



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS – PPGVET

NATHALIA DE ASSIS PEREIRA

INVESTIGAÇÃO MOLECULAR DE PATÓGENOS EM MORCEGOS COLETADOS NO
ESTADO DO MATO GROSSO, BRASIL.

Cuiabá

2024

NATHALIA DE ASSIS PERERIA

INVESTIGAÇÃO MOLECULAR DE PATÓGENOS EM MORCEGOS COLETADOS NO
ESTADO DO MATO GROSSO, BRASIL.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Medicina Veterinária, da Universidade Federal de Mato Grosso, para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária, área de concentração: Sanidade Animal.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Moura de Aguiar

Cuiabá

2024

FICHA CATALOGRÁFICA

Dados Internacionais de Catalogação na Fonte.

P436i Pereira, Nathalia de Assis.

Investigação molecular de patógenos em morcegos coletados no estado do Mato Grosso, Brasil. [recurso eletrônico] / Nathalia de Assis Pereira. -- Dados eletrônicos (1 arquivo : 45 f., pdf). -- 2024.

Orientador: Daniel Moura de Aguiar.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Mato Grosso, Faculdade de Agronomia, Medicina Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Cuiabá, 2024.

Modo de acesso: World Wide Web: <https://ri.ufmt.br>.

Inclui bibliografia.

1. Morcegos. 2. Zoonoses. 3. Patógenos. 4. qPCR. 5. Mycoplasma. I. Aguiar, Daniel Moura de, *orientador*. II. Título.

ia catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(

Permitida a reprodução parcial ou total, desde que citada a fonte.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
FOLHA DE APROVAÇÃO

TÍTULO: INVESTIGAÇÃO MOLECULAR DE PATÓGENOS EM MORCEGOS COLETADOS NO ESTADO DO MATO GROSSO, BRASIL

AUTORA: Mestranda Nathalia de Assis Pereira

Dissertação defendida e aprovada em 16 de fevereiro de 2024.

COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA

Doutor Daniel Moura de Aguiar (Presidente da Banca/Orientador)

Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso

Doutora Lívia Saab Muraro (Examinadora Externa)

Instituição: Universidade de Cuiabá-UNIC

Doutora Valéria Dutra (Examinadora Interna)

Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso

Doutora Andréia Lima Tomé Melo (Examinadora Suplente)

Instituição: Universidade de Cuiabá-UNIC

Cuiabá, 16 de fevereiro de 2024.



Documento assinado eletronicamente por **VALERIA DUTRA, Docente da Universidade Federal de Mato Grosso**, em 26/02/2024, às 16:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **DANIEL MOURA DE AGUIAR, Docente da Universidade Federal de Mato Grosso**, em 27/02/2024, às 10:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Nathalia de assis Pereira, Usuário Externo**, em 29/02/2024, às 16:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Livia Saab Muraro, Usuário Externo**, em 04/03/2024, às 14:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufmt.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **6639683** e o código CRC **41F1260C**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Professor Daniel Moura de Aguiar, a equipe do laboratório de Virologia e Rickettsioses do Hospital Veterinário da UFMT *campus* Cuiabá e a todos que contribuíram para a realização do trabalho.

RESUMO

Os morcegos podem abrigar uma grande variedade de microrganismos, incluindo vírus, bactérias, fungos e protozoários, e diversos fatores contribuem para que eles sejam portadores e disseminadores de patógenos potencialmente zoonóticos, como a capacidade de fazer longos voos, facilidade para se adaptar aos mais diversos ambientes, contato próximo com humanos e animais domésticos em áreas urbanas, longevidade e suscetibilidade reduzida a vários patógenos humanos e animais, permanecendo assintomático na maior parte do tempo. Neste estudo foi realizada uma investigação molecular de alguns patógenos zoonóticos transmitidos por morcegos, sendo eles os gêneros: *Bartonella* spp., *Mycoplasma* spp., *Trypanosoma* spp. e *Histoplasma capsulatum*. Foram capturados morcegos de diferentes espécies em 5 municípios das regiões do Mato Grosso (Cuiabá, Santo Antônio do Leverger, Nobres, Poconé e Barão de Melgaço), e as amostras obtidas destes animais submetidas a uma qPCR. Os resultados das análises moleculares demonstraram amostras positivas para o gênero *Mycoplasma* spp. em morcegos das espécies *Glossophaga soricina*, *Molossus* sp., *Desmodus rotundus*. O Estado de Mato Grosso possui uma grande diversidade de espécies de morcegos e este estudo demonstrou a presença de um patógeno zoonótico nos exemplares amostrados, portanto, é fundamental elucidar a distribuição desses hospedeiros nesta região para facilitar a implementação da vigilância eficaz contra os patógenos abordados neste estudo.

Palavras-chave: Morcegos, Zoonoses, qPCR, Patógenos.

ABSTRACT

Bats can harbor a wide variety of microorganisms, including viruses, bacteria, fungi and protozoa, and several factors contribute to their being carriers and disseminators of potentially zoonotic pathogens, such as the ability to make long flights, ease in adapting to the most diverse environments, close contact with humans and domestic animals in urban areas, longevity and reduced susceptibility to various human and animal pathogens, remaining asymptomatic most of the time. In this study, an molecular investigation was carried out on some zoonotic pathogens transmitted by bats, namely: *Bartonella* spp., *Mycoplasma* spp., *Trypanosoma* spp. and *Histoplasma capsulatum*. Bats of different species were captured in 5 municipalities in different regions of Mato Grosso (Cuiabá, Santo Antônio do Leverger, Nobres, Poconé and Barão de Melgaço), and the samples obtained from these animals were subjected to a qPCR. The results of these molecular analyzes demonstrated positive samples for the genus *Mycoplasma* spp. in bats of the species *Glossophaga soricina*, *Molossus* sp., *Desmodus rotundus*. The State of Mato Grosso has a great diversity of bat species, and this study demonstrated the presence of a zoonotic pathogen in the specimens sampled. Therefore, it is essential to elucidate the distribution of these hosts in this region to facilitate the implementation of effective surveillance against the pathogens in the study adressed.

Keywords: Bats, Zoonoses, qPCR, Pathogens.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA	Ácido desoxirribonucleico
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
qPCR	Real Time quantitative PCR
RNA	Ácido ribonucleico
rRNA	Ácido ribonucleico ribossômico
UFMT	Universidade Federal de Mato Grosso

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. REVISÃO DE LITERATURA	10
2.1 GÊNERO <i>Bartonella</i>	10
2.2 GÊNERO <i>Mycoplasma</i>	11
2.3 <i>Histoplasma capsulatum</i>	12
2.4 GÊNERO <i>Trypanosoma</i>	13
2.5 IMPORTÂNCIA DOS MORCEGOS COMO RESERVATÓRIOS.....	14
3. OBJETIVOS	15
3.1 OBJETIVO GERAL.....	15
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
4.1 ÁREAS DE ESTUDO.....	15
4.2 AMOSTRAGEM E CAPTURAS DOS MORCEGOS.....	16
4.3 IDENTIFICAÇÃO DOS MORCEGOS E EUTANÁSIA	18
4.4 ANÁLISES MOLECULARES.....	20
4.5 ANÁLISES FILOGENÉTICAS.....	21
4.6 DECLARAÇÃO DE ÉTICA.....	21
5. RESULTADOS	22
6. DISCUSSÃO	26
7. CONCLUSÃO.....	28
REFERÊNCIAS.....	29
APENDICE A – ARTIGO SUBMETIDO A REVISTA.....	33
APENDICE B - COMPROVANTE DE SUBMISSÃO A REVISTA.....	43
APENDICE C - CLASSIFICAÇÃO DA REVISTA.....	44

1. INTRODUÇÃO

Os morcegos são os mamíferos com o grupo taxonômico mais rico em espécies nos trópicos (PATTERSON et al., 2001). Esta diversidade é acompanhada pela sua ampla distribuição geográfica, que exclui apenas as regiões polares ou com climas desérticos extremos e algumas ilhas nos oceanos (IRVING et al., 2021). Há fatores ambientais que limitam a ocorrência e abundância de algumas espécies, incluindo heterogeneidade do habitat, sazonalidade e estado de conservação (ALHO et al., 2011). Os morcegos abrigam uma diversidade de patógenos, que incluem vírus, bactérias, protozoários e fungos, eles também possuem resistência a uma gama de infecções (IRVING et al., 2021).

Entre as bactérias abrigadas por morcegos, os gêneros *Bartonella* e *Mycoplasma* (grupo dos micoplasmas hemotrópicos) têm se destacando devido à importância de serem as bactérias zoonóticas mais relatadas no Brasil na última década, sendo que esse primeiro tem relevância na saúde pública principalmente por sua resistência antimicrobiana (CASTELO-BRANCO et al., 2023).

Alguns protozoários e fungos parecem ter coevoluído com os morcegos, pois esses animais contribuem para a manutenção desses patógenos no ambiente. Destaca-se neste sentido o fungo *Histoplasma capsulatum*, causador da Histoplasmose e *Trypanosoma cruzi*, causador da doença de Chagas, ambos endêmicos no Brasil (CASTELO-BRANCO et al., 2023; DIAS et al., 2011; HAMILTON et al., 2012).

Morcegos são considerados os mamíferos silvestres carreadores e vetores primários do *H. capsulatum* (DIAS et al., 2011), servindo de hospedeiros naturais para este patógeno, participando ativamente na epidemiologia da Histoplasmose, pois se mantêm infectados e excretando fungos viáveis nas suas fezes por longos períodos (VELOSO et al., 2014). Portanto, eles são importantes contribuintes na propagação do *H. capsulatum* (ALLTON et al., 2010; WANK & LAZERA, 2004).

Já entre os protozoários os morcegos são importantes reservatórios de *Trypanosoma* spp., pois eles hospedam os agentes generalistas e os restritos a seu gênero; e dada a relevância da doença de Chagas, é importante avaliar o risco representado pelos morcegos como reservatórios e transmissores desses patógenos (BERGNER et al., 2021).

Estudos no Brasil relatam cada vez mais a presença de morcegos em áreas urbanas, áreas, praças e parques das grandes cidades, principalmente devido à migração de estes animais dos seus habitats naturais, que estão frequentemente sob perturbações antrópicas. Contudo, ainda existem poucos estudos sobre a microbiota dos morcegos e seu papel no ciclo epidemiológico de patógenos zoonóticos (CASTELO-BRANCO et al., 2023).

Os estudos envolvendo epidemiologia molecular são essenciais para esclarecer a origem e o fluxo de transmissão de patógenos em ciclo

s naturais, o que é útil para o desenvolvimento de medidas eficazes de vigilância e controle no âmbito relacionados a zoonoses e na clínica veterinária, podendo assim realizar um monitoramento nas regiões e populações expostas (MENOZZI et al., 2020).

Desse modo, esse estudo, cujo objetivo principal foi realizar a investigação epidemiológica de agentes zoonóticos em morcegos que habitam diferentes regiões do Mato Grosso para conhecer quais microrganismos estão circulando nesses animais, a fim de evitar possíveis surtos de doenças transmitidas pelos patógenos abordados.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 GÊNERO *Bartonella*

As espécies do gênero *Bartonella* são bactérias gram-negativas intracelulares que pertencem à ordem Rhizobiales e à família Bartonellaceae, sendo capaz de infectar os eritrócitos e as células endoteliais de mamíferos (IKEDA et al., 2017).

Das mais de 40 espécies e subespécies descritas de *Bartonella* spp. encontradas em todo o mundo, pelo menos 13 são confirmadas ou suspeitas de serem zoonóticas (OKARO et al. 2017), enquanto o significado médico ou veterinário de outras ainda não foi determinado (BILLETER, 2022). É estimado que esse gênero começou a infectar mamíferos há 62 milhões de anos, perto do período Cretáceo-Paleógeno. A radiação de determinados clados correlaciona-se fortemente com o momento da diversificação dos hospedeiros mamíferos, sendo relatado que os morcegos são os hospedeiros ancestrais de todas as espécies associadas aos mamíferos e parecem ser responsáveis pela expansão geográfica inicial do gênero (MCKEE et al., 2021).

Espécies de *Bartonella* spp. podem ser transmitidas por vetores artrópodes, arranhadura ou contato direto com sangue ou fluidos corporais de animais (FONTALVO

et al., 2017). A transmissão para os vertebrados por artrópodes ocorre através da inoculação de material fecal infeccioso deles no local da picada ou ferida na pele (CHESLOCK & EMBERS, 2019), embora a transmissão direta via secreções salivares durante alimentação sanguínea foi sugerida por Wechtaisong et al (2020).

Embora o ácido nucleico desse agente tenha sido detectado em uma variedade de artrópodes hematófagos, apenas quatro foram confirmados como competentes vetores de espécies zoonóticas, são elas: a pulga de roedor *Ctenophthalmus nobilis* para *Bartonella Grahamii*, a pulga do gato *Ctenocephalides felis* para *Bartonella henselae*, o piolho do corpo humano *Pediculus humanus humanus* para *Bartonella quintana* e o flebotomíneo *Lutzomyia verrucarum* para *Bartonella bacilliformis* (BILLETTER, 2022).

B. bacilliformis, *B. quintana* e *B. henselae* são três espécies principais que desencadeiam doenças em humanos, sendo elas a doença de Carrion, febre das trincheiras e doença da arranhadura do gato, respectivamente. Os sintomas e síndromes das bartoneloses são diversas, variando desde angiomatose bacilar, bacilar peliose hepática, bacteremia crônica assintomática, endocardite e distúrbios neurológicos (JIN et al., 2023). Além disso, as espécies *B. henselae* e *Bartonella clarridgeiae* já foram detectadas em amostras de sangue de doadores humanos em um banco de sangue (PITASSI et al., 2015), indicando sua presença em indivíduos humanos assintomáticos (JIN et al., 2023).

2.2 GÊNERO *Mycoplasma*

Mycoplasmas hemotrópicos, também conhecidos como hemoplasmas, são bactérias gram-negativas pertencentes à ordem Mycoplasmatales, família Mycoplasmataceae, gênero *Mycoplasma* (IKEDA et al., 2017). Sabe-se que esses patógenos causam manifestações que vão desde assintomáticas a doenças crônicas, bem como anemia hemolítica grave devido à capacidade de adesão à superfície dos eritrócitos, causando indentação ou deformação da membrana da célula-alvo (MILLÁN et al., 2021), sendo que a gravidade da doença depende do genótipo ou da espécie envolvidos (IKEDA et al., 2022).

No Brasil, as infecções por hemoplasma foram relatadas em animais selvagens como canídeos, felinos e primatas não humanos (ANDRÉ et al., 2011; BONATO et al., 2015). Esses microorganismos também foram relatados no Brasil em morcegos hematófagos como o *Desmosdus rotundus* e morcegos não hematófagos, como *Molossus molossus*, *Sturnira liliium* e *Eptesicus* spp. coletados no Estado de Paraná, *Artibeus planirostris*, *M. molossus*, *Eumops auripectus*, e *Myotis nigricans* no Estado do Pará, *Glossophaga soricina* no Estado do Tocantins e *Molossus rufus* no estado de

Mato Grosso (CORREIA DOS SANTOS et al., 2020).

Artrópodes hematófagos como pulgas e carrapatos foram propostos como vetores naturais desse gênero, porém, os hospedeiros vertebrados também podem ser infectados de diversas formas, incluindo inoculação subcutânea, intravenosa, intraperitoneal e oral de sangue contaminado (CORREIA DOS SANTOS et al., 2020). Análises metagenômicas também têm demonstrado a presença de hemoplasmas na saliva de morcegos hematófagos, sugerindo a possibilidade de transmissão direta pela mordida desses animais (VOLOKHOV et al., 2017).

2.3 *Histoplasma capsulatum*

Histoplasma capsulatum é um fungo dimórfico que no ambiente se encontra na fase miceliana, sendo saprofítico nesta fase e de forma filamentosa. Já a forma infectante, que é quando adentra o hospedeiro, é cultivada entre 35 e 37°C, nesta temperatura tendo forma leveduriforme. Ele é encontrado em solos ácidos e úmidos, ricos em compostos nitrogenados e também crescem em solos enriquecidos com excrementos de morcegos e aves, podendo persistir no ambiente por longos períodos de tempo uma vez que o local foi infectado. O *H. capsulatum* infectam os seres humanos quando ocorre perturbação do solo infectado, através de construções, demolições, exploração de caverna e até mesmo ecoturismo (COTTLE et al., 2013; GUNDACKER et al., 2017; KAUFFMAN, 2007).

É normalmente uma infecção assintomática em humanos, porém, surtos de infecção aguda com sintomas intensos no sistema respiratório já foram relatados, principalmente em pessoas imunossuprimidas, com uma sintomatologia incluindo febre, calafrios, cefaléia, mialgias, hiporexia, tosse, dispnéia e dor torácica (WHEAT et al., 2016). Em cães e gatos a infecção pode ser similar com a infecção em humanos (BRÖMEL & SYKES, 2005).

Os morcegos são considerados os mamíferos silvestres carreadores e vetores primários desse fungo (DIAS et al., 2011), servindo de hospedeiros naturais para este patógeno. Eles o adquirem através da inalação de esporos e podem desenvolver a doença sistêmica, eliminando assim os esporos deste agente em suas fezes ricas em nitrogênio, que fornecem uma abundância de nutrientes para o crescimento do *Histoplasma* (DOS SANTOS et al., 2018). Além disso, é importante considerar que a própria movimentação do solo causada pelo bater das asas dos morcegos ao alçarem vôo, deixam os esporos em suspensão no ar e proporcionam o transporte dos microconídios para locais distantes ou acabam por infectar indivíduos que estejam no

local ou próximo a ele.

Eles também atuam como participantes ativos na epidemiologia da doença, pois se mantem infectados e excretando fungos viáveis nas suas fezes por longos períodos de tempo, principalmente as fêmeas, pois estas permanecem em seus abrigos por um período maior devida à necessidade de cuidar da prole (VELOSO et al., 2014). Portanto os morcegos são importantes contribuintes na propagação do *H. capsulatum* (ALLTON et al., 2010; WANK & LAZERA, 2004).

2.4 GÊNERO *Trypanosoma*

A família Trypanosomatidae é um grupo composto por protozoários flagelados que infectam invertebrados, vertebrados e plantas hospedeiras, sendo assim denominados de heteroxenos. Na ordem Chiroptera, foram descritas mais de 30 espécies pertencentes aos subgêneros *Herpetosoma*, *Schizotrypanum*, *Megatrypanum* e *Trypanozoon* (HOARE, 1972). O gênero *Trypanosoma* compreende espécies que infectam vertebrados e, dentre as 125 espécies encontradas em mamíferos, 10% são consideradas patogênicas para humanos e/ou outros mamíferos. A espécie *Trypanosoma cruzi* é a única do subgênero *Schizotrypanum* inespecífica para morcegos hospedeiros, diferindo assim de *Trypanosoma dionisii* e *Trypanosoma cruzi marinkellei*, que infectam apenas morcegos (MOLYNEUX, 1991).

Estudos realizados no Brasil encontraram *T. cruzi*, *T. c. marinkellei* e *T. dionisii* por meio de avaliações de hemocultura. Já a espécie *Trypanosoma dionisii* foi detectada em 4 famílias de morcegos em todos os biomas analisados do Norte ao Sul do Brasil, enquanto que *T. c. marinkellei* só foi encontrado em uma família de morcegos nas áreas Norte e Centro-Oeste, e *T. cruzi* em duas famílias de morcegos nos biomas Amazônia, Pantanal e Mata Atlântica. Adicionalmente, uma nova linhagem *Trypanosoma rangeli* foi descrita em morcegos do Pantanal (MARCILI et al., 2013).

O ciclo de transmissão deste gênero é apenas conhecido por uma minoria de espécies, como *Trypanosoma brucei* (Doença do sono em humanos), *Trypanosoma evansi* (Mal das cadeiras em animais) e *Trypanosoma cruzi* (Doença de Chagas em humanos) (DARIO et al., 2022).

Esses tripanossomas patogênicos habitam principalmente o sangue e a linfa do hospedeiro, mas ocorrem às vezes no líquido cefalorraquidiano e outros tecidos do hospedeiro. Os tripanossomas são transmitidos principalmente por insetos, mas meios alternativos de transmissão incluem mamíferos como vetores (por exemplo, morcegos hematófagos para *T. evansi* e marsupiais para *T. cruzi*) e vias transcutâneas e transmembranares, como peroral, venérea, transplacentárias, iatrogênicas, além da

transmissão horizontal e vertical ocasional (DESQUESNES et al., 2022).

Estudos moleculares e filogenéticos realizados até o momento mostraram que a grande maioria dos tripanossomatídeos de morcegos descritos pertencem ao altamente diverso clado *T. cruzi*. É importante ressaltar que esses estudos coletivamente geraram evidências convincentes de que os morcegos desempenharam um papel na evolução do zoonótico *T. cruzi* e sua dispersão para uma variedade de hospedeiros mamíferos terrestres, incluindo humanos (ALVES et al., 2021; AUSTEN & BARBOSA, 2021; HAMILTON et al., 2012).

2.5 IMPORTÂNCIA DOS MORCEGOS COMO RESERVATÓRIOS

Os morcegos são um grupo de interesse especial, pois, em primeiro lugar, eles pertencerem à ordem Chiroptera, segunda ordem mais abundante de mamíferos do mundo, contendo 181 espécies, 68 gêneros e 9 famílias no território brasileiro, cerca de 15% da diversidade mundial de morcegos (GARBINO et al., 2020). No estado do Mato Grosso há registro de cerca de 99 espécies de morcegos (BRANDÃO et al., 2019).

Em segundo lugar, eles também são capazes de abrigar uma grande variedade de microrganismos, incluindo vírus, bactérias, fungos e protozoários, devido ao seu longo tempo de evolução que levou a processos intracelulares se adaptarem e permitirem a ocorrência de alguns tipos de infecções, eles possuem um repertório diversificado de anticorpos com avidéz relativamente menor, além de uma associação mais fraca com antígenos, exibindo um pico retardado ou diferencial de resposta primária de anticorpos, fazendo com que esses animais tenham resistência principalmente em infecções virais (CASTELO-BRANCO et al., 2023; IKEDA et al., 2022; IRVING et al., 2021; NABI et al., 2021).

Esses mamíferos, apesar de não terem um papel na transmissão direta de patógenos zoonóticos, podem participar do ciclo epidemiológico deles, contribuindo para sua manutenção e dispersão ambiental, uma vez que as espécies insetívoras e frugívoras atuam significativamente na fertilização, polinização, dispersão de sementes e no controle de populações de insetos (IRVING et al., 2021). Além disso, os morcegos também possuem a capacidade de migrar por longas distâncias e têm a tendência de se agregar em colônias, facilitando tanto a transmissão intraespecífica quanto interespecífica de micróbios (ALLOCATI et al., 2016; CASTELO-BRANCO et al., 2023; HAYMAN et al. 2013).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Considerando a ampla distribuição de morcegos no Estado do Mato Grosso e a importância deles na epidemiologia de diversas doenças, este estudo teve por objetivo investigar a infecção por *Bartonella* spp., *Mycoplasma* spp., *Trypanosoma* spp. e por *H. capsulatum* em morcegos de diferentes municípios da região.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a ocorrência desses agentes entre espécies de morcegos bem como nas áreas amostradas.
- Identificar as espécies dos patógenos em que as análises moleculares detectarem apenas os gêneros.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ÁREAS DE ESTUDO

Durante o período de fevereiro a agosto de 2021, órgãos de 157 morcegos foram coletados em 33 locais distribuídos entre os municípios de Cuiabá, Santo Antônio do Leverger, Nobres, Poconé e Barão de Melgaço, Estado de Mato Grosso (Figura 1). Essas localidades foram selecionadas por representarem diferentes ambientes, bom estado de preservação, conhecimento da fauna presente, além de proximidade de centros urbanos.



Figura 1: Distribuição dos locais de captura dos morcegos.

4.2 AMOSTRAGEM E CAPTURAS DOS MORCEGOS

As coletas dos morcegos consistiram em busca ativa com o auxílio de um puçá e rede de neblina, durante os períodos de seca e chuva, com campanhas de 5 dias e com 4 pessoas em campo. As redes de neblina foram armadas no final da tarde e vistoriadas em intervalos de 15 minutos. Os animais capturados foram acondicionados em sacos de pano, medidos, pesados e tiveram seu sexo determinado.

Na Figura 2 é possível observar um espécime de morcego no momento da coleta com um puçá.



Figura 2: Morcego sendo retirado de um puça.

Já a Figura 3 apresenta morcegos capturados pela rede de neblina, e a Figura 4 já demonstra a retirada do morcego de dentro da armadilha (puçá).



Figura 3: Morcegos capturados pela rede de neblina.



Figura 4: Morcego sendo retirado de dentro do puçá.

4.3 IDENTIFICAÇÃO DOS MORCEGOS E EUTANÁSIA

Os procedimentos de manipulação de animais seguiram as Diretrizes da Sociedade Americana de Mamologistas para o uso de mamíferos silvestres em pesquisa (SIKES, 2016) e a identificação taxonômica dos exemplares foram realizadas conforme Díaz et al. (2021).

Após a identificação foi realizada a eutanásia dos morcegos coletados seguindo as diretrizes do Conselho Regional de Medicina Veterinária de Mato Grosso (Guia Brasileiro de Boas Práticas para a Eutanásia em Animais, 2013).

Desse modo, os animais foram anestesiados por injeção intramuscular de solução de cloridrato de cetamina/xilazina. Todos os espécimes de mamíferos foram subsequentemente eutanasiados aumentando as doses de anestésico. Posteriormente, fragmentos de pulmão, coração, rim, fígado, baço, estômago e intestino, também sendo coletado *swab* oral (Figura 5), retal e sangue total (Figura 6).

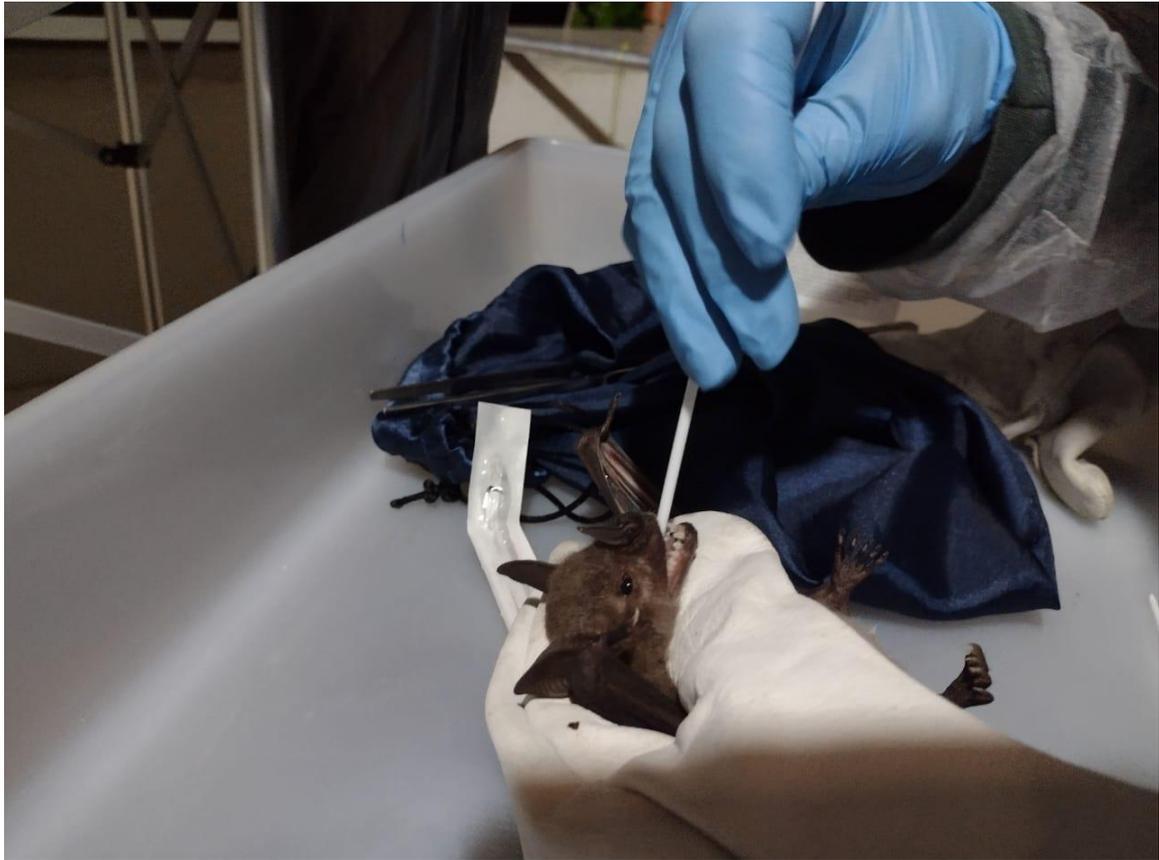


Figura 5: Coleta de um swab oral de um exemplar de morcego.



Figura 6: Coleta de sangue de um exemplar de morcego.

Essas amostras foram armazenadas em criotubos, sendo que os swabs (oral e retal) e sangue total eram adicionados meio de transporte, as amostras eram colocadas em nitrogênio líquido e transportadas ao laboratório de Virologia e Rickettsioses da Universidade Federal do Mato Grosso, onde foram armazenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o processamento.

Todos os animais capturados passaram por um processo de taxidermia e foram depositados na Coleção de Mastozoologia da Universidade Federal de Mato

Grosso (UFMT) Cuiabá, MatoGrosso, Brasil, na curadoria do Professor Dr. Rogério Rossi.

4.4 ANÁLISES MOLECULARES

A extração do ácido nucleico foi realizada com um fragmento de 20 mg do pulmão, utilizando o kit de purificação MagMAX™ CORE (Applied Biosystems™, South San Francisco, CA, USA) seguindo as orientações do fabricante. A Reação em Cadeia pela Polimerase em Tempo Real (qPCR) dos agentes *Bartonella* spp., *Trypanosoma* spp. e *H. capsulatum* e foram feitas com os reagentes TaqMan (TaqMan® Gene Expression Assay, Applied Biosystems™, South San Francisco, CA, USA) seguindo as orientações do fabricante. Já para *Mycoplasma* spp. foi utilizado um ensaio com os reagentes SYBER (PowerTrack® SYBR Green Master Mix, Applied Biosystems™, South San Francisco, CA, USA) conforme as orientações do fabricante. As reações de qPCR sendo feitas utilizando os protocolos conforme a Tabela 1.

Tabela 1. Genes, primers, sondas e referências dos agentes *Bartonella* spp., *Mycoplasma* spp., *H. capsulatum* e *Trypanosoma* spp.

qPCR	Gene	Primers/Sonda	Referência
<i>Bartonella</i> spp.	28S	F-Bart (5'-CAATCTTCTTTTGCTTCACC-3') R- Bart (5'- TCAGGGCTTTATGTGAATAC-3') (5'-FAM-TTYGTCATTTGAACACG-BHQ1-3')	André et al. (2016)
<i>Mycoplasma</i> spp.	16S-23S rRNA	F (5'-AGCAATRCCATGTGAACGATGAA-3') R (5'-TGGCACATAGTTTGCTGTCACTT-3')	Justice-Allen et al. (2011)
<i>H. capsulatum</i>	mtSSU	F (5'-CGTACGACATCATATTAATAAATGA-3') R (5'-CTTTCTTTAAGGTAGCCAAAAT-3') (5'-FAM- TGTAGTGGTGTACAGGTGAGT-BHQ1-3')	Alanio et al. (2021)
<i>Trypanosoma</i> spp.	5.8S rRNA	F (5'-CAACGTGTCGCGATGGATGA-3') R (5'-ATTCTGCAATTGATACCACTTATC-3') (5'-FAM-GTTGAAGAACGCAGCAAAGGCGAT-3')	Medkour et al. (2020)

A PCR convencional foi usada nas amostras positivas para *Mycoplasma* spp., com primers gênero-específicos direcionados a uma porção (900 pb) do 16S gene rRNA de *Mycoplasma* spp. hemotrópico. Os que amplificaram nessa reação também foram posteriormente submetidos a um ensaio de PCR gênero-específico visando um fragmento (800 pb) do gene 23S rRNA de hemoplasmas, protocolos conforme Oliveira et al. (2021).

4.5 ANÁLISES FILOGENÉTICAS

Os produtos de PCR das amostras positivas para *Mycoplasma* foram aplicados em géis de agarose a 1% corados com GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, Fremont, CA) e visualizados em um sistema ChemiDoc XRS (Bio-Rad, Hercules, CA). Os amplicons de tamanho esperado foram purificados usando o kit Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare, Chicago, IL) e preparados para sequenciamento com o kit BigDye™ (Applied Biosystems, Foster, CA). Um analisador genético ABI-PRISM 3500 (Applied Biosystems, Foster, CA) foi empregado para procedimentos de sequenciamento com os mesmos primers usados para PCR convencional.

As sequências obtidas a partir do software Geneious Prime® 2019.1.1 (Biomatters, USA) foram comparadas com o banco de dados de DNA usando o algoritmo BLAST® (versão 2.8.0) do National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>) para determinar as identidades mais próximas com organismos genéricos disponíveis no GenBank®.

As sequências dos genes 23S e 16S foram alinhadas pelo programa MUSCLE, utilizando o software Geneious (Biomatters Ltd.), com 19 sequências de *Mycoplasma* spp. de diferentes partes do mundo, disponíveis no Genbank: HM138663.1 (23S), N_076944.1(23S), MN692881.1 (23S), OL963932.1 (23S), OR753267.1 (23S), OQ518944.1 (23S), OQ518933.1 (23S), OQ518945.1 (23S), OQ518934.1 (23S), OR055988.1 (23S), KJ 530704.1 (16S), OP795503.1 (16S), OQ407847.1 (16S), OQ407836.1 (16S), MH245175.1 (16S), OR016505.1 (16S), MK353861.1 (16S) e MN710412.1 (16S). Foram alinhados 387 caracteres do gene 23S e 622 caracteres do gene 16S. A árvore filogenética foi inferida pelo método de Neighbor-Joining usando o software Geneious com o modelo substituto Tamura-Nei. Os valores observados representam a porcentagem de 1000 bootstrap de reamostragem. A sequência de *Ureaplasma parvum* (NR_076563.1) foi incluída como grupo externo (outgroup) na árvore filogenética do gene 23S.

4.6 DECLARAÇÃO DE ÉTICA

Os materiais biológicos utilizados na pesquisa são provenientes de coletas realizadas para o projeto “Monitoramento de SARS-COV-2, Coronavírus e vírus da Influenza no Pantanal”, autorizadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais sob o protocolo Nº 23108.085496/2020-32. Todos os requisitos e diretrizes legais no Brasil para o cuidado e uso de animais foram seguidos.

5. RESULTADOS

Os morcegos coletados pertenciam à ordem Chiroptera e às famílias Phyllostomidae, Molossidae, Noctilionidae, Vespertilionidae, Mormoopidae e Emballonuridae. As espécies identificadas nessas famílias estão apresentadas na Tabela 2. Dentre elas, a família Phyllostomidae apresentou a maior quantidade de exemplares (104) pertencentes às espécies: *Carollia perspicillata* (17), *Glossophaga soricina* (45), *Platyrrhinus lineatus* (18), *Desmodus rotundus* (13) e *Noctilio albiventris* (11). Do total de morcegos coletados 87 eram fêmeas e 70 eram machos.

Sobre os hábitos alimentares foram capturados morcegos nectarívoros (45), frugívoros (43), insetívoros (31), onívoros (26) e hematofágos (13) e os espécimes pertenciam a colônias gregárias de pequeno e médio tamanho. Eles pertenciam aos municípios de Cuiabá (4) Santo Antônio de Leverger (96), Nobres (9), Poconé (40) e Barão de Melgaço (8). O maior número de animais amostrados foi no município de Santo Antônio de Leverger, devido ao maior número de locais de coleta nessa região.

Sobre os métodos de coleta 107 (68,2%) morcegos foram coletados através da busca ativa com puça e 50 (31,8%) espécimes foram coletados através da rede de neblina. Dos 157 morcegos analisados no presente estudo, apenas 4 exemplares não puderam ser identificados a espécie, sendo identificado os seguintes gêneros: *Carollia* (1), *Lophostoma* (1), *Macrophyllum* (1) e *Pteronotus* (1).

Um total de 5 amostras positivas para *Mycoplasma* spp. foram detectadas em ensaios de qPCR com amplificação do gene 16-23S da bactéria, nos municípios Santo Antônio do Lerverger (3) e Poconé (2), conforme a tabela 3. As espécies em que foram detectados o patógeno: *Glossophaga soricina*, *Molossus* sp., *Desmodus rotundus* e uma espécie da família Molossidae que não pode ser identificada. Os morcegos eram todos adultos e em sua maioria fêmeas (3/5). Não foram detectadas amostras positivas nos outros patógenos pesquisados nos morcegos amostrados nesse estudo.

Os sequenciamentos geraram sequências de 500 e 700 nucleotídeos para os genes 23S e 16S. A sequência de nucleotídeos apresentou identidades variando de 98.7% a 99.9% frente diferentes sequências de *Mycoplasma*, elas passaram por múltiplos alinhamentos com sequências selecionadas do GenBank® utilizando o software Geneious Prime® software (version 2019.1.1, Biomatters, USA), resultando nas árvores filogenéticas correspondentes as figuras 7 e 8. As amostras foram depositadas no GenBank® sob os acessos PP193952, PP194257, PP194256, PP197661 e PP197662.

A figura 7 representa a árvore filogenética que demonstra a similaridade e bootstrap elevados da amostra 21MT1C172 com um clado próximo a uma sequência de Mangusto-de-java (*Herpestes javanicus*), já na figura 8 com base nos valores de similaridade e de bootstrap elevados, observou-se que as amostras 21MT1C155, 21MT1C172, 21MT1C289 e 21MT1C295 foram agrupadas em dois clados próximos a outras sequências detectados em morcegos (OR75367.1 e OQ359466.1) previamente depositados no banco de dados do GenBank®.

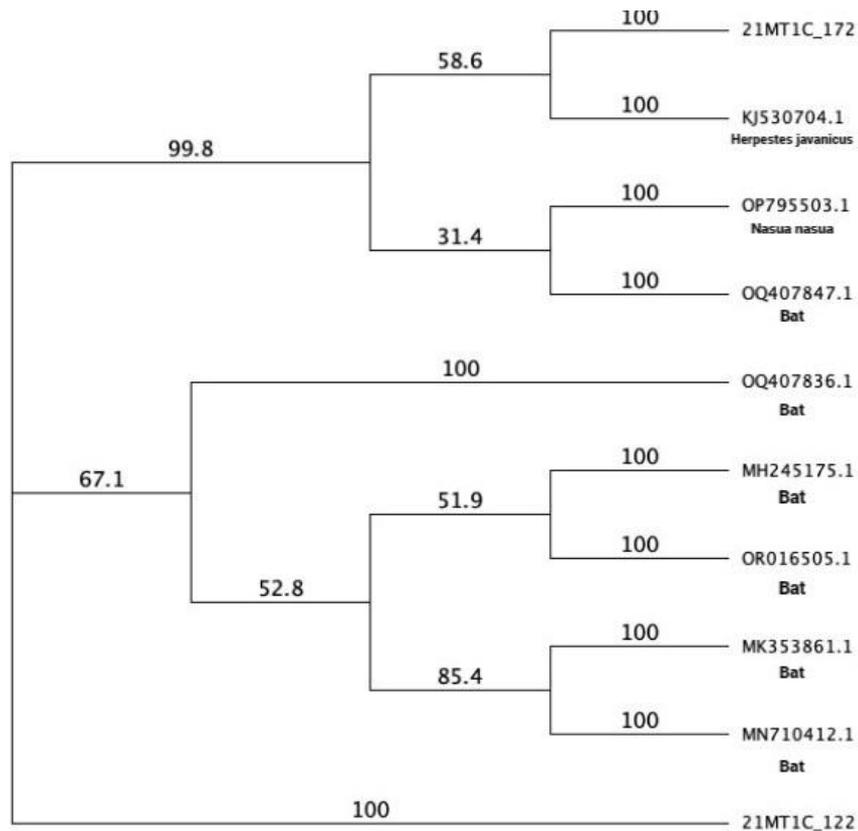


Figura 7: Árvore filogenética das amostras 21MT1C172 e 21MT1C122.

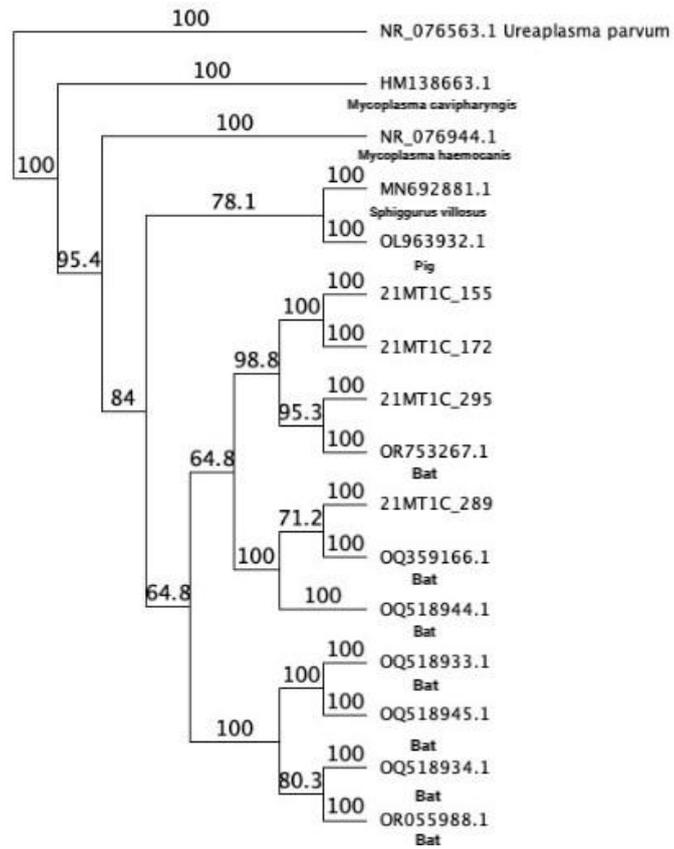


Figura 8: Árvore filogenética das amostras 21MT1C155, 21MT1C172, 21MT1C295 e 21MT1C289.

Tabela 2. Espécies, famílias, hábitos alimentares e as respectivas quantidades de morcegos amostradas.

Espécies	Animais (n=157)			
	Famílias	Municípios coletados	Hábitos alimentares	Quantidades de exemplares
<i>Artibeus obscurus</i>	Phyllostomidae	Santo Antônio do Leverger	Frugívoro	1
<i>Artibeus planirostris</i>	Phyllostomidae	Santo Antônio do Leverger e Cuiabá	Frugívoro	6
<i>Carollia perspicillata</i>	Phyllostomidae	Santo Antônio do Leverger e Barão de Melgaço	Frugívoro	17
<i>Carollia sp.</i>	Phyllostomidae	Santo Antônio do Leverger	Fugívoro	1
<i>Cynomops planirostris</i>	Molossidae	Barão de Melgaço	Insetívoro	2
<i>Desmodus rotundus</i>	Phyllostomidae	Santo Antônio do Leverger e Poconé	Hematófago	13
<i>Eptesicus cf. diminutus</i>	Vespertilionidae	Santo Antônio do Leverger	Insetívoro	2
<i>Glossophaga soricina</i>	Phyllostomidae	Santo Antônio do Leverger, Cuiabá e Poconé	Nectarívoros	45
<i>Lophostoma sp.</i>	Phyllostomidae	Santo Antônio do Leverger	Insetívoro	1
<i>Macrophyllum sp.</i>	Phyllostomidae	Santo Antônio do Leverger	Insetívoro	1
<i>Molossops temminckii</i>	Molossidae	Santo Antônio do Leverger, Cuiabá e Poconé	Insetívoro	4
<i>Molossus molossus</i>	Molossidae	Santo Antônio do Leverger, Barão de Melgaço e Poconé	Insetívoro	4
<i>Molossus rufus</i>	Molossidae	Santo Antônio do Leverger	Insetívoro	5
<i>Myotis cf. nigricans</i>	Vespertilionidae	Santo Antônio do Leverger e Barão de Melgaço	Insetívoro	1
<i>Myotis cf. simus</i>	Vespertilionidae	Santo Antônio do Leverger	Insetívoro	2
<i>Noctilio albiventris</i>	Noctilionidae	Santo Antônio do Leverger	Onívoro	11
<i>Phyllostomus discolor</i>	Phyllostomidae	Santo Antônio do Leverger	Onívoro	4
<i>Phyllostomus discolor cf.</i>	Phyllostomidae	Santo Antônio do Leverger	Onívoro	1
<i>Phyllostomus hastatus</i>	Phyllostomidae	Santo Antônio do Leverger	Onívoro	4
<i>Platyrrhinus lineatus</i>	Phyllostomidae	Santo Antônio do Leverger e Nobres	Frugívoro	18
<i>Pteronotus sp.</i>	Mormoopidae	Santo Antônio do Leverger	Onívoro	1
<i>Rhogeessa io</i>	Vespertilionidae	Santo Antônio do Leverger	Insetívoro	1
<i>Rhynchonycteris naso</i>	Emballonuridae	Poconé	Insetívoro	6
<i>Sturnira lilium</i>	Phyllostomidae	Santo Antônio do Leverger	Frugívoro	1
<i>Trachops cirrhosus</i>	Phyllostomidae	Poconé	Onívoro	5

Tabela 3. Dados das amostras positivas para *Mycoplasma* spp.

Identificação	Família	Espécie	Município	Acesso Genbank (Identidade no Blast)
21MT1C155	Phyllostomidae	<i>Glossophaga soricina</i>	Poconé	OR753267.1 (93.17%)
21MT1C172	Phyllostomidae	<i>Glossophaga soricina</i>	Santo Antônio do Leverger	OR753267.1 (91.30%)
21MT1C289	Molossidae	<i>Molossus</i> sp.	Santo Antônio do Leverger	OQ359166.1 (99.83%)
21MT1C295	Phyllostomidae	<i>Desmodus rotundus</i>	Poconé	OR753267.1 (99.58%)
21MT1C122	Molossidae	Não identificada	Santo Antônio do Leverger	MH245175.1 (99.03%)

6. DISCUSSÃO

Os morcegos são mamíferos importantes que desempenham um papel essencial na manutenção de ecossistemas, eles contribuem para a manutenção da estabilidade ambiental através do controle de pragas de insetos, polinização, dispersão de sementes e produção de guano como fertilizante para plantas (RAMÍRES-FRANCEL et al., 2022).

Conforme Miretzki (2003) em estudo ecológico realizado em Curitiba, espécies de morcegos foram relatadas e classificadas em cinco famílias, delas a família Phyllostomidae esteve presente com maior abundância de espécies (47%), seguida pela Molossidae (24%), Vespertilionidae (23%), Noctilionidae (4%) e Emballonuridae (2%). Esses resultados se assemelham aos encontrados neste estudo, onde para a família Phyllostomidae foram amostrados maiores diversidade e quantidade de espécimes (75,1%), seguida também pela Molossidae (9,5%), porém a terceira família mais frequentemente coletada foi a Noctilionidae (7%), seguida então de Vespertilionidae (3,8%) e Emballonuridae (3,8%) com a mesma quantidade de morcegos classificados nessas famílias.

Outro estudo conduzido por Alho et al. (2010) no Pantanal do Mato Grosso, onde foram amostrados morcegos entre os anos de 1994 e 2007, também demonstrou que as famílias mais encontradas e com maiores diversidades de espécies foram a Phyllostomidae e Molossidae. Altos números da família Phyllostomidae pode representar um bom indicador de baixos níveis de perturbação do habitat, sendo que esta família é bem diversificada em número de espécies e hábitos alimentares (MEDELLÍN et al., 2000). Neste estudo, as áreas de coletas tinham como fator de escolha locais com boa preservação ambiental, o que concorda com os resultados do autor citado anteriormente.

Em relação ao gênero *Mycoplasma*, um total de cinco amostras positivas foram detectadas nas espécies de morcego *Glossophaga soricina* (21MT1C155 e 21MT1C172), *Molossus* sp. (21MT1C289), *Desmodus rotundus* (21MT1C295) e uma

espécie da família Molossidae que não pode ser identificada (21MT1C122). Os espécimes positivos foram coletados nos municípios de Santo Antônio do Leverger e Poconé, isso pode ter ocorrido devido ao maior número de coletas nessas áreas.

Conforme um estudo conduzido por Ikeda et al. (2017), no período foi relatado na região do Mato Grosso a detecção de um morcego da família Molossidae positivo para hemoplasmas, divergindo parcialmente com o presente estudo, que detectou morcegos positivos para o gênero *Mycoplasma* na família Molossidae e Phyllostomidae. Porém, posteriormente Ikeda et al. (2022) realizou um novo estudo na região do Mato Grosso, encontrando 43% dos morcegos amostrados positivos para hemoplasmas, detectando espécimes positivas tanto na família Molossidae quanto Phyllostomidae, estando assim mais próximo com os resultados deste trabalho.

Já Correia dos Santos (2020) na região sul do Brasil encontrou morcegos positivos para hemoplasmas nas espécies *Desmodus rotundus*, *Diphylla ecaudata* e *Molossus* sp., portanto também encontrando o agente em morcegos das famílias Phyllostomidae e Molossidae, corroborando com os achados deste estudo mais uma vez. Portanto, estudos como este, que envolvam os ciclos bacterianos do *Mycoplasma* spp. na natureza, sua diversidade genética, identificação de hospedeiros, vetores e distribuição de espécies em um determinado ecótopo possuem grande importância (GONÇALVES et al., 2020).

As sequências obtidas no presente estudo foram comparadas às homologas no banco de dados do GenBank® resultando próximas a espécies de *Mycoplasma* encontradas em morcegos, tanto no gene 16S quanto no gene 23S. Somente a amostra 21MT1C122 se posicionou no gene 16S em um clado diferente das outras amostras. Infelizmente não foi possível posicionar nossos isolados com alguma espécie de *Mycoplasma*, uma vez que muitas destas espécies ainda não foram totalmente caracterizadas. Ressalta-se que espécies deste gênero são de difícil cultivo, pois os micoplasmas hemotrópicos não possuem muitas vias metabólicas associadas a produção de energia e síntese de componentes celulares encontrados em outras bactérias. Por isso são totalmente dependentes dos eritrócitos e fatores de crescimento do hospedeiro, muitos dos quais são desconhecidos (MILLÁN et al., 2021).

Entre as bactérias abordadas, o gênero *Bartonella* é amplamente distribuído e associado a mamíferos e vetores artrópodes em todo o mundo (MCKEE et al., 2021). No Brasil, já foi relatado uma baixa prevalência desse gênero em morcegos não hematófagos (5,28%) amostrados nos Estados de São Paulo, Pará, Tocantins e Mato Grosso (IKEDA et al., 2017). Apesar de ela não ter sido detectada neste trabalho a baixa prevalência encontrada em estados brasileiros corrobora de certo modo com este estudo, e isso poderia ser justificado por diversos fatores, como o tipo de amostra, o

número de amostras analisadas e a distribuição dos animais amostrados (BRAGA et al., 2020; FONLTALVO et al., 2017; IKEDA et al., 2017).

Quanto à ausência do *H. capsulatum* nos morcegos do presente estudo, ela pode ser explicada por uma taxa de infecção comparativamente baixa desse agente nos locais estudados, ou também pelo fato da captura dos exemplares terem sido aleatórias, coletados em sua maioria através da busca ativa por puçá, sendo assim não se pode afirmar que foram amostrados morcegos em quantidade suficientes da mesma colônia. Além de que os morcegos que foram coletados da mesma colônia pertenciam a colônias médias e pequenas, concordando com o que já foi descrito na literatura (TAYLOR et al., 1999), que a maior transmissão de *H. capsulatum* ocorre entre morcegos em grandes colônias gregárias (VELOSO et al., 2014).

Por fim, este artigo também não relatou amostras positivas para o gênero *Trypanosoma*. A literatura demonstra que tripanosomatídeos de morcegos são diversos e geograficamente difundidos, várias espécies dentro deste grupo mudou independentemente de morcegos para mamíferos terrestres ao longo da evolução, com uma dessas mudanças dando origem a *T. c. cruzi* (HAMILTON et al., 2012). A prevalência encontrada no estado de Mato Grosso conforme Marcili et al. (2013) foi de 4,8% na região do Pantanal e 15,5% na região Amazônia/Cerrado. Por isso é importante que estudos similares como este são necessários, pois no Brasil ainda não é clara as espécies deste gênero que infectam os morcegos, portanto, é necessário que exista uma vigilância desses espécimes e os patógenos que eles albergam.

7. CONCLUSÃO

Devida a importância na disseminação de patógenos pelos morcegos este estudo teve como objetivo fazer a investigação molecular de microrganismos zoonóticos em morcegos possivelmente infectados, encontrando espécimes positivas para *Mycoplasma* spp. Embora mycoplasmas hemotrópicos não sejam caracterizados como zoonótico, nem qual seria a forma de transmissão ao homem, em face dos outros agentes pesquisados, estudos como este são essenciais para reconhecer e gerenciar os riscos do surgimento desses patógenos no pantanal mato-grossense.

REFERÊNCIAS

- ALANIO, A.; GITS-MUSELLI, M.; LANTERNIER, F.; STURNY-LECLÈRE, A.; BENAZRA, M.; HAMANE, S.; RODRIGUES, A.M.; GARCIA-HERMOSO, D.; LORTHOLARY, O.; DROMER, F.; BRETAGNE, S. Evaluation of a New *Histoplasma* spp. Quantitative RT-PCR Assay. **The Journal of molecular diagnostics**. [S.L.], v. 23, n. 6, p. 698–709, 2021.
- ALHO, C. J.; FISCHER, E.; OLIVEIRA-PISSINI, L. F.; SANTOS, C. F. (2011). Bat-species richness in the Pantanal floodplain and its surrounding uplands. **Brazilian journal of biology**, [S.L.], v. 71, n. 1, p. 311–320. 2011. <https://doi.org/10.1590/s1519-69842011000200010>
- ALLOCATI, N.; PETRUCCI, A.G.; DI GIOVANNI, P.; MASULLI, M.; DI ILIO, C.; DE LAURENZI, V. Bat-man disease transmission: zoonotic pathogens from wildlife reservoirs to human populations. **Cell death Discovery**. 2016.
- ALLTON, D.R.; RIVARD, R.G.; CONNOLLY, P.A. et al. Detection of Latin American strains of *Histoplasma* in a murine model by use of a commercially available antigen test. **Clin Vaccine Immunol**. [S.L.], v. 17, n. 5, p. 802-806. 2010.
- ALVES, F.M.; RANGEL, D.A.; VILAR, E.M.; PAVAN, M.G.; MORATELLI, R.; ROQUE, A.L.R.; JANSEN, A.M. *Trypanosoma* spp. Neobats: Insights about those poorly known trypanosomatids. **International journal for parasitology: Parasites and wildlife**. [S.L.], v. 16, p. 145-152. 2021.
- ANDRÉ, M. R.; ADANIA, C. H.; ALLEGRETTI, S. M.; MACHADO, R. Z. Hemoplasmas in wild canids and felids in Brazil. **J. Zoo Wildl. Med**, [S.L.], v. 42, p. 324–347. 2011. <https://doi.org/10.1638/2010-0198.1>.
- ANDRÉ, M.R.; DUMLER, J.S.; HERRERA, H.M.; GONÇALVES, L.R.; DE SOUSA, K.C.; SCORPIO, D.G.; DE SANTIS, A.C.; DOMINGOS, I.H.; DE MACEDO, G.C.; MACHADO, R.Z. Assessment of a quantitative 5' nuclease real-time polymerase chain reaction using the nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase gamma subunit (nuoG) for *Bartonella* species in domiciled and stray cats in Brazil. **Journal of feline medicine and surgery**. [S.L.], v.18, n. 10, p. 783–790. 2016.
- AUSTEN, J.M. & BARBOSA, A.D. (2021). Diversity and Epidemiology of Bat Trypanosomes: A One Health Perspective. **Pathogens**. [S.L.], v. 10, n. 9, p. 1148. 2021.
- BERGNER, L.M.; BECKER, D.J.; TELLO, C.; CARRERA, J.E.; STREICKER, D.G. Detection of *Trypanosoma cruzi* in the saliva of diverse neotropical bats. **Zoonoses and public health**, [S.L.], v. 68, n. 3, p. 271–276. 2021.
- BONATO, L.; FIGUEIREDO, M. A. P.; GONÇALVES, L. R.; MACHADO, R. Z.; ANDRÉ, M. R. Occurrence and molecular characterization of *Bartonella* spp. and hemoplasmas in neotropical primates from Brazilian Amazon, **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis**, [S.L.], v. 42, p. 15–20, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2015.09.001>.
- BILLETTER S. A. A Review of *Bartonella* Infections in California-Implications for Public and Veterinary Health. **Journal of medical entomology**, [S.L.], v. 59, n. 4, p. 1154–1163, 2022. <https://doi.org/10.1093/jme/tjac056>
- BRAGA, M. D. S. C. O.; GONÇALVES, L. R.; SILVA, T. M. V. D.; COSTA, F. B.; PEREIRA, J. G.; SANTOS, L. S. D.; CARVALHO NETA, A. V.; ARRUDA, R. C. N.; MESQUITA, E. T. K. C.; CHAVES, D. P.; MELO, F. A.; LOPES, J. L.; MARTINS, R. T. B.; LIMA, M. S.; AMARAL, R. B. D.; MACHADO, R. Z.; ANDRÉ, M. R. Occurrence of *Bartonella* genotypes in bats and associated Streblidae flies from Maranhão state, northeastern **Brazilian journal of veterinary parasitology**, [S.L.], v. 29, n. 4, e014420. 2020. <https://doi.org/10.1590/S1984-296120200>
- BRANDÃO, M.V.; GARBINO G.S.T.; SEMEDO, T.B.F.; FEIJÓ, A.; NASCIMENTO, F.O.; FERNANDES FERREIRA, H.; ROSSI, R.V.; DALPONTE, J.; CARMIGNOTTO, A.P. Mammals of Mato Grosso, Brazil: annotated species list and historical review. **Mastozoologia Neotropical**, [S.L.], v. 26, p. 263307. 2019.
- BRÖMEL, C.; & SYKES, J. E.. Histoplasmosis in dogs and cats. **Clinical techniques in small animal practice**, [S.L.], v. 20, n. 4, p. 227–232, 2005. <https://doi.org/10.1053/j.ctsap.2005.07.003>
- CASTELO-BRANCO, D.S.C.M.; NOBRE, J.A.; SOUZA, P.R.H.; DIÓGENES, E.M.; GUEDES, G.M.M.; MESQUITA, F.P.; SOUZA, P.F.N.; ROCHA, M.F.G.; SIDRIM, J.J.C.; CORDEIRO, R.A.;

MONTENEGRO, R.C. Role of Brazilian bats in the epidemiological cycle of potentially zoonotic pathogens. **Microbial pathogenesis**. 2023.

CHESLOCK, M. A. & M. E. EMBERS. 2019. Human bartonellosis: an underappreciated public health problem? **Trop. Med. Infect. Dis.** [S.L.], v. 4, n. 69. 2019.

CORREIA DOS SANTOS, L.; VIDOTTO, O.; DOS SANTOS, N.J.R.; RIBEIRO, J.; PELLIZZARO, M.; DOS SANTOS, A.P.; HAISI, A.; WISCHRAL JAYME VIEIRA, T.S.; DE BARROS FILHO, I.R.; CUBILLA, M.P.; ARAUJO, J.P.; JUNIOR DA COSTA VIEIRA, R.F.; ULLMANN, L.S.; BIONDO, A.W. Hemotropic mycoplasmas (hemoplasmas) in free-ranging bats from Southern Brazil. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**. 2020.

DARIO, M. A.; FURTADO, C.; LISBOA, C. V.; DE OLIVEIRA, F.; SANTOS, F. M.; D'ANDREA, P. S.; ROQUE, A. L. R.; XAVIER, S. C. D. C.; JANSEN, A. M. Trypanosomatid Richness Among Rats, Opossums, and Dogs in the Caatinga Biome, Northeast Brazil, a Former Endemic Area of Chagas Disease. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, [S.L.], v. 12, 851903, 2022. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.851903>

DESQUESNES, M.; GONZATTI, M.; SAZMAND, A.; THÉVENON, S.; BOSSARD, G.; BOULANGÉ, A.; GIMONNEAU, G.; TRUC, P.; HERDER, S.; RAVEL, S.; SERENO, D.; JAMONNEAU, V.; JITTAPALAPONG, S.; JACQUIET, P.; SOLANO, P.; BERTHIER, D. A review on the diagnosis of animal trypanosomoses. **Parasites & vectors**, [S.L.], v. 15, n. 1, p. 64, 2022. <https://doi.org/10.1186/s13071-022-05190-1>

DIAS, M.G.; OLIVEIRA, R.Z.; GIUDICE, M.C.; NETTO, H.M.; JORDÃO, L.R.; GRIGORIO, I.M.; TABORDA, C.P. Isolation of *Histoplasma capsulatum* from bats in the urban area of São Paulo State, Brazil. **Epidemiology & Infection**. [S.L.], v. 139, p. 1642–1644. 2011.

DÍAZ, M.; SOLARI, S.; GREGORIN, R.; AGUIRRE, L.; BARQUEZ, R. Clave de identificación de los murciélagos neotropicales_. Primera edición. **Ed Programa de Conservación de los Murciélagos de Argentina, Tucumán**. 2021.

DOS SANTOS, B.; LANGONI, H.; DA SILVA, R.C. et al. Molecular detection of *Histoplasma capsulatum* in insectivorous and frugivorous bats in Southeastern Brazil. **Med Mycol**. [S.L.], v. 56, n. 8, p. 937-940. 2018.

FONTALVO, M.C.; FAVACHO, A.R.M.; ARAUJO, A.C.; SANTOS, N.M.D.; OLIVEIRA, G.M.B.; AGUIAR, D.M.; LEMOS, E.R.S.; HORTA, M.C. *Bartonella* species pathogenic for humans infect pets, free-ranging wild mammals and their ectoparasites in the Caatinga biome, Northeastern Brazil: a serological and molecular study. **The Brazilian journal of infectious diseases** [S.L.], v. 21, n. 3, p. 290–296. 2017.

GARBINO, G.S.T.; GREGORIN, R.; LIMA, I.P.; LOUREIRO, L.; MORAS, L.M.; MORATELLI, R.; NOGUEIRA, M.R.; PAVAN, A.C.; TAVARES, V.C.; DO NASCIMENTO, M.C.; PERACCHI, AL. Comitê da Lista de Morcegos do Brasil—CLMB. **Sociedade Brasileira Para o Estudo de Quirópteros (Sbeq)**. 2020.

GONÇALVES, L. R., HERRERA, H. M., NANTES, W. A. G., SANTOS, F. M., PORFÍRIO, G. E. O., BARRETO, W. T. G., DE MACEDO, G. C., ASSIS, W. O., CAMPOS, J. B. V., DA SILVA, T. M. V., MARIANO, L. C., BARROS-BATTESTI, D. M., MACHADO, R. Z., & ANDRÉ, M. R. Genetic diversity and lack of molecular evidence for hemoplasma cross-species transmission between wild and synanthropic mammals from Central-Western Brazil. **Acta tropica**, [S.L.], v. 203, p. 105303. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105303>

HAMILTON, P.B.; TEIXEIRA, M.M.; STEVENS, J.R. (2012). The evolution of *Trypanosoma cruzi*: the 'bat seeding' hypothesis. **Trends in parasitology**. [S.L.], v. 28, n. 4, p. 136–141. 2012.

HAYMAN, D.T.; BOWEN, R.A.; CRYAN, P.M.; MCCRACKEN, G.F.; O'SHEA, T.J.; PEEL, A.J. Ecology of zoonotic infectious diseases in bats: current knowledge and future directions. **Zoonoses Public Health**. [S.L.], v. 60, p. 2–21. 2013.

HOARE, C.A. **The trypanosomes of mammals**. A zoological monograph. Oxford: Blackwell; 1972.

JIN, X.; GOU, Y.; XIN, Y.; LI, J.; SUN, J.; LI, T.; FENG, J. Advancements in understanding the molecular and immune mechanisms of *Bartonella* pathogenicity. **Frontiers in microbiology**, [S.L.], v. 14, 1196700, 2023. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1196700>

JUSTICE-ALLEN, A.; TRUJILLO, J.; GOODELL, G.; WILSON, D. Detection of multiple *Mycoplasma* species in bulk tank milk samples using real-time PCR and conventional culture and comparison of test sensitivities. **Journal of dairy science**, [S.L.], v. 94, n. 7, p. 3411–3419. 2011.

IKEDA, P.; SEKI, M.C.; CARRASCO, A.O.T.; RUDIÁK, L.V.; MIRANDA, J.M.D.; GONÇALVES, S.M.M.; HOPPE, E.G.L.; ALBUQUERQUE, A.C.A.; TEIXEIRA, M.M.G.; PASSOS, C.E.; WERTHER, K.; MACHADO, R.Z.; ANDRÉ, M.R. Evidence and molecular characterization of *Bartonella* spp. and hemoplasmas in neotropical bats in Brazil. **Epidemiology and infection**. [S.L.], v. 145, n. 10, p. 2038–2052. 2017.

IKEDA, P.; TORRES, J.M.; LOURENÇO, E.C.; ALBERY, G.F.; HERRERA, H.M.; DE OLIVEIRA, C.E.; MACHADO, R.Z.; ANDRÉ, M.R. Molecular detection and genotype diversity of hemoplasmas in non-hematophagous bats and associated ectoparasites sampled in peri-urban areas from Brazil. **Acta tropica**. 2022.

IRVING, A.T.; AHN, M.; GOH, G.; ANDERSON, D.E.; WANG, L.F. Lessons from the host defences of bats, a unique viral reservoir. **Nature**. [S.L.], v. 589, n. 7842, p. 363–370. 2021.

MARCILI, A.; DA COSTA, A. P.; SOARES, H. S.; ACOSTA, I.DAC.; DE LIMA, J. T.; MINERVINO, A. H.; MELO, A. T.; AGUIAR, D. M.; PACHECO, R. C.; GENNARI, S. M. (2013). Isolation and phylogenetic relationships of bat trypanosomes from different biomes in Mato Grosso, Brazil. **The Journal of parasitology**, [S.L.], v. 99, n. 6, p. 1071–1076. 2013. <https://doi.org/10.1645/12-156.1>

MCKEE, C.D.; BAI, Y.; WEBB, C.T.; KOSOY, M.Y. Bats are key hosts in the radiation of mammal associated *Bartonella* bacteria. **Infect Genet Evol**, [S.L.], v. 89, p. 104719. Jan 2021. doi: 10.1016/j.meegid.2021.104719.

MEDKOUR, H.; VARLOUD, M.; DAVOUST, B.; MEDIANNIKOV, O. New Molecular Approach for the Detection of Kinetoplastida Parasites of Medical and Veterinary Interest. **Microorganisms**. [S.L.], v. 8, n. 3, p. 356. 2020.

MEDELLÍN, R. A.; EQUIHUA, M.; AMIN, M. A. (2000). Bat Diversity and Abundance as Indicators of Disturbance in Neotropical Rainforests. **Conservation biology: the journal of the Society for Conservation Biology**, [S.L.], v. 14, n. 6, p. 1666–1675. 2000. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2000.99068.x>

MENOZZI, B.D.; DA PAZ, G.S.; PAIZ, L.M. et al. Rabies virus and *Histoplasma suramericanum* coinfection in a bat from southeastern Brazil. **Zoonoses Public Health**. [S.L.], v. 67, n. 2, p. 138-147. 2020.

MILLÁN, J.; DI CATALDO, S.; VOLOKHOV, D.V.; BECKER, D.J. Worldwide occurrence of haemoplasmas in wildlife: Insights into the patterns of infection, transmission, pathology and zoonotic potential. **Transboundary and emerging diseases**. [S.L.], v. 68, n. 6, p. 3236–3256. 2021.

MIRETZKI, M. Morcegos do estado do Paraná, Brasil (Mammalia, Chiroptera): riqueza de espécies, distribuição e síntese do conhecimento atual. **Pap. Avulsos Zool**, [S.L.], v. 6, p. 101–138, 2003. <https://doi.org/10.1590/S0031-10492003000600001>.

MOLYNEUX, D. H. Trypanosomes of bats. In Parasitic Protozoa, J. P Kreier and J. R Baker (eds). Academic Press, Waltham, Massachusetts, p. 95–223. 1991.

NABI, G.; WANG, Y.; LÜ, L.; JIANG, C.; AHMAD, S.; WU, Y.; LI, D. Bats and birds as viral reservoirs: A physiological and ecological perspective. **The Science of the total environment**, [S.L.], v. 754, p. 142372. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142372>

OKARO, U.; ADDISU, A.; CASANAS, B.; ANDERSON, B. *Bartonella* species, an emerging cause of blood-culture-negative endocarditis. **Clin. Microbiol. Rev**. [S.L.], v. 30, p. 709–746. 2017.

OLIVEIRA, R. P. A.; COLLERE, F. C. M.; FERRARI, L. D. R.; CORADI, V. D. S.; SOARES, N. A.; LEANDRO, A. S.; OLIVEIRA, W. F.; GALVÃO, S. R.; KAFKA, R.; DELAI, R. M.; MARTINI, R.; SALDANHA, A.; SANTOS, L. P. D.; CUBAS, Z. S.; LANGE, R. R.; VIEIRA, T. S. W. J.; VIEIRA, R. F. D. C. 'Candidatus *Mycoplasma haemoalbiventris*' and tick-borne pathogens screening in white-eared opossums (*Didelphis albiventris*) from Curitiba and Foz do Iguazu Cities, Paraná State, southern Brazil. **Brazilian journal of veterinary parasitology**, [S.L.], v. 30, n. 4, e009721. 2021. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612021072>

PATTERSON, B.D.; WILLIG, M.R.; STEVENS, R.D. Tropic strategies, niche partitioning, and patterns of ecological organization. In KUNZ, TH. and FENTON, MB., Ed. *Bat ecology*. Chicago, Illinois, USA: University of Chicago Press. 2001.

PITASSI, L. H.; DE PAIVA DINIZ, P. P.; SCORPIO, D. G.; DRUMMOND, M. R.; LANIA, B. G.; BARJAS-CASTRO, M. L. et al. *Bartonella* spp. bacteremia in blood donors from Campinas, Brazil. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, [S.L.], v. 9, e0003467. 2015. doi: 10.1371/journal.pntd.0003467

RAMÍREZ-FRÁNCEL, L. A.; GARCÍA-HERRERA, L. V.; LOSADA-PRADO, S.; REINOSO-FLÓREZ, G.; SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ, A.; ESTRADA-VILLEGAS, S.; LIM, B. K.; GUEVARA, G. Bats and their vital ecosystem services: a global review. **Integrative zoology**, [S.L.], v.17, n.1, p. 2–23. 2022. <https://doi.org/10.1111/1749-4877.12552>

SIKES, Robert S. 2016 Guidelines of the American Society of Mammalogists for the use of wild mammals in research and education. **Journal Of Mammalogy**, [S.L.], v. 97, n. 3, p. 663-688, 28 maio 2016. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jmammal/gyw078>.

TAYLOR, M.L.; CHÁVEZ-TAPIA, C.B.; VARGAS-YAÑEZ, R.; RODRÍGUEZ-ARELLANES, G.; PEÑA-SANDOVAL, G.R.; TORIELLO, C.; PÉREZ, A. & REYES-MONTES, M.R. Environmental conditions favoring bat infection with *Histoplasma capsulatum* in Mexican shelters. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, [S.L.], v. 61, n. 6, p. 914-919. 1999.

VELOSO, S.C.S.; FERREIRO, L.; PACHECO, S.M. et al. *Pneumocystis* spp. e *Histoplasma capsulatum* detectados em pulmões de morcegos das regiões Sul e Centro-Oeste do Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**. [S.L.], v. 42, n. 1, p. 1–7. 2014.

VOLOKHOV, D. V.; BECKER, D. J.; BERGNER, L. M.; CAMUS, M. S.; ORTON, R.J.; CHIZHIKOV, V. E.; ALTIZER, S.M.; STREICKER, D. G. Novel hemotropic mycoplasmas are widespread and genetically diverse in vampire bats. **Epidemiol. Infect**, [S.L.], v. 145, p. 1–14. 2017. <https://doi.org/10.1017/S095026881700231X>.

WANK, B. & LAZERA, M. Histoplasmoses clássica e africana. In: Micologiamédica à luz de autores contemporâneos. **Guanabara Koogan**, Rio de Janeiro, p. 222–236. 2004.

WECHTAISONG, W.; BONNET, S. I.; LIEN, Y. Y.; CHUANG, S. T.; TSAI, Y. L. Transmission of *Bartonella henselae* within *Rhipicephalus sanguineus*: Data on the Potential Vector Role of the Tick. **PLoS neglected tropical diseases**, [S.L.], v. 14, n.10, e0008664. Out 2020. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008664>

WHEAT, L. J.; AZAR, M. M.; BAHR, N. C.; SPEC, A.; RELICH, R. F.; HAGE, C. Histoplasmosis. **Infectious disease clinics of North America**, [S.L.], v. 30, n. 1, p. 207–227, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2015.10.009>

APENDICE A – ARTIGO SUBMETIDO À REVISTA

Molecular characterization of *Mycoplasma* spp. detected in bats from the north Pantanal, Brazil.

Caracterização Molecular de *Mycoplasma* spp. em morcegos coletados no estado do Mato Grosso, Brasil.

Nathalia de Assis Pereira¹ ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4045-9073>

Juliane Saldanha¹ ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-3983-7169>

Thiago B. F. Semedo² ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-4379-5993>

Sayanne L. Hatum¹ ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4086-2775>

Andréia Lima Tomé Melo³ ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7329-4255>

Thállitha Samih Wischral Jayme Vieira⁴ ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8631-2712>

Rafael Felipe da Costa Vieira⁵ ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6613-0287>

Daniel Moura de Aguiar¹ ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8631-522X>

¹Laboratório de Virologia e Rickettsioses, Faculdade de Medicina Veterinária FAVET- Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, Brasil. ² Departamento de Biologia, Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Porto, Portugal. ³ Departamento de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade de Cuiabá-UNIC. ⁴ Laboratório de Zoonoses e Epidemiologia Molecular da Universidade Federal do Paraná. ⁵ Departamento de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Paraná -UFPR e Ciência Animal Universidade Estadual de Londrina – UEL.

Abstract

Bats can harbor a wide variety of microorganisms and several factors contribute to their being carriers and disseminators of potentially zoonotic pathogens, such as the ability to make long flights, ease in adapting to the most diverse environments, close contact with humans and domestic animals in urban areas, longevity and reduced susceptibility to various pathogens. In this study, a molecular investigation of *Mycoplasma* spp. was carried out on bats of different species captured in different regions of the north Pantanal of Mato Grosso, the samples obtained were subjected to a screening with qPCR for the gene 16S-23S. Positive samples were then subjected to a conventional PCR with genus-specific primers targeting a portion (900 bp) of the 16S rRNA gene of hemotropic *Mycoplasma* spp. and then to a genus-specific PCR assay targeting a fragment (800 bp) of the 23S rRNA. The obtained 16S rRNA and 23SrRNA sequences showed to be clustering with other bat-associated hemoplasmas and a sequence of

45 *Herpestes javanicus*. Therefore, due to the importance in the dissemination of pathogens by
46 bats, it is essential to recognize and manage the risks of the emergence of hemoplasmas in the
47 Pantanal of Mato Grosso.

48 **Keywords:** Bats, Hemoplasmas, qPCR, Pantanal.

49 **Resumo**

50 Os morcegos podem abrigar uma grande variedade de microrganismos e diversos fatores
51 contribuem para que eles sejam portadores e disseminadores de patógenos potencialmente
52 zoonóticos, como a capacidade de fazer longos voos, facilidade para se adaptar aos mais diversos
53 ambientes, contato próximo com humanos e animais domésticos em áreas urbanas, longevidade
54 e suscetibilidade a vários patógenos, permanecendo assintomático na maior parte do tempo. Neste
55 estudo foi realizada uma investigação molecular para *Mycoplasma* spp. em morcegos capturados
56 em 5 municípios de diferentes regiões de Mato Grosso, as amostras obtidas destes animais
57 submetidas a uma triagem com Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR) para o
58 gene 16S-23S, os animais positivos, morcegos da espécie *Glossophaga soricina*, *Molossus* sp. e
59 *Desmodus rotundus*, foram então submetidos a uma PCR convencional com primers gênero-
60 específicos visando uma porção (900 pb) do gene 16S rRNA do hemotrópico *Mycoplasma* spp. e
61 depois para um ensaio de PCR gênero-específicos visando um fragmento (800 pb) do rRNA 23S.
62 Portanto, é fundamental elucidar a distribuição desses hospedeiros no estado de Mato Grosso para
63 facilitar a implementação de uma vigilância eficaz contra um possível surto de hemoplasmas na
64 população humana.

65 **Palavras-chave:** Morcegos, Zoonoses, qPCR.

66

67

68 **Introduction**

69

70

71 Bats are the mammals with the most species-rich taxonomic group in the tropics
72 (PATTERSON et al., 2001), this diversity is accompanied by its wide geographic distribution,
73 which excludes only polar regions or those with extreme desert climates and some islands in the
74 oceans (IRVING et al., 2021). There are environmental factors that limit the occurrence and
75 abundance of some species, including habitat heterogeneity, seasonality and conservation status
76 (ALHO et al., 2011). Bats harbor a diversity of pathogens, which include viruses, bacteria,
77 protozoa and fungi, and are also resistant to a range of infections (IRVING et al., 2021). In the
78 state of Mato Grosso, there are records of around 99 species of bats (BRANDÃO et al., 2019).

79 Among the bacteria harbored by bats, *Mycoplasma* (group of hemotropic mycoplasmas)
80 have stood out due to the importance of being one of the most reported zoonotic bacteria in Brazil
81 in the last decade (CASTELO-BRANCO et al., 2023), they are gram-negative bacteria belonging
82 to the order Mycoplasmatales, family Mycoplasmataceae, genus *Mycoplasma* (IKEDA et al.,

83 2017). It is known that these pathogens cause manifestations ranging from asymptomatic to
84 chronic diseases, as well as severe hemolytic anemia due to their ability to adhere to the surface
85 of erythrocytes, causing indentation or deformation of the target cell membrane (MILLÁN et al.,
86 2021), the severity of the disease depends on the genotype or species involved. (IKEDA et al.,
87 2022).

88 In Brazil, hemoplasma infections have been reported in wild animals such as canines,
89 felines, non-human primates and in hematophagous and non-hematophagous bats (ANDRÉ et al.,
90 2011; BONATO et al., 2015; CORREIA DOS SANTOS et al., 2020).

91 Hematophagous arthropods such as fleas and ticks have been proposed as natural vectors
92 of this genus, however, vertebrate hosts can also be infected in several ways, including
93 subcutaneous, intravenous, intraperitoneal and oral inoculation of contaminated blood
94 (CORREIA DOS SANTOS et al., 2020). Metagenomic analyzes have also demonstrated the
95 presence of hemoplasmas in the saliva of vampire bats, suggesting the possibility of direct
96 transmission through bites from these animals (VOLOKHOV et al., 2017).

97 Studies involving molecular epidemiology are essential to clarify the origin and
98 transmission flow of pathogens in natural cycles, which is useful for the development of effective
99 surveillance and control measures in the context of zoonoses and in veterinary clinics, thus being
100 able to carry out a monitoring in exposed regions and populations (MENOZZI et al., 2019).

101 Thus, this study, whose main objective was to carry out a molecular investigation of
102 *Mycoplasma* spp. in bats that inhabit different regions of Mato Grosso, to have knowledge about
103 the distribution of this pathogen in the region studied, so that it is possible to avoid possible
104 outbreaks of disease transmitted by these bacteria to other animals or even the human population.

105

106 **Materials and Methods**

107

108 The biological materials used in the research come from collections carried out for the
109 project “Monitoring SARS-COV-2, Coronavirus and Influenza virus in the Pantanal”, authorized
110 by the Ethics Committee on the Use of Animals under protocol No. 23108.085496/2020-32. This
111 study was conducted with 157 bat samples collected in the municipalities of Cuiabá, Santo
112 Antônio do Leverger, Nobres, Poconé and Barão de Melgaço in Mato Grosso, Brazil during the
113 period from February to August 2021. These locations were selected because they represent
114 different environments, good state of preservation, knowledge of the fauna present, in addition to
115 proximity to urban centers.

116 The collection methods used to capture these specimens consisted of active search with
117 the aid of a puçá and mist net, after capture they were placed in silk bags until their taxonomic
118 identification according to Díaz et al. (2021). After identification, the collected bats were
119 euthanized following the guidelines of the regional Veterinary Medicine council of our state, Mato

120 Grosse. The samples were collected from these animals and stored in cryotubes, placed in liquid
121 nitrogen and transported to the Virology and Rickettsioses laboratory at the Federal University of
122 Mato Grosso so that they could then be stored at – 80 °C. DNA extraction was performed with a
123 20 mg fragment of the lung, using the MagMAX™ CORE nucleic acid purification kit (Applied
124 Biosystems™, South San Francisco, CA, USA) following the manufacturer's instructions.

125 Real-time PCR (qPCR) assay for *Mycoplasma* spp. with SYBER reagents (PowerTrack®
126 SYBR Green Master Mix, Applied Biosystems™, South San Francisco, CA, USA) following
127 the manufacturer's instructions, the primers used in this study were forward (5-
128 AGCAATRCCATGTGAACGATGAA-3) and reverse (5-
129 TGGCACATAGTTTGCTGTCACCTT-3) according to Justice-Allen et al (2011). The positive
130 bats were then then subjected to a conventional PCR with genus-specific primers targeting a
131 portion (900 bp) of the 16S rRNA gene of hemotropic *Mycoplasma* spp. and then to a genus-
132 specific PCR assay targeting a fragment (800 bp) of the 23S rRNA according to Oliveira et al.
133 (2021).

134 PCR products from Mycoplasma-positive samples were loaded onto 1% agarose gels
135 stained with GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, Fremont, CA) and visualized on a
136 ChemiDoc XRS system (Bio-Rad, Hercules, CA). Amplicons of expected size were purified using
137 the Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit (GE Healthcare, Chicago, IL) and
138 prepared for sequencing with the BigDye™ kit (Applied Biosystems, Foster, CA). An ABI-
139 PRISM 3500 genetic analyzer (Applied Biosystems, Foster, CA) was employed for sequencing
140 procedures with the same primers used for conventional PCR.

141 The sequences obtained from the Geneious Prime® 2019.1.1 software (Biomatters, USA)
142 were compared with the DNA database using the BLAST® algorithm (version 2.8.0) from the
143 National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>) to determine the closest identities to generic
144 organisms available in GenBank®.

146 The sequences of the 23S and 16S genes were aligned by the MUSCLE program, using
147 the Geneious software (Biomatters Ltd.), with 19 sequences from *Mycoplasma* spp. from different
148 parts of the world, available on Genbank: HM138663.1 (23S), N_076944.1(23S), MN692881.1
149 (23S), OL963932.1 (23S), OR753267.1 (23S), OQ518944.1 (23S)), OQ407836.1 (16S),
150 MH245175.1 (16S), OR016505.1 (16S), MK353861.1 (16S) and MN710412.1 (16S). 387
151 characters from the 23S gene and 622 characters from the 16S gene were aligned. The
152 phylogenetic tree was inferred by the Neighbor-Joining method using the Geneious software with
153 the Tamura-Nei surrogate model. Observed values represent the percentage of 1000 resampling
154 bootstrap. The *Ureaplasma parvum* sequence (NR_076563.1) was included as an outgroup in the
155 phylogenetic tree of the 23S gene.

157 Results

158 The collected bats belonged to the order Chiroptera and the families Phyllostomidae,
159 Molossidae, Noctilionidae, Vespertilionidae, Mormoopidae and Emballonuridae. Among them,
160 the Phyllostomidae family obtained the largest number of specimens (104) belonging to the
161 species: *Carollia perspicillata* (17), *Glossophaga soricina* (45), *Platyrrhinus lineatus* (18),
162 *Desmodus rotundus* (13) and *Noctilio albiventris* (11), of the total bats collected 87 were females
163 and 70 were males.

164 Regarding feeding habits, nectarivorous (45), frugivorous (43), insectivorous (31),
165 omnivorous (26) and blood-feeding (13) bats were captured, and the specimens belonged to small
166 and medium-sized gregarious colonies, they belonged to the municipalities of Cuiabá (4), Santo
167 Antônio de Leverger (96), Nobres (9), Poconé (40) and Barão de Melgaço (8). The largest number
168 of animals sampled were in the municipality of Santo Antônio de Leverger, this is due to the
169 greater number of collection sites in this region.

170 Regarding collection methods, 107 (68.2%) bats were collected through active search with
171 a puça and 50 (31.8%) specimens were collected through mist nets. Of the 157 bats sampled, only
172 4 specimens could not be identified to the species, with the following genera being identified:
173 *Carollia* (1), *Lophostoma* (1), *Macrophyllum* (1) and *Pteronotus* (1).

174 A total of 5 samples positive for *Mycoplasma* spp. were detected in qPCR assays with
175 amplification of the 16-23S gene of the bacteria, according to Table 1 containing data on positive
176 specimens, the municipalities in which they were found consisted of Santo Antônio do Leverger
177 (3) and Poconé (2), the species in which the pathogen was detected: *Glossophaga soricina*,
178 *Molossus* sp., *Desmodus rotundus* and a species from the Molossidae family that cannot be
179 identified. The bats were all adults and mostly female (3/5).

180

181 Table 1. Data from samples positive for *Mycoplasma* spp.

Identification	Family	Species	Municipality	Genbank Access (Identity in Blast)
21MT1C155	Phyllostomidae	<i>Glossophaga soricina</i>	Poconé	OR753267.1 (93.17%)
21MT1C172	Phyllostomidae	<i>Glossophaga soricina</i>	Santo Antônio do Leverger	OR753267.1 (91.30%)
21MT1C289	Molossidae	<i>Molossus</i> sp.	Santo Antônio do Leverger	OQ359166.1 (99.83%)
21MT1C295	Phyllostomidae	<i>Desmodus rotundus</i>	Poconé	OR753267.1 (99.58%)
21MT1C122	Molossidae	Not identified	Santo Antônio do Leverger	MH245175.1 (99.03%)

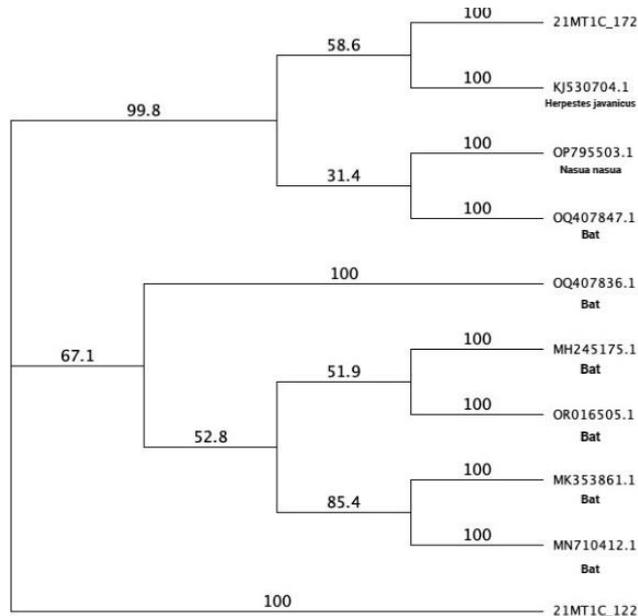
182

183 The consensus sequence of samples positive for *Mycoplasma* spp. underwent multiple
184 alignments with sequences selected from GenBank® using the Geneious Prime® software
185 (version 2019.1.1, Biomatters, USA), resulting in the phylogenetic trees corresponding to figures
186 1 and 2. In the phylogenetic tree represented by figure 1 we can observe that the samples
187 21MT1C155, 21MT1C172, 21MT1C289 and 21MT1C295 have sequences similar to other
188 *Mycoplasmas* found in bats (OR75367.1 and OQ359466.1) previously deposited in the
189 GenBank® database.

190 Sequencing generated sequences of 500 and 700 nucleotides for the 23S and 16S genes.
191 The nucleotide sequence presented identities ranging from 98.7% to 99.9% against different
192 Mycoplasma sequences, they underwent multiple alignments with sequences selected from
193 GenBank® using the Geneious Prime® software (version 2019.1.1, Biomatters, USA), resulting
194 in the phylogenetic trees corresponding to figures 1 and 2. The samples were deposited in
195 GenBank® under accessions PP193952, PP194257, PP194256, PP197661 and PP197662.

196 Figure 1 represents the phylogenetic tree that demonstrates the similarity and high
197 bootstrap of sample 21MT1C172 with a clade close to a sequence of Javan Mongoose (*Herpestes*
198 *javanicus*), whereas in figure 2, based on the similarity and high bootstrap values, it was observed
199 that samples 21MT1C155, 21MT1C172, 21MT1C289 and 21MT1C295 were grouped into two
200 clades close to other sequences detected in bats (OR75367.1 and OQ359466.1) previously
201 deposited in the GenBank® database.

202

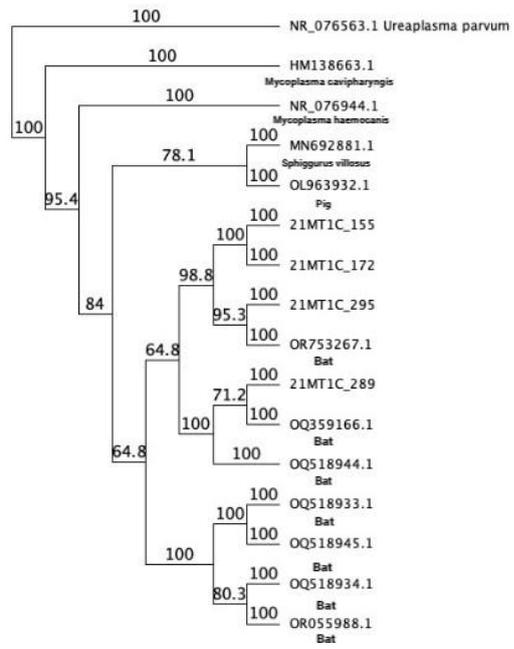


203

204

205

Figure 1: Phylogenetic tree of samples 21MT1C172 and 21MT1C122.



206

207

208

Figure 2: Phylogenetic tree of samples 21MT1C155, 21MT1C172, 21MT1C295 and 21MT1C289

209

210 **Discussion**

211 Bats are important mammals that play an essential role in maintaining ecosystems, they
212 contribute to the maintenance of environmental stability through the control of insect pests,
213 pollination, seed dispersal and production of guano as a fertilizer for plants (RAMÍRES-
214 FRANCELO et al., 2022).

215 According to Miretzki (2003), in an ecological study carried out in Curitiba, bat species
216 were reported and classified into five families, of which the Phyllostomidae family was present
217 with the greatest abundance of species (47%), followed by Molossidae (24%), Vespertilionidae
218 (23 %), Noctilionidae (4%) and Emballonuridae (2%). These results are similar to those found in
219 this study, where for the Phyllostomidae family the greatest diversity and quantity of specimens
220 were sampled (75.1%), followed also by the Molossidae (9.5%), but as the third most collected
221 family we had the Noctilionidae (7%), and then Vespertilionidae (3.8%) and Emballonuridae
222 (3.8%) with the same number of bats classified in these families.

223 Another study conducted by Alho et al. (2010) in the Pantanal of Mato Grosso, where bats
224 were sampled between 1994 and 2007, also demonstrated that the families most found and with
225 the greatest species diversity were Phyllostomidae and Molossidae. High numbers of the
226 Phyllostomidae family may represent a good indicator of low levels of habitat disturbance, as this
227 family is well diversified in terms of number of species and feeding habits (MEDELLÍN et al.,
228 2000). In this study, the collection areas were chosen as locations with good environmental
229 preservation, which agrees with the author mentioned above.

230 Regarding the *Mycoplasma* genus, a total of five positive samples were detected in the bat
231 species *Glossophaga soricina* (21MT1C155 and 21MT1C172), *Molossus* sp. (21MT1C289),
232 *Desmodus rotundus* (21MT1C295) and a species from the Molossidae family that cannot be
233 identified (21MT1C122). The positive specimens were collected in the municipalities of Santo
234 Antônio do Leverger and Poconé, this may have occurred due to the greater number of collections
235 in these areas.

236 According to a study conducted by Ikeda et al. (2017), at the time, the detection of a bat
237 from the Molossidae family positive for hemoplasmas was reported in the Mato Grosso region,
238 bats positive for hemoplasmas were also found in the species *G. soricina*, but in other states of
239 Brazil, this being the second species of bat in which the bacteria was most found in this assay, in
240 this present study there was the molecular detection of *Mycoplasma* spp. both in the Molossidae
241 family and in the Phyllostomidae family. Later Ikeda et al. (2022) carried out a new study in the
242 Mato Grosso region, finding 43% of the bats sampled positive for hemoplasmas, among the
243 positive species was *G. soricina*, thus being closer to the results of this work.

244 Correia dos Santos (2020) in the southern region of Brazil found bats positive for

245 hemoplasmas in the species *Desmodus rotundus*, *Diphylla ecaudata* and *Molossus* sp., therefore
246 also finding the agent in bats from the families Phyllostomidae and Molossidae, corroborating the
247 findings of this study once again. Therefore, studies like this, which involve the bacterial cycles of
248 *Mycoplasma* spp. in nature, its genetic diversity, identification of hosts, vectors and distribution of
249 species in each ecotope are of great importance (GONÇALVES et al., 2020).

250 The sequences obtained through phylogenetic analyzes when compared in the GenBank®
251 database resulted in *Mycoplasma* species found in bats, with the exception of sample 21MT1C122,
252 which was found in a different clade from the rest of the samples, unfortunately it was not possible
253 to reach a specie of *Mycoplasma*, this is due to the difficulty of cultivating this bacterium in vitro,
254 as hemotropic mycoplasmas do not have many of the metabolic pathways associated with energy
255 production and synthesis of cellular components found in other bacteria, they are totally dependent
256 on erythrocytes and host growth factors, many of which are unknown (MILLÁN et al., 2021).

257

258 **Conclusion**

259 Due to the importance in the dissemination of pathogens by bats, this study aimed to carry
260 out a molecular investigation for *Mycoplasma* spp., finding 5 positive specimens in the population
261 sampled, although hemotropic mycoplasmas are not characterized as zoonotic, nor what would be
262 the form of transmission to humans, studies like this are essential to recognize and manage the
263 risks of the emergence of this pathogen in the Pantanal of Mato Grosso.

264 **References**

- 265 Alho CJ, Fischer E, Oliveira-Pissini LF, Santos CF. Bat-species richness in the Pantanal
266 floodplain and its surrounding uplands. *Braz J Biol.* 2011;71(1 Suppl 1):311-320.
267 <https://doi.org/10.1590/s1519-69842011000200010>
268
- 269 André MR, Adania CH, Allegretti SM, Machado RZ. Hemoplasmas in wild canids and felids in
270 Brazil. *J Zoo Wildl Med.* 2011;42(2):342-347. <https://doi.org/10.1638/2010-0198.1>
271
- 272 Bonato L, Figueiredo MA, Gonçalves LR, Machado RZ, André MR. Occurrence and molecular
273 characterization of Bartonella spp. and hemoplasmas in neotropical primates from Brazilian
274 Amazon. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2015; 42:15-20.
275 <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2015.09.001>
276
- 277 Brandão MV, Garbino GST, Semedo TBF, Feijó A, Nascimento FO, et al. Mammals of Mato
278 Grosso, Brazil: annotated species list and historical review. *Mastozoologia Neotropical* 2019;
279 26: 263307.
280
- 281 Castelo-Branco DSCM, Nobre JA, Souza PRH, et al. Role of Brazilian bats in the
282 epidemiological cycle of potentially zoonotic pathogens. *Microb Pathog.* 2023; 177:106032.
283 <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2023.106032>
284
- 285 Correia Dos Santos L, Vidotto O, Dos Santos NJR, et al. Hemotropic mycoplasmas
286 (hemoplasmas) in free-ranging bats from Southern Brazil. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.*
287 2020; 69:101416. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2020.101416>
288
- 289 Díaz M, Solari S, Gregorin R, Aguirre L, Barquez R. Clave de identificación de los murciélagos
290 neotropicales. Primera edición. Ed Programa de Conservación de los Murciélagos de Argentina,
291 Tucumán. 2021.
292
- 293 Gonçalves LR, Herrera HM, Nantes WAG, et al. Genetic diversity and lack of molecular
294 evidence for hemoplasma cross-species transmission between wild and synanthropic mammals
295 from Central-Western Brazil. *Acta Trop.* 2020; 203:105303.
296 <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105303>
297
- 298 Justice-Allen A, Trujillo J, Goodell G, Wilson D. Detection of multiple Mycoplasma species in
299 bulk tank milk samples using real-time PCR and conventional culture and comparison of test
300 sensitivities. *J Dairy Sci.* 2011;94(7):3411-3419. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3940>
301
- 302 Ikeda P, Seki MC, Carrasco AOT, et al. Evidence and molecular characterization of Bartonella
303 spp. and hemoplasmas in neotropical bats in Brazil. *Epidemiol Infect.* 2017;145(10):2038-2052.
304 <https://doi.org/10.1017/S0950268817000966>
305
- 306 Ikeda P, Torres JM, Lourenço EC, et al. Molecular detection and genotype diversity of
307 hemoplasmas in non-hematophagous bats and associated ectoparasites sampled in peri-urban
308 areas from Brazil. *Acta Trop.* 2022; 225:106203.
309 <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2021.106203>
310
- 311 Irving AT, Ahn M, Goh G, Anderson DE, Wang LF. Lessons from the host defences of bats, a
312 unique viral reservoir. *Nature.* 2021;589(7842):363-370. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-03128-0>
313
314
- 315 Medellín RA, Equihua M, Amin MA. Bat Diversity and Abundance as Indicators of
316 Disturbance in Neotropical Rainforests. *Conserv Biol.* 2000;14(6):1666-1675.

317 <https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2000.99068.x>
318
319 Menozzi BD, Da Paz GS, Paiz LM. et al. Rabies virus and *Histoplasma suramericanum*
320 coinfection in a bat from southeastern Brazil. *Zoonoses Public Health*. 2020; 67(2): 138-147.
321 <https://doi.org/10.1111/zph.12663>
322
323 Millán J, Di Cataldo S, Volokhov DV, Becker DJ. Worldwide occurrence of haemoplasmas in
324 wildlife: Insights into the patterns of infection, transmission, pathology and zoonotic
325 potential. *Transbound Emerg Dis*. 2021;68(6):3236-3256. <https://doi.org/10.1111/tbed.13932>
326
327 Miretzki M. Morcegos do estado do Paraná, Brasil (Mammalia, Chiroptera): riqueza de
328 espécies, distribuição e síntese do conhecimento atual. *Pap. Avulsos Zool*. 2003; 6: 101-138.
329 <https://doi.org/10.1590/S0031-10492003000600001>.
330
331 Oliveira RPA, Collere FCM, Ferrari LDR, et al. 'Candidatus Mycoplasma haemoalbiventris' and
332 tick-borne pathogens screening in white-eared opossums (*Didelphis albiventris*) from Curitiba
333 and Foz do Iguaçu Cities, Paraná State, southern Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet*.
334 2021;30(4):e009721. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612021072>
335
336 Patterson BD, Willig MR, Stevens RD. Tropic strategies, niche partitioning, and patterns of
337 ecological organization. In Kunz TH. and Fenton MB, Ed. *Bat ecology*. Chicago, Illinois, USA:
338 University of Chicago Press. 2001.
339
340 Ramírez-Fráncel LA, García-Herrera LV, Losada-Prado S, et al. Bats and their vital ecosystem
341 services: a global review. *Integr Zool*. 2022;17(1):2-23. [https://doi.org/10.1111/1749-](https://doi.org/10.1111/1749-4877.12552)
342 [4877.12552](https://doi.org/10.1111/1749-4877.12552)
343
344 Volokhov DV, Becker DJ, Bergner LM, et al. Novel hemotropic mycoplasmas are widespread
345 and genetically diverse in vampire bats. *Epidemiol Infect*. 2017;145(15):3154-3167.
346 <https://doi.org/10.1017/S095026881700231X>

APENDICE B – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO A REVISTA

ScholarOne Manuscripts™ Daniel Aguiar English (US) Instructions & Forms Help

 Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária

[Home](#) [Author](#) [Review](#)

[Author Dashboard](#) / [Submission Confirmation](#)

Submission Confirmation

Thank you for your submission

Submitted to Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária

Manuscript ID RBPV-2024-0022

Title Molecular characterization of Mycoplasma spp. detected in bats from the north Pantanal, Brazil.

Authors de Assis Pereira, Nathalia
Saldanha, Juliane
Semedo, Thiago
de Almeida, Sayanne
Melo, Andréia
Santos, Nayara
Vieira, Thallitha
Vieira, Rafael
Aguiar, Daniel

Date Submitted 02-Feb-2024

APENDICE C – CLASSIFICAÇÃO DA REVISTA

Revista Brasileira de
Parasitologia Veterinária
Brazilian Journal of Veterinary Parasitology

 Open Access

Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária

Publicação de: **Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária**

Área: Ciências Biológicas

Versão impressa ISSN: 0103-846X Versão on-line ISSN: 1984-2961

Qualis Periódicos

* Evento de Classificação:

CLASSIFICAÇÕES DE PERIÓDICOS QUADRIÊNIO 2017-2020 ▾

Área de Avaliação:

MEDICINA VETERINÁRIA ▾ +

ISSN:

0103-846X

Título:

Classificação:

-- SELECIONE -- ▾

[Consultar](#) [Cancelar](#)

Periódicos

ISSN	Título	Área com publicação no quadriênio	Classificação	Área mãe
0103-846X	REVISTA BRASILEIRA DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA (IMPRESSO)	MEDICINA VETERINÁRIA	A2	MEDICINA VETERINÁRIA