante. Inicialmente, uma PCR inicial direcionada ao gene mitocondrial do citocromo b de mamífero (*cytb*) foi realizada conforme descrito por Steuber *et al*. (2005), a fim de verificar o sucesso da extração. Após, as amostras foram testadas individualmente para pesquisa de DNA de protozoários do gênero *Hepatozoon*, protozoários do gênero *Babesia*, bactérias do gênero *Borrelia* e bactérias da família Anaplasmataceae, conforme descrito nos itens 3.3.1 a 3.3.4.

As PCR foram realizadas em solução total de 25 µL e utilizando DreamTaq Green PCR Master Mix (Foster City, CA). Os protocolos estão descritos em suas respectivas referências (RAS et al., 1996; INOKUMA; RAOULT; BROUQUI, 2000; STROMDAHL et al., 2003; BUNIKIS et al., 2004; SCHWAN et al., 2005; CRIADO-FORNELIO et al., 2006; AGUIAR et al., 2007; TOLEDO et al., 2010; FOMENKO et al., 2011; PAROLA et al., 2011; ALMEIDA et al., 2012,2013; MARGOS et al., 2018). Os produtos amplificados a partir das reações de PCR foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% (100 ml TBE 0,5%; 2,0g agarose UltraPure™ Agarose

Invitrogen™) corado com Sybr Safe InvitrogenTM em cuba horizontal com solução tampão TBE 0,5X (0,045 M Tris-borato; 0,001 M EDTA pH 8,0) submetida à voltagem de 1 a 10 V/cm durante 45 minutos. A visualização das bandas foi feita em analizador de imagem (AlphaImager).

3.3.1 Pesquisa de *Hepatozoon* spp.

Para a pesquisa de DNA de *Hepatozoon* spp, foram utilizados os primers HEP2 144-169 senso e HEP2 743-718 antisenso, que amplificam um fragmento de cerca de 574 pb do gene 18S rRNA de *Hepatozoon* spp, conforme protocolo preconizado por Almeida *et al*. (2013). Amostras que geraram amplicons pela PCR inicial específica para o gênero *Hepatozoon* foram submetidas a protocolos de PCR para amplificar um fragmento maior do gene *18S* rRNA (~1274pb), utilizando os pares de primers HAM-1 senso e HPF2 antisenso para reação, conforme descrito por Criado-Fornelio *et al.* (2006). Para todas as reações foram utilizados controles positivos (DNA de *H. canis* obtido de cão) e negativo (água Milli-Q).

3.3.2 **Pesquisa de *Babesia* spp**.

A pesquisa de agentes do gênero *Babesia,* foi realizada com os primers BAB2-143-167 senso e BAB2-694-667 antisenso, correspondentes a regiões conservadas do gene 18S rRNA de *Babesia* spp, que amplifica um fragmento de cerca de 551pb, conforme previamente estabelecido por Almeida *et al.* (2012). Controles positivos (DNA de sangue de cão positivo para *Babesia vogeli*) e negativo (água Milli-Q) foram incluídos em cada reação.

3.3.3 Pesquisa de agentes da Família Anaplasmataceae

Na pesquisa de DNA para agentes da Família Anaplasmataceae cada amostra foi testada com um par de *primers* EHR16SD senso e EHR16SR antisenso para o gene *16S* que amplifica um fragmento de 345pb. (INOKUMA; RAOULT; BROUQUI, 2000). Quando positivas, as amostras seguiram para PCR para pesquisa de DNA de *Ehrlichia* spp. Cada amostra foi testada com um par de *primers* DSB-330 senso e DSB-720 antisenso (DOYLE et al., 2005) que amplifica um fragmento de 401 pb do

gene *dsb,* conforme protocolo descrito por Aguiar *et al*. (2007), o amplicon gerado seguiu para a *heminested* PCR foi utilizando os *primers* DSB-380 senso e DSB-720 antisenso que amplifica um fragmento de 349 pb do gene *dsb*, conforme Almeida *et al*. (2013). Controles positivo (DNA de cães positivos para *Ehrlichia canis*) e negativo (água Milli-Q) foram incluídos em cada reação.

3.3.4 Pesquisa de *Borrelia* spp.

Para a pesquisa de DNA de *Borrelia*, foi utilizado PCR real-time semiquantitativo (7500 Real Time PCR Systems apparatus – Applied Bio Systems, Foster City, CA, USA) como triagem, com os primers Bor16S3F senso e Bor16S3R antisenso, e sonda interna Bor16S3P senso, que amplifica um fragmento de 148pb do gene *16S* RNA conforme Parola *et al*. (2011). As amostras positivas foram submetidas a protocolos de PCR para amplificar fragmentos maiores do gene *flaB*, utilizando um par de primers FlaLL senso e FlaRL antisenso externos, que amplifica um fragmento de 665 pb do gene *flaB* e uma segunda reação utilizando um par de primers FlaLS senso e FlaRS antisenso internos (*nested* PCR), que amplifica um fragmento de 354 pb, de acordo com Stromdahl *et al*. (2003). Para todas as reações foi utilizamos água Milli-Q como controle negativo e como controle positivo de DNA de *Borrelia venezuelensis* RMA01 (MUÑOZ-LEAL et al., 2018).

Após sequenciar esses dois loci e identificar a qual grupo as *Borrelia* sp. detectadas pertenciam, grupo Lyme ou grupo Febre recorrente, tentamos amplificar uma gama de outros genes, descritos nas Tabela 2, 3 e 4. Para todas as reações foram utilizados controle negativo (água Milli-Q) e como controle positivo de amostras pertencentes ao grupo Lyme DNA de "*Candidatus* Borrelia ibitipoquensis" ip37 (MUÑOZ-LEAL et al., 2020) e como controle positivo de amostras pertencentes ao grupo Febre Recorrente utilizamos de DNA de *Borrelia venezuelensis* RMA01 (MUÑOZ-LEAL et al., 2018).

Tabela 2. Lista dos *primers* utilizados nas Reações em Cadeia pela Polimerase (PCR) para pesquisa de Borrelia.

Gene /Especificidade de Sequência dos *primers* (5'-3') ***Primers*** **Grupo**		**Fragmento Amplificado**	**Referência**
rrs-rrlA	*Febre Recorrente* *Lyme*		
IGS-F	F- GTATGTTTAGTGAGGGGGGTG	987 pb	Bunikis et al. 2004

IGS-R		R- GGATCATAGCTCAGGTGGTTAG		
IGS-Fn		F- AGGGGGGTGAAGTCGTAACAAG	945 pb (*nested*)	
IGS-Rn		R- GTCTGATAAACCTGAGGTCGGA		
16S rRNA	*Febre Recorrente Lyme*			
FD3 T50		F- AGAGTTTGATCCTGGCTTAG R- GTTACGACTTCACCCTCCT	1498 pb	Ras et al. 1996
Rec-4 Rec-9		F- ATGCTAGAAACTGCATGA* R- TCGTCTGAGTCCCCATCT*		
16s-1 16s-2		F- TAGAAGTTCGCCTTCGCCTCTG* R- TACAGGTGCTGCATGGTTGTCG*		
p66	*Febre Recorrente Lyme*			
P66-F P66-R		F- GATTTTTCTATATTTGGACACAT R- TGTAAATCTTATTAGTTTTTCAAG	744 pb	Bunikis et al. 2004
P66-Fn P66-Fr		F- CAAAAAAGAAACACCCTCAGATCC R- CCTGTTTTTAAATAAATTTTTGTAGCATC	683 pb (*nested*)	
flaB	*Febre Recorrente*			
Fla-ans5' Btur-fla3' Fla+1A Fla-1B Fla-alt3		F- TGTGATATCCTTTTAAAGAGACAAATGG R- GGTTCCTGACTTTAACACTAGCC F- AGAGCTTGGAATGCAACCTG* R- TGCTTCATCCTGATTTGC* F- TCTAAGCAATGACAATACATATTGAGG*	1246 pb	Schwan et al. 2005
glpQ	*Febre Recorrente*			
glpQ F+1 Rev-2 Rev-1 glpQ F-1		F- GGGGTTCTGTTACTGCTAGTGCCATTAC R- CAATACTAAGACCAGTTGCTCCTCCGCC F- GCACAGGTAGGAATGTTGGAATTTATCCTG* R- CAATTTTAGATATGTCTTTACCTTGTTGTTTATGCC*	1386pb	Schwan et al. 2005
glpQ	*Febre Recorrente*			
Q1 Q2		F- CACCATTGATCATAGCTCACAG R- CTGTTGGTGCTTCATTCCAGTC	597pb	Fomenko et al. 2011
Q3 Q4		F- GCTAGTGGG TATCTTCCAGAAC R- CTTGTTGTTTATGCCAGAAGGGT	535pb (*nested*)	
glpQ	*Febre Recorrente*			
glpQ-frag 1F glpQ-frag 1R		F- CATTAATTATAGCTCACAGAG R- AACAAGCATTATCAATTTTCC	599pb	Toledo et al. 2010
glpQ-frag 2F glpQ-frag 2R		F- TATGGCATAAACAACAAGGTA R- AATCTGTAAATAGACCATCTA	453pb (*nested*)	
gyrB	*Febre Recorrente*			
gyrB 3' gyrB 5'+3		F- GGTTTATGAGTTATGTTGCTAGTAATATTCAAGTGC R- GCTGATGCTGATGTTGATG	600pb	Schwan et al. 2005
ospA	*Lyme*			
OspA-F OspA-R		F- TATTTATTGGGAATAGGTC R- GACTCAGCACCTTTTTG	889pb	Bunikis et al. 2004
ospC	*Lyme*			
OspC -F OspC-R		F- ATGAAAAAGAATACATTAAGTGC R-	657pb	Bunikis et al. 2004

	ATTAATCTTATAATATTGATTTTAATTAAG G	
OspC-Fn	F-	617pb (*nested*)
OspC-Rn	TATTAATGACTTTATTTTTATTTATATCT R- TTGATTTTAATTAAGGTTTTTTTGG	

**Primers* utilizados somente no sequenciamento

Tabela 3. Lista dos *primers* utilizados na Reações em Cadeia pela Polimerase (PCR) para pesquisa em Multilocus de espécies de *Borrelia* sp. do Grupo Lyme.

MLST (Lyme)				
Gene	Primers	**Sequência dos *primers* (5'-3')**	**Fragmento Amplificado**	**Referência**
clpA	clpAF1237	F- AAAGATAGATTTCTTCCAGAC	981pb	http://pubmlst.org/borrelia
	clpAR2218	R- GAATTTCATCTATTAAAAGCTTTC		
	clpAF1255	F- GACAAAGCTTTTGATATTTTAG	849pb (*nested*)	
	clpAR2104	R- CAAAAAAAACATCAAATTTTCTATCTC		
rplB	rplF2	F- TGGGTATTAAGACTTATAAGC	758pb	http://pubmlst.org/borrelia
	rplR760	R- GCTGTCCCCAAGGAGACA		
	rplF40	F- CGCTATAAGACGACTTTATC	720pb (hemi-*nested*)	
pyrG	pyrF391	F- GATTGCAAGTTCTGAGAATA	799pb	http://pubmlst.org/borrelia
	pyrR1190	R- CAAACATTACGAGCAAATTC		
	pyrF448	F- GATATGGAAAATATTTTATTTATTG	687pb (*nested*)	
	pyrR1154	R- AAACCAAGACAAATTCCAAG		
recG	recF890	F- CCCTTGTTGCCTTGCTTTC	804pb	http://pubmlst.org/borrelia
	recR1694	R- GAAAGTCCAAAACGCTCAG		
	recF917	F- CTTTAATTGAAGCTGGATATC	722pb (*nested*)	
	recR1658	R- CAAGTTGCATTTGGACAATC		
clpX	clpXF391	F- GCTGCAGAGATGAATGTGCC	859pb	http://pubmlst.org/borrelia
	clpXR1273	R- GATTGATTTCATATAACTCTTTTG		
	clpXF403	F- AATGTGCCATTTGCAATAGC	721pb (*nested*)	
	clpXR1124	R- TTAAGAAGACCCTCTAAAATAG		
pepX	pepXF449	F- TTATTCCAAACCTTGCAATCC	791pb	Margos et al. 2018
	pepXR1172	R- GTTCCAATGTCAATAGTTTC		
	pepXR1115	R- TGTGCCTGAAGGAACATTTG	648pb (hemi-*nested*)	
nifS	nifF1	F- ATGGATTTCAAACAAATAAAAAG	1027pb	Margos et al. 2018
	nifR1049	R- GATATTATTGAATTTCTTTTAAG		
	nifR719	R- GTTGGAGCAAGCATTTTATG	719pb (hemi-*nested*)	
uvrA	uvrF1408	F- GAAATTTTAAAGGAAATTAAAAGTAG	891pb	Margos et al. 2018
	uvrR2318	R- CAAGGAACAAAAACATCTGG		
	uvrF1434	F- GCTTAAATTTTTAATTGATGTTGG	677pb (*nested*)	
	uvrR2111	R- CCTATTGGTTTTTGATTTATTTG		

Tabela 4. Lista dos primers utilizados na Reações em Cadeia pela Polimerase (PCR) para pesquisa em Multilocus de espécies de *Borrelia* sp. do Grupo Febre Recorrente.

MLST (Febre recorrente)				
Gene	Primers	**Sequência dos *primers* (5'-3')**	**Fragmento Amplificado**	**Referência**
clpA	clpAF1262	F- AAGCTTTTGA**YY**TATTAGATGGTC	1014pb	http://pubmlst.org/borrelia
	clpAR2276	R- TCATATTT**D**AT**R**GT**D**TCGTC		
	clpAF1264	F- GCTTTTGAYYTATTAGATGGTC	834pb (*nested*)	
	clpAR2098	R- CAAAAAAAA**S**ATC**H**A**RRT**TTTCATTTTTTAG		
rplB	rplF3	F- GGAGAAAAATATGGG**K**ATTAAGAC	766pb	http://pubmlst.org/borrelia
	rplR769	R- G**R**CCCCAAGG**W**GATAC		
	rplF18	F- ATTAAGACTTATA**R**GCCAAAAAC	741pb (*nested*)	
	rplF759	R- GATACAGGATG**W**CGACC		
	rplF24	F- GACTTATA**R**GCCAAAAACTTC	741pb (*nested*)	
	rplF765	R- CCAAGG**W**GATACAGGATG		
pyrG	pyrF372	F- TGG**R**AA**R**TATTTAGG**K**AGAACTG	1003pb	http://pubmlst.org/borrelia
	pyrR1375	R- TATTTAGG**K**AGAACTGTACAGC		
	PyrF379	F- TATTTAGG**K**AGAACTGTACAGC	873pb (*nested*)	
	PyrR1252	R- TAT**R**CCACAAACATTACG**K**GC		
recG	recF898	F- GC**K**TTTCT**M**TCTAG**Y**ATTCC	881pb	http://pubmlst.org/borrelia
	recR1779	R- TC**R**GTTAAAGGTTCCTTATAAAG		
	recF908	F- CTAG**Y**ATTCCT**Y**TAATTGA**R**GC	871pb (hemi-*nested*)	
clpX	clpXF109	F- GC**Y**ATTTGTTTTGAATGTTCTAAAATATG	859pb	http://pubmlst.org/borrelia
	clpXR1277	R- TAAAGTTCTTTTGCCCAAGG		
	clpXF268	F- GC**Y**ATTTGTTTTGAATGTTCTAAAATATG	721pb (*nested*)	
	clpXR1183	R- CTTTTTTAATTTGCTTA**S**T**W**GAAGG		
pepX	pepXF361	F- AGAGA**Y**TTAAG**Y**TTA**K**CAGG	1168pb	http://pubmlst.org/borrelia
	pepXR1207	R- C**Y**ATAGTTTCTCTTAAAGA**Y**TGC		
	pepXF364	F- GA**Y**TTAAG**Y**TTA**K**CAGGA**R**TTG	823pb (*nested*)	
	pepXR1187	R- TGCATTCCCCACATTGG		
nifS	nifF23	F- TAAAAATAAAGAGTACTAAATAAATG	876pb	http://pubmlst.org/borrelia
	nifR899	R- CCAAGACCAATAATTCCTGC		
	nifF60	F- AAATAATGGTATAATTCTTAAAATAA	656pb (*nested*)	
	nifR716	R- GGAGCAAGCATTTT**Y**TGTC		
uvrA	uvrF1170	F- GAGGCGTTATCTT**W**CAAC	983pb	http://pubmlst.org/borrelia
	uvrR2153	R- CTAATCTC**D**GTAAAAAATCCAACATAAG		
	uvrF1173	F- GCGTTATCTT**W**CAACTGAATC	974pb (*nested*)	
	uvrR2147	R- TC**D**GTAAAAAATCCAACATAAGTTGC		

3.4 ANÁLISES DAS SEQUÊNCIAS

Todos os amplicons positivos gerados nas amostras de campo testadas pelos protocolos de PCR descritos acima foram purificados e sequenciados utilizando o “kit” comercial BigDye TM Terminator – Cycle Sequencing Ready Reaction – Applied Biosystems e em seguida sequenciados no sequenciador de DNA modelo ABI 3500 Genetic Analyser (Applied Biosystens/Perkin Elmer), segundo seu manual de instruções. As sequências obtidas foram editadas pelo pacote de programas Bioedit e submetidas à análise de similaridade com as sequências disponíveis no GenBank, através do programa BLAST analysis (ALTSCHUL et al. 1990), visando análises filogenéticas e uma melhor elucidação taxonômica dos agentes encontrados

3.5 ANÁLISES FILOGENÉTICAS

As sequências obtidas para os diferentes grupos de patógenos e genes foram alinhadas com diversas sequências disponíveis no GeneBank. O alinhamento das sequências foi realizado com o programa ClustalX (THOMPSON et al., 1997) e ajustado manualmente no programa GeneDoc v. 2.6.01 (NICHOLAS et al., 1997). As análises filogenéticas foram inferidas pelo método de Máxima Parcimônia (MP). As árvores de MP foram construídas utilizando o programa PAUP* v. 4.0b10 (SWOFFORD, 1998), com 1000 réplicas de bootstrap, e por análise Bayesiana (BA) usando MrBayes v3.1.2 (RONQUIST et al., 2003) com 1.000.000 de réplicas.

4. RESULTADOS

Um total de 524 mamíferos foram capturados durante os anos de 2015-2018, compreendendo sete espécies de marsupiais, 14 roedores, dois carnívoros e um Cingulata (Tabela 5). Amostras de sangue foram coletadas em todos os casos. Entre os 524 animais, 277 foram eutanasiados e foram coletadas amostras de fígado, pulmão e baço. Testamos um total de 1355 amostras (524 de sangue, 277 de fígado, 277 de pulmão e 277 de baço). De acordo com nossos resultados para *Borrelia* (descritos no item 4.1) realizamos mais uma campanha no mês de maio de 2021 na A5 (Ribeirão Preto-SP). Nessa campanha capturamos apenas dois *Didelphis*

albiventris dos quais coletamos amostras de sangue e tecido (fígado, pulmão e baço) que foram destinadas apenas para pesquisa de *Borrelia*. Amplicons de tamanho esperado para o gene *cytb* foram obtidos em todas as 1.355 amostras, confirmando assim as extrações de DNA bem-sucedidas.

Tabela 5. Número de pequenos mamíferos capturados no presente estudo (2015-2018)*, de acordo com Ordem, espécie, área de estudo e tipo de amostra (sangue e tecido).

Pequenos Mamíferos	Nº animais eutanasiados/ Nº animais capturados							Total (sangue)	Total (órgãos)
	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7		
Ordem Didelmorphia									
Didelphis albiventris	9/18	14/38	2/10	6/24	7/41			131	38
Didelphis aurita	1/1					2/10		11	3
Gracilinanus agilis			5/7	17/31	7/19		2/6	63	31
Gracilinanus microtarsus		1/1	2/6				4/5	12	7
Marmosa constantinae				2/2		2/2		4	4
Monodelphis domestica							11/27	27	11
Phylander sp.				1/1				1	1
Subtotal	10/19	15/39	9/23	26/56	14/60	4/12	17/38	249	95
Ordem Rodentia									
Rattus rattus	1/1	14/16			10/11			28	25
Mus musculus		1/1						1	1
Oecomys aff. marmorae				1/1			13/43	47	14
Nectomys squamipes				4/7	10/16			23	14
Necromys lasiurus			9/10	1/1				11	10
Oligoryzomys spp.	8/8	1/1	16/18	24/28	20/23			78	69
Juliomys cf. *ossitenuis*				2/2				2	2
Akodon sp.				5/6	2/3	6/6		15	13
Hylaeamys megacephalus				3/6	1/1			7	4
Euryoryzomys russatus			3/4			9/9		13	12
Cavia sp.			2/2	1/1				3	3
Clyomis laticeps							1/2	2	1
Thrichomys pachyurus							6/34	34	6
Cerradomys sp.				1/2				2	1
Subtotal	9/9	16/18	30/34	42/54	43/54	15/15	20/79	266	175
Ordem Cingulata									
Dasypus novemcinctus	1/1							1	1

Subtotal								1	1
Ordem Carnivora									
Galictis cuja			0/1					1	
Nasua nasua	1/1						1/2	3	2
Subtotal	1/1		0/1				1/2	4	2
Não Identificados (N.I.)									
N.i.			3/3	1/1				4	4
Subtotal			3/3	1/1				4	4
Total	21/30	31/57	49/61	69/113	51/114	17/27	38/122	524	277

*Essa tabela não inclui os dois *Didelphis albiventris* capturados na coleta de 2021.

*Áreas A1 até A7 estão indicadas na Fig. 1.

4.1 PESQUISA DE *Hepatozoon* spp., *Babesia* spp. E AGENTES DA FAMÍLIA ANAPLASMATACEAE.

Entre os 524 animais amostrados, 21 (4,0%) produziram amplicons na PCR inicial específica do gênero *Hepatozoon* visando um fragmento de 574 pb do gene 18S rRNA. Esses 21 animais foram compostos por 11 roedores do estado de São Paulo (um de A4, um de A5 e nove de A6), e seis marsupiais e quatro roedores do estado de Mato Grosso do Sul (A7) (Tabela 5). Apenas um dos 21 animais infectados pelo *Hepatozoon* produziu amplicons de sangue. Os 20 mamíferos infectados restantes produziram amplicons dos órgãos: pulmão (7 animais), fígado (3), baço (1), pulmão e baço (4) e pulmão, fígado e baço (5). Os amplicons dos 21 pequenos mamíferos PCR-positivos foram submetidos ao sequenciamento de DNA, resultando em quatro novos haplótipos *18S* rRNA (1, 2, 3 e 4) do gênero *Hepatozoon*. Os haplótipos 1 e 2 restringiram-se a roedores do estado de São Paulo, enquanto os outros dois haplótipos foram encontrados apenas no estado de Mato Grosso do Sul, sendo o haplótipo 3 em roedores e o haplótipo 4 em marsupiais (Tabela 6).

Considerando as identidades mais próximas através da análise BLAST, o haplótipo 1, detectado nos roedores *Nectomys squamipes* e *Oligoryzomys nigripes*, foi 98,7% (532/539pb) idêntico ao *Hepatozoon* sp. detectado no carrapato *Ixodes* sp. do Chile (MH174345) e *Hepatozoon* sp. detectado no roedor *Phyllotis darwini* do Chile (MW881034).

O haplótipo 2, detectado nos roedores *Akodon* sp. e *Euryoryzomys russatus*, foi 99,8% (543/544 pb) idêntico aos mesmos dois *Hepatozoon* sp. das sequências do

Chile (MH174345, MW881034). Da mesma forma, o Haplotipo 3, detectado nos roedores *Oecomys marmorae* e *Thrichomys pachyurus*, foi 98,2% (532/542 pb) idêntico aos mesmos dois *Hepatozoon* sp. das sequências do Chile (MH174345, MW881034).

Finalmente, o Haplotipo 4, detectado nos marsupiais *Gracilinanus microtarsus* e *Monodelphis domestica*, foi 98,0% (532/543 pb) idêntico ao *Hepatozoon* sp. detectado no réptil *Caiman crocodilus yacare* do Brasil (KJ413132). Com base nas amostras acima que geraram quatro haplótipos distintos, tentamos gerar uma sequência maior (1700 pb) do gene *Hepatozoon 18S* rRNA de pelo menos um pequeno mamífero de cada haplótipo.

Não obtivemos nenhum fragmento maior a partir de representantes do haplótipo 1. Do haplótipo 2, foi possível gerar fragmentos de quatro representantes, dos quais as sequências do gene *18S* rRNA foram idênticas e designadas como *Hepatozoon* sp. HF005, HF009, HF014 e HF015. Na análise BLAST essas sequências foram 99,2% (1715/1729 pb) idênticas ao *Hepatozoon ayorgbor* da cobra *Python regius* de Gana, na África (EF157822) (Tabela 6). Do haplótipo 3 foi possível gerar um fragmento do animal PS085, designado como *Hepatozoon* sp. PS085. Esse fragmento foi 98,2% (1710/1741 pb) idêntico à mesma sequência de *H. ayorgbor* mencionada acima (EF157822). Da mesma forma, a partir do haplótipo 4 foi possível uma sequência, designada como *Hepatozoon* sp. PS001, seu fragmento de *18S* rDNA foi 98,2% (1692/1723 pb) idêntico a *H. ayorgbor* (EF157822) (Tabela 6).

Tabela 6. Dados dos 21 pequenos mamíferos que apresentaram DNA de *Hepatozoon* nos dois protocolos de PCR executados, um direcionado a um pequeno fragmento (≈540 pb) e o outro direcionado a um grande fragmento (≈1700 pb) do gene 18S RNA de *Hepatozoon*.

Código Individual	Área*	Espécie de Mamífero	Resultados da PCR para o gene 18S rRNA		
			Amostras positivas	Haplótipo fragmento ≈540 pb [1]	Haplótipo fragmento ≈1700 pb [2]
PR065	A4	*Nectomys squamipes*	Baço	1	
RP033	A5	*Oligoryzomys* sp.	Pulmão	1	
HF006	A6	*Akodon* sp.	Pulmão, Fígado, Baço	2	
HF010	A6	*Akodon* sp.	Fígado	2	
HF015	A6	*Akodon* sp.	Fígado	2	HF015
HF025	A6	*Akodon* sp.	Sangue	2	

HF027	A6	*Akodon* sp.	Pulmão	2	
HF00	A6	*Akodon* sp.	Pulmão, Fígado, Baço	2	HF005
HF009	A6	*Euryoryzomys russatus*	Pulmão	2	HF009
HF014	A6	*E. russatus*	Pulmão	2	HF014
HF021	A6	*E. russatus*	Pulmão	2	
PS003	A7	*Gracilinanus microtarsus*	Fígado	4	
PS001	A7	*Monodelphis domestica*	Pulmão, Baço	4	PS001
PS063	A7	*M. domestica*	Pulmão, Fígado, Baço	4	
PS082	A7	*M. domestica*	Fígado, Baço	4	
PS113	A7	*M. domestica*	Pulmão, Fígado, Baço	4	
PS130	A7	*M. domestica*	Pulmão, Baço	4	
PS085	A7	*Oecomys marmorae*	Pulmão	3	PS085
PS119	A7	*O. marmorae*	Pulmão, Baço	3	
PS125	A7	*O. marmorae*	Pulmão, Fígado, Baço	3	
PS022	A7	*Thrichomys pachyurus*	Pulmão	3	

*Áreas A4, A5, A6 e A7 estão indicadas na Fig. 1; [1]ver Fig. 2; [2]ver Fig. 3

Na árvore filogenética feita a partir de sequências curtas (≈540 bp) os haplótipos 1, 2, 3 e 4 se ramificaram dentro de um grande clado composto por muitos haplótipos de *Hepatozoon* associados a roedores e répteis de diferentes partes do mundo. Este grande clado aparece como irmão de outro grande clado que contém haplótipos de *Hepatozoon* associados com canídeos (*Hepatozoon canis*) e felinos (*Hepatozoon felis*) (Fig. 9). Esta topologia é semelhante com a árvore filogenética das sequências maiores (≈1.700 bp), em que as sequências desse estudo se ramificaram dentro de um grande clado contendo muitos haplótipos associados a roedores e alguns répteis (Fig. 10).

Nenhuma das 1.355 amostras teve amplicons pelo protocolo de Almeida *et al*. (2013) para o gênero *Babesia*. Uma amostra de sangue de um *Oligoryzomys* sp. de Piracicaba (A1) gerou amplicons pelo protocolo de Inokuma *et al*. (2000). Esses amplicons geraram uma sequência de DNA 100% (306/306 pb) idêntica ao endossimbionte *Wolbachia pipientis* do filarídeo *Litomosoides galizai* (AJ548800) de roedores.

Figura 9. Árvore filogenética baseada nas sequências de 574pb do gene 18S rRNA de *Hepatozoon* spp.. A posição dos haplótipos encontrados nesse trabalho está destacada em negrito.

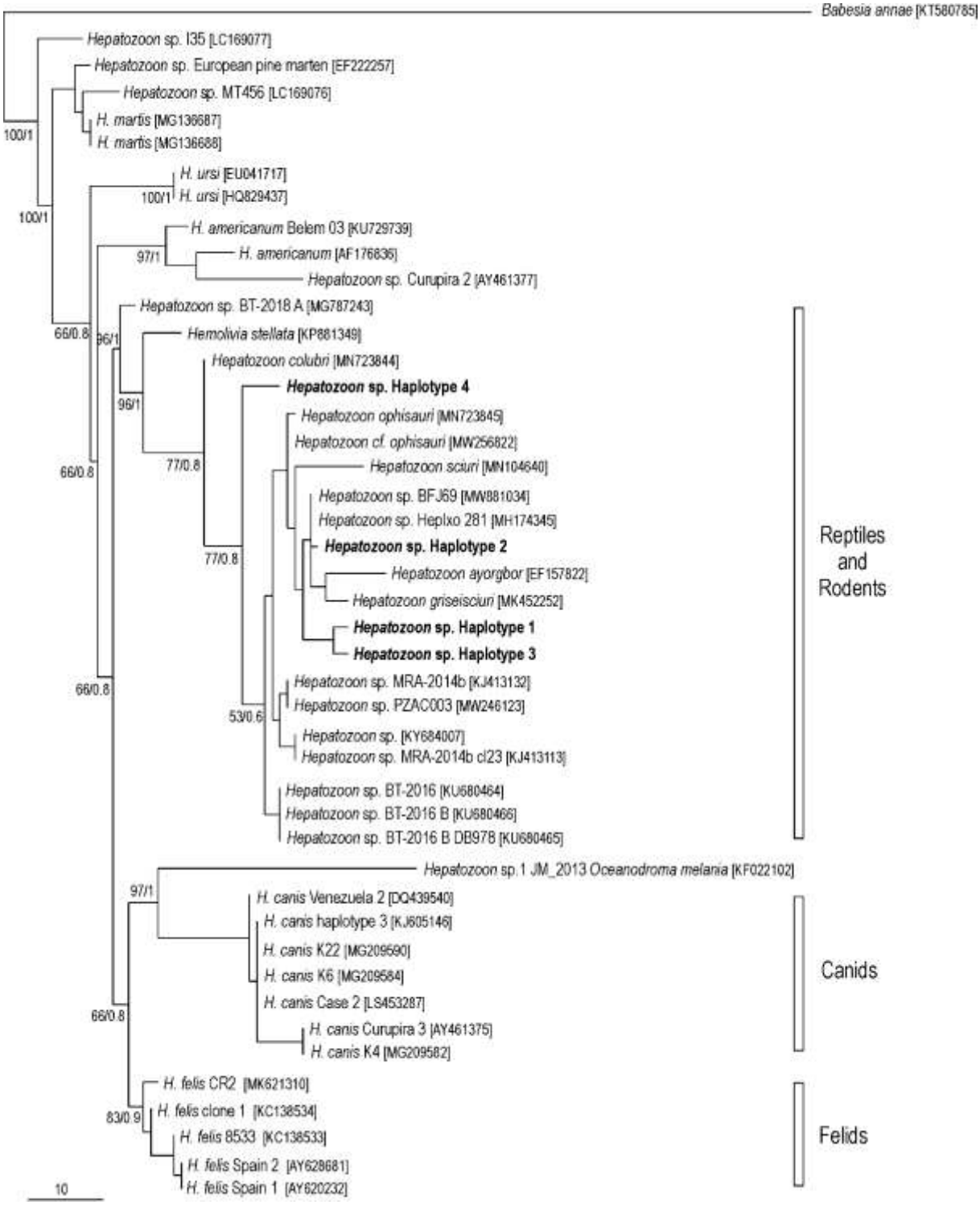
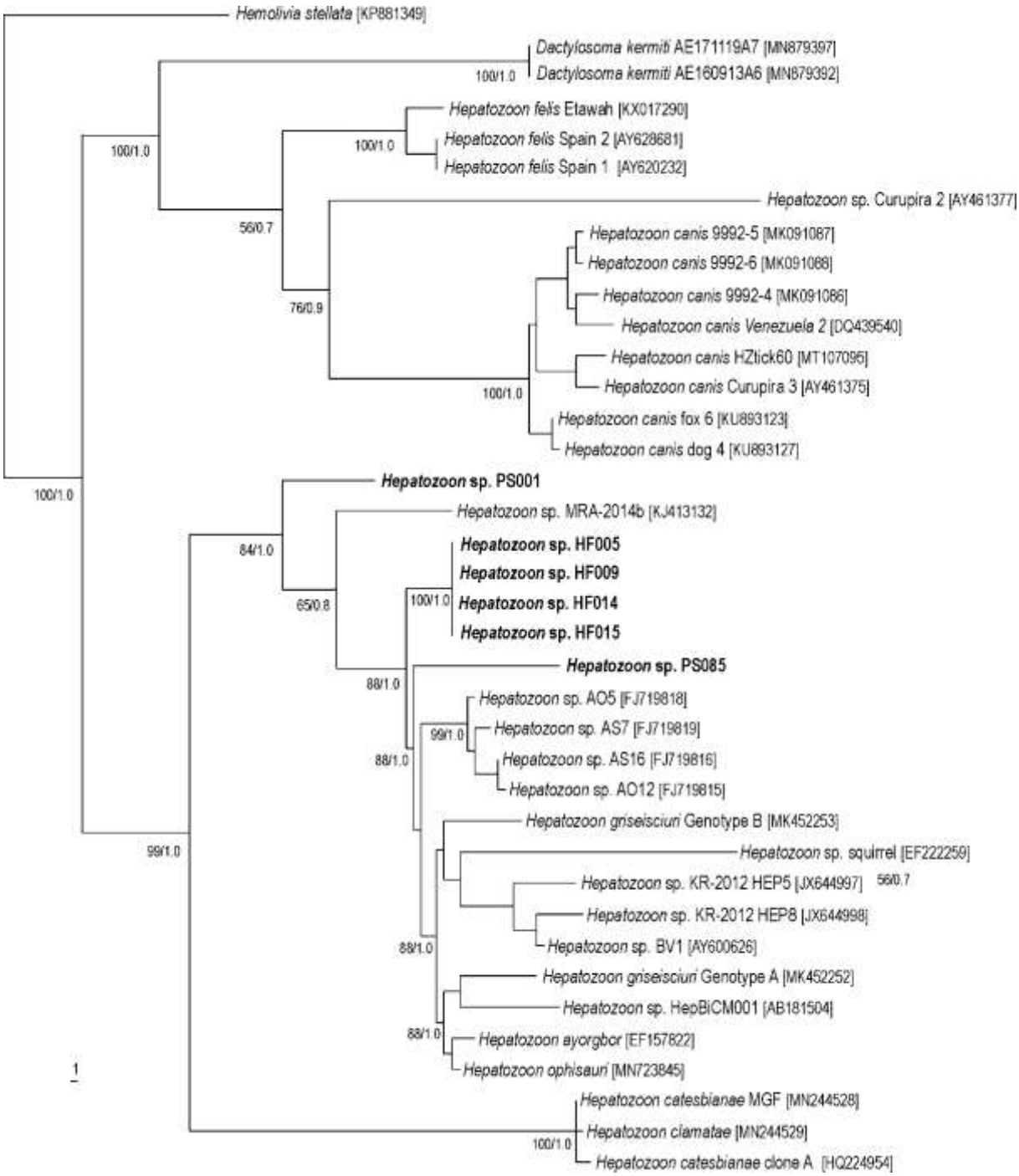


Figura 10. Árvore filogenética baseada nas sequências de ≈1700 bp do gene 18S rRNA de *Hepatozoon* spp.. A posição dos haplótipos encontrados nesse trabalho está destacada em negrito.



4.2 PESQUISA DE *Borrelia* spp.

Das 1357 amostras testadas, amostra de pulmões de dois *Oligoryzomys* sp. (Rodentia: Cricetidae) e amostras de sangue de sete *Didelphis albiventris* (de Ribeirão

Preto, SP - área 5) foram positivos na triagem por PCR em tempo real do gênero *Borrelia*. Ainda na triagem para determinar a qual grupo de *Borrelia* sp., obtivemos fragmentos de tamanho esperado para o gene *flaB*. As amostras provenientes de pulmão dos roedores continham DNA de *Borrelia* pertencente ao grupo Lyme (*Oligoryzomys* sp.), enquanto as amostras de sangue de marsupiais (*Didelphis albiventris*) continham DNA de *Borrelia* pertencente ao grupo Febre Recorrente. Não obtivemos amplicons para todos os genes testados e as sequências geradas estão descritas nos itens 4.2.1 e 4.2.2.

Como os cricetideos positivos estavam identificados apenas a nível de gênero, ambos os animais foram identificados molecularmente através do sequenciamento dos amplicons gerados a partir do gene *cytb*, com objetivo de ter mais clareza em relação a espécie de roedor. Os dois animais geraram sequências iguais que foram 99,13% idênticas com *Oligoryzomys mattogrossae* do Brasil (KY952253, KY952255, KY952256, KY952258, KY952259), uma sequência representativa desses espécimes foi depositada no GenBank sob o número de acesso OL684651.

4.2.1 Pesquisa de *Borrelia* sp. Grupo Lyme

Para a *Borrelia* pertencente ao grupo Lyme obtivemos fragmentos de tamanho esperado para os genes 16S rRNA, *flaB*, *opsC* e sete dos oito loci MLST (*clpA*, *clpX*, *nifS*, *pepX*, *pyrG*, *recG* e *rplB*) em ambos *O. mattogrossae* positivos. As sequências de *Borrelia* de ambos os roedores foram idênticas entre si e depositadas no GenBank sob os números de acesso OL663845, OL631181-OL631189 (16S rDNA, *flaB*, *opsC* e MLST foram respectivamente).

Na análise filogenética da sequência de 16S rDNA e das sequências de MLST, observamos que a *Borrelia* sp. que foi encontrada forma um clado monofilético com *B. carolinensis*, que é uma espécie norte-americana. Por outro lado, a filogenia *flaB* aponta uma relação com genótipos sul-americanos detectados no Uruguai e no Brasil; ainda que *B. carolinensis* e *B. bissettiae* também se apresentam intimamente relacionadas com alto suporte (Figura 11). Em relação ao *ospC*, a sequência derivada de *O. mattogrossae* aparece como uma linhagem independente e dentro de um grupo composto por cepas de *B. bissettiae* (DN127 e BUL-H-1), cepas de *B. carolinensis* (SCGT-8a e SCCH-6), e várias cepas de *B. burgdorferi* s.s. de roedores cricetídeos ou de seus carrapatos nos Estados Unidos (Figura 12).

Figura 11. Árvores filogenéticas de *Borrelia* spp. usando os genes 16S rRNA (1419 pb) (A) e flaB (523 pb) (B). A espécie descrita nesse trabalho, “Candidatus Borrelia paulista” RP42 está destacada em negrito.

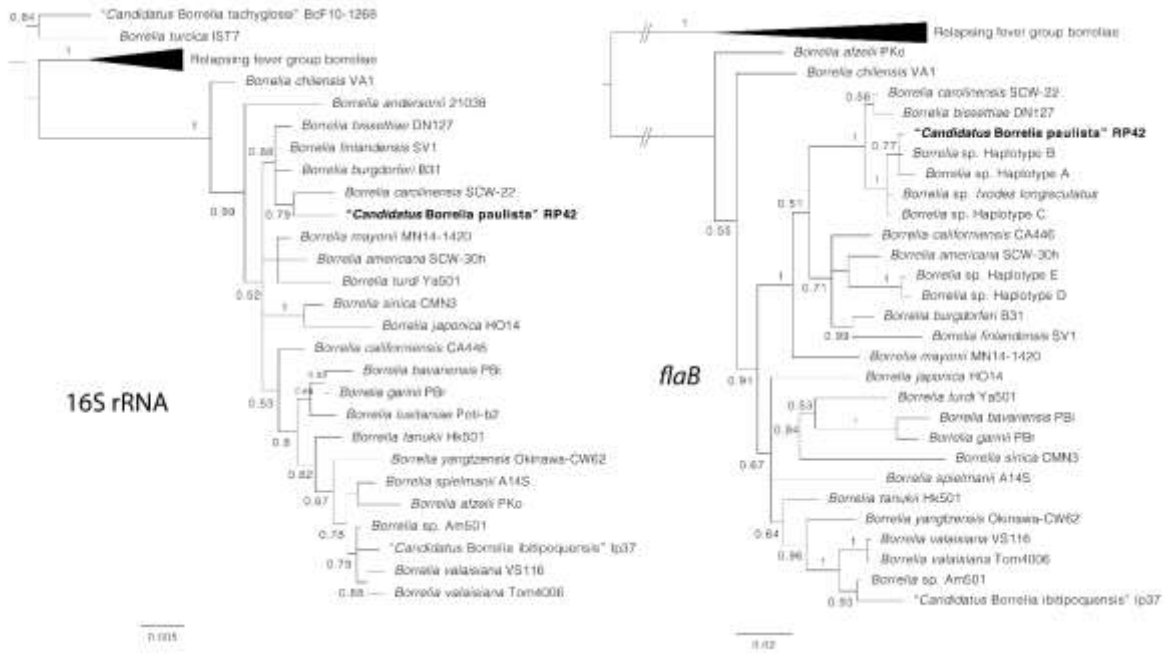
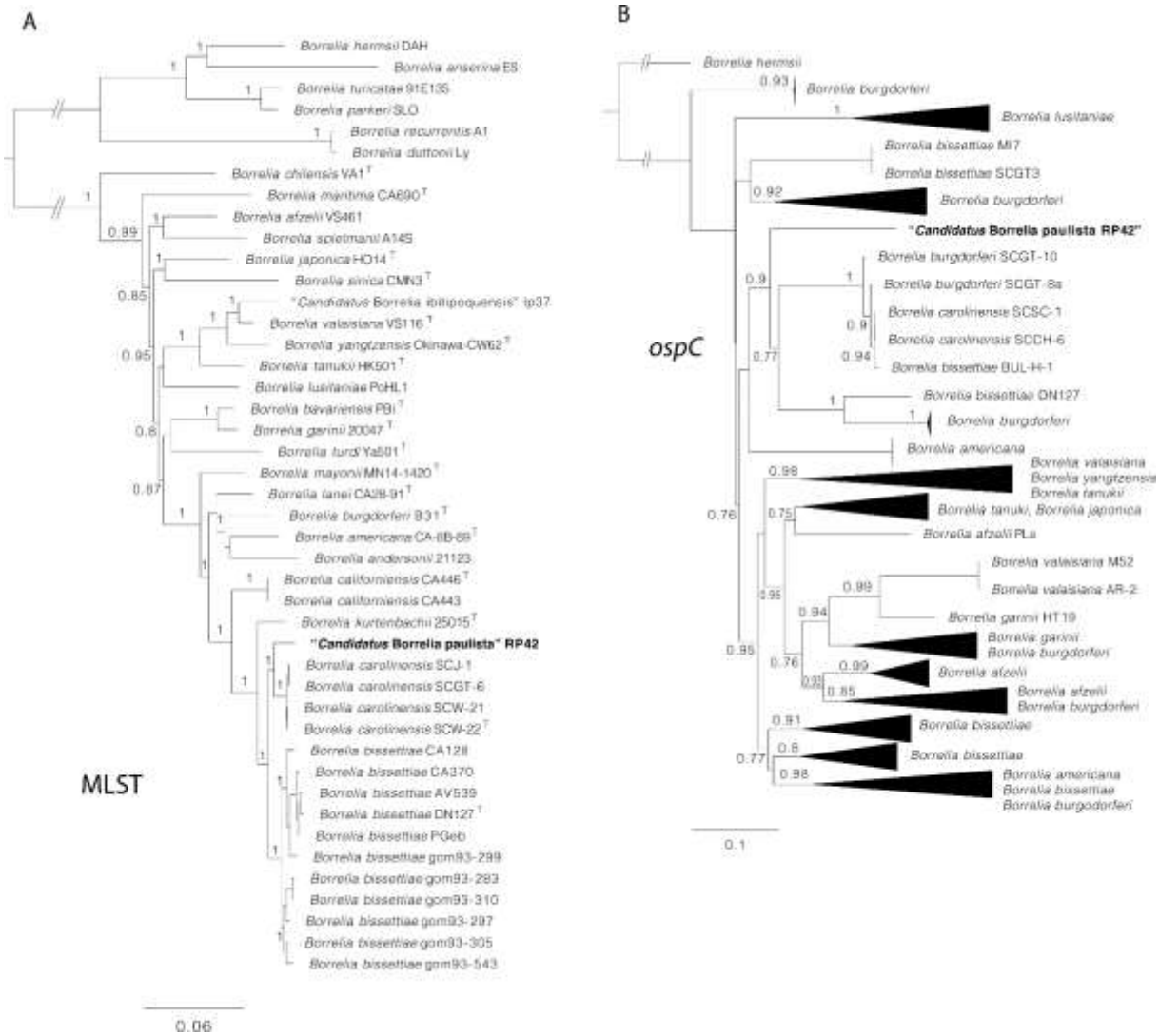


Figura 12. Árvores filogenéticas de *Borrelia* spp. usando os genes do esquema MLST (4,186 pb) (A), e o gene *ospC* (686 pb) (B). A espécie descrita nesse trabalho, “Candidatus Borrelia paulista” RP42 está destacada em negrito.



4.2.2 Pesquisa de *Borrelia* sp. Grupo Febre Recorrente

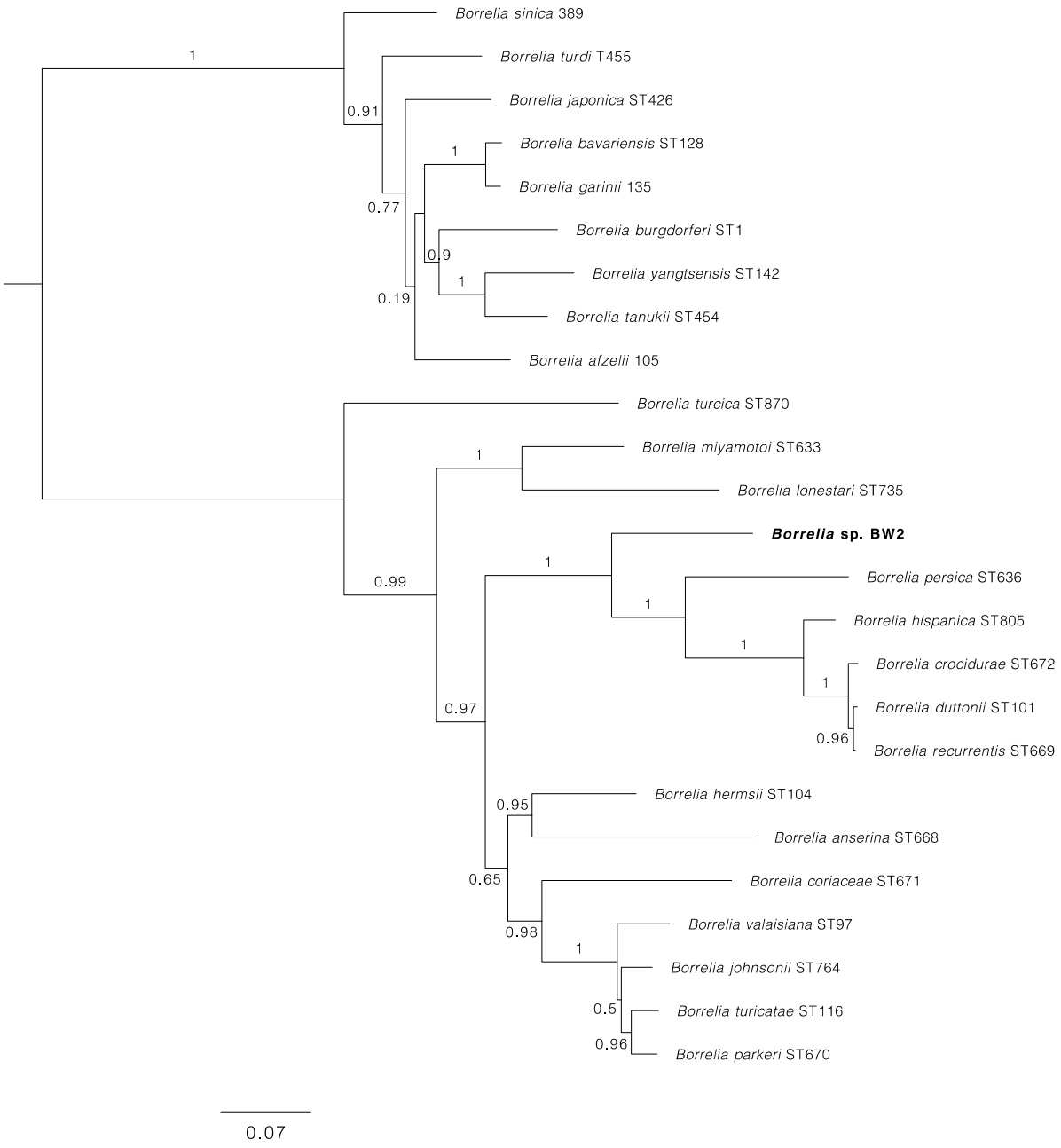
Para *Borrelia* pertencente ao grupo Febre Recorrente obtivemos fragmentos de tamanho esperado para os genes *16S* rRNA, *flaB* e *rrs–rrlA* (IGS) das sete amostras de sangue de *Didelphis albiventris* (RP001, RP014, RP018, RP069, RP22, RP34 e RP58) de Ribeirão Preto, SP. As sete sequências foram iguais entre si, e a partir do gene rrs–rrlA (IGS) tiveram 97,2% de identidade com sequências obtidas a partir de amostra de sangue do roedor *Phyllotis xanthopygus* do Chile (SANCHÉZ et al., 2020). As sequências *16S* rRNA (1346 pb) e *flaB* (504 pb) apresentaram 100% de

similaridade com sequências de *Borrelia* encontradas em *Ornithodoros mimon* (MT013211, MT013212 e MT076262 - respectivamente) coletados em uma residência na zona urbana de Cuiabá, estado do Mato Grosso (MUÑOZ-LEAL et al., 2021).

A partir desses resultados realizamos a campanha do ano de 2021 em busca de mais amostras de animais positivos para melhor caracterização gênica e futuras tentativas de isolamento. Na coleta realizada em maio de 2021 capturamos dois *D. albiventris*, e um desses animais (BW2) teve amostras de baço e sangue que produziram amplicons de tamanho esperado para os mesmos genes *16S* rRNA, *flaB* e IGS, as sequências desses amplicons foram idênticas com as descritas para os animais testados anteriormente (RP001, RP014, RP018, RP069, RP22, RP34 e RP58).

Para essa amostra amplificamos também cinco dos oito loci MLST (*clpX*, *pepX*, *uvrA, recG* e *rplB*). Na análise filogenética das sequências de MLST, observamos que *Borrelia* sp. que foi encontrada fica basal as borrelias do grupo asiático-africano. (Figura 13).

Figura 13. Árvore filogenética de *Borrelia* spp. usando os genes do esquema MLST para o grupo Febre Recorrente. *Borrelia* sp. BW2 está indicada em negrito.



5. DISCUSSÃO

5.1 *Hepatozoon* spp., *Babesia* spp. E AGENTES DA FAMÍLIA ANAPLASMATACEAE

No presente estudo, quatro haplótipos diferentes (1, 2, 3, 4) de *Hepatozoon* spp. foram detectados em pequenos mamíferos de diferentes biomas entre dois estados brasileiros: São Paulo e Mato Grosso do Sul. No estado de São Paulo, o haplótipo 1 foi detectado em roedores do Cerrado e em uma área de transição dos biomas Cerrado e Mata Atlântica, enquanto o haplótipo 2 foi detectado em roedores do bioma Mata Atlântica. Por outro lado, os haplótipos 3 e 4 restringiram-se a roedores e marsupiais, respectivamente, do bioma Pantanal mato-grossense. Nenhuma espécie hospedeira compartilhou mais de um haplótipo. Apesar dessas associações geográficas e de hospedeiros distintas, nas análises filogenéticas os quatro haplótipos aparecem em um mesmo clado que contém quase todos os haplótipos de *Hepatozoon* relatados anteriormente em roedores e marsupiais, além de vários haplótipos associados a répteis de diferentes partes do mundo.

No Brasil, detecções moleculares de *Hepatozoon* spp. em pequenos roedores e marsupiais são restritas a seis estudos (WOLF et al., 2016; COLLE et al., 2019; DEMONER et al., 2019; SILVA et al., 2017, SOUSA et al., 2017b; DEMONER et al., 2016), sendo que a grande maioria desses registros foi na verdade em pequenos roedores (pelo menos 12 espécies de roedores), em contraste com apenas três registros em marsupiais: *Hepatozoon* sp. PCR165 em um *Thylamys macrurus*, *H. canis* em dois *Didelphis albiventris* e *Hepatozoon* sp. isolate MTopossum em *Didelphis marsupialis* (SOUSA et al. 2017b; SILVA et al. 2017, COLLE et al., 2019).

Exceto por este registro de *H. canis* em *Didelphis albiventris*, todos os registros anteriores demonstraram que os haplótipos de *Hepatozoon* spp. descritos nessas espécies no país, pertencem ao grande clado composto por haplótipos associados a roedores, marsupiais e répteis, conforme os resultados do presente estudo. Infelizmente, muitas das sequências desses estudos anteriores são de regiões do gene *18S* rRNA diferentes de nossos achados (Figura 9) ou muito menores do que 1700 pb (Figura 10); por esse motivo, eles não foram incluídos em nossa análise filogenética. Nesse trabalho encontramos um terceiro haplótipo de *Hepatozoon* sp. associado a marsupiais no Brasil, identificado como haplótipo 4 na Figura 9 ou haplótipo PS001 na Figura 10, e pertencente a este grande clado roedor-marsupial-

réptil.

A infecção por *Hepatozoon* ocorre após hospedeiros vertebrados ingerirem um artrópode hematófago infectado com oocistos maduros desse agente. De outra maneira, a infecção pode ser adquirida por transmissão intrauterina ou por predação de vertebrados infectados contendo merozoítos (hospedeiros intermediários) ou cistozoítos (hospedeiro paratênico) (MODRÝ et al., 2017). Estudos anteriores com roedores selvagens detectaram merontes de *Hepatozoon* no fígado e pulmão desses animais (DEMONER et al., 2019). No fígado foram encontrados apenas merontes, enquanto cistozoítos foram detectados no baço, pulmões e rins. Uma vez que apenas um dos 21 hospedeiros infectados produziu amplicon no sangue (ou seja, detecção de gamonte), inferimos que os pequenos mamíferos do presente estudo continham merontes e/ou cistozoítos, portanto, eles podem estar agindo como hospedeiros intermediários ou paratênicos para esse protozoário nas áreas estudadas.

Entre as sete áreas amostradas do presente estudo, a infecção por *Hepatozoon* spp. foi detectada apenas nas áreas A4, A5, A6 e A7. De acordo com análises anteriores (SERPA et al., 2021) essas quatro áreas apresentaram diversidade significativamente maior de pequenos mamíferos do que as áreas A1, A2 e A3. Uma maior biodiversidade poderia favorecer a transmissão de *Hepatozoon* por predação interespécies, uma provável rota de transmissão importante deste protozoário (SOUSA et al., 2021). Além disso, a maior diversidade de carrapatos também pode facilitar a transmissão de *Hepatozoon*. Novamente, vale ressaltar que as áreas A4, A5, A6 e A7 apresentaram maior diversidade de carrapatos do que as demais (SERPA et al., 2021), sugerindo que o ciclo de vida de *Hepatozoon* spp. em pequenos mamíferos está sob uma interação complexa de hospedeiros vertebrados e invertebrados.

Nesse trabalho também acrescentamos alguns dados novos sobre a diversidade *Hepatozoon* spp. no Brasil, sendo encontradas três espécies de marsupiais infectados (*Monodelphis domestica*, *Gracilinanus microtarsus*, *Didelphis aurita*) e cinco roedores (*Euryoryzomys russatus*, *Akodon* sp., *Nectomys squamipes*, *Oligoryzomys nigripes*, *Oecomys marmorae* e *Thrichomys pachyurus*). Apesar da evidência de espécies de *Hepatozoon* em marsupiais (SILVA et al., 2017; SOUSA et al., 2017b; COLLE et al., 2019).

A prevalência encontrada em cada localidade (0,6 - 33,3%) corrobora com estudos desse protozoário em pequenos mamíferos no Brasil (PERLES et al., 2019),

principalmente no Pantanal (Corumbá – MS), onde foi obtida uma prevalência de 15%, assim como outros estudos demonstraram em roedores (*Calomys callosus*, *Oecomys mamorae*) e marsupiais (*Thylamys macrurus*) para esse mesmo bioma: 7,1% - 21,8% (WOLF et al., 2016, SOUSA et al., 2017).

No ensaio de PCR visando bactérias da família Anaplasmataceae obtivemos amplicons do sangue de um *Oligoryzomys* sp., que correspondeu a uma sequência parcial de 16S rDNA 100% idêntica a *Wolbachia pipientis*, bactéria endossimbionte associada ao filarídeo *Litomosoides galizai*. Esta é uma evidência indireta de que este roedor foi infectado por nematóides filariais. Em estudos anteriores, ensaios de PCR semelhantes amplificaram fragmentos de *Wolbachia* de mamíferos selvagens (macacos e gambás) e cães domésticos, levando os autores a concluir que esses animais foram infectados por parasitas filarídeos (SOARES et al., 2017a; SOARES et al., 2014).

Em relação aos ensaios de PCR para o gênero Babesia e os outros agentes da família Anaplasmataceae (*Anaplasma* e *Ehrlichia*), nenhuma das amostras apresentou DNA detectável. Estudos publicados anteriormente também não demonstram a presença desses agentes em pequenos mamíferos ou quando ocorre, a frequência parece ser baixa (DE OLIVEIRA, et al., 2020; LOPES et al., 2018, SOUSA et al., 2017 BENEVENUTE et al., 2017, COLLE et al.,2019). Este fato sugere que as espécies desse estudo têm um papel limitado como reservatórios para esses agentes nas áreas estudadas.

Mais estudos são necessários para verificar a presença desses hemoparasitas em pequenos mamíferos, bem como novas espécies e sua transmissão por predação entre espécies (roedores e marsupiais x répteis e anfíbios).

5.2 *Borrelia* sp. GRUPO LYME

Neste estudo descobrimos uma possível nova genoespécie do grupo Bbsl em um roedor *O. mattogrossae* no estado de São Paulo, atribuída como "*Candidatus* Borrelia paulista" (WECK et al., 2022). Roedores do gênero *Oligoryzomys* são presentes em todos os ecossistemas sul-americanos (PATTON et al., 2015), e suas implicações como reservatórios de *Borrelia* spp. vem sendo estudadas. Por exemplo, *Borrelia chilensis* foi isolada de carrapatos *Ixodes stilesi* coletados em *Oligoryzomys longicaudatus* no sul do Chile (IVANOVA et al., 2015). Embora o DNA de uma espécie

de Bbsl tenha sido encontrada recentemente nessa espécie de roedor (SANCHÉZ et al., 2020), seu papel como reservatório de espiroquetas ainda é obscuro. Aqui, detectamos "*Ca.* B. paulista" em órgãos de *O. mattogrossae*, implicando que Bbsl infectaria *Oligoryzomys* spp. Como Bbsl colonizam tecidos (PETZKE e SCHWARTZ, 2015) se considerarmos todos os animais amostrados com tecidos (277), temos uma prevalência de 0,72% (2/277) para esta espiroqueta. Essa prevalência parece ser baixa se comparada com outros ecossistemas com o ciclo de Bbsl bem definido (FOLEY et al., 2014; SÓLIS-HERNÁNDEZ et al., 2016). É bem conhecido que roedores cricetídeos são hospedeiros comuns para Bbsl na América do Norte (WOLCOTT et al., 2021), e nossos resultados sugerem que na América do Sul, roedores desta família também mantêm essas espiroquetas em ciclos enzoóticos.

Das sete áreas de nosso estudo, apenas em Ribeirão Preto (A5) animais positivos foram observados. No estudo de Serpa *et al*. (2021) todos os espécimes de *Oligoryzomys* coletados na A5 foram determinados como *Oligoryzomys nigripes* com base na morfologia e registros de distribuição geográfica (dados não apresentados). Aqui, análises moleculares revelaram que os dois espécimes de *Oligoryzomys* infectados por *Borrelia* pertenciam à espécie *O. mattogrossae*. Dado que sequenciamos *cytb* apenas desses roedores positivos para *Borrelia*; que ambas as espécies de roedores são morfologicamente semelhantes; e *O. nigripes* e *O. mattogrossae* podem ocorrer simpatricamente (WESKLER et al., 2005; 2017) não podemos excluir que as duas espécies estejam presentes na mesma área. Por esta razão na Tabela 5 estão mencionados somente como *Oligoryzomys* spp..

Nesse mesmo estudo anterior realizado na A5, alguns espécimes de *Oligoryzomys* estavam infestados por ninfas e larvas de *Amblyomma dubitatum* e *Ixodes schulzei* (SERPA et al., 2021). Embora nenhum dos dois *O. mattogrossae* infectados por *Borrelia* do presente estudo estivesse infestado por carrapatos quando capturado, é amplamente conhecido que Bbsl está associada principalmente a carrapatos do gênero *Ixodes* (RUDENKO et al., 2011). Assim, *I. schulzei* pode ser inferido como possível vetor de "*Ca.* B. paulista".

Em todas as árvores filogenéticas construídas para "*Candidatus* B. paulista", observamos que ela agrupa com *B. carolinensis*. *Borrelia carolinensis* foi formalmente descrita em 2011, cultivada a partir de um carrapato *Ixodes minor* e de roedores *Peromyscus* e *Neotoma* coletados na Carolina do Sul, Estados Unidos, e até o momento não foi relatada fora sudeste dos Estados Unidos (RUDENKO et al., 2011).

Portanto, é improvável que a genoespécie caracterizada neste estudo corresponda a *B. carolinensis* porque infecta um gênero diferente de roedor, e porque carrapatos com distribuições muito distantes estão implícitos como seus vetores. Curiosamente, a filogenia de *ospC* de "*Ca.* B. paulista" indica uma relação com várias linhagens de *B. carolinensis*, *B. bissettiae* e *B. burgdorferi* s.s. Como o *OspC* modula a resposta imunológica dos mamíferos favorecendo o início da infecção bacteriana, acredita-se que a variabilidade genética desse gene possa ser moldada pela variedade de hospedeiros que uma determinada espécie de *Borrelia* infecta (BARBOUR et al., 2010).

Levando em conta que "*Ca.* B. paulista" infecta uma espécie de roedor cricetídeo, não surpreende que sua sequência *ospC* esteja geneticamente relacionada a espécie de *Borrelia* spp. que tem seus ciclos também com roedores desta família.

As primeiras detecções moleculares de *Borrelia* spp. na América do Sul foram baseadas em sequências de *flaB*; portanto, as filogenias para este gene incluem a maioria dos genótipos caracterizados para a região atualmente. Nossa análise filogenética para este gene está de acordo com estudos anteriores (BARBIERI et al., 2013; DALL'AGNOL et al., 2017) que descrevem um grupo monofilético de Bbsl sul-americano relacionado com *B. bissettiae* e *B. carolinensis* (Figura 4), na qual os genótipos mais próximos de "*Ca.* B. paulista correspondem aos clones A, B e C detectados em *Ixodes parariсinus* do Uruguai (BARBIERI et al., 2013), e *Borrelia* sp. Pampa detectada em *I. longiscutatus* do Brasil (DALL'AGNOL et al., 2017). Ambos os carrapatos podem usar roedores como hospedeiros, pelo menos, para ninfas e larvas (NAVA et al., 2017).

Outros genótipos de *Borrelia* detectados em carrapatos sul-americanos associados a roedores (*Ixodes sigelos*, *Ixodes neuquenensis*) já foram descritos, e são filogeneticamente relacionados a *Borrelia chilensis* (SEBASTIAN et al., 2016), essas descrições associadas as nossas evidências demonstram que pelo menos duas linhagens principais de Bbsl evoluíram em associação com roedores e seus carrapatos na América do Sul.

Por fim, "*Ca.* B. paulista" é a terceira genoespécie de Bbsl identificada no Brasil (DALL'AGNOL et al., 2017; MUÑOZ-LEAL et al., 2020). Como discutido acima, o carrapato identificado como mais provável vetor para essa *Borrelia* sp. é *I. schulzei*, uma espécie que não é implicada com o parasitismo humano (GUGLIELMONE., 2018). Portanto, qualquer projeção de "*Ca.* B. paulista" como possível patógeno

humano ainda é muito prematuro e necessita de mais pesquisas.

5.3 *Borrelia* sp. GRUPO FEBRE RECORRENTE

Neste estudo encontramos uma genoespécie de *borrelia* do grupo Febre Recorrente associada ao marsupial *D. albiventris* no estado de São Paulo. Ao que tudo indica é a mesma espécie que foi recentemente descrita no carrapato *Ornithodoros mimon* no estado do Mato Grosso (MUÑOZ-LEAL et al., 2021). Os marsupiais do gênero *Didelphis* são mamíferos geograficamente restritos ao continente Americano (GARDNER et al., 2008). No Brasil, são relatadas quatro espécies deste gênero: *D. imperfecta* e *D. marsupialis* (gambá-comum) na floresta amazônica, *D. aurita* (gambá-de-orelha-preta) na Mata Atlântica e *D. albiventris* (gambá-de-orelha-branca) principalmente no Cerrado (FARIA E MELO, 2017; GARDNER 2008; BEZERRA-SANTOS et al., 2020).

A implicação desses animais como reservatório de borrelias já foi abordada em estudos na Venezuela e Panamá, onde em esfregaço com sangue *Didelphis aurita* foram visualizadas espiroquetas idênticas a *Borrelia venezuelensis* porém não foram realizadas provas biológicas que permitiram estabelecer na época a identidade das bactérias, além desse fato larvas de um dos vetores (*Ornithodorus talaje*) também foi encontrada parasitando gambás Nesses locais a doença em humanos foi relatada pela primeira vez a mais de um século, e permanece endêmica até hoje (DUNN & CLARK, 1933; PIFANO, 1941).

Os oito animais positivos nesse trabalho apresentaram sequências *16S* rDNA e *flaB* com 100% de similaridade com uma nova espécie de *Borrelia* encontrada em *Ornithodoros mimon* no estado do Mato Grosso (MT013211, e MT076262) (MUÑOZ-LEAL et al., 2021). As sequências encontras por Muñoz-Leal *et al*. (2021) formam um clado monofilético relacionado a borrelias do Grupo Febre Recorrente que ocorre no Velho Mundo.

Por sua vez, o mesmo agrupamento ocorreu com a *Borrelia* sp. BW2 aqui mencionada, na filogenia utilizando sequências de genes (*clpX*, *pepX*, *uvrA, recG* e *rplB*) do esquema MLSA (Figura 6). Esses resultados corroboram com o descrito por Muñoz-Leal *et al.* (2021) e Thompson *et al*. (2021), no qual o grupo de *borrelias* sul-americanas associadas a Argasídeos, pequenos mamíferos (roedores, e agora marsupiais) são filogeneticamente associados a espécies asiáticas-africanas de

borrelias da Febre Recorrente, e acrescentam ainda mais evidências de que espiroquetas da Febre Recorrente do Velho e do Novo Mundo não necessariamente têm distribuições geográficas definidas. Por fim, considerando que essas detecções ocorreram em anos distintos (2015-2018 e 2021) é importante destacar a circulação contínua da *Borrelia* encontrada nesse local.

Para o gene *rrs–rrlA* (IGS) as sequências tiveram 97,2% de identidade com sequências obtidas a partir de amostra de sangue do roedor *Phyllotis xanthopygus* do Chile (SANCHÉZ et al., 2020). Analisés de Filogenia para esse gene também são necessárias para melhor caracterização de *Borrelia* sp. BW2.

No estudo de Serpa *et al*. (2021) um espécime de *D. albiventris* (FMRP087) da A5 estava parasitado com 3 larvas de *O. mimon*, e nenhum outro argasídeo foi encontrado. Essa espécie de argasídeo parasita morcegos, pequenos mamíferos (marsupiais principalmente) e humanos, sendo muito agressivos ao homem (GRACIOLLI et al., 2008, BARROS-BATTESTI et al., 2011; LABRUNA et al., 2014, SPONCHIADO et al., 2015; LOPES et al., 2018).

Nenhum dos oito *D. albiventris* infectados por *Borrelia* do presente estudo estava infestado por carrapatos quando capturado, porém os achados de *O. mimon* parasitando *D. albventris* na mesma área (SERPA et al., 2021) e a *Borrelia* sp. BW2 apresentar 100% de similaridade com a *Borrelia* encontrada recentemente nesse argasídeo (MUÑOZ-LEAL et al., 2021), nos permite sugerir *O. mimon* como possível vetor e *D. albiventris* como potencial hospedeiro para esses novos genótipos de *Borrelia* em ecossistemas naturais no Brasil.

Estudos futuros são necessários para determinar melhor a competência desses marsupiais em infecções por *Borrelia* e também investigar se outras espécies de pequenos mamíferos participam do ciclo enzoótico dessa espiroqueta.

Como espiroquetas de humanos as implicações dessas espécies ainda são desconhecidas, porém é importante salientar que o caráter antropofílico de *O. mimon* (LABRUNA et al., 2014) e o comportamento sinantrópico de espécies do gênero *Didelphis* (JANSEN et al., 2002), que utilizam ocos de árvores e até mesmo o telhado das casas ou outros locais dentro dos centros urbanos como abrigos (VIEIRA e CAMARGO, 2012.; BEZERRA-SANTOS et al., 2020), pode aumentar a possibilidade de transmissão de patógenos (por exemplo, *Borrelia* spp.) para o homem.

Por fim, trabalhos recentes demonstraram espiroquetas da febre recorrente em argasídeos no Brasil, incluindo o isolamento de *B. venezuelensis* (MUÑOZ-LEAL et

al., 2018; 2021), porém este é o primeiro relato de infecção por *Borrelia* spp. em pequenos mamíferos no país.

6. CONCLUSÕES

Nesse trabalho foi relatada uma variedade de haplótipos de *Hepatozoon* associados a pequenos mamíferos em três Biomas brasileiros: Cerrado, Mata Atlântica e Pantanal. Por meio das análises filogenéticas os haplótipos se agruparam no grande clado roedor-marsupial-réptil de *Hepatozoon* spp. do mundo. A detecção de *W. pipientis* associada ao filarídeo *L. galizai* de roedores indica que o roedor foi infectado por nematóides filariais. Por fim, duas possíveis novas espécies de *Borrelia* foram descritas. "*Ca.* B. paulista", do Grupo Bbsl, encontrada em roedores *Oligoryzomys matogrossae,* é a terceira genoespécie de Bbsl identificada no Brasil. *Borrelia* sp. BW2, do Grupo Febre recorrente, encontrada em marsupiais *Dideplhis albiventris* é a primeira espiroqueta descrita em pequenos mamíferos no Brasil, e está relacionada ao carrapato *O. mimon*.

7. BIBLIOGRAFIA

AGUIAR, D.M.; CAVALCANTE, G.T.; PINTER, A.; GENNARI, S.M. & CAMARGO, L.M.A. 2007. Prevalence of *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in dogs and Rhipicephalus sanguineus (Acari: Ixodidae) ticks from Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v.44, p.126-132.

AGUIAR, D.M.; ZILIANI, T.F.; ZHANG, X. et al. A novel *Ehrlichia* genotype strain distinguished by the TRP36 gene naturally infects cattle in Brazil and causes clinical manifestations associated with ehrlichiosis. **Ticks and Tick Borne Diseases**, v.5, p.537-544, 2014.

ALABÍ, A.S.; MONTI, G.; OTTH, C.; SEPULVEDA-GARCÍA, P.; PERLES, L.; MACHADO, R.Z.; ANDRÉ, M.R.; BITTENCOURT, P.; MÜLLER, A. Genetic diversity of *Hepatozoon* spp. in rodents from Chile. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.30, n.4, 2021

ALMEIDA, A. P.; MARCILI, A.; LEITE, R. C.; NIERI-BASTOS, F.; DOMINGUES, L. N., MARTINS, J. R.; LABRUNA, M. B. *Coxiella* symbiont in the tick *Ornithodoros rostratus* (Acari: Argasidae). **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 3, p. 203– 206, 2012.

ALMEIDA, A. P.; SOUZA, T. D.; MARCILI, A.; LABRUNA, M. B. Novel *Ehrlichia* and *Hepatozoon* agents infecting the crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) in southeastern Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 50, n. 3, p. 640-646, 2013.

ANDRÉ, M.R.; ADANIA, C.H.; TEIXEIRA, R.H.; VARGAS, G.H.; FALCADE, M.; SOUSA, L.; SALLES, A.R.; ALLEGRETTI, S.M.; FELIPPE, P.A.; MACHADO, R.Z. Molecular detection of *Hepatozoon* spp. in Brazilian and exotic wild carnivores. **Veterinary Parasitology**, v. 173, n. 1–2, p. 134–138. 2010.

ARAGÃO, H.B. O. brasiliensis n. sp. **Brasil Médico**. v.37, p.20, 1923.

ARRAGA-ALVARADO, C.M.; QUROLLO, B.A.; PARRA, O.C.; BERRUETA, M.A.; HEGARTY, B.C.; BREITSCHWERDT, E.B. 2014. Case report: Molecular evidence of *Anaplasma platys* infection in two women from Venezuela. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.91, p.1161-1165

BAHIA, M.; SILVA, J.S.; GONTIJO, I.S.; CORDEIRO, M.D.; SANTOS, P.N.D.; SILVA, C.B.D.; NICOLINO, R.R.; MOTA, D.A.; SILVA, J.B.D.; FONSECA, A.H. Characterization of cattle tick fever in calves from the northwestern region of Minas Gerais, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.29, n.1, 2020.

BANETH, G.; SAMISH, M.; SHKAP, V. Life cycle of *Hepatozoon canis* (Apicomplexa: 291 adeleorina: Hepatozoidae) in the tick *Rhipicephalus sanguineus* and domestic dog (*Canis* 292 *familiaris*). **Journal of Parasitology**, v.93, p.283-299, 2007.

BARBIERI, A.M.; VENZAL, J.M.; MARCILI, A.; ALMEIDA, A.P.; GONZÁLEZ, E.M.; LABRUNA, M.B. *Borrelia burgdorferi* sensu lato infecting ticks of the *Ixodes ricinus* complex in Uruguay: first report for the Southern Hemisphere. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, v.13, n.3, p147-153, 2013.

BARBOSA, C.O.S.; GARCIA, J.R.; FAVA, N.M.N.; PEREIRA, D.A.; DA CUNHA, M.J.R.; NACHUM-BIALA, Y.; CURY, M.C.; BANETH, G. Babesiosis caused by *Babesia vogeli* in dogs from Uberlândia State of Minas Gerais, Brazil. **Parasitology Research**, v.119, n.3, 1173-1176, 2020.

BARBOUR, A.G.; PUTTEET-DRIVER, A.D.; BUNIKIS, J. Horizontally acquired genes for purine salvage in *Borrelia* spp. causing relapsing fever. **Infection and Immunity**, v.73, n.9, p.6165-6168, 2005.

BARBOUR, A.G., TRAVINSKY, B. Evolution and distribution of the ospC Gene, a transferable serotype determinant of *Borrelia burgdorferi*. **mBio**, v.1, n.4, 2010.

BARROS-BATTESTI, D. M.; LANDULFO, G. A.; ONOFRIO, V. C.; FACCINI, J. L. H.; MARCILI, A.; NIERI-BASTOS, F. A.; VENZAL, J. M.; LABRUNA, M. B. *Carios mimon* (Acari: Argasidae): description of adults and redescription of larva. **Experimental and Applied Acarology**, v. 54, p.93-104, 2011.

BARROS-BATTESTI, D.M., ARZUA, M.& BECHARA, G.H. Carrapatos de importância médico-veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies. Vox/ICTTD-3/Butantan, São Paulo, São Paulo. 223 p., 2006.

BENEVENUTE, J.L.; DUMLER, J.S.; OGRZEWALSKA, M.; ROQUE, A.L.R.; MELLO, V.V.C.; DE SOUSA, K.C.M.; GONÇALVES, L.R.; D'ANDREA, P.S.; LEMOS, E.R.;, MACHADO, R.Z.; ANDRÉ, M.R. Assessment of a quantitative 5' nuclease real-time polymerase chain reaction using groEL gene for *Ehrlichia* and *Anaplasma* species in rodents in Brazil. **Ticks and Tick-Borne Diseases**. v.8, n.4, p. 646-656.

BEZERRA, M.C.F.; MELO, A.L.T.; TAQUES, I.I.G.G.; AGUIAR, D.M.; PACHECO, R.C.; SLHESSARENKO, R.D. Seropositivity for *Rickettsia* spp. and *Ehrlichia* spp. in the human population of Mato Grosso, Central-Western Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.50, n.3, p.399-403, 2017.

BEZERRA-SANTOS, M.A.; NOGUEIRA, B.C.F.; YAMATOGI, R.S.; RAMOS, R.A.N.; GALHARDO, J.A.; CAMPOS, A.K. Ticks, fleas and endosymbionts in the ectoparasite fauna of the black-eared opossum *Dipelphis aurita* in Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, v.80, n.3, p329-338, 2020.

BONVICINO, C. R. Guia dos Roedores do Brasil, com Chaves para Gêneros Baseados em Características Externas. Rio de Janeiro: Centro Pan-Americano de Febre Aftosa – OPAS/OMS. 2008.

BRAGA, M.D.S.C.O.; PEREIRA, J.G.; FERNANDES, S.J.; MARQUES, I.C.L.; JESUS, R.P.; FERREIRA, G.S.; XAVIER, D.R.; BENEVENUTE, J.L.; MACHADO, R.Z.; ANDRÉ, M.R. Molecular detection of Anaplasmataceae agents in *Dasyprocta azarae* in northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 12, n.1, p. 99-105, 2018.

BREITSCHWERDT, E.B.; HEGARTY, B.C.; QUROLLO, B.A.; SAITO, T.B.; MAGGI, R.G.; BLANTON, L.S.; BOUYER, D.H. Intravascular persistence of *Anaplasma platys*, *Ehrlichia chaffeensis*, and *Ehrlichia ewingii* DNA in the blood of a dog and two family members. **Parasites and Vectors**, v.7, p.298, 2014.

BUNIKIS, J., TSAO, J., GARPMO, U., BERGLUND, J., FISH, D., BARBOUR, A.G. Typing of borrelia relapsing fever group strains. **Emerging Infectious Diseases**, v.10, n.9, p.1661-1664, 2004.

CABEZAS-CRUZ, A.; ZWEYGAR,T.H.E.; VANCOVÁ, M.; BRONISZEWSKA, M.; GRUBHOFFER, L.; PASSOS, L.M.F.; RIBEIRO, M.F.B.; ALBERDI, P., DE LA FUENTE, J. *Ehrlichia minasensis* sp. nov., isolated from the tick *Rhipicephalus microplus*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.66, n.3, p1426-1430, 2016.

CALIC, S.B.; GALVÃO, M.A.; BACELLAR, F.; ROCHA, C.M.; MAFRA, C.L.; LEITE, R.C.; WALKER, D.H. Human ehrlichioses in Brazil: first suspect cases. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.8, n.3, p. 259-262, 2004.

CANÇADO, P.H.; PIRANDA, E.M.; MOURÃO, G.M.; FACCINI, J,L. Spatial distribution and impact of cattle-raising on ticks in the Pantanal region of Brazil by using the CO(2) tick trap. **Parasitology Research**, v.103, n.2, p. 371-377, 2008.

CLARK, K.; SAVICK, K.; BUTLER, J. *Babesia microti* in Rodents and Raccoons from Northeast Florida. **Journal of Parasitology**, v.98, p. 1117-1121, 2012.

COLLE, A.C.; MENDONÇA, R.F.B.; MAIA, M.O.; FREITAS, L.D.C.; WITTER, R.; MARCILI, A.; et al. Molecular survey of tick-borne pathogens in small mammals from Brazilian Amazonia. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.28, p. 592-604, 2019.

CRIADO-FORNELIO, A.; RUAS, J.L.; CASADO, N.; FARIAS, N.A.; SOARES, M.P.; MÜLLER, G.; BRUMT, J.G.; BERNE, M.E.; BULING-SARAÑA, A. & BARBA-CARRETERO, J.C. New molecular data on mammalian Hepatozoon species (Apicomplexa: Adeleorina) from Brazil and Spain. **Journal of Parasitology**, v.92, p. 93-99, 2006.

DAGNONE, A.S.; SOUZA, A.I.; ANDRÉ, M.R.; MACHADO, R.Z. Molecular diagnosis of anaplasmataceae organisms in dogs with clinical and microscopical signs of ehrlichiosis. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.18, n.4, p.20–25, 2009.

DALL'AGNOL, B.; MICHEL, T.; WECK, B., SOUZA, U.A.; WEBSTER, A.; LEAL, B.F.; KLAFKE, G.M.; MARTINS, J.R.; OTT, R.; VENZAL, J.M.; FERREIRA, C.A.S.; RECK, J. *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes longiscutatus* ticks from Brazilian Pampa. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v.8, n.6, p.l928-932, 2017.

DANTAS-TORRES, F.; CHOMEL, B.B.; OTRANTO, D. Ticks and tick-borne diseases: a One Health perspective. ***Trends in Parasitology***, v.28, n.10, p. 437-46, 2012.

DE OLIVEIRA, S.V.; BITENCOURTH, K.; BORSOI, A.B.P.; DE FREITAS, F.S.S.; COELHO, G.C.B.; AMORIM, M.; GAZETA, G.S. Human parasitism and toxicosis by *Ornithodoros rietcorreai* (Acari: Argasidae) in an urban area of Northeastern Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v.9, n.6, 1494-1498, 2018.

OLIVEIRA, G.M.B.; SILVA, I.W.G.; EVARISTO, A.M.V.F.; SERPA, M.C.A.; CAMPOS, A.N.S.; DUTRA, V.; NAKAZATO, L.; AGUIAR, D.M.; LABRUNA, M.B.; HORTA, M.C.

Tick-borne pathogens in dogs, wild small mammals and their ectoparasites in the semi-arid Caatinga biome, northeastern Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 11, n. 4, 2020.

DEMONER, L.C.; MAGRO, N.M.; DA SILVA, M.R.L.; DE PAULA, A. J.M.A.; CALABUIG, C.I.P.; O'DWYER, L.H. *Hepatozoon* spp. infections in wild rodents in an area of endemic canine hepatozoonosis in southeastern Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v.7, p859-864, 2016.

DEMONER, L.C.; SILVA, M.R.L.; MAGRO, N.M.; O'DWYER, L.H. *Hepatozoon milleri* sp. nov. (Adeleorina: Hepatozoidae) in *Akodon montensis* (Rodentia: Cricetidae: Sigmodontinae) from southeastern Brazil. **Parasitology**, v.146, p. 662-669, 2019.

DEMONER, L.C.; RUBINI, A.S.; PADUAN, K.S.; METZGER, B.; ANTUNES, J.M.A.P.; MARTINS, T.F.; MATHIAS, M.I.C.; O'DWYER, L.H. Investigation of tick vectors of *Hepatozoon canis* in Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 4, p. 542–546, 2013.

DOYLE, C. K.; LABRUNA, M. B.; BREITSCHWERDT, E. B.; TANG, Y. W.; CORSTVET, R. E.; HEGARTY, B. C.; BLOCH, K. C.; LI, P.; WALKER, D. H.; & McBride J.W. Detection of medically important *Ehrlichia* by quantitative multicolor TaqMan real-time polymerase chain reaction of the dsb gene. **The Journal of molecular diagnostics**, v.7, p. 504-510, 2005.

DUMLER, J.S.; BARBET, A.F.; BEKKER, C.P.; DASCH, G.A.; PALMER, G.H.; RAY, S.C.; et al. Reorganization of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma, Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsi*a, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila.* **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.51, p. 2145-2165, 2001.

DUNN, L. H.; CLARK, H. C., Notes on Relapsing Fever in Panama with special reference to animal hosts. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 16-18, 1982.

DURDEN, L.A. Taxonomy, hosts associations, life cycles and vectorial importance of ticks parasitizing small mammals. In Micromammals and Macroparasites: From Evolutionary Ecology to Management; Morand, S., Krasnov, B.R., Poulin, R., Eds.; Springer: Tokyo, Japan, 2006; pp. 1–647.

EMBRAPA PANTANAL. [s.d.]. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em: embrapa.br/pantanal. Acessado em 2 de abril de 2019.

ESALQ. 2019. Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Disponível em: esalq.usp.br. Acessado em 27 de março de 2019.

FACCINI-MARTÍNEZ, Á.A.; MUÑOZ-LEAL, S.; LABRUNA, M.B; ANGERAMI, R.N. Borrelioses in Brazil: Is it time to consider tick-borne relapsing fever a neglected disease in Brazil? **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.12, n.54, 2021.

FARIA, M.B.; MELO, F.R. Didelphis imperfecta, Didelphimorphia, Didelphidae

(Mondolfi, Pérez-Hernández, 1984): a new record in the Brazilian Amazon. **Boletim da Sociedade Brasileira de Mastozoologia**, v.79, p. 44-46, 2017.

FEA-RP. 2012. Universidade de São Paulo, Faculdade de Economia, Administração e Contabilidade de Ribeirão Preto. Disponível em: fearp.usp.br. Acessado em 28 de março de 2019.

FERREIRA, R.F.; CERQUEIRA, A.M.F.; PEREIRA, A.M.; GUIMARÃES, C.M.; SÁ, A.G.; ABREU, F.S.; MASSARD, C.L.; ALMONSNY, N.R.P. Anaplasma platys diagnosis in dogs: comparison between morphological and molecular tests **International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine**, v.5, n.3, p.113-119, 2007.

FOLEY, J.E.; KRAMER, V.; WEBER, D. Experimental Infection of dusky-footed wood rats (*Neotoma fuscipes)* with *Ehrlichia phagocytophila* sensu lato. **Journal of Wildlife Diseases***,* v.38, n.1, p.194-198, 2002.

FOLEY, J.; OTT-CONN, C.; WORT, J.; POULSEN, A.; CLIFFORD, D. An *Ixodes minor* and *Borrelia carolinensis* enzootic cycle involving a critically endangered Mojave Desert rodent. **Ecology Evolution**, v.4, p. 576-581, 2014.

FOMENKO, N.V.; BORGOIAKOV, V.I.U.; PANOV, V.V. Genetic features of *Borrelia miyamotoi* transmitted by *Ixodes persulcatus*. **Molecular Genetics, Microbiology, and Virusology**, v.2, p. 12-17, 2011.

FORLANO, M.; SCOFIELD, A.; ELISEI, C.; FERNANDES, K.R.; EWING, S.A.; MASSARD, C.L. Diagnosis of *Hepatozoon* spp. in *Amblyomma ovale* and its experimental transmission in domestic dogs in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.25, n.134, p.1-7, 2005.

FUTSE, J.E.; UETI, M.W.; KNOWLES, D.P.; PALMER, G.H. Transmission of *Anaplasma marginale* by *Boophilus microplus*: Retention of vector competence in the absence of vector-pathogen interaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, p.3829-3834, 2003.

FZEA. 2015. Universidade de São Paulo, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos. Disponível em: fzea.usp.br. Acessado em 27 de março de 2019.

GARDNER, A.L. 2008. Mammals of South America. Vol. 1. Marsupials, xenarthrans, shrews, and bats. Chicago University Press, Chicago, p. 1-669.

GAZETA, G.S.; CARVALHO, R.W.; AVELAR, R.F.; AMORIM, M.; ABOUD-DUTRA, A.E. Occurrence of *Babesia* sp in small rodents in Brazil, **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56, n.6, p.741-744, 2004.

GRACIOLLI, G.; AZEVEDO, A. A.; ARZUA, M.; BARROS-BATTESTI, D. M.; LINARDI, P. M. Artrópodes ectoparasitos de morcegos no Brasil. In: PACHECO, S. M.; MARQUES, R. V.; ESBÉRARD, C. E. L (eds). Morcegos no Brasil: biologia sistemática, ecologia e conservação. Armazém Digital, Porto Alegre, 2008. p. 123–138.

GRAY, J.; ZINTL, A.; HILDEBRANDT, A.; HUNFELD, K.P.; WEISS, L. Zoonotic

babesiosis: overview of the disease and novel aspects of pathogen identity. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v.1, n.1, p.3-10, 2010.

GUGLIELMONE, A.A. Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. **Veterinary Parasitology**, v.57, p. 109-119, 1995.

GUGLIELMONE, A. A.; NAVA, S. Rodents of the subfamily Caviinae (Hystricognathi: *Caviidae*) as hosts for hard ticks (Acari: *Ixodidae*). **Mastozoología Neotropical**, v.17, n.2, p.279-286, 2010.

GUGLIELMONE, A.A.; NAVA, S. Hosts of Amblyomma dissimile Koch, 1844 and Amblyomma rotundatum Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). **Zootaxa**, p. 27–49, 2010.

GUGLIEMNOME, A.A.; ROBBINS, R. Hard Ticks (Acari: Ixodida: Ixodidae) Parasitizing Humans. Springer, Cham. Ed 1. 314pg.

GUIMARÃES, A.; RAIMUNDO, J.M.; PEIXOTO, M.P.; DA SILVA, C.B.; PIRES, M.S.; SANTOS, H.A.; BALDANI, C.D. Molecular detection, characterization of *Anaplasma* spp. in domestic cats from Rio de Janeiro state. **Acta Tropica**, v.191, p. 239-242, 2019.

GUIMARÃES, A.; RAIMUNDO, J.M.; SILVA, A.T.D.; CARPINTERO, F.M.; PIRES, J.R.; BENEVENUTE, J.L.; MACHADO, R.Z.; ANDRÉ, M.R.; BALDANI, C.D. Detection of a putative novel genotype of *Ehrlichia* sp. from opossums (Didelphis aurita) from Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.28, n.1, p. 140-11, 2019.

HAN, B.A.; KRAMER, A.M.; DRAKE. Global patterns of zoonotic disease in mammals. **Trends in Parasitology**, n.32, p.565–577, 2016.

HORAK, I.G.; CAMICAS, J.L.; KEIRANS, J.E. The *Argasidae*, *Ixodidae* and *Nuttalliellidae* (Acari: Ixodida); a world list of valid tick names. **Experimental and Applied Acarology**, n.28, v.27, p.54, 2002.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Panorama das cidades. 2017. V4.

INOKUMA, H.; RAOULT, D.; BROUQUI, P. Detection of *Ehrlichia platys* DNA in brown dog ticks (*Rhipicephalus sanguineus*) in Okinawa island, Japan. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 11, p. 4219–4221, 2000.

INSTITUTO FLORESTAL DE SÃO PAULO, 2018. Guia de áreas protegidas. Disponível em: https://guiadeareasprotegidas.sp.gov.br/ap/parque-estadual-cantareira/. Acesse em 27 de dezembro de 2021.

IVANOVA, L.B.; TOMOVA, A.; GONZÁLEZ-ACUÑA, D.; MURÚA, R.; MORENO, C.X.; HERNÁNDEZ, C.; CABELLO, J.; CABELLO, C.; DANIELS, T.J.; GODFREY, H.P.; et al. *Borrelia chilensis*, a new member of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex that extends the range of this genospecies in the Southern Hemisphere. **Environmental Microbiology**, v.16, p.1069–1080, 2014.

JANSEN, A. M.; ANDRADE, L. (2002). Marsupiais Didelfídeos: gambás e cuícas. A Família Didelphidae: O Gambá *Didelphis marsupialis*. Editora Fiocruz, 388.

JOHNSON, E.M.; PANCIERA, R.J.; ALLEN, K.E.; SHEETS, M.E.; BEAL, J.D.; EWING, S.A.; et al. Alternate Pathway of Infection with *Hepatozoon americanum* and the Epidemiologic Importance of Predation. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.23, p. 1315-1318, 2009.

JOHNSON, E.M.; ALLEN, K.E.; PANCIERA, R.J.; EWING, S.A.; LITTLE, S.E.; REICHARD, M.V. Field survey of rodents for *Hepatozoon* infections in an endemic focus of American canine hepatozoonosis. **Veterinary Parasitology**, v.150, p.27–32, 2007.

KERSTERS, K.; D E VOS, P.; GILLIS, M.; SWINGS, J.; VANDAMME, P.; STACKEBRANDT, E. (2006). Introduction to the Proteobacteria. In: DWORKIN, M.; FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K.H.; STACKEBRANDT, E. (eds) The Prokaryotes. Springer, New York, NY.

KESSLER., R.H., Considerações sobre a transmissão de Considerações sobre a transmissão de *Anaplasma marginale*. **Pesquisa Veteterinária Brasileira**, v.21, n.4, p.177-179, 2001.

KURTENBACH, K.; KAMPEN, H.; DIZIJ, A.; ARNDT, S.; SEITZ, H.M.; SCHAIBLE, U.E.; SIMON, M.M. Infestation of rodents with larval *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) is an important factor in the transmission cycle of *Borrelia burgdorferi* s.l. in German woodlands. **Journal of Medical Entomology**, v.32, n.6, p. 807-817,1995.

LABRUNA, M.B.; MARCILI, A.; OGRZEWALSKA, M.; BARROS-BATTESTI, D.M.; DANTAS-TORRES, F.; FERNANDES, A.A.; LEITE, R.C.; VENZAL, J.M. New records and human parasitism by *Ornithodoros mimon* (Acari: Argasidae) in Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v.51, n.1, p. 283-287, 2014.

LABRUNA, M. B.; VENZAL, J. M. *Carios fonsecai* sp. nov. (Acari, Argasidae), a bat tick from the central-western region of Brazil. **Acta Parasitologica**, v. 54, p. 355-363, 2009.

LI, H., ZHENG, Y.C.; MA, L.; JIA, N.; JIANG, B.G.; JIANG, R.R.; HUO,Q.B.; WANG, Y.W.; LIU, H.B.; CHU, Y.L.; SONG, Y.D.; YAO, N.N.; SUN, T.; ZENG, F.Y.; DUMLER, J.S.; JIANG, J.F.; CAO, W.C. Human infection with a novel tick-borne *Anaplasma* species in China: a surveillance study. **The Lancet Infectious Diseases**, v.15, n.6, 663-670, 2015.

LOPES, M.G.; MUÑOZ-LEAL, S.; DE LIMA, J.T.R.; FOURNIER, G.F.D.S.R.; ACOSTA, I.D.C.L; MARTINS, T.F.; RAMIREZ, D.G.; GENNARI, S.M.; LABRUNA, M.B. Ticks, rickettsial and erlichial infection in small mammals from Atlantic forest remnants in northeastern Brazil. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v.7, n.9, p. 380-385, 2018.

LUZ, H.R.; COSTA, F.B.; BENATTI, H.R.; RAMOS, V.N.; SERPA, M.C.A.; MARTINS, T.F.; ACOSTA, I.C.L.; RAMIREZ, D.G.; MUÑOZ-LEAL, S.; RAMIREZ-HERNANDEZ, A.; BINDER, L.C.; CARVALHO, M.P.; et al. Epidemiology of capybara-associated Brazilian spotted fever. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v.13, n.9, 2019.

MACHADO, R.Z.; ANDRÉ, M.R.; WERTHER, K.; DE SOUSA, E.; GAVIOLI, F.A.; ALVES JUNIOR, J.R. Migratory and carnivorous birds in Brazil: reservoirs for

Anaplasma and Ehrlichia species? **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, v.12, n.8, p.705-708, 2012.

MACHADO, R. Z. et al. Detection of *Ehrlichia chaffeensis* in Brazilian marsh deer (*Blastocerus dichotomus*). **Veterinary Parasitology**, v. 139, n. 1-3, p. 262-266, 2006.

MADISON-ANTENUCCI, S.; KRAMER, L.D.; GEBHARDT, L.L.; KAUFFMAN, E. Emerging Tick-Borne Diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, v.33, n.2, 2020.

MAGGI, R.G.; KRÄMER, F. A review on the occurrence of companion vector-borne diseases in pet animals in Latin America. **Parasites & Vectors**, v.2, n.145, 2019.

MAGGI, R.G.; MASCARELLI, P.E.; HAVENGA, L.N.; NAIODOO, V.; REITSCHWERDT, E.B. Co-infection with *Anaplasma platys*, *Bartonella henselae* and *Candidatus* Mycoplasma haematoparvum in a veterinarian. **Parasites & Vectors**, v.6, n.103, 2013.

MAIA, J. P.; ALVARES, F.; BORATYNSKI, Z.; BRITO, J.C.; LEITE, J.V.; HARRIS, D. J. Molecular assessment of *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleorina) infections in wild canids and rodents from North Africa, with implications for transmission synamics across taxonomic groups. **Journal of Wildlife Diseases**, v.50, p.837-848, 2014.

MARGOS, G.; GOFTON, A.; WIBBERG, D.; DANGEL, A.; MAROSEVIC, D.; LOH, S.M.; OSKAM, C.; FINGERLE, V. The genus Borrelia reloaded. **PLoS One**, v.13, n.12, 2018.

MARGOS, G.; CHU, C.-Y.; TAKANO, A.; JIANG, B.-G.; LIU, W.; KURTENBACH, K.; MASUZAWA, T.; FINGERLE, V.; CAO, W.C.; KAWABATA, H. *Borrelia yangtzensis* sp. nov., a rodent-associated species in Asia, is related to *Borrelia valaisiana*. International **Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.65, p.3836–3840, 2015.

MARGOS, G.; GATEWOOD, A.G.; AANENSEN, D.M.; HANINCOVA, K.; TEREKHOVA, D.; VOLLMER, S.A.; CORNET, M.; PIESMAN, J.; DONAGHY, M.; BORMANE, A.; et al. MLST of housekeeping genes captures geographic population structure and suggests a European origin of *Borrelia burgdorferi*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.105, p.8730–8735, 2008.

MCBRIDE, J. W. Detection of medically important *Ehrlichia* by quantitative multicolor TaqMan real-time polymerase chain reaction of the dsb gene. **Journal of Molecular Diagnostics**, v. 7, n. 4, p. 504-510, 2005.

MEDIANNIKOV, O., FENOLLAR, F. Looking in ticks for human bacterial pathogens. ***Microbial Pathogenesis***, v.77, n. 142-8, 2014.

MERINO, S., VÁSQUEZ, R.A., MARTÍNEZ, J., CELIS-DIEZ, J.L., MARTÍNEZ-DE-LA-PUENTE, J., MARÍN-VIAL, P., et al. A Sarcocystid misidentified as *Hepatozoon didelphydis*: molecular data from a parasitic infection in the blood of the Southern mouse opossum (*Thylamys elegans*) from Chile, **Journal of Eukaryotic Microbiology**, n.55, p. 536-540, 2008.

MIRANDA, R.L.; O'DWYER, L.H.; DE CASTRO, J.R.; METZGER, B.; RUBINI, A.S.;

MUNDIM, A.V.; EYAL O, TALMI-FRANK D, CURY MC, BANETH G. Prevalence and molecular characterization of *Hepatozoon canis* in dogs from urban and rural areas in Southeast Brazil. **Research in Veterinary Science**, v.97, n.2, 2014.

MIRANDA, R.L.; DE CASTRO, J.R.; OLEGÁRIO, M.M.; BELETTI, M.E.; MUNDIM, A.V.; O'DWYER, L.H.; EYAL, O.; TALMI-FRANK, D.; CURY, M.C.; BANETH, G. Oocysts of *Hepatozoon canis* in *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* collected from a naturally infected dog. **Veterinary Parasitology**. v.177, n 3-4, p. 392-396, 2011.

MIZIARA, C.S.M.G.; SERRANO, V.A.G.; YOSHINARI, N. Passage of *Borrelia burgdorferi* through diverse Ixodid hard ticks causes distinct diseases: Lyme borreliosis and Baggio-Yoshinari syndrome. **Clinics**, v.73, n.1-4, 2018.

MODRÝ, D.; BECK, R.; HRAZDILOVÁ, K.; BANETH, G. A review of methods for detection of *Hepatozoon* infection in carnivores and arthropod vectors. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, v.17, p.66-72, 2017.

MONGRUEL, A.C.; BENEVENUTE, J.L.; ANDRÉ, M.R.; CARRASCO, A.O.; MACHADO, R.Z.; SEKI, M.C. Molecular characterization of *Anaplasma* sp. in free-living gray brockets (*Mazama gouazoubira*). **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v.17, p.165–171, 2017.

MORAES-FILHO, J.; KRAWCZAK, F.S.; COSTA, F.B.; SOARES, J.F.; LABRUNA, M,B. Comparative evaluation of the vector competence of four south american populations of the *Rhipicephalus sanguineus* group for the bacterium *Ehrlichia canis*, the agent of canine monocytic ehrlichiosis. **PLoS One**, v.10, 2015.

MUÑOZ-LEAL, S., FACCINI-MARTÍNEZ, Á.A.; COSTA, F.B.; MARCILI, A.; MESQUITA, E.T.K.C.; MARQUES, E.P.; LABRUNA, M.B. Isolation and molecular characterization of a relapsing fever Borrelia recovered from *Ornithodoros rudis* in Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v.9, n.4, p.864-871, 2018.

MUÑOZ-LEAL, S.; RAMIREZ, D.G.; LUZ, H.R.; FACCINI, J.L.H.; LABRUNA, M.B. "*Candidatus* Borrelia ibitipoquensis", a *Borrelia valaisiana*-Related Genospecies Characterized from *Ixodes paranaensis* in Brazil. **Microbial Ecology**, v.80, n.3, p682-689, 2020.

MUÑOZ-LEAL, S.; VENZAL, J.M.; JORGE, F.R.; TEIXEIRA, B.M.; LABRUNA, M.B. A new species of soft tick from dry tropical forests of Brazilian caatinga. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v.12, n.5, 2021b.

MUÑOZ-LEAL, S.; LOPES, M.G.; MARCILI, A.; MARTINS, T.F.; GONZÁLEZ-ACUÑA, D.; LABRUNA, M.B. Anaplasmataceae, *Borrelia* and *Hepatozoon* agents in ticks (Acari: Argasidae, Ixodidae) from Chile. **Acta Tropica**, v.192, p.91–103, 2019.

MUÑOZ-LEAL, S.; FACCINI-MARTÍNEZ, Á.A.; TEIXEIRA, B.M.; MARTINS, M.M.; SERPA, M.C.A.; OLIVEIRA, G.M.B.; JORGE, F.R.; PACHECO, R.C.; COSTA, F.B.; LUZ, H.R.; LABRUNA, M.B. Relapsing Fever Group Borreliae in Human-Biting Soft Ticks, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v.27, n.1, p.322-324, 2021a.

NAVA, S.; LARESCHI, M. Ecological Characterization of a Community of Arthropods Parasitic of Sigmodontine Rodents in the Argentinean Chaco. **Journal of medical**

entomology, n 49., v.6., 1276-82, 2012.

NAVA, S.; VENZAL, J.M.; GONZÁLEZ-ACUÑA, D.; MARTINS, T.F.; GUGLIELMONE, A.A. Ticks of the Southern Cone of America: Diagnosis, Distribution and Hosts with Taxonomy, Ecology and Sanitary Importance; Elsevier: Cambridge, MA, USA, 2017; 348p

NICHOLAS, K.B.; NICHOLAS, H.B.J.R.; EDEERFIELD, D.W. II. 1997. GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation. EMBNEW NEWS 4:14.

OBIEGALA, A.; PFEFFER, M.; PFISTER, K.; TIEDEMANN, T.; THIEL, C.; BALLING, A.; et al. *Candidatus* Neoehrlichia mikurensis and *Anaplasma phagocytophilum*: prevalences and investigations on a new transmission path in small mammals and ixodid ticks. ***Parasites & Vectors***, v.7, p.563, 2014.

O'DWYER, L.H. Brazilian canine hepatozoonosis. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.20, p 181-193, 2011.

O'DWYER, L.H.; EYAL, O.; TALMI-FRANK, D.; CURY, M.C.; BANETH, G. Oocysts of *Hepatozoon canis* in *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* collected from a naturally infected dog. **Veterinary Parasitology**, v. 177, n. 3-4, p. 392-396, 2011.

OLANO, J.P.; WALKER, D.H. Human ehrlichioses. **Medical Clinics of North America**, v.86, n.2, p.375-392, 2002.

OLIVEIRA, L. S.; OLIVEIRA, K.A.; MOURÃO, L.C.; PESCATORE, A.M.; ALMEIDA, R.M.; CONCEIÇÃO, L.G.; GALVÃO, M.A.M.; MAFRA, C. First report of *Ehrlichia ewingii* detected by molecular investigation in dogs from Brazil. **Clinical microbiology**, v.15, n.2, p.55-56, 2009.

OLIVEIRA, S.V.; FACCINI-MARTÍNEZ, Á.A.; CERUTTI, C.J. Lack of serological evidence for Lyme-like borreliosis in Brazil. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v.26, p.62-62, 2018.

OPPLER, Z.J.; O'KEEFFE, K.R.; MCCOY, K.D.; BRISSON, D. Evolutionary Genetics of *Borrelia.* **Current Issues in Molecular Biology**, v.42, p97-112, 2021.

PAGLIA, A.P.; FONSECA, G.A.B.; RYLANDS, A.B.; HERRMANN, G.; AGUIAR, L.M.S.; CHIARELLO, A.G.; LEITE, Y.L.R.; COSTA, L.P.; SICILIANO, S.; KIERULLFF, M.C.M.; MENDES, S.L.; TAVARES, V.C.; MITTEMEIER, R.A.; PATTON, J.L. Annotated checklist of Brazilian mammals. In: ARLINGTON, V.A. (Ed.), Occassional Papers in Conservation Biology. Belo Horizonte: **Conservational Biology**, p. 1-76., 2012.

PANTI-MAY, J.A.; RODRÍGUEZ-VIVAS, R.I. Canine babesiosis: A literature review of prevalence, distribution, and diagnosis in Latin America and the Caribbean. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 21, 2020.

PAROLA, P.; DIATTA, G.; SOCOLOVSCHI, C.; MEDIANNIKOV, O.; TALL, A.; BASSENE, H.; TRAPE, J.F.; RAOULT, D. Tick-borne relapsing fever borreliosis, rural senegal. **Emerging Infectious Diseases**, v.17, n.5, p. 883-885, 2011.

PATTON, J.L.; PARDIÑAS, U.F.J.; D'ELÍA, G. Mammals of South America; University of Chicago Press: Chicago, IL, USA; London, UK, 2015; p. 1–1384.

PERLES, L.; ROQUE, A.L.R.; D'ANDREA, P.S.; LEMOS, E.R.S.; SANTOS, A.F.; MORALES, A.C. et al. Genetic diversity of *Hepatozoon* spp. in rodents from Brazil. **Scientific Reports**, v.9, 2019.

PETZKE, M.; SCHWARTZ, I. *Borrelia burgdorferi* Pathogenesis and the Immune Response. **Clinics in Laboratory Medicine**, v.35, n.4, 2015.

PIFANO, F. Investigaciones para el estudio de la fiebre recurriente en Venezuela. **Revista venezolana de sanidad y asistencia social**, v.6, n.6, 787-811, 1941.

PORTILLO, A.; SANTIBÁÑEZ, P.; PALOMAR, A.M.; SANTIBÁÑEZ, S.; OTEO, J.A. '*Candidatus* Neoehrlichia mikurensis' in Europe. **New Microbes New Infections**, v.6, n.22, p.30-36, 2018.

PRITT, B.S.; RESPICIO-KINGRY, L.B.; SLOAN, L.M.; SCHRIEFER, M.E.; REPLOGLE, A.J.; BJORK, J.; LIU, G.; KINGRY, L.C.; MEAD, P.S.; NEITZEL, D.F.; et al. *Borrelia mayonii* sp. nov., a member of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex, detected in patients and ticks in the upper midwestern United States. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.66, p.48478-4880, 2016.

PRUNEAU, L.; EMBOULE, L.; GELY, P.; MARCELINO, I.; MARI, B.; PINARELLO. V.; et al. Global gene expression profiling of *Ehrlichia ruminantium* at different stages of development. **Immunology and Medical Microbiology**, v.64, p. 66-73, 2012.

RAMOS, R.; RAMOS, C.; ARAUJO, F.; OLIVEIRA, R.; SOUZA, I.; PIMENTEL, D. Molecular survey and genetic characterization of tick-borne pathogens in dogs in metropolitan Recife (north-eastern Brazil). **Parasitology Research**, v.107, p.1115-1120, 2010.

RAMOS, C.A.N.; RAMOS, R.A.N.; ARAÚJO, F.R.; GUEDES, J.R. D.S.; SOUZA, I.I.F.; ONO, T.M. Comparação de nested-PCR com o diagnóstico direto na detecção de *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* em cães. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.1, p.58–62, 2009.

RAR, V.; GOLOVLJOVA, I. *Anaplasma*, *Ehrlichia*, and "*Candidatus Neoehrlichia*" bacteria: pathogenicity, biodiversity, and molecular genetic characteristics, a review. **Infection, Genetics and Evolution**, v.11, n.8, p. 1842-1861, 2011.

RAS, N.M.; LASCOLA, B.; POSTIC, D.; CUTLER, S.J.; RODHAIN, F.; BARANTON, G.; RAOULT, D. Phylogenesis of relapsing fever Borrelia spp. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.46, n.4, p859-865, 1996.

REIS, N. R.; PERACCHI, A. L.; PEDRO, W. A. & LIMA, I. P. 2006. Mamíferos do Brasil. Londrina: SEMA, 437 p.

RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. P. Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, v.19, p,1572-1574, 2003.

RUAS, N.A.R.; FARIAS, M.P.; SOARES, J.G.W.; BRUM, J.L. *Babesia* sp. em graxaim do campo (*lycalopex gymnocercus*) no sul do Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.70, n.1, p.113-114, 2003.

RUDENKO, N.; GOLOVCHENKO, M.; GRUBHOFFER, L.; OLIVER, J.H. *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex with respect to public health. **Ticks and Tick-borne Diseases**. v.2, p.123–128, 2011.

RUDENKO, N.; GOLOVCHENKO, M.; GRUBHOFFER, L.; OLIVER, J.H. *Borrelia carolinensis* sp. nov., a novel species of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex isolated from rodents and a tick from the south-eastern USA. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.61, p381-383, 2011.

SANCHES, G.S.; ÉVORA, P.M.; MANGOLD, A.J.; JITTAPALAPONG, S.; RODRIGUEZ-MALLON, A.; GUZMÁN, P.E.; BECHARA, G.H.; CAMARGO-MATHIAS, M.I. Molecular, biological, and morphometric comparisons between different geographical populations of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v.15, n.215, p.78-87, 2016.

SÁNCHEZ, R.S.T.; SANTODOMINGO, A.M.S.; MUÑOZ-LEAL, S.; SILVA DE LA FUENTE, M.C.; LLANOS-SOTO, S.; SALAS, L.M.; GONZÁLEZ-ACUÑA, D. Rodents as potential reservoirs for *Borrelia* spp. in northern Chile. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.26, n.29, 2020.

SANTOS, E.C.F.; MOURA-MARTINIANO, N.O.; VILELA, R.V.; LUCIO, C.S.; SILVA, A.F.; OLIVEIRA, S.V.; GAZETA, G.S. *Hepatozoon* Infecting Bats in the Southeastern Brazilian Rainforest. **Journal of Wildlife Diseases**, v.56, n.3, p., 693-697, 2020.

SANTOS, F.; COPPEDE, J.S.; PEREIRA, A.L.; OLIVEIRA, L.P.; ROBERTO, P.G.; BENEDETTI, R.B.; et al. Molecular evaluation of the incidence of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* and *Babesia* spp. in dogs from Ribeirão Preto, Brazil. **Veterinary Journal**, v.179, n.1, p.145-148, 2009.

SARAIVA, D.G.; FOURNIER, G.F.; MARTINS, T.F.; LEAL, K.P.; VIEIRA, F.N.; CÂMARA, E.M.; COSTA, C.G.; ONOFRIO, V.C.; BARROS-BATTESTI, D.M.; GUGLIELMONE, A.A.; LABRUNA, M.B. Ticks (Acari: Ixodidae) associated with small terrestrial mammals in the state of Minas Gerais, southeastern Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, v.58, n.2, p.159-166, 2012.

SCHWAN, T.G.; RAFFEL, S.J.; SCHRUMPF, M.E.; POLICASTRO, P.F.; RAWLINGS, J.A.; LANE, R.S.; BREITSCHWERDT, E.B.; PORCELLA, S.F. Phylogenetic analysis of the spirochetes *Borrelia parkeri* and *Borrelia turicatae* and the potential for tick-borne relapsing fever in Florida. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n.8, p.3851-3859, 2005.

SEBASTIAN, P.S.; BOTTERO, M.N.S.; CARVALHO, L.; MACKENSTEDT, U.; LARESCHI, M.; VENZAL, J.M.; NAVA, S. *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes* cf. *neuquenensis* and *Ixodes sigelos* ticks from the Patagonian region of Argentina. **Acta Tropica**, v.162, p. 218–221, 2016.

SERPA, M.C.A., LUZ, H.R., COSTA, F.B., WECK, B.C., BENATTI, H.R., MARTINS,T.F., et al. Small mammals, ticks and rickettsiae in natural and human-

modified landscapes: Diversity and occurrence of Brazilian spotted fever in Brazil. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, n.12, 2021.

SILVA, M.R.L.; FORNAZARI, F.; DEMONER, L.C.; TEIXEIRA, C.R.; LANGONI, H.; O'DWYER, L.H. *Didelphis albiventris* naturally infected with *Hepatozoon* canis in southeastern Brazil. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v.8, p. 878-881, 2017.

SILVA, M.; RONCONI, A.; CORDEIRO, N.; BOSSI, D.E.P.; BERGALLO, H.G.; COSTA, M.C.C.; BALIEIRO, J.C.C.; VARZIM, F.L.S.B. Blood parasites, total plasma protein andpacked cell volume of small wild mammals trapped in three mountain rangesof the Atlantic Forest in Southeastern Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v.67, p.531–535, 2007.

SMITH, T.G. The genus *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleina). J. Parasitol. 996;82:565-85

SOARES, H.S., MARCILI, A., BARBIERI, A.R.M., MINERVINO, A.H.H., MOREIRA, T.R., GENNARI, S.M., et al. Novel piroplasmid and *Hepatozoon* organisms infecting the wildlife of two regions of the Brazilian Amazon. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife,** v.6, p115-121, 2017b;

SOARES, H.S., MARCILI, A., BARBIERI, A.R.M., MINERVINO, A.H.H., MALHEIROS, A.F., GENNARI, S.M., et al. Novel *Anaplasma* and *Ehrlichia* organisms infecting the wildlife of two regions of the Brazilian Amazon. **Acta Tropica**, v.174, p.82-87, 2017a.

SOLÍS-HERNÁNDEZ, A.; RODRÍGUEZ-VIVAS, R.I.; ESTEVE-GASSENT, M.D.; VILLEGAS-PÉREZ, S.L. Prevalencia de *Borrelia burgdorferi* sensu lato en roedores sinantrópicos de dos comunidades rurales de Yucatán, México. **Biomedica**, v.36, p.109–117, 2016.

SOUSA, K.C.M.; FERNANDES, M.P.; HERRERA, H.M.; FRESCHI, C.R.; MACHADO, R.Z.; ANDRÉ, M.R. Diversity of piroplasmids among wild and domestic mammals and ectoparasites in Pantanal wetland, Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v.9, n.2, p.245-253, 2018.

SOUSA, K.C.M., FERNANDES, M.P., HERRERA, H.M., BENEVENUTE, J.L., SANTOS, F.M., ROCHA, F.L., BARRETO, W.T.G., MACEDO, G.C., CAMPOS, J.B., MARTINS, T.F., PINTO, P.C.E.A., BARROS-BATTESTI, D., PIRANDA, E.M., CANÇADO, P.H.D., MACHADO, R.Z., ANDRÉA, M.R. Molecular detection of *Hepatozoon* spp. in domestic dogs and wild mammals in southern Pantanal, Brazil with implications in the transmission route. **Veterinary Parasitology**, v. 237, p. 37–46, 2017a.

SPOLIDORIO, M.G.; LABRUNA, M.B.; MACHADO, R.Z.; MORAES-FILHO, J.; ZAGO, A.M.; DONATELE, D.M.; PINHEIRO, S.R.; SILVEIRA, I.; CALIARI, K.M.; YOSHINARI, N.H. Survey for tick-borne zoonoses in the state of Espirito Santo, southeastern Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.83, n.1, p.201-206, 2010.

SPOLIDORIO, M.G.; LABRUNA, M.B.; ZAGO, A.M.; DONATELE, D.M.; CALIARI, K.M.; YOSHINARI, N.H. *Hepatozoon canis* infecting dogs in the State of Espírito Santo, southeastern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.163, n.4, p.357-361, 2009.

SPONCHIADO, J.; MELO, G.L.; MARTINS, T.F.; KRAWCZAK, F.S.; LABRUNA, M.B.; CÁCERES, N.C. Association patterns of ticks (acari: ixodida: ixodidae, argasidae) of small mammals in cerrado fragments, western Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, v.65, n.3, p.389-401, 2015.

STEERE, A.C.; STRLE, F.; WORMSER, G.P.; HU, L.T.; BRANDA, J.A.; HOVIUS, J.W.R.; LI, X.; MEAD, P.S. Lyme borreliosis. **Nature Reviews Disease Primers**, v.2, 2016.

STEUBER, S.; ABDEL-RADY, A.; CLAUSEN, P. PCR-RFLP analysis: a promising technique for host species identification of blood meals from tsetse flies (Diptera: Glossinidae). **Parasitology Research**, v.97, p.247-254, 2005.

TALAGRAND-REBOUL, E.; BOYER, P.H.; BERGSTRÖM, S.; VIAL, L.; BOULANGER, N. Relapsing fevers: neglected tick-borne diseases. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v.8, n.98, 2018.

THOMAS, R.S.; SANTODOMINGO, A.M.S.; MUÑOZ-LEAL, S.; SILVA-DE LA FUENTE, M.C.; LLANOS-SOTO, S.; SALAS, L.M.; GONZÁLEZ-ACUÑA, D. Rodents as potential reservoirs for *Borrelia* spp. in northern Chile. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.29, p.1-10, 2020.

THOMPSON, J. D.; GIBSON, T.J; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D. G. The clustalX windons interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, v.25, p.4876-4882,1997.

THOMPSON, M.; MUÑOZ-LEAL, S.; TRONCOSO, I.; THOMAS, R.; SANTODOMINGO, A.; MORENO-SALAS, L.; GONZÁLEZ-ACUÑA, D. A *Borrelia* sp. in *Ornithodoros octodontus* (Argasidae). **Systematic and Applied Acarology**, v.26, n.11, 2021.

TOLEDO, A.; ANDA, P.; ESCUDERO, R.; LARSSON, C.; BERGSTROM, S.; BENACH, J.L. Phylogenetic analysis of a virulent *Borrelia* species isolated from patients with relapsing fever. **Journal of Clinical Microbiology**, v.48, n.7, p.2484-2489, 2010.

VIEIRA, F.T.; ACOSTA, I.C.L.; MARTINS, T.F.; FILHO, J.M.; KRAWCZAK, F.D.S.; BARBIERI, A.R.M.; EGERT, L.; FERNANDES, D.R.; BRAGA, F.R.; LABRUNA, M.B.; DIETZE, R. Tick-borne infections in dogs and horses in the state of Espírito Santo, Southeast Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.15, n.249, p.43-48, 2018.

VIEIRA, E.; CAMARGO, N. (2012). Uso do espaço vertical por marsupiais brasileiros. Os marsupiais do Brasil: biologia, ecologia e conservação (pp.347-363). Edition: 2nd. Chapter: Uso do espaço vertical por marsupiais brasileiros. Publisher: Editora da UFMS. Editors: Nilton C. Cáceres.

VIEIRA, R. F.C.; BIONDO, A.W.; GUIMARÃES, A.M.S.; SANTOS, A.P.; SANTOS, R.P.; DUTRA, L.H.; DINIZ, P.P.V.P; MORAIS, H.A.; MESSICK, J.B.; LABRUNA, M.B, VIDOTTO, O. Ehrlichiosis in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n.1, p.1-12, 2011.

VIEIRA, T.; VIEIRA, R.F.; KRAWCZAK, F.S.; SOARES, H.S.; GUIMARÃES, A.M.; et

al.; *Ehrlichia* sp infection in carthorses of low-income owners, Southern Brazil. **Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases**. v. 48, p. 1-5, 2016.

WEKSLER, M.; BONVICINO, C.R. Taxonomy of pigmy rice rats genus *Oligoryzomys Bangs*, 1900 (Rodentia, Sigmodontinae) of the Brazilian Cerrado, with the description of two new species. **Arquivos do Museu Nacional**, v.63, p.113–130, 2005.

WEKSLER, M.; LEMOS, E.; D'ANDREA, P.; BONVICINO, C.R. The Taxonomic Status of *Oligoryzomys mattogrossae* (Allen 1916) (Rodentia: Cricetidae: Sigmodontinae), Reservoir of *Anajatuba Hantavirus*. **American Museum Novitates**. 2017, 3880, 1–32.

WIDMER, C.E., AZEVEDO, F.C., ALMEIDA, A.P., FERREIRA, F., LABRUNA, M.B. Tick-borne bacteria in free-living jaguars (*Panthera onca*) in Wetland, Brazil. **Vector Borne and Zoonotic Diseases.** v.11, n.5, 2011.

WOLCOTT, K.A.; MARGOS, G.; FINGERLE, V.; BECKER, N. Host association of Borrelia burgdorferi sensu lato: A review. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v.12, 2021.

WOLF, R.W.; ARAGONA, M.; MUÑOZ-LEAL, S.; PINTO, L.B.; MELO, A.L.T.; BRAGA, I.A.; et al. Novel *Babesia* and *Hepatozoon* agents infecting non-volant small mammals in the Brazilian Wetland, with the first record of the tick *Ornithodoros guaporensis* in Brazil. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v.7, p. 449-456, 2016.

YABSLEY, M.J.; SHOCK, B.C. Natural history of Zoonotic *Babesia*: Role of wildlife reservoirs. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v.22, n.2, p.18-31, 2012.