

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Daniele da Silva

**ESTUDO DAS INTERAÇÕES PARASITOS-HOSPEDEIRO EM
MORCEGOS PROVINDOS DE AMBIENTES URBANOS NO
RIO GRANDE DO SUL, BRASIL**

Santa Maria, RS
2024

Daniele da Silva

ESTUDO DAS INTERAÇÕES PARASITOS-HOSPEDEIRO EM MORCEGOS
PROVINDOS DE AMBIENTES URBANOS NO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutora em Medicina Veterinária**.

Orientador: Prof. Dr. Luís Antônio Sangioni

Santa Maria, RS

2024

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Silva, Daniele da
ESTUDO DAS INTERAÇÕES PARASITOS-HOSPEDEIRO EM MORCEGOS
PROVINDOS DE AMBIENTES URBANOS NO RIO GRANDE DO SUL,
BRASIL / Daniele da Silva.- 2024.
91 p. ; 30 cm

Orientadora: Luís Antônio Sangioni
Coorientadora: Sônia de Ávila Botton
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós
Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2024

1. Ectoparasitos 2. Diagnóstico molecular 3. Quiróptero
4. Ácaros 5. Protozoários I. Sangioni , Luís Antônio II.
Botton, Sônia de Ávila III. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, DANIELE DA SILVA, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Tese) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Daniele da Silva

**ESTUDO DAS INTERAÇÕES PARASITOS-HOSPEDEIRO EM MORCEGOS
PROVINDOS DE AMBIENTES URBANOS NO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutora em Medicina Veterinária**.

Aprovada em 11 de março de 2024:

Luís Antônio Sangioni, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Elizabete Captivo Lourenço, Dra. (UERJ)

Fernanda Silveira Flores Vogel, Dra. (UFSM)

Helton Fernandes dos Santos, Dr. (UFSM)

Maurício Cláudio Horta, Dr. (UNIVASF)

Santa Maria, RS
2024

Dedico

À memória do meu pai, Valdomiro, que me ensinou a amar a natureza.

A minha mãe, Maria, que me instigou a lutar pelos meus sonhos.

A minha irmã, Karine, pelo amor e apoio incondicional.

A minha amada sobrinha Júlia, que colore, ilumina e alegra os meus dias.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, ao meu anjo da guarda, aos meus guias e a toda a espiritualidade por me concederem a vida, a saúde e todas as oportunidades que tenho recebido.

Expresso minha gratidão à Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) e ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (PPGMV), pela valiosa oportunidade de aprendizado e pelo meu crescimento pessoal, intelectual e profissional. Desde a infância, nutro o sonho de estudar Medicina Veterinária nesta instituição, e é com imenso orgulho que concluo mais uma etapa importante em minha jornada educacional.

Agradeço aos órgãos de fomento, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro em nossas pesquisas.

Agradeço à equipe de professores (as), funcionários (as), estagiários (as), e pós graduandos (as) do Laboratório de Doenças Parasitárias (LADOPAR-UFSM), Laboratório de Doenças Bacterianas (LABAC-UFSM) e Setor de Virologia (SV-UFSM) pela estrutura e pelo apoio fornecidos para a execução do experimento.

Agradeço ao Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF-Eldorado do Sul/RS) pelo armazenamento das amostras utilizadas na pesquisa e identificação dos animais e ao Centro Estadual de Vigilância Sanitária (CEVS-RS) pelo consentimento para utilização dos animais na pesquisa.

Agradeço ao meu orientador Luís Antônio Sangioni, por abrir as portas do LADOPAR para mim e tornar possível a realização deste sonho. Agradeço sinceramente por ser a orientação essencial ao longo dos anos de doutorado, refinando minhas ideias, guiando meus estudos e corrigindo quando necessário.

Agradeço às Professoras Juliana Felipetto Cargnelutti, Fernanda Silveira Flores Vogel e Sônia de Ávila Botton e à Técnica em Assuntos Educacionais Patricia Bräunig por sua assistência na execução das técnicas moleculares, pela ajuda diante das dificuldades que surgiram ao longo do caminho e pela revisão dos trabalhos.

Expresso meu sincero agradecimento ao Professor Luis Felipe Dias Lopes pelo inestimável auxílio com as análises estatísticas. Sua gentileza, expertise e orientação foram fundamentais para o sucesso deste trabalho.

Agradeço ao Professor Marcelo Bahia Labruna, pelo suporte prestado para esclarecer as dúvidas relacionadas à pesquisa com *Rickettsia* spp. e por disponibilizar as alíquotas de *R. vinni*.

Gostaria de expressar meu agradecimento especial a Elizabete Lourenço, cuja incansável colaboração na pesquisa dos ectoparasitos, tanto na sua identificação quanto nas revisões e sugestões na pesquisa desempenharam papel fundamental para a conclusão deste trabalho.

Expresso minha gratidão ao Wilson Roth pela gentileza ao emprestar os computadores, pelo auxílio no uso das tecnologias e, sobretudo, pelo apoio e momentos que compartilhamos.

Agradeço ao tio Jairo da Rosa e a tia Eleonice da Rosa pelo apoio, acolhimento e por todos os ensinamentos.

Agradeço sinceramente a todas as pessoas que estiveram ao meu lado, seja através de orações ou participando e enfrentando corajosamente comigo uma das batalhas mais desafiadoras que vivi até o momento. Expresso minha profunda gratidão à minha família, pois sei que posso sempre contar com o apoio de vocês, e em especial a Rosangela Fellipe e ao Rafael Santini. Agradeço pelo acolhimento, carinho, compreensão e empatia, bem como pela incansável e generosa assistência que me proporcionaram, além das inúmeras conversas significativas que tivemos. Foi graças a vocês que esta etapa do meu percurso se tornou menos árdua, apontando o caminho para minha plena recuperação.

Agradeço de coração aos meus colegas: Fabiana Raquel Ratzlaff, não apenas por ser o elo que me conduziu ao LADOPAR, mas também por nossa amizade. As longas e enriquecedoras conversas que tivemos desde o mestrado, persistindo durante o doutorado, tenho a convicção de que permanecerão ao longo do tempo. Quero expressar minha sincera gratidão ao Fagner D'Ambroso, Vanessa Osmari e Gisele Samoel pela incansável colaboração na elaboração dos manuscritos, pelos finais de semana dedicados ao trabalho no laboratório e, acima de tudo, pela valiosa amizade que compartilhamos.

Quero expressar minha gratidão aos colegas do LADOPAR e LABAC pelo ambiente de trabalho excepcional, que é tanto agradável quanto divertido. O esforço e dedicação de cada um de vocês desempenham um papel fundamental no bom funcionamento dos laboratórios, criando assim um ambiente propício e saudável para que todos possam realizar suas pesquisas com sucesso.

“Não é o crítico que importa. Nem aquele que aponta onde foi que tropeçamos ou como poderíamos ter feito melhor. O crédito pertence a quem está por inteiro na arena da vida, cujo rosto está manchado de poeira, suor e lágrimas. A quem luta bravamente, erra, decepciona, pois não há esforço sem erros e decepções, mas que, na verdade, se empenha em seus feitos. Que conhece o entusiasmo, as grandes paixões, que se entrega a uma causa digna, que, na melhor das hipóteses, conhece no final o triunfo da grande conquista e que, na pior, se fracassar, ao menos fracassa ousando grandemente.”

Adaptado de “O homem na arena” - Theodore Roosevelt

RESUMO

ESTUDO DAS INTERAÇÕES PARASITOS-HOSPEDEIRO EM MORCEGOS PROVINDOS DE AMBIENTES URBANOS NO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL

AUTORA: Daniele da Silva

ORIENTADOR: Luís Antônio Sangioni

O presente trabalho investigou o parasitismo em morcegos provenientes de áreas urbanas de 34 municípios do Rio Grande do Sul. Os animais avaliados foram obtidos do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor, encaminhados pelo Centro Estadual de Vigilância em Saúde, para a realização dos testes diagnósticos da raiva, durante o período de 2016 a 2021. Dos 109 animais pesquisados, 35,8% (39/109) apresentaram ectoparasitos, com uma média de 9,9 parasitos por animal. Foram recuperados um total de 385 ectoparasitos, incluindo *Rhipicephalus microplus*, *Chirnyssoides* sp., *Ewingana inaequalis* e *Chiroptonyssus robustipes*. Desses morcegos, todos possuíam hábito alimentar insetívoro, sendo 35,9% (14/39) fêmeas e 64,1% (25/39) machos. Foi registrado pela primeira vez o co-parasitismo de ácaros *Chirnyssoides* sp., *Ewingana inaequalis* e *Chiroptonyssus robustipes* em *Molossus currentium* (Mammalia, Chiroptera), correspondendo às primeiras associações interespecíficas registradas para as espécies. Observou-se a expansão da ocorrência desses ectoparasitos em morcegos insetívoros no RS. Além disso, este é o primeiro relato de *Rhipicephalus microplus* parasitando morcego. Foi realizada a pesquisa molecular para investigar a presença de *Rickettsia* spp. e *Trypanosoma* spp. nas carcaças dos animais. A investigação se estendeu aos ácaros *Chiroptonyssus robustipes*, os quais foram testados para *Rickettsia* spp., *Trypanosoma* spp. e *Leishmania* spp. Não foram verificados ácaros ou animais positivos para os agentes pesquisados. Dado a carência de protocolos estabelecidos para a extração de DNA de *C. robustipes*, foram conduzidos testes utilizando três kits comerciais e protocolos distintos. Os resultados indicaram que *DNeasy Blood & Tissue Kit* (GmbH, Qiagen[®], Germany) se mostrou mais eficaz na extração de DNA total ($p < 0,05$) ao extrair o material genético de apenas um ácaro inteiro, demonstrando concentrações mais elevadas de DNA em todos os grupos testados. Este estudo contribui não apenas para o entendimento da diversidade parasitária em morcegos, mas também para a compreensão da interação entre esses artrópodes, hospedeiros e potencial transmissão de patógenos.

Palavras-chave: Ectoparasitos. Diagnóstico molecular. Quiróptero. Ácaros. Protozoários.

ABSTRACT

STUDY OF PARASITE-HOST INTERACTIONS IN BATS FROM URBAN ENVIRONMENTS IN RIO GRANDE DO SUL, BRAZIL

AUTHOR: Daniele da Silva

ADVISOR: Luís Antônio Sangioni

The present work investigated parasitism in bats from urban areas of 34 municipalities in Rio Grande do Sul. The animals evaluated were obtained from the Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor, sent by the Centro Estadual de Vigilância em Saúde, to carry out diagnostic tests for bats rabies, during the period from 2016 to 2021. Of the 109 animals surveyed, 35.8% (39/109) had ectoparasites, with an average of 9.9 parasites per animal. A total of 385 ectoparasites were recovered, including *Rhipicephalus microplus*, *Chirnyssoides* sp., *Ewingana inaequalis* and *Chiroptonyssus robustipes*. Of these bats, all had insectivorous eating habits, 35.9% (14/39) females and 64.1% (25/39) males. Co-parasitism of mites *Chirnyssoides* sp., *Ewingana inaequalis* and *Chiroptonyssus robustipes* was recorded for the first time on *Molossus currentium* (Mammalia, Chiroptera), corresponding to the first interspecific associations recorded for the species. An expansion in the occurrence of these ectoparasites in insectivorous bats in RS was observed. Furthermore, this is the first report of *Rhipicephalus microplus* parasitizing bats. Molecular research was carried out to investigate the presence of *Rickettsia* spp. and *Trypanosoma* spp. in animal carcasses. The investigation extended to *Chiroptonyssus robustipes* mites, which were tested for *Rickettsia* spp., *Trypanosoma* spp. and *Leishmania* spp. No mites or animals positive for the agents studied were found. Given the lack of established protocols for extracting DNA from *C. robustipes*, tests were conducted using three commercial kits and different protocols. The results indicated that the *DNeasy Blood & Tissue Kit* (GmbH, Qiagen®, Germany) was more effective in extracting total DNA ($p < 0.05$) when extracting the genetic material from just one whole mite, demonstrating higher concentrations of DNA in all tested groups. This study contributes not only to the understanding of parasitic diversity in bats, but also to the understanding of the interaction between these arthropods, hosts and potential pathogen transmission.

Keywords: Ectoparasites. Molecular diagnostics. Chiroptera. Mite. Protozoan.

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO 1

Figura 1 – (Figure 1) *Rhipicephalus microplus* larvae..... 31

ARTIGO 2

Figura 1- (Figure 1) Egg and larva of *Chirnyssoides* sp., *Chiroptonyssus robustipes*,
Ewingana inaequalis 50

DISCUSSÃO

Figura 1 – Mapa do Rio Grande do Sul destacando os municípios onde foram encontrados morcegos 74

Figura 2 – Mapa do Rio Grande do Sul destacando os municípios onde foram encontrados morcegos com ectoparasitos 75

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 2

Tabela 1 – (Table 1) - Distribution of bats by family, eating habits, genus, species, municipality of capture, sex and frequency of detection of ectoparasites by species, city and family between 2016 and 2021 in the state of Rio Grande do Sul (RS), Brazil.....	51
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

MANUSCRITO 1

Tabela 1 – (Table 1) - Quantification and average quality of total DNA extracted from <i>Chiroptonyssus robustipes</i> mites using three different protocols	59
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

SUMÁRIO

1	APRESENTAÇÃO.....	14
2	INTRODUÇÃO.....	15
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
3.1	ORDEM CHIROPTERA.....	18
3.2	PARASITISMO EM MORCEGOS.....	19
3.2.1	Ácaros de morcegos	20
3.2.1.1	<i>Ewingana inaequalis</i>	20
3.2.1.2	<i>Chirotonyssus robustipes</i>	21
3.2.1.3	<i>Chirnyssoides</i> sp	22
3.2.2	<i>Rhipicephalus microplus</i>	22
3.2.3	<i>Rickettsia</i> spp.	23
3.2.4	<i>Trypanosoma</i> spp.	24
3.2.5	<i>Leishmania</i> spp.	25
4	ARTIGO 1 – <i>Rhipicephalus microplus</i> larvae: first report in bats, <i>Molossus rufus</i>	27
5	ARTIGO 2 – Detection of ectoparasites and investigation of infection by <i>Rickettsia</i> spp. and <i>Trypanosoma</i> spp. in bats from Rio Grande do Sul, Brazil	32
6	MANUSCRITO 1 – Comparison of total DNA extraction protocols for <i>Chirotonyssus robustipes</i> mites	53
7	MANUSCRITO 2 – Pesquisa molecular de <i>Rickettsia</i> spp., <i>Trypanosoma</i> spp. e <i>Leishmania</i> spp. em <i>Chirotonyssus robustipes</i> (Ewing, 1925) (Acari: Macronyssidae) de quirópteros do Rio Grande do Sul, Brasil	60
8	DISCUSSÃO	70
9	CONSIDERAÇÕES FINAIS	75
	REFERÊNCIAS.....	78

1 APRESENTAÇÃO

Este estudo investigou o parasitismo em morcegos provenientes de áreas urbanas de 34 municípios do Rio Grande do Sul, durante o período de 2016 a 2021. Dos 109 morcegos avaliados, 35,8% apresentaram ectoparasitos, incluindo *Rhipicephalus microplus*, *Chirnyssoides* sp., *Ewingana inaequalis* e *Chiroptonyssus robustipes*. Foi observado o co-parasitismo de ácaros *Chirnyssoides* sp., *Ewingana inaequalis* e *Chiroptonyssus robustipes* em *Molossus currentium* pela primeira vez. O estudo também registrou pela primeira vez *Rhipicephalus microplus* parasitando morcegos.

A investigação molecular não detectou *Rickettsia* spp. ou *Trypanosoma* spp. nas carcaças dos animais. Os ácaros *C. robustipes* foram submetidos a testes moleculares para detecção de *Rickettsia* spp., *Trypanosoma* spp. e *Leishmania* spp., no entanto não foi encontrado DNA destes microrganismos. Testes de extração de DNA indicaram que *DNeasy Blood & Tissue Kit* (GmbH, Qiagen®, Germany) foi mais eficaz na extração de DNA total desses ácaros.

Esta tese de doutorado está composta pelos itens 2 INTRODUÇÃO, 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA, 4 ARTIGO 1, 5 ARTIGO 2, 6 MANUSCRITO 1, 7 MANUSCRITO 2 e 8 CONSIDERAÇÕES FINAIS e REFERÊNCIAS. Os artigos 1 e 2 e os manuscritos 1 e 2 compõem a íntegra deste estudo. Separadamente, nos artigos 1 e 2 e nos manuscritos 1 e 2, estão descritas as seções de Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências. As REFERÊNCIAS contêm as citações inseridas nos itens INTRODUÇÃO, REVISÃO BIBLIOGRÁFICA e CONSIDERAÇÕES FINAIS desta tese.

2 INTRODUÇÃO

O estudo sobre os animais silvestres vem ganhando destaque, considerando sua proximidade cada vez mais frequente com a ambiência dos seres humanos e animais domésticos, devido a constante e impactante ação antrópica no ambiente. Salienta-se que estes animais podem ser reservatórios de agentes com potencial zoonótico, e que algumas espécies silvestres se apresentam como sentinelas em relação à circulação de determinadas doenças, servindo como sinalizadores para o risco da ocorrência de algumas enfermidades nas populações humanas, suscitando a adoção de medidas profiláticas.

Conforme a Organização Mundial da Saúde, 71,8% das doenças zoonóticas são originárias de animais da vida selvagem (OMS, 2017) e, segundo PAGE et al. (2011), 58% de todas as doenças que acometem humanos e animais estão ligadas aos distúrbios do ecossistema, representando importantes riscos à saúde pública e à conservação da vida silvestre.

Os morcegos se caracterizam por serem o segundo maior grupo da classe Mammalia, compreendendo aproximadamente 25% dos mamíferos de toda a fauna existente (UIEDA; BRED, 2016). O Brasil possui uma das maiores faunas de quirópteros identificadas, sendo nove famílias de microquirópteros, totalizando 181 espécies e 68 gêneros, distribuídos em todo o território nacional (GARBINO et al., 2020). Estes animais desempenham diversos papéis nas comunidades das quais fazem parte, sendo de grande importância para o ecossistema (REIS et al., 2007). Os quirópteros apresentam um comportamento social diversificado, com grande interação social, formação de colônias simples ou mistas e algumas espécies apresentam comportamento migratório (NEUWEILER, 2000; SERRA-COBO et al., 2002), que são fatores importantes na disseminação de doenças e parasitos.

Os morcegos podem albergar vírus, bactérias, fungos, protozoários e helmintos ou como reservatório de patógenos responsáveis por zoonoses de grande importância, como o vírus do gênero *Lyssavirus*, causador da raiva e do protozoário do gênero *Plasmodium*, causador da malária (MELO et al., 2008; CUROTTO et al., 2012). Mais de 70 espécies de quirópteros foram identificadas como portadoras de tripanossomatídeos e dos vírus responsáveis por doenças infecciosas emergentes, incluindo novas cepas virais (CALISHER et al., 2006). Os vírus têm recebido destaque dos pesquisadores, tendo sido identificados em mais de 200 espécies, em 37 gêneros de quirópteros, com potencial de causar doença em humanos (MORATELLI; CALISHER, 2015). No ano de 2019, foi identificado o vírus SARS-CoV-2, cujas análises moleculares e investigações epidemiológicas sugerem que esse agente tenha se originado dos morcegos. A introdução desta doença na população humana possivelmente ocorreu por meio

de um hospedeiro intermediário, apresentando rápida adaptação e transmissão entre humanos (BOSCO-LAUTH et al., 2020). Estes agentes zoonóticos podem representar um potencial problema à saúde pública, caso haja mudança e adaptabilidade em outros hospedeiros (CALISHER et al., 2006).

No que se refere aos estudos parasitológicos de morcegos no Brasil, ressalta-se que foram identificadas 126 espécies de ectoparasitos, como *Chirotonyssus* spp., *Trichobius costalimai* e *Macronyssoides* sp., distribuídos em 37 gêneros (GRACIOLLI et al., 2008) e mais de 15 espécies de protozoários, entre elas: *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania infantum*, *Leishmania amazonensis* e *Toxoplasma gondii* (SAVANI et al., 2009; CABRAL et al., 2013).

Os estudos envolvendo quirópteros apresentam algumas dificuldades, como o manuseio destes animais, sua relação intrínseca com a transmissão da raiva e a necessidade de eutanásia para realização da necropsia. Adicionalmente, destaca-se que algumas espécies encontradas no Brasil estão em risco de extinção (REIS et al., 2007; PINHEIRO et al., 2013). A captura destes animais, além de oferecer risco às equipes de trabalho, pode representar um problema para a conservação destas espécies, tornando o aproveitamento de morcegos recolhidos pelos serviços de vigilância epidemiológica no diagnóstico da raiva um meio alternativo para o uso destes animais em pesquisas.

Devido a constante e acentuada redução ou extinção dos abrigos naturais desses mamíferos alados, cada vez mais eles estão coabitando os domicílios humanos, aumentando as chances de transmissão de patógenos entre quirópteros, humanos e animais domésticos (UIEDA; BRED, 2016). As implicações epidemiológicas relacionadas às doenças parasitárias na interface animais silvestres, animais domésticos e humanos é reconhecida, tanto para a saúde humana e dos animais domésticos quanto para a conservação da biodiversidade. Sendo assim, os estudos relacionados à presença de agentes parasitários nestas espécies são de grande relevância.

Nos últimos anos houve um aumento nas pesquisas sobre o parasitismo de quirópteros, no entanto, os registros ainda são raros, particularmente no Rio Grande do Sul. A compreensão da diversidade de parasitos de morcegos pode esclarecer questões relacionadas à ecologia, sistemática, biogeografia, comportamento e evolução desses mamíferos. Além disto, devido às alterações ambientais, os quirópteros estão cada vez mais coabitando as construções humanas, o que pode desencadear mudanças na epidemiologia de alguns parasitos, especialmente os que podem causar impactos às populações de animais domésticos e os de caráter zoonótico, como o observado atualmente com o vírus SARS-CoV-2. Desta forma, este estudo visa contribuir

para o conhecimento sobre a ocorrência de diferentes parasitos em morcegos do Rio Grande do Sul, Brasil, fornecendo informações aos estudos e projetos voltados para a saúde pública, ecologia e conservação desses mamíferos.

Este estudo recebeu autorização institucional da CEVS, conforme as Portarias SES/RS nº 334/2019 e nº1.134/2022 e foi submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFSM), sob o número de protocolo 7576231019, bem como ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio/SISBIO).

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 ORDEM CHIROPTERA:

Esse grupo de animais representa os únicos mamíferos com capacidade de voo, devido à modificação dos seus membros anteriores em asas. A maioria das espécies, incluindo todas as encontradas no Brasil, utiliza a ecolocalização como forma de orientação e identificação de presas (RIO GRANDE DO SUL, 2018). Estes animais estão divididos em duas subordens, Megachiroptera e Microchiroptera, sendo a primeira composta apenas pela família Pteropodidae, que devido ao seu grande porte são conhecidas como “raposas voadoras”. Mais de 185 espécies de megaquirópteros se alimentam principalmente de flores, frutos e insetos e estão distribuídas no velho mundo, em regiões tropicais da África e Índia, sudeste da Ásia e Austrália e ausentes no continente Americano (FENTON, 1992; UIEDA; BRED, 2016).

Os microchiroptera estão divididos em 18 famílias, 202 gêneros e 1200 espécies distribuídas por todo o mundo, com exceção de algumas ilhas oceânicas e das regiões polares (UIEDA; BRED, 2016). No Brasil foram identificadas nove famílias de microquirópteros: Phyllostomidae (93 espécies), Molossidae (32 espécies), Vespertilionidae (26 espécies), Emballonuridae (17 espécies), Mormoopidae (quatro espécies), Thyropteridae (cinco espécies), Noctilionidae (duas espécies), Furipteridae (uma espécie) e Natalidae (uma espécie), totalizando 181 espécies em 68 gêneros, distribuídos em todo o território nacional (GARIBINO et al., 2020).

A biodiversidade de quirópteros na região da Amazônia abrange 87% da fauna brasileira desses mamíferos voadores. Entre as 146 espécies presentes nesse bioma, 46 foram identificadas exclusivamente nessa área (REIS et al., 2007). Contudo, no estado do Rio Grande do Sul foram registradas 40 espécies, pertencentes às famílias Noctilionidae, Phyllostomidae, Vespertilionidae e Molossidae (PACHECO, 2013).

De acordo com o hábito alimentar desses animais, podem ser classificados em: frugívoros, insetívoros, nectarívoros, carnívoros, onívoros e hematófagos (PERACCHI et al., 2006). A capacidade de se deslocarem por longas distâncias, aliada ao seu comportamento de defecar durante o voo, torna os morcegos frugívoros bons dispersores de sementes. Os nectarívoros polinizam plantas, sendo considerados os principais responsáveis pelo reflorestamento das espécies vegetais pertencentes às florestas neotropicais, enquanto os demais, pertencentes a outras guildas alimentares, atuam como importantes reguladores de populações animais (BRASIL, 1998).

Das famílias encontradas no Brasil, Molossidae, Vespertilionidae, Emballonuridae, Mormoopidae, Thyropteridae, Furipteridae e Natalidae são compostas por espécies com dieta exclusivamente insetívora. Esse hábito alimentar contribui no controle da população dos insetos, sendo que, muitos destes são vetores transmissores de doenças aos humanos e animais, além de constituírem-se como hospedeiros intermediários de helmintos ou prejudiciais à agricultura (REIS et al., 2007). A maior diversidade de hábitos alimentares ocorre na família Phyllostomidae, composta por espécies frugívoras, nectarívoras, polinívoras, insetívoras, carnívoras, onívoras e hematófagas. O hábito de ingerir peixes (piscívora) é restrito a apenas uma das espécies (*Noctilio leporinus*) da família Noctilionidae (UIEDA et al., 2006).

3.2 PARASITISMO EM MORCEGOS:

Mundialmente, foram descritas 687 espécies de ectoparasitos de morcegos, distribuídas nas ordens Siphonaptera, Diptera, Hemiptera e Dermaptera (Insecta) e na ordem Acari (Arachnida) (FRANK et al., 2014), sendo as famílias Polyctenidae (hemípetros), Ischnopsyllidae (pulgas), Streblidae (moscas), Nycteribiidae (moscas), Spinturnicidae (ácaros) e Spelaeorhynchidae (ácaros) ectoparasitos exclusivos de morcegos (COSTA LIMA, 1940; FURMAN, 1966; MARSHALL, 1982; LINARDI; GUIMARÃES, 2000; DICK; PATTERSON, 2006; GRACIOLLI et al., 2008).

No Brasil, foram identificadas 83 espécies de estreblídeos (GRACIOLLI, 2018a), 26 espécies de nycteribídeos (GRACIOLLI, 2018b), 15 espécies de spinturnicídeos (ALMEIDA; GETTINGER, 2018) e duas espécies de ischnopsylídeos (PATRÍCIO et al., 2016) parasitando morcegos. No Rio Grande do Sul os estudos direcionados aos ectoparasitos de morcegos são escassos, havendo registro de 12 espécies de Streblidae (GRACIOLLI; RUI, 2001), quatro espécies de Nycteribiidae (GRACIOLI, 2004), da pulga *Rhynchopsyllus pulex* (MONTEIRO et al., 2005) e de três espécies da família Spinturnicidae (SILVA et al., 2009).

Especialmente devido ao ato da hematofagia, os ectoparasitos são importantes e potenciais transmissores de doenças, uma vez que eles podem servir como vetores ou hospedeiros intermediários para helmintos, protozoários, bactérias e vírus (MELLO, 2017), havendo uma correlação positiva entre a riqueza de ectoparasitos e de vírus em morcegos (GAY et al., 2014). No entanto, apesar das ordens Chiroptera e Rodentia serem as que possuem mais espécies de ectoparasitos descritas (KRASNOV et al., 2006), ainda são poucos os estudos sobre o papel desses parasitos na transmissão

de doenças entre os morcegos ou para outros animais silvestres ou domésticos, assim como para seres humanos.

3.2.1 Ácaros de morcegos

3.2.1.1. *Ewingana inaequalis*

Ewingana inaequalis (Radford 1948) pertence à família Myobiidae e foi identificado somente em populações de *Tadarida brasiliensis* dos Estados Unidos da América (DURDEN et al., 1992; FOSTER; MERTINS, 1996), México (GUZMÁN-CORNEJO et al., 2003), Chile (MUÑOZ et al., 2003; MUÑOZ et al., 2011) e no estado do Rio Grande do Sul, Brasil (PESENTI et al., 2014).

Ácaros da família Myobiidae apresentam alta especificidade parasitária e muitas espécies são específicas para um único gênero hospedeiro (FAIN, 1994). A densidade de hospedeiros parece ser o determinante mais importante da taxa de infestação por estes ácaros (LAVOPIERRE; BECK, 1970).

Os estudos direcionados para esta espécie são escassos e sua biologia é pouco conhecida. O ciclo de vida de *E. inaequalis* dura cerca de dois meses. Os ovos são encontrados em intervalos bimestrais em morcegos adultos, mas raramente em filhotes lactantes (BECK, 1966). Eles são cimentados, geralmente encontram-se isolados, na porção basal dos pelos e podem ser encontrados entre as orelhas, na região genital e nas fossas laterais. O estágio protoninfal presumivelmente é menos que uma semana. Deutoninfas duram de três a cinco semanas. Em morcegos lactantes, miobídeos imaturos podem ser encontrados incrustados na pele ou aderidos aos pelos esparsos do dorso. Em animais mais velhos, larvas e protoninfas são geralmente encontradas nos lados proximais das fossas laterais. Deutoninfas e adultos também são comuns nesta área, mas são quase tão frequentes em outras partes do corpo do hospedeiro com pelos. A reprodução destes ácaros é reduzida, mas não interrompida durante os períodos frios do ano (LAVOPIERRE; BECK, 1970).

Lesões observadas em quirópteros, causadas por *E. inaequalis*, constituem pequenos edemas papilomatosos variando em diâmetro, desde pápulas minúsculas até tumores relativamente grandes, 0,3 a 0,4 mm de diâmetro e projetando-se 0,1 mm ou mais acima da superfície da pele. Onde se encontra o idiossoma do ácaro, a camada da epiderme do morcego engrossa, enquanto o estrato córneo mostra uma leve hiperqueratose. Essencialmente, cada tumor é composto por uma massa fibrosa envolvendo um folículo piloso hipertrofiado e coberto por uma camada acantótica de epitélio. Geralmente os tumores são discretos, mas ocasionalmente, quando dois ou mais são contíguos, seus contornos tornam-se um tanto confusos. Nos folículos parasitados, o ácaro está ligado ao pelo próximo a pele por uma das pernas anteriores. O aparelho bucal é introduzido no folículo abaixo do

pelo e direcionado para baixo, nos tecidos próximos ao eixo do pelo. O ácaro se nutre dos tecidos dérmicos edematosos que circundam a raiz do pelo. *E. inaequalis* adultos se movem por todo o corpo do hospedeiro durante a alimentação. Assim, parece improvável que uma reação hiperplásica circunscrita tão grave quanto essa teria tempo de se formar durante a alimentação dos estágios adultos, e também foram observadas apenas formas larvais ou ninfas associadas aos tumores (LAVOPIERRE; BECK, 1970).

3.2.1.2 *Chirotonyssus robustipes*

Chirotonyssus robustipes (Ewing 1925) é um ácaro pertencente à família Macronyssidae e tem sido objeto de estudo devido à sua alta prevalência e abundância em diversas espécies de quirópteros (PESENTI et al., 2014). A espécie foi relatada no Brasil, Chile, Cuba, Estados Unidos, México, Panamá, Paraguai e Venezuela (SAUNDERS, 1975; WHITAKER; EASTERLA, 1975; GUZMÁN-CORNEJO et al., 2003A; 2003B; PRESLEY, 2008; MUÑOZ et al., 2011; FRANK et al., 2014).

A espécie de morcegos mais parasitada por *C. robustipes* é *Tadarida brasiliensis* (DURDEN et al., 1992; GUSMAN-CORNEJO et al., 2003; MUÑOZ et al., 2003; COLÍN-MARTÍNEZ et al. 2017; SILVA et al., 2016). No Brasil, *C. robustipes* foi encontrado em morcegos das espécies *Histiotus velatus*, *Artibeus lituratus* e *Tadarida brasiliensis* em Minas Gerais (MORAES et al., 2013; MELO, 2017), *Nyctinomops macrotis* no estado de São Paulo (FONSECA, 1948) e na espécie *Tadarida brasiliensis* no Rio Grande do Sul (PESENTI et al., 2014).

Os representantes da família Macronyssidae são ectoparasitos abundantes em diversas espécies de mamíferos, incluindo várias espécies de morcegos. Estes ácaros desenvolveram diferentes estruturas para se adaptar aos seus hospedeiros (COLÍN-MARTÍNEZ et al., 2017). Desta forma, parasitaram primeiramente os morcegos e posteriormente se transferiram para os outros mamíferos, bem como para répteis e pássaros (RADOVSKY, 1967).

São obrigatoriamente hematófagos nos estágios de protoninfa e adultos, porém as larvas e deutoninfas não se alimentam. Os ovos são depositados pelas fêmeas nos ninhos dos hospedeiros, em camas ou frestas. Em geral, a postura leva uma semana e em média 100 ovos são colocados por dia. Durante esse período a fêmea se alimenta duas vezes. As larvas eclodem em aproximadamente dois dias, realizando ecdise sem repasto sanguíneo dentro de quatro a seis horas. A protoninfa realiza ecdise dentro de cinco a 14 dias após alimentação. O ciclo biológico desses ácaros é altamente dependente das condições ambientais como temperatura e umidade. Todo o ciclo pode ser completado, em média, em dez dias (OVAZZA, 1950). Os machos são raramente encontrados sobre

seus hospedeiros, sendo o estágio ninfal o de maior ocorrência (RADOVSKY, 1967). As protoninfas de *C. robustipes* permanecem no hospedeiro por vários dias. Durante esse intervalo elas se alimentam de fluidos teciduais, realizando essa atividade por um período de 10 a 12 horas. As fêmeas se alimentam exclusivamente de sangue, realizando o ingurgitamento em um período de 15 a 20 minutos, após o qual deixam o hospedeiro (LAVOPIERRE; BECK, 1967; RADOVSKY, 1967).

Os ácaros podem se adaptar bem às construções humanas, conforme relatado por Reh (1974), onde as equipes de saúde pública da Califórnia, EUA, ao investigarem uma dermatite persistente no rosto e no abdômen de uma criança de 18 meses de idade, encontraram o ácaro *Chiroptonyssus robustipes* no corpo do infante e na parede atrás do móvel onde ele tomava banho.

3.2.1.3 *Chirnyssoides* sp.

Chirnyssoides são ácaros pertencentes à família Sarcoptidae, sendo considerados ectoparasitos exclusivos das famílias *Phyllostomidae* e *Noctilionidae* (FAIN; LUKOSCHUS, 1971). As informações sobre os ácaros deste gênero são escassas, havendo registros da distribuição de *Chirnyssoides* sp. em 10 países da América Central e América do Sul. No Brasil, há registros de *Chirnyssoides caparti*, *Chirnyssoides amazonae*, *Chirnyssoides brasiliensis* e *Chirnyssoides phyllostomus* parasitando morcegos da família *Phyllostomidae*, nos estados do Amazonas, Pará e Pernambuco, conforme dados compilados por Lourenço et al. (2013). Os mesmos autores relataram o primeiro registro de *C. amazonae* em *Carollia perspicillata* no Rio de Janeiro.

3.2.2 *Rhipicephalus microplus*

Rhipicephalus microplus teve sua origem na Ásia, berço também do ancestral bovino (*Bos primigenius*), há 250 milhões de anos (BRASIL, 2020). Este ácaro parasita bovinos domésticos e selvagens em regiões tropicais e subtropicais do mundo (GEORGE et al., 2002) e está amplamente distribuído em todo território nacional. Contudo, a adaptabilidade deste ectoparasito pode influenciar o parasitismo. Embora não tenha sido identificado em morcegos, este ixodídeo pode esporadicamente parasitar outras espécies, como equinos, ovinos, caprinos (BARROS-BATTESTI et al., 2006), cães e veados (GONZALES, 1975).

Este ectoparasito apresenta ciclo de vida monoxeno, permanecendo no animal durante sua fase reprodutiva, alimentando-se exclusivamente de sangue, sendo muito resiliente no ambiente. O clima em regiões tropicais, subtropicais e temperadas permite o desenvolvimento do carrapato por praticamente o ano todo (BRASIL, 2020). A fase parasitária se desenvolve em torno de 21 dias e

compreende desde a fixação da larva no hospedeiro até o desprendimento da teleógina. De quatro a sete dias após a fixação, a larva sofre ecdise e se transforma em ninfa, que por sua vez, leva de nove a 16 dias para sofrer muda para o estágio adulto. Todavia, os carrapatos adultos realizam a cópula e as fêmeas se desprendem do hospedeiro entre 18 e 35 dias após a fixação das larvas (GONZALES, 1974).

A fase não parasitária tem início quando a teleógina se desprende do hospedeiro e cai no solo. No ambiente, a fêmea inicia a ovipostura em um período de três a cinco dias em condições climáticas adequadas, e ao final desta etapa, morre. Cada teleógina possui a capacidade de transformar, em média, 50% do seu peso corporal em massa de ovos. Posteriormente, as larvas eclodem e após um curto período de quiescência sobem para as pontas das folhas do capim, onde permanecem a espera de um hospedeiro. Após a subida das larvas no capim, elas se fixam no hospedeiro iniciando a fase parasitária ou permanecem a espera por um hospedeiro até a exaustão ou desidratação e morte (BARROS et al., 2017), podendo permanecer na pastagem por mais de 80 dias, dependendo das condições ambientais (GAUSS; FURLONG, 2002).

A intensidade de infestação do carrapato é influenciada pelas variações da condição climática das diferentes regiões do Brasil (GONZALES, 1995). Economicamente, é um dos artrópodes que mais afetam as populações de bovinos em todo o mundo (JONGEJAN; UILENBERG, 2005), pois é vetor dos protozoários *Babesia bovis* e *B. bigemina*, agentes causadores da babesiose bovina e *Anaplasma marginale* que causa anaplasmosose (BOCK et al., 2004).

3.2.3 *Rickettsia* spp.

As bactérias do gênero *Rickettsia* pertencem à ordem Rickettsiales, família Rickettsiaceae, classe das alfa-proteobacterias. Essas bactérias são classificadas como cocobacilos Gram-negativos, intracelulares obrigatórias que tem como principal alvo as células endoteliais do hospedeiro vertebrado, onde ocorre a multiplicação por divisão binária (SCHROEDER et al., 2015; MONTEIRO, 2017). Nos artrópodes hospedeiros, as bactérias têm predileção por glândulas salivares e ovários, mas também infectam e se multiplicam em células dos intestinos, túbulos de malpighi e hemolinfa (YU; WALKER, 2003). A parede celular deste microorganismo é composta de lipopolissacarídeo e somente *Rickettsia prowazekii*, causadora do tifo, apresenta flagelos. A maioria dos antígenos de superfície é reconhecida por anticorpos presentes em humanos e animais. A bactéria possui as proteínas de membranas imunodominantes Omp A e Omp B, que contêm epítomos espécie-específicos, utilizados como base em testes moleculares (MONTEIRO, 2017).

As diferentes espécies pertencentes ao gênero *Rickettsia* são classificadas em cinco grupos distintos: Grupo do Tifo (Thyphus Group - TG), Grupo de Transição (Transitional Group - TRG), Grupo Canadensis (Canadensis group - CG), Grupo Belli (Belli Group - BG) e Grupo da Febre Maculosa (Spotted Fever Group - SFG) (MONTEIRO, 2017). Dentre as espécies e subespécies conhecidas mundialmente, vinte e duas são consideradas zoonoses. Nas Américas, as espécies causadoras de riquetsioses em humanos são *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia africae*, *Rickettsia felis*, *Rickettsia akari* e *Rickettsia parkeri*. No Brasil, até o momento, foram identificadas cinco espécies de Rickettsias: *Rickettsia rhiphcephali*; *Rickettsia amblyommatis*, descrita nas Américas com possível associação a casos de riquetsioses em humanos e *R. rickettsii*, *R. felis*, e *R. parkeri* (cepa Mata Atlântica), que estão associadas a casos humanos (MONTEIRO, 2017; SILVA et al., 2019).

A Febre Maculosa é uma doença infecciosa, de caráter endêmico, causada por espécies de Rickettsias pertencentes ao Grupo Febre Maculosa (GFM). Estas bactérias foram identificadas em diversos países, especialmente em regiões tropicais e subtropicais (LABRUNA et al., 2009; SILVA et al., 2019). Inicialmente denominada Febre Maculosa das Montanhas Rochosas, esta enfermidade foi identificada pela primeira vez no Estado de Idaho, nos Estados Unidos, no final do século XIX. Em 1906, o agente etiológico, *Rickettsia rickettsii*, foi descrito por Howard Taylor Ricketts, que identificou também o carrapato como principal vetor de transmissão (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021).

No Brasil a enfermidade é denominada como Febre Maculosa Brasileira (FMB), tifo transmitido pelo carrapato ou febre petequial. Essa doença ainda é pouco conhecida e de notificação compulsória ao Ministério da Saúde desde o ano de 2001. *Rickettsia rickettsii* tem sido considerada como o principal agente etiológico no território brasileiro e também a espécie mais patogênica para humanos e cães, podendo haver variação quanto à virulência dos genótipos circulantes (LABRUNA et al., 2009; MONTEIRO, 2017; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021). A espécie *R. parkeri* foi considerada não patogênica por mais de 60 anos (PADDOCK et al., 2004), entretanto, Sangioni et al. (2011) descreveram *R. parkeri* como principal agente causador de Febre Maculosa no estado do Rio Grande do Sul.

A enfermidade foi reconhecida pela primeira vez no Brasil no ano de 1929, no estado de São Paulo, sendo identificada em seguida no estado de Minas Gerais e no Rio de Janeiro (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021). Atualmente, as áreas de ocorrência de casos humanos de Febre Maculosa Brasileira estão concentradas em SP e MG, embora casos da doença tenham sido registrados nos estados do RJ, ES, MT, PR, SC e RS (LABRUNA et al., 2009). Observou-se maior prevalência em

zonas rurais, devido à facilidade de proliferação de carrapatos, com uma incidência maior de casos durante a primavera e início do verão, período de maior circulação das fases de larva e ninfa destes artrópodes, podendo variar de uma região para outra (SILVA; MOREIRA, 2016).

3.2.4 *Trypanosoma* spp.

O gênero *Trypanosoma* é constituído por protozoários flagelados pertencentes ao filo Sarcomastigophora, que possuem a capacidade de infectar uma ampla variedade de espécies animais e são transmitidos principalmente por vetores invertebrados hematófagos. Esses parasitos apresentam características morfológicas e biológicas distintas e são agrupados em dois subgêneros principais com base em seu ciclo de vida nos hospedeiros invertebrados: Salivaria e Stercoraria (DARIO et al., 2017).

Morcegos de todo o mundo são parasitados por várias espécies de *Trypanosoma*, algumas infectando exclusivamente esses mamíferos (LIMA et al., 2015; HODO et al., 2016). A detecção de *Trypanosomas* em amostras de sangue fresco e hemoculturas revelou a capacidade dos morcegos em apresentar alta parasitemia, sendo um reservatório competente para transmitir esses parasitos a um vetor e desempenhando um papel importante na manutenção destes parasitos na natureza (SANT'ANNA et al., 2016).

Existem duas hipóteses sobre a origem do clado *T. cruzi*; a primeira, conhecida como hipótese do supercontinente do sul, propõe que *T. cruzi* tenha se especializado em marsupiais após a separação da América do Sul do continente australiano (STEVENS et al., 1999). A segunda hipótese, denominada de infecção por morcegos, propõe que estes mamíferos foram os hospedeiros antigos e naturais do clado *T. cruzi* (HAMILTON et al., 2012). Os morcegos são generalistas em termos de hábitos alimentares, incluindo a ingestão de insetos (FINDLEY, 1993; KALKO, 2002) o que pode aumentar suas chances de adquirir infecções por tripanossomos. Além disso, o comportamento de viver em colônias (GREENHALL et al., 1983; McCracken, 2003) e de higienização entre os indivíduos (SCHMIDT; MANSKE, 1973) pode facilitar a transmissão/dispersão de tripanossomos.

3.2.5 *Leishmania* spp.

A leishmaniose é uma enfermidade incluída no grupo das doenças tropicais negligenciadas (BRASIL, 2021). Estima-se que aproximadamente um milhão de novos casos humanos ocorram anualmente, na maioria das vezes associada a população em vulnerabilidade (WHO, 2022). A doença pode acometer seres humanos sendo que a maioria dos infectados pode não desenvolver sintomas,

mas, se presentes, pode apresentar-se nas formas: cutânea, muco-cutânea ou visceral, enquanto que nos animais pode apresentar sinais cutâneos e/ou viscerais (MAXFIELD; CRANE, 2022).

Os agentes etiológicos causadores da leishmaniose são protozoários Sarcomastigophora pertencentes a classe Kinetoplastida, ordem Trypanosomatida, família Trypanosomatidae, do gênero *Leishmania*, subgêneros *Leishmania* e *Viannia* com diferentes espécies, apresentando formas epidemiológicas e clínicas diferentes da doença, de acordo com a espécie do protozoário envolvida (TAYLOR et al., 2017). São conhecidas cerca de 55 espécies de *Leishmania*, das quais 21 são confirmadas patogênicas para seres humanos (AKHOUNDI et al., 2016).

Esses tripanossomatídeos são organismos digenéticos, sendo a forma amastigota intracelular obrigatória, multiplicando-se no interior de macrófagos de hospedeiros vertebrados, enquanto a forma promastigota é encontrada no trato digestório do inseto vetor e constitui a forma infectante (LANGONI, 2016). A transmissão do agente ocorre pelo repasto sanguíneo das fêmeas do gênero *Lutzomyia* (ordem Diptera, família Psychodidae) que apresenta hábito alimentar crepuscular noturno, em hospedeiros vertebrados (AGUIAR et al., 1987; MORRISON et al., 1993).

ARTIGO 1***Rhipicephalus microplus* larvae: first report in bats, *Molossus rufus***

(Manuscript published in the Veterinary Research Communications (electronic ISSN 1573-7446; print ISSN 0165-7380; linking ISSN 0165-7380). Vet Res Commun. 2023 Sep;47(3):1749-1751. <http://doi.org/10.1007/s11259-022-10050-5>. Epub 2023 Jan 4. PMID: 36598644.)

Daniele da Silva¹ Fabiana Raquel Ratzlaff¹ Vanessa Osmari¹ Fagner D'ambroso Fernandes^{1,2} Elizabete Captivo Lourenço³ Katia Maria Famadas⁴ Aline Campos⁵ André Alberto Witt⁶ Susi Missil Pacheco⁷ Fernanda Silveira Flores Vogel¹ Sônia de Ávila Botton⁸ Luis Antonio Sanigioni¹

¹Laboratório de Doenças Parasitárias (LADOPAR), Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Rurais (CCR), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Av. Roraima, nº 1000, Prédio 63D, Bairro Camobi, CEP: 97105-900 Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil

² Faculdade Santo Ângelo (FASA), Rua do Seminário, nº 188, Bairro Vera Cruz, CEP: 98807-296 Santo Ângelo, Rio Grande do Sul, Brasil

³ Departamento de Ecologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil

⁴ Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Rio de Janeiro, Brasil

⁵ Centro Estadual de Vigilância em Saúde (CEVS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

⁶ Divisão de Defesa Sanitária Animal (DDA), Pecuária e Desenvolvimento Rural (SEAPDRA), Secretaria da Agricultura, Porto Alegre, Brasil

⁷ Instituto Sauver - Organização não Governamental, Porto Alegre, Brasil

⁸ Laboratório de Saúde Única (LaSUS), Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Rurais (CCR), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Av. Roraima, nº 1000, Prédio 44, Bairro Camobi, CEP: 97105-900 Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil

*Corresponding author:

E-mail address: Corresponding author: Fagner D'ambroso Fernandes

Av. Roraima, nº 1000, Prédio 63C, Bairro Camobi. CEP: 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.

Telephone: +55 (55) 99986-5156

E-mail: fagner.fernandes@acad.ufsm.br

Rhipicephalus microplus larvae: first report in bats, *Molossus rufus*

ABSTRACT

Cattle are the main hosts of *Rhipicephalus microplus*; however, this ixodid can also parasitize other animal species. We collected a specimen of *R. microplus* larvae from a bat of the species *Molossus rufus* (Mammalia, Chiroptera) from the Cachoeirinha municipality (29° 56' 52" S and 51° 5' 43" W), Rio Grande do Sul, Brazil. The specimens were taxonomically identified using identification keys (Vargas 2006). This study reports the first occurrence of this species parasitizing insectivorous bats in Brazil.

Keywords: Ixodidae. Tick. Brazil. Rio Grande do Sul

Rhipicephalus microplus is a monoxenous parasite; cattle are the preferred hosts of these arthropods. However, in times of great infestation in pastures, the ixodid can infest other animals, such as sheep, horses, deer, dogs, goats and humans (Gonzalez et al. 1974). The objective of this study was to carry out the detection of ectoparasites from carcasses of bats referred for the of rabies diagnosis. In this study, 109 bats carcasses were collected and sent to the Centro Estadual de Vigilância Sanitária (CEVS). Of the total sample, one (1/109) bat from the Cachoeirinha municipality (29° 56' 52" S and 51° 5' 43" W) was parasitized with a tick larvae. The Cachoeirinha municipality is located in the Pampa biome. It has an area of 43,778 km² with an estimated population of 132,144 (IBGE 2021). In the IPVDF, bats were taxonomically classified according to Díaz et al. (2016) as *Molossus rufus* and kept frozen at -20°C. After thawing the bats at room temperature, the coat and membranes were inspected using magnifying glasses. An unengorged tick larvae, from one bat, were removed using anatomical dissection forceps and hypodermic needles. Subsequently, we swept the animal's entire body using a soft-bristled brush, and collected the specimen in a Petri dish. The bat's storage packaging was also inspected. The collected specimen was stored in a 2 ml microtube with 70° ethanol solution and sent to the Laboratório de Artrópodes Parasitas (LAPAR), Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). The ectoparasite was clarified with lactic acid, mounted in Hoyer's medium and observed, using an Olympus UC30 optical microscope. The specimen was morphologically identified according to the identification keys Vargas (2006), as *Rhipicephalus microplus* larvae (Fig. 1). The specimen analyzed had three sagittiform sensilla posterior to the thighs and a pair on the dorsolateral part, a short palp with three articles, five dorsal setae anterior to the fourth sagittiform

sensilla and eyes. The tarsus I has two setae anterior to Haller's organ, one pair lateral, and three pairs posterior to Haller's organ. *Molossus rufus* is found in Mexico, Peru, northern Argentina, Brazil and the Guianas. It has an exclusively insectivorous feeding habit (Peracchi et al. 2011) and forages twice a night, at dusk and at dawn, when there is still daylight and prefers consuming insects (Fenton et al. 1998). When leaving their habitat, *M. rufus* does not immediately take flight because they need to gain lift and momentum. They do this by falling a few meters and occasionally falling to the ground, from where they walk to an elevated position to fly (Nolte et al. 2009). This chiropteran, which like most molossids, does not rest hanging, but in contact with the surface can cohabit with human households (Peracchi et al. 2011). This increases the risk of pathogen transmission between bats, humans and domestic animals (Soares et al. 2007). In Brazil, 124 species of ectoparasites including the ticks of the Ixodidae family have been identified (Graciolli et al. 2008). However, this is the first report of *R. microplus* larvae in this mammal. Although there is no evidence of the epidemiological importance of bats in the tick cycle or in pathogen transmission, the vectorial capacity is worth mentioning

Authors' contributions - Conceptualization and methodology, Daniele da Silva, Fabiana Raquel Ratzlaff, Vanessa Osmari, Fagner D'ambroso Fernandes, Elizabete Captivo Lourenço, Katia Maria Famadas, Aline Campos, André Alberto Witt, SusiMissil Pacheco, Luis Antonio Sangioni; investigation, Daniele da Silva, Fagner D'ambroso Fernandes, Fernanda Silveira Flores Vogel, Luis Antonio Sangioni; writing—original draft preparation, Daniele da Silva, Fagner D'ambroso Fernandes, Luis Antonio Sangioni; writing—review and editing, Daniele da Silva, Fagner D'ambroso Fernandes, Luis Antonio Sangioni; supervision, Sônia de Avila Botton, Fernanda Silveira Flores Vogel, Luis Antonio Sangioni.

Funding - Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) - Financial code 001 and National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) for the financial support.

Data Availability - Not applicable.

Declarations

Ethics approval - Not applicable.

Conflicts of interest/Competing interests - The authors declare that there are no conflicts of interest. Consent to participate - Not applicable.

Consent for publication - Not applicable.

References

- Díaz MM, Solari S, Aguirre LF, Aguiar L, Barquez RM (2016) Clave de identificación de los murciélagos de Sudamérica – Chave de identificação dos morcegos da América do sul, 1 edn. Yerba Buena, bilíngue – Argentina, p 160.
- Fenton MB, Rautenbach IL, Rydell J, Arita HT, Ortega J, Bouchard S, Hovorka MD, Lim B, Odgren E, Portfors CV, Scully WW, Syme DM, Vonhof MJ (1998) Emergence, echolocation, diet and foraging behavior of *Molossus ater* (Chiroptera: Molossidae). *Biotropica* 30:314–320
- Gonzales JC, Silva NR, Wagner EM (1974) O ciclo parasitário do *Boophilus microplus* em bovinos estabulados. *Arq Fac Vet UFRGS* 2:25–34
- Gracioli G, Azevedo AA, Árzua M, Barros-Battesti DM, Linardi PM (2008) Artrópodos ectoparasitos de morcegos no Brasil. In: Pacheco S, Marques, RV. & Esberárd, CEL org. *Morcegos do Brasil: Biologia, Sistemática, Ecologia e Conservação*. Porto Alegre, Armazém Digital. 123–138
- Instituto brasileiro de geografia e estatística: censo demográfico (2021) Available in: <https://www.ibge.gov.br/cidades-e-estado>.
- Nolte MJ, Hockman D, Cretokos CJ, Behringer RR, Rasweiler JJ (2009) Embryonic staging system for the black mastiff bat, *Molossus rufus* (Molossidae), correlated with structure-function relationships in the adult. *Anat Rec* 292:155–168
- Peracchi AL, Lima IP, Reis NR, Nogueira MR, Ortêncio Filho H (2011) Ordem Chiroptera, pp. 155–234. In: Reis NR, Peracchi AL, Pedro WA, Lima IP. (Eds), *Mamíferos do Brasil*. Londrina, Nélío Roberto dos Reis, 2ª edição. 439p
- Soares JF, Sangioni LA, Vogel FSF, Silva CFB (2007) Parasitismo em ser humano por *B. microplus* (Acari: Ixodidae) em Santa Maria, RS, Brasil. *Cienc Rural* 37:1495–1497

Vargas M (2006) Clave para los géneros más comunes de larvas de Ixodida. (Acari:Ixodidae) Agron Costarricense

30:101–106

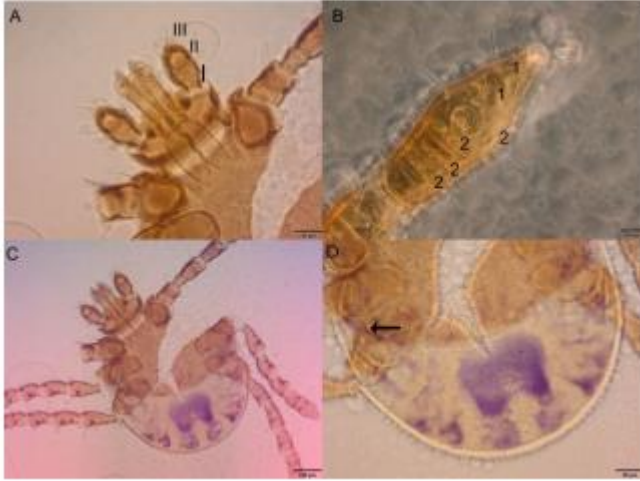


Fig. 1 *Rhipicephalus microplus* larvae. (A) Hexagonal mouthparts, chelicerae, palps with 3 articles (I, II, III). (B) Dorsal tarsus I, show setal alignment (1:1:2:2:2:2) and Haller's organ. (C) Ventral view. (D) Dorsal view, arrow show the eye (Olympus UC30 optical microscope)

ARTIGO 2**Detection of ectoparasites and investigation of infection by *Rickettsia* spp. and *Trypanosoma* spp. in bats
from Rio Grande do Sul, Brazil**

(Manuscript accepted for publication in the Journal Parasitology Research (eletronic ISSN 1432 1955; print ISSN 0932 0113). Submission ID 49d06258-cef2-4067-94f1-538c3b0624cf

Daniele da Silva^a, Fabiana Raquel Ratzlaff^a; Vanessa Osmari^a; Fagner D'ambroso Fernandes^{a,b}; Elizabete Captivo Lourenço^c; Katia Maria Famadas^d; Gisele Vaz Aguirre Samoel^a; Aline Campos^e; Susi Missel Pacheco^f; Helton Fernandes dos Santos^g, Fernanda Silveira Flores Vogel^a; Sônia de Avila Botton^h; Luís Antônio Sangioni^{a,h}

^aLaboratório de Doenças Parasitárias (LADOPAR), Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP), Centro de Ciências Rurais (CCR), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Av. Roraima, nº 1000, Prédio 63D, Bairro Camobi, CEP 97105-900, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil

^bCentro Universitário Ritter Dos Reis (UniRitter), Av. Manoel Elias, nº 2001, Bairro Passo das Pedras, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, CEP 91240-261, Brasil

^cLaboratório de Ecologia de Mamíferos (LEMA), Departamento de Ecologia, Universidade Do Estado Do Rio de Janeiro (UERJ), Rua Dolores Duran, Bairro Maracanã, Rio de Janeiro, RJ, CEP 20990-000, Brasil

^dLaboratório de Artrópodes Parasitas (LAPAR), Departamento de Parasitologia Animal (DPA), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Rod. BR 465, Km 7, Seropédica, Rio de Janeiro, CEP 23890-000, Brasil

^eCentro Estadual de Vigilância em Saúde (CEVS), Av. Ipiranga, 5400, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, CEP 90610-000, Brasil

^fInstituto Sauver (ISAUVER) - Organização Não Governamental, Rua Dr. Paulo Franco Dos Réis, Nº 40, Bairro Boa Vista, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, CEP 90480-090, Brasil

^gLaboratório Central de Diagnóstico em Patologia Aviária (LCDPA), Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP), Centro de Ciências Rurais (CCR), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Av. Roraima, Nº 1000, Prédio 44, Bairro Camobi, Santa Maria, Rio Grande do Sul, CEP 97105-900, Brasil

^hLaboratório de Saúde Única (LASUS), Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Rurais (CCR), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Av. Roraima, nº 1000, Prédio 44, Bairro Camobi, Santa Maria, RS, CEP 97105-900, Brasil

Detection of ectoparasites and investigation of infection by *Rickettsia* spp. and *Trypanosoma* spp. in bats from Rio Grande do Sul, Brazil

Abstract

This study aimed to investigate the presence of ectoparasites and the occurrence of natural infection by *Rickettsia* spp. and *Trypanosoma* spp. in bats from Rio Grande do Sul (RS), Brazil. The evaluated animals were obtained from the Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor, sent by the Centro Estadual de Vigilância Sanitária, to carry out rabies diagnostic tests, during the period from 2016 to 2021. The bats came from 34 municipalities in RS. Of the 109 animals surveyed, 35.8% (39/109) had 385 ectoparasites, with an average of 9.9 parasites per animal. Of these bats, all had insectivorous feeding habits, with 35.9% (14/39) females and 64.1% (25/39) males. The co-parasitism of *Chirnyssoides* sp., *Ewingana inaequalis*, and *Chiroptonyssus robustipes* on *Molossus currentium* (Mammalia, Chiroptera) was recorded for the first time. All bats surveyed were negative for infection by the protozoan and bacteria. Thus, the expansion of the occurrence of these ectoparasites in insectivorous bats in RS was observed. Furthermore, this study corresponds to the first recorded interspecific associations for the species.

Keywords: Chiroptera, Sarcoptidae, Myobiidae, Macronyssidae, Co-parasitism, PCR

1. Introduction

Bats represent the second largest group of the Mammalia class, comprising approximately 25% of the mammals of all existing fauna (Uieda and Bred 2016). However, there are still numerous gaps in the study of the parasites that affect bats (Dick and Patterson 2006). Our research contributes to understanding this gap by presenting an analysis of parasite diversity of ectoparasites found in bats in southern Brazil.

Protozoan and bacterial infections in bats can lead to several significant consequences, including behavioral changes and neurological damage. These infections can manifest themselves in impairment of flight skills and motor coordination, and have serious impacts on the ability to search for food, and consequently on the survival of these animals (Gardner and Molyneux 1987; Sangster et al. 2012). Several pathogens have been identified in bats, some of which have zoonotic potential (Matei et al. 2021), such as *Lyssavirus*, *Ebola*, SARS-CoV-2 (Brook and Dobson 2015; Zhou et al. 2020), *Borrelia* spp. (Socolovschi et al. 2012) and *R. parkeri* (Zhao et al. 2020).

Brazilian spotted fever (BSF), caused by bacteria of the genus *Rickettsia* (order Rickettsiales, family Rickettsiaceae), is an infectious disease of a zoonotic nature with mandatory notification of human cases to the Ministério da Saúde (Silva et al. 2019). These microorganisms are classified as Gram-negative, obligate intracellular coccobacillus, and the pathogenic species of *Rickettsia* are divided into two groups: typhus group (TG) and spotted fever group (SFG), (Schroeder et al. 2015; Monteiro 2017). *Rickettsia* spp., belonging to the SFG, are transmitted by several species of ticks, with the genus *Amblyomma* being the most prevalent. Currently, BSF is considered a reemerging disease with moderate prevalence in several Brazilian states and a great impact on public health due to the difficulty of diagnosis and high mortality in human cases that are not treated early (Labruna 2009; Silva et al. 2019). Regarding the role of bats as carriers of *Rickettsia* spp., there are studies proving the participation of these animals in the biological cycle in the Americas, Europe, Africa, and Asia (Reeves et al. 2006; D'Auria et al. 2010; Reeves et al. 2016; Dietrich et al. 2016; Cicuttin et al. 2017; Zhao et al. 2020; Matei et al. 2021).

Trypanosoma spp. belong to the phylum Sarcomastigophora and comprise an important class of flagellated protozoa with the ability to infect a variety of animal species, with transmission generally carried out by means of hematophagous invertebrate vectors (Galvão et al. 2003; Jansen and Roque 2010). Infection by this protozoan has significant implications for both human and animal health. Bats are considered ancestral hosts of the *Trypanosoma cruzi* clade, since they are known to harbor several species of this protozoan (Hamilton et al. 2012). Marinkelle (1982) indicated the epidemiological significance of these mammals as possible reservoirs for this protozoan. In recent years, there has

been an increase in reports of new *Trypanosoma* species, mainly associated with the *T. cruzi* clade, identified in bats from different regions of the world (Dario et al. 2017).

The aim of the present study was to research ectoparasites and verify the occurrence of natural infection by *Rickettsia* spp. and *Trypanosoma* spp. in bats from Rio Grande do Sul, Brazil, where cases of BSF and Chagas disease in humans have been reported.

2. Materials and methods

The evaluated animals came from 34 municipalities in the state of Rio Grande do Sul (RS) and were referred by users of the Sistema Único de Saúde (SUS) to municipal health agents, being found in urban and peri-urban environments during the period from 2016 to 2021 (Table 1). Rio Grande do Sul is the state located in the south of Brazil (32° 02' 06" S and 52° 05' 55" W), border with Argentina and Uruguay. It has an area of 281,707.151 km², in 2022 the population was estimated at 10,882.965 inhabitants, distributed in 497 municipalities, predominantly in urban areas, with the capital being the city of Porto Alegre. In RS, due to the diversity of climate, soils and relief, there is the formation of different ecosystems derived from two large biomes: the Atlantic Forest and the Pampas. The Biome Pampa, whose occurrence in Brazil is restricted to Rio Grande do Sul, occupies the southern half of the state extending over 63% of the state's territory. Being marked by the presence of a great diversity of fauna and flora, still little known. It is currently considered the second most threatened biome in the country, second only to the Atlantic Forest biome (IBGE 2024).

Subsequently, the chiroptera were taken to the Centro Estadual de Vigilância Sanitária (CEVS) and sent to the Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF), to undergo diagnostic tests for rabies. In this institution, the bats were classified taxonomically according to Díaz et al. (2016) (Table 1). The animals had their central nervous system removed for sample collection and rabies diagnosis and the carcass was stored and kept frozen at -20°C. Subsequently, the animals with negative results for the test were sent to the Laboratório de Doenças Parasitárias (LADOPAR), of the Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), in isothermal boxes for microbiological and parasitological studies.

After defrosting the Chiroptera carcasses at room temperature, sexing, and weighing were performed. To verify the presence of ectoparasites, the fur and membranes of the bats were inspected with magnifying glasses. Subsequently, the body of each animal was "swept", individually, with a soft bristle brush and the specimens of ectoparasites found were collected in a Petri dish. The animals' storage packaging was also thoroughly inspected. The collected specimens were stored in 2 mL microtubes with 70° GL ethanol solution and sent to the Laboratório de Artrópodes Parasitas

(LAPAR), of the Departamento de Parasitologia Animal, from Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), for identification and taxonomic characterization. The ectoparasites were clarified with lactic acid, mounted in Hoyer's medium, and observed under an Olympus UC30 stereoscopic microscope. Photographic records were taken using a Zeiss Primo Star optical microscope (2) with a 10 × magnification for *Chirotonyssus robustipes* and *Ewingana inaequalis*, and a 40 × magnification for eggs and larvae of *Chirnyssoides* sp. Mites were morphologically identified according to the taxonomical keys of Fain (1959), Fain and Lukoschus (1975), and Klompen (1992) (Sarcoptidae family), Dusbábek (1968) and Herrera-Mares et al. (2021) (Myobiidae family) and Radovsky's (2010) (Macronyssidae family). For the tick species *Rhipicephalus microplus*, Vargas (2006) taxonomical key was used.

After collecting ectoparasites, the animals were necropsied. The organs and tissues were individually separated, identified, macerated, aliquoted and stored in freezers at -20 °C until the total DNA extraction was performed. For this procedure, an aliquota of each organ was collected and grouped into pools, totaling 20 mg. The material was divided into four different groups of samples, namely: lymph node, spleen and liver (pool 1); heart and lungs (pool 2); skin of the epigastric region, ears, and wings (pool 3) and bone marrow (pool 4).

Total DNA was extracted from tissue samples using the Wizard Genomic DNA Purification Kit (A1125, Promega®, USA) following the manufacturer's instructions. Differently, in the extraction of DNA from the skin, the samples were incubated at 55 °C for 12 h with the addition of proteinase K (17.5 µL) at a concentration of 20 mg/mL (Ludwig Biotec®, Brazil). The quantity and quality of DNA extraction were evaluated using a NanoDrop 1000 spectrophotometer at an absorption rate of 260/280 nm (Thermo Fisher® Scientific). Subsequently, the DNA samples were stored at -20 °C until the tests were performed.

For research on *Rickettsia* spp., amplification of the total DNA extracted from pools 1 and 3 was performed using primers CS-78 sense (5'-38 GCAAGTATCGGTGAGGATGTAAT-3') and CS-323 antisense (5'-GCTTCCTTAAAATTCAATAAATCAGGAT-3'), which amplify a 401 bp fragment of the citrate synthase (*gltA*) gene. (Labruna et al. 2004). The PCR reaction was prepared in a final volume of 25 µL containing: 1 X Buffer (Promega® Corporation, Madison, WI, USA), 2 mM MgCl₂ (Ludwig Biotec®, Brazil), 0.2 mM dNTPs (Ludwig Biotec®, Brazil), 0.2 µM of each primer (Exxtend Biotecnologia®, São Paulo, Brazil), 2 U of Taq DNA polymerase (Promega® Corporation, Madison, WI, USA), and ~ 20 ng of extracted DNA samples. The amplification was processed in an automatic thermal cycler (T100™ Thermal Cycler, Bio-Rad®) under the following conditions: 1 initial cycle at 95 °C for 3 min, 40 cycles of 30 s at 95 °C, 30 s at 48 °C, 30 s at 72 °C and 1 final cycle at 72 °C for 7 min, followed by 4 °C/∞.

For each reaction, Milli-Q water was used as a negative control and *Rickettsia vini* obtained from cell culture as a positive control (Novakova et al. 2016). Afterward, 8 μ L of the PCR amplified products were submitted to electrophoresis in a 2% agarose gel, with the addition of 2 μ L of Diamond™ Nucleic Acid Dye (Promega® Corporation, Madison, WI, USA) and 2 μ L of Buffer (Promega® Corporation, Madison, WI, USA), under 90 V, for 60 min at 300 A, and subsequently visualized on a transilluminator in the presence of ultraviolet light.

For the search for *Trypanosoma* spp. a total amplification of the DNA extracted from the four pools was performed using the primers KIN1R sense (5'-GCGTTCAAAGATTGGGCAAT-3') and KIN2F antisense (5'-CGCCCGAAAGTTCACC -3'), which amplify a fragment of 540 bp of the gene ITS1 target in the conserved 18S and 5.8S region of rDNA (Desquesnes et al. 2001). The PCR reaction was prepared in a final volume of 25 μ L containing: 1 X Buffer (Promega® Corporation, Madison, WI, USA), 2 mM MgCl₂ (Ludwig Biotec, Brazil), 0.2 mM dNTPs (Ludwig Biotec®, Brazil), 0.2 μ M of each Primer (Exxtend Biotecnologia, São Paulo, Brazil), 2 U of Taq DNA polymerase (Promega® Corporation, Madison, WI, USA), and ~ 20 ng of extracted DNA sample.

The reaction was carried out in an automatic thermal cycler (T100™ Thermal Cycler, Bio-Rad®), under the following conditions: initial cycle at 94 °C for 3 min, 35 cycles of 94 °C for 1 min, 53 °C for 1 min, 72 °C for 1 min and a final cycle at 72 °C for 5 min, followed by 4 °C/∞. For each reaction, Milli-Q water was used as a negative control and *Trypanosoma evansi*, isolated from a naturally infected dog, as a positive control. Afterwards, 8 μ L of the PCR amplified products were submitted to electrophoresis in a 1.5% agarose gel, adding 2 μ L of Diamond™ Nucleic Acid Dye (Promega® Corporation, Madison, WI, USA) and 2 μ L of Buffer (Promega® Corporation, Madison, WI, USA), under 70 V, for 50 min at 300 A, and subsequently visualized in a transilluminator in the presence of ultraviolet light.

The detection threshold of both reactions was performed by diluting each positive control in Milli-Q water in the following serial dilutions from 1:10 to 1:10 and tested by PCR. The inhibition of the PCR reaction was carried out, individually, with a dilution of the positive control of *T. evansi* and *R. vini* in the ratio of 1:1, and tested by PCR. PCR reactions for both tests were performed as previously described.

This study received institutional authorization from CEVS, in accordance with Portarias SES/RS n° 334/2019 and n° 1134/2022, and was submitted to the Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFSM), under protocol number 7576231019, as well as to the Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio/SISBIO).

3. Results

The description of bats by family, eating habits, gender, species, municipality of capture, and frequency of detection of ectoparasites is shown in Table 1. Of the total bats analyzed, 35.8% (39/109) had a total of 385 ectoparasites. The variation in occurrence of infestation per animal ranged from 1 to 38, with an average of 9.9 mites per bat. All parasitized animals had an insectivorous feeding habit – 35.9% females (14/39) and 64.1% males (25/39).

One (01/109; 0.92%) bat of the species *Molossus currentium* from the municipality of Pelotas, RS (31° 46' 19" S and 52° 20' 33" W) showed co-parasitism of eggs and larva, one female of *Chirnyssoides* sp., one female of *Ewingana inaequalis*, and one female of *C. robustipes* (Fig. 1). It was not possible to identify the species of *Chirnyssoides* sp. due to sample quality.

One (01/109; 0.92%) bat of the species *Molossus rufus* from the municipality of Cachoeirinha, RS (29° 56' 52" S and 51° 5' 43" W) was parasitized with a larva of *Rhipicephalus microplus*.

The other bats (37/109; 33.9%) were parasitized with *C. robustipes*, corresponding to the species *Tadarida brasiliensis* (31/109; 28.4%), followed by *Molossus molossus* (01/109; 0.92%). In addition, there were *Molossus rufus* (01/109; 0.92%), *Molossus* sp. (01/109; 0.92%), and three bats (03/109; 2.75%) of unidentified species. Different stages of the mite *C. robustipes* were recovered, with the presence of protonymphs being the majority (353/385; 91.68%), followed by some females (19/385; 4.93%) and rare males (10/385; 2.59%). The parasitized animals came from 16 municipalities in RS (Table 1).

In the PCR reactions for searching for *Rickettsia* spp. and *Trypanosoma* spp., none of the 109 processed samples amplified the DNA of these microorganisms.

4. Discussion

Brazil has one of the largest identified bat faunas, with nine families verified, totaling 181 species and 68 genera distributed throughout the national territory (Garbino et al. 2020). In Rio Grande do Sul (RS), 40 species of these animals have been recorded among the families Noctilionidae, Phyllostomidae, Vespertilionidae, and Molossidae (Pacheco 2013), representing approximately 22% of the chiropterofauna recorded so far in Brazil. Approximately half of the municipalities in RS do not have records of their chiropteran fauna (Pacheco 2013).

In the RS state, studies directed at ectoparasites of bats are scarce, with records of 12 species of *Streblidae*, four species of *Nycteribiidae*, and mites of the Spinturnicidae family in bats of the Phyllostomidae and Vespertilionidae families (Graciolli and Rui 2001; Gracioli 2004; Silva et al. 2009). Molossid ectoparasites reported include the flea *Rhynchopsyllus pulex* in *Nyctinomops laticaudatus* (Monteiro et al. 2005), *C. robustipes* and *E. inaequalis* described in

bats of the species *T. brasiliensis* (Pesenti et al. 2014) and *R. microplus* in *M. rufus* (Silva et al. 2023). It should be noted that there is no description of *C. robustipes* and *E. inaequalis* in *M. currentium* in the state. The record of *Chirnyssoides* sp. geographically closest to RS is in the state of Rio de Janeiro, occurring in bats of the Phyllostomidae family (Lourenço et al. 2013). It is noteworthy that there are no reports of this mite in RS, as well as of parasitism in bats of the Molossidae family.

Several factors can influence the diversity of ectoparasites in animals, such as climate, habitat, geographic distribution, behavior, physical size, type of shelter, or immune response of the host species (Szentiványi et al. 2018; Rui and Gracioli 2005). The ability of Chiroptera to move between fragments of the ecosystem, as well as the characteristics and environmental integrity can be determinant in the variations of species of diagnosed ectoparasites (Santos et al. 2012). Colonies of *T. brasiliensis* located in RS range from 10 to 8,000 specimens, a number not registered in other Brazilian states (Pacheco 2013). Although there are no reports of sharing shelters with *Molossus currentium*, Pacheco (2013) found *T. brasiliensis* sharing shelter with other molossids, such as *M. rufus* and *M. molossus*, which may allow the transmission of infectious agents and parasites between species of Chiroptera. In the present study, the bat that presented co-parasitism comes from the municipality of Pelotas, which has an area of 1,609.708 km and an estimated population of 343,826 (IBGE 2022), of the Pampa biome, which has few records of the occurrence of these animals.

Chirotonyssus robustipes (Ewing 1925) is a mite belonging to the Macronyssidae family and has been studied due to its high prevalence and abundance in several bat species (Pesenti et al. 2014). On the other hand, mites of the Myobiidae family, such as the species *Ewingana inaequalis* (Radford 1948), have high parasite specificity (Fain 1994), as well as mites of the genus *Chirnyssoides*, belonging to the Sarcoptidae family, which are considered ectoparasites exclusive to the families Phyllostomidae and Noctilionidae (Fain and Lukoschus 1971).

Chirotonyssus robustipes is the most abundant mite in bats. Males are rarely found on their hosts, the nymphal stage being the most frequent (Radovsky 1967). *C. robustipes* protonymphs remain in the host for several days. During this interval they feed on tissue fluids, performing this activity for a period of 10 to 12 h. The sites where feeding occurs are highly attractive to Other protonymphs, resulting in them clustering around these sources. After this tissue-feeding phase, the protonymphs become engorged and move on to the deutonymph phase, in which they do not feed. Later, the females feed exclusively on blood, carrying out the engorgement in a period of 15 to 20 min, after which they leave the host (Lavoipierre and Beck 1967; Radovsky 1967).

Although this ectoparasite is found in a variety of bat species, such as *Myotis nigricans*, *Myotis californicus*, *Eptesicus fuscus* and *Nyctinomops macrotis* (Durden et al. 1992; Guzmán-Cornejo et al. 2003), this mite has specificity

with *T. brasiliensis*, parasitizing this species in the United States of America (USA), Antillean Island, Panama, Mexico, Venezuela, Argentina, Chile and Southern Brazil (Pesenti et al. 2014). In Brazil, Fonseca (1948) identified *C. robustipes* in bats of the species *N. macrotis* and in unidentified species in the state of São Paulo. Silva et al. (2017) reported these mites on *Noctlio albiventris* in the state of Mato Grosso do Sul, and Pesenti et al. (2014) found the parasite in bats of the *T. brasiliensis* species in RS.

In our study, it was observed that *C. robustipes* was the most abundant ectoparasite and was predominantly parasitizing bats of the *T. brasiliensis* species. It was verified that the presence of protonymphs was the majority, with males being rarely found, corroborating what was described by Radovsky (1967) and Pesenti et al. (2014). Although the present research did not record the specific anatomical locations of mite fixation, it is emphasized that the definition of the location of parasitism is relevant, being substantial for carrying out further studies, improving understanding of the relationships between parasitic mites and their hosts.

According to Whitaker et al. (1988), parasites with host specificity can adapt to other species due to the circumstances of the environment and the host. It should be noted that the parasite population does not disperse beyond the host population and, if there is a decrease in population or extinction of the host, the parasite may consequently become extinct. However, one of the strategies adopted by mites to maintain the species includes becoming generalists and parasitizing multiple hosts, enabling their survival and dissemination (Furman 1966). With regard to the specificity of *Chirnyssoides* sp., evolution and adaptation to new hosts may occur. However, the low occurrence of the parasite described in the present work can be characterized as an incidental finding.

The simultaneous presence of mites of different species may be due to the preference of the parasites for different parts of the host, thus avoiding interspecific competition in the same individual (Ter Hofstede et al. 2004). *C. robustipes* has a preference for location over *T. brasiliensis* in the plagiopatagium area. Although they can be found on the wings, adult specimens are usually located on the head and body (Spears et al. 1999). However, *Chirnyssoides* sp. are usually found on the edges of the wing membranes (Fain and Lukoschus 1971), while *E. inaequalis* can be found preferentially in the lateral fossae, but also on the back and other regions covered by fur, not being described on the wings or the ends of the limbs (Lavoipierre and Beck 1970).

With regard to BSF, different epidemiological scenarios related to this disease are observed. *Rickettsia rickettsii* presents high lethality, while *Rickettsia parkeri* presents milder and non-lethal infection to the hosts. The tick *Amblyomma sculptum*, the main vector of BSF, is not usually found in RS, due to climate issues. In this location, BSF transmission is

associated with other species of ticks belonging to the genus *Amblyomma*, which can be found on wild animals and occasionally on dogs and cats (SES and SEAPI 2023).

It should be noted that *R. rickettsii*, *R. parkeri*, *R. amblyommii*, *R. rhipicephali*, and *R. bellii* were identified in bats of the families Molossidae, Vespertilionidae, and Phyllostomidae in the state of São Paulo, Brazil (D'Auria et al. 2010). Furthermore, *Rickettsia* spp. was detected in several species of ticks collected from bats in the USA, France, Poland, and French Guiana (Loftis et al. 2005; Reeves et al. 2006; Socolovschi et al. 2012; Tahir et al. 2012; Piksa et al. 2016). The bats examined in the present study came from urban and peri-urban areas. In RS, the disease does not have an occurrence profile in these areas. In the period between 2007 and 2022, 17 human cases of BSF were confirmed in RS, with no deaths. All cases were associated with *R. parkeri*, with the majority being registered in people who had been in rural areas or areas with dense forest, as well as due to the transport of ticks typical of wild fauna into the interior of homes via domestic animals that enter the forests close to the residences (SES and SEAPI 2023).

Rio Grande do Sul was reported as one of the states with the highest rate of human seroprevalence for *T. cruzi* (Camargo et al. 1984) and is still considered endemic for Chagas disease (Bianchi et al. 2021). It is important to point out that the main form of infection by *T. cruzi* occurs through vectors, and RS is considered free of vector transmission of this disease. *Triatoma infestans* is considered the main vector of *T. cruzi* and has been controlled in the state (Bedin et al. 2009, 2021). However, there are other species of triatomines that live in rural households, with a predominance of the species *Triatoma rubrovaria* (Bianchi et al. 2021), which may be competent agents for the transmission of *T. cruzi* (Silva and Silva 1993). The bats investigated in this study were identified as insectivores, which implies a greater potential for exposure and infection by trypanosomes, since they can acquire the infection either via vector transmission, as well as oral transmission when feeding on infected insects (Ribeiro et al. 1987). Oral transmission of *T. cruzi* occurs when forms infective trypomastigotes invade the gastric mucosal epithelium until reach the epithelial cells of the host organ (Yoshida 2009). *T. cruzi* presents high pathogenicity in situations of oral infection, which can result in severe and acute cases, which can lead to death (Camandaroba et al. 2002). Studies conducted in different regions of RS revealed the absence of positive insects for *T. cruzi* (Priotto et al. 2014; Ribeiro et al. 2014; Bianchi et al. 2021). These results may explain the absence of positive individuals in our molecular analyses.

In Brazil, in addition to the prevention and control measures aimed at BSF, which mainly consist of avoiding contact of the population with potential vectors, surveillance actions are carried out, which include research to identify the circulation of etiological agents in unknown areas (Ministério da Saúde 2021). It should be noted that RS maintains a continuous surveillance program for tick species found in humans and animals, aiming to identify risks to human and

animal health (SES and SEAPI 2023), as well as active and passive vector research as an action of environmental health surveillance for Chagas disease (Bedin et al. 2021). Thus, the importance of this research is emphasized, corroborating with the epidemiology and surveillance of these diseases.

5. Conclusion

This study represents the first investigation of *Rickettsia* spp. and *Trypanosoma* spp. in bats in RS. This research expands the distribution of *Chirnyssoides* sp. in Brazil, including the first record of this mite on *Molossus currentium* in RS. It also expands the host diversity of *Chirnyssoides* sp., *E. inaequalis*, and *C. robustipes*, reporting bat parasitism of the species *M. currentium*. Furthermore, this finding corresponds to the first interspecific associations recorded for the species.

Acknowledgements

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

Author contributions

All authors whose names appear on the submission DS, FRR, VO, FDF, ECL, KMF, GVAS, AC, SMP, HFS, FSFV, SAB, LAS made substantial contributions to the conception or design of the work; or the acquisition, analysis, or interpretation of data; or the creation of new software used in the work.

Funding

This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001.

Data availability

Not applicable.

Declarations

Ethical approval Not applicable.

Consent to participate Not applicable.

Consent to publish Not applicable.

Competing interests The authors declare no competing interests.

References

- Bedin C, Mello F, Wilhelms TS, Torres MA, Estima C, Ferreira CF, Sehn L (2009) Vigilância ambiental: doença de Chagas no Rio Grande do Sul. *Bol Epidemiol* 11:1–8
- Bedin C, Wilhelms T, Villela MM, Silva GC, Riffel AP, Sackis P, Mello F (2021) Residual foci of *Triatoma infestans* infestation: surveillance and control in Rio Grande do Sul, Brazil, 2001–2018. *Rev Soc Bras Med Trop* 54:e0530–2020. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0530-2020>
- Bianchi TF, Jeske S, Sartori A, Grala AP, Villela MM (2021) Validation of a documentar on Chagas disease by a population livin g in an endemic area. *Braz J Biol* 81(3). <https://doi.org/10.1590/1519-6984.228876>
- Brook CE, Dobson AP (2015) Bats as “special” reservoirs for emerging zoonotic pathogens. *Trends Microbiol* 23(3):172–180. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.12.004>
- Camandaroba ELP, Lima CMP, Andrade SG (2002) Oral transmission of Chagas Disease: Importance of *Trypanosoma cruzi* biodeme in the intragastric experimental infection. *Rev Inst Med Trop São Paulo* v 44, n. 2, p. 97–103, mar/apr. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652002000200008>
- Camargo ME, Silva GR, Castilho EA, Silveira AC (1984) Inquérito sorológico de prevalência da infecção chagásica no Brasil, 1975/1980. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 26(4):192–204. <https://doi.org/10.1590/S0036-46651984000400003>
- Cicuttin GL, Salvo MN, Rosa IL, Dohmen FG (2017) *Neorickettsia risticii*, *Rickettsia* sp. and *Bartonella* sp.in *Tadarida brasiliensis* bats from Buenos Aires, Argentina. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 52:1–5. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2017.04.004>
- D’Auria SRN, Camargo MCG, Pacheco RC, Savani ESMM, Dias MAG, Rosa AR, Almeida MF, Labruna MB (2010) Serologic survey for rickettsiosis in bats from São Paulo city, Brazil. *Vector Borne Zoonotic Dis* 10(5):459–463. <https://doi.org/10.1089/vbz.2009.0070>
- Dario MA, Lisboa CV, Costa LM, Moratelli R, Nascimento MP, Costa LP, Leite YLR, Llewellyn MS, Xavier SCC, Roque ALR, Jansen AM (2017) High *Trypanosoma* spp. diversity is maintained by bats and triatomines in Espírito Santo state, Brazil. *PLoS One* 12(11):e0188412. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188412>
- Desquesnes M, McLaughlin G, Zoungrana A, Dávila AM (2001) Detection and identification of *Trypanosoma* of African livestock through a single PCR based on internal transcribed spacer 1 of rDNA. *Int J Parasitol* 31(5–6):610–4. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(01\)00161-8](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(01)00161-8)
- Díaz MM, Solari S, Aguirre LF, Aguiar L, Barquez RM (2016) Clave de identificación de losmurciélagos de Sudamérica – Chavede identificação dos morcegos da América do Sul. 1ed. bilíngue – Argentina:Yerba Buena, 160 p.

- Dick CW, Patterson BD (2006) Bat flies: Obligate ectoparasites of bats. In: *Micromammals and Macroparasites: from Evolutionary Ecology to Management*. Springer-Verlag Publishing. 647
- Dietrich M, Tjale MA, Weyer J, Kearney T, Seemark ECJ, Nel LH, Monadjem A, Markotter W (2016) Diversity of *Bartonella* and *Rickettsia* spp. in bats and their blood-feeding ectoparasites from South Africa and Swaziland. *PLoS One* 11(3):e0152077. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152077>
- Durden LA, Best TL, Wilson N, Hilton CD (1992) Ectoparasites mites (Acari) of sympatric Brazilian free-tailed bats and big brown bats in Alabama. *J Med Entomol* 29(2):507–511. <https://doi.org/10.1093/jmedent/29.3.507>
- Dusbábek F (1968) Los acaros cubanos de la familia Spinturnicidae (Acarina), com notas sobre su especificidad de hospedeiros. *Poeyana Serie A* 57:1–31
- Fain A (1959) Les acariens psoriques parasites des chauves-souris. X. Le genre *Chirnyssoides* g.n. chez les chauves-souris sud-américaines (Sarcoptiformes: Sarcoptidae). *Bulletin de l'Institut Royal des Sciences Naturelles de Belgique Entomologie*. 35(31):1–19
- Fain A (1994) Adaptation, specificity and host-parasite coevolution in mites (ACARI). *Int J Parasitol* 24(8):1273–1283. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(94\)90194-5](https://doi.org/10.1016/0020-7519(94)90194-5)
- Fain A, Lukoschus FS (1971) Parasitic mites of Surinam. XVIII. Mites of the genera *Notoedres* and *Chirnyssoides* from bats (Sarcoptiformes: Sarcoptidae). *Bull Ann Soc Roy Entomol Belgique* 107:298–313
- Fain A, Lukoschus FS (1975) Parasitic mites of Surinam. XXX. New observations on the genera *Chirnyssoides* and *Notoedres* from bats (Sarcoptiformes: Sarcoptidae). *Acta Zool Pathol Antwerp* 61:91–118
- Fonseca F (1948) A monograph of the genera and species of *Macronyssidae oudemans*, 1936 (Synom Liponissidae Vitzthum, 1931) (Acari). *Proc Zool Soc Lond* 118:249–334
- Furman DP (1966) The spinturnicid mites of Panama. In: Wenzel, R.L., Tipton, V.J. *Ectoparasites of Panama* Editado; Chicago: Field Museum of Natural History. 125–166
- Galvão C, Carcavalho R, Rocha DS, Jurberg J (2003) A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. *Zootaxa* 202:1–36. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.202.1.1>
- Garbino GST, Gregorin R, Lima IP, Loureiro L, Moras L, Moratelli R, Nogueira MR, Pavan AC, Tavares VC, Nascimento MC, Novaes RLM, Peracchi AL (2020) Updated checklist of Brazilian bats: versão 2020. Comitê da Lista de Morcegos do Brasil—CLMB. Sociedade Brasileira para o Estudo de Quirópteros (Sbeq)

- Gardner RA, Molyneux DH (1987) *Babesia vesperuginis*: natural and experimental infections in British bats (Microchiroptera). *Parasitology* 95:461–469. <https://doi.org/10.1017/s0031182000057887>
- Gracioli G, Rui AM (2001) Streblidae (Diptera, Hippoboscoidea) em morcegos (Chiroptera, Phyllostomidae) no nordeste do Rio Grande do Sul, Brasil. *Iheringia, Sér. Zool. Porto Alegre* 90:85–92. <https://doi.org/10.1590/S0073-47212001000100009>
- Guzman-Cornejo C, García-Prieto L, León GP, Juan B, Morales-Malacara JB (2003) Parasites of *Tadarida brasiliensis mexicana* (Chiroptera: Molossidae) from Arid Regions of Mexico. *Comp Parasitol* 70(1):11–25. [https://doi.org/10.1654/1525-2647\(2003\)070\[0011:POTBMC\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1654/1525-2647(2003)070[0011:POTBMC]2.0.CO;2)
- Hamilton PB, Teixeira MMG, Stevens JR (2012) The evolution of *Trypanosoma cruzi*: The “bat seeding” hypothesis. *Trends Parasitol.* <https://doi.org/10.1016/j.pt.2012.01.006>
- Herrera-Mares A, Guzmán-Cornejo C, Morales-Malacara JB (2021) The myobiid mites (Acariformes, Eleutherengona, Myobiidae) from Mexico: hosts, distribution and identification key for the genera and species. *Syst Appl Acarol* 26(4):724–748. <https://doi.org/10.11158/saa.26.4.6>
- IBGE (2022) Instituto brasileiro de geografia e estatística: censo demográfico. Available in: <https://www.ibge.gov.br/cidades-e-estado> >. Accessed in: 10 jan 2023
- IBGE (2024) Instituto brasileiro de geografia e estatística: censo demográfico. Available in: <https://www.ibge.gov.br/cidades-e-estado> &t ;. Accessed in: 17 jan 2024
- Jansen AM, Roque ALR (2010) Domestic and wild mammalian reservoir. In: Telleria J, Tibayrenc M (eds) *American trypanosomiasis Chagas Disease—one hundred years of research*. Elsevier, London, pp 249–276
- Klompen JSH (1992) Phylogenetic relationships in the mite family Sarcoptidae (Acari: Astigmata). *Museum of Zoology, University of Michigan, Michigan*, p 154
- Labruna MB (2009) Ecology of *Rickettsia* in South America. *Ann N Y Acad Sci* 1166:156–166. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04516.x>
- Labruna MB, Whitworth T, Horta MC, Bouyer DH, McBride JW, Pinter A, Popov V, Gennari SM, Walker DH (2004) *Rickettsia* species infecting *Amblyomma cooperi* ticks from an area in the state of São Paulo, Brazil, where Brazilian spotted fever is endemic. *J Clin Microbiol* 42(1):90–98. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.1.90-98.2004>
- Lavoipierre MMJ, Beck AJ (1967) Feeding mechanism of *Chiroptonyssus robustipes* on the transilluminated bat wing. *Exp Parasitol* 20:312–320. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(67\)90054-9](https://doi.org/10.1016/0014-4894(67)90054-9)

- Lavoipierre MMJ, Beck AJ (1970) Host-parasite relationships of acarine parasites and their vertebrate hosts. II. Lesions produced by myobiid mites in the skin of their hosts. *Acta Trop* 27(2):146–64
- Lourenço EC, Pinheiro MC, Faccini JLH, Famadas KM (2013) New record, host and localities of bat mite of genus *Chirnyssoides* (Acari, Sarcoptiformes, Sarcoptidae). *Rev Bras Parasitol Vet* 22(2):260–264. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612013000200045>
- Marinkelle CJ (1982) Developmental stages of *Trypanosoma cruzi*-like flagellates in *Carvenicola pilosa*. *Rev Biol Trop* 30:107–111
- Matei IA, Corduneanu A, Sándor AD, Ionică AM, Panait L, Kalmár Z, Ivan T, Papuc I, Bouari C, Fit N, Mihalca AD (2021) Rickettsia spp. in bats of Romania: high prevalence of *Rickettsia monacensis* in two insectivorous bat species. *Parasit Vectors* 14(1):107. <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04592-x>
- Ministério da Saúde (2021) Doenças tropicais negligenciadas. Boletim Epidemiológico - Secretaria de Vigilância em Saúde. Número Especial. Mar
- Monteiro SG, Hermann GP, Luchese FC, Mottin VD (2005) Primeiro registro de *Rhynchopsyllus pulex* (Siphonaptera: Tungidae) em *Nyctinomops laticaudatus* (Chiroptera: Molossidae) no Brasil. *Ciência Rural* 35:956–957. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782005000400037>
- Monteiro SG (2017) Parasitologia na Medicina Veterinária. 2 ed- Rio de Janeiro, Roca. 370
- Novakova M, Costa FB, Krause F, Literak I, Labruna MB (2016) *Rickettsia vini* n. sp. (Rickettsiaceae) infecting the tick *Ixodes arboricola* (Acari: Ixodidae). *Parasit Vectors* 9:469. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1742-8>
- Pacheco SM (2013) Chiroptera, p. 175–176, 244, 254. In: Weber MM, Roman C, Cáceres NC (Org.). *Mamíferos do Rio Grande do Sul*. Santa Maria, Editora da UFSM, 554
- Pesenti TC, Gomes SN, Rui AM, Müller G (2014) Geographic variation in ectoparasitic mites diversity in *Tadarida brasiliensis* (Chiroptera, Molossidae) *Iheringia. Série Zoologia* 104(4):451–456. <https://doi.org/10.1590/1678-476620141044451456>
- Priotto MC, Santos CV, Mello F, Ferraz ML, Villela MM (2014) Aspectos da vigilância entomológica da doença de Chagas no sul do Rio Grande do Sul, Brasil. *Rev Patol Trop* 43:228–238. <https://doi.org/10.5216/rpt.v43i2.31113>
- Radovsky FJ (1967) The *Macronyssidae* and *Laelapidae* (Acarina: Mesostigmata) parasitic on bats. *Univ Calif Publ Entomol* 46:1–288
- Radovsky FJ (2010) Revision of genera of the parasitic mite family *Macronyssidae* (Mesostigmata: Dermanyssoidea) of the world. Michigan, West Bloomfield, Indira Publishing House, USA, p 170

- Reeves WK, Streicker DG, Loftis AD, Dasch GA (2006) Serologic survey of *Eptesicus fuscus* from Georgia, USA for *Rickettsia* and *Borrelia* and laboratory transmission of a *Rickettsia* by bat ticks. *J Vector Ecol* 31(2):386–389. [https://doi.org/10.3376/1081-1710\(2006\)31\[386:ssoeff\]2.0.co;2](https://doi.org/10.3376/1081-1710(2006)31[386:ssoeff]2.0.co;2)
- Reeves WK, Beck J, Orlova MV, Daly JL, Pippin K, Revan F, Loftis AD (2016) Ecology of bats, their ectoparasites, and associated pathogens on Saint Kitts Island. *J Med Entomol* 53:1218–1225. <https://doi.org/10.1093/jme/tjw078>
- Ribeiro AR, Mendonça VJ, Alves RT, Martinez I, Araújo RF, Mello F, Rosa JA (2014) *Trypanosoma cruzi* strains from triatominecollected in Bahia and Rio Grande do Sul, Brazil. *Rev Saude Publica* 48(2):295–302. <https://doi.org/10.1590/S0034-8910.2014048004719>
- Ribeiro RD, Garcia TAR, Bonomo WC (1987) Contribuição para o estudo dos mecanismos de transmissão do agente etiológico da Doença de Chagas. *Rev. Saúde Pública, São Paulo*, v. 21, n. 1, p. 51–54, feb. <https://doi.org/10.1590/S0034-89101987000100008>
- Rui AM, Graciolli G (2005) Moscas ectoparasitas (Diptera, Streblidae) de morcegos (Chiroptera, Phyllostomidae) no sul do Brasil: associações hospedeiros-parasitas e taxas de infestação. *Rev Bras Zool* 22(2):438–445. <https://doi.org/10.1590/S0101-81752005000200021>
- Sangster CR, Gordon AN, Hayes D (2012) Systemic toxoplasmosis in captive flying-foxes. *Aust Vet J* 90:140–142. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.2011.00868.x>
- Santos FGA, Calouro AM, Souza SF, Lague BM, Marciente R, Faustino CL, Santos GJL, Cunha AO (2012) Ectoparasitismo em uma assembléia de morcegos em um fragmento florestal no estado do Acre, Brasil. *Acta Vet Bras* 6(3):211–218. <https://doi.org/10.21708/avb.2012.6.3.2778>
- Schroeder CLC, Narra HP, Rojas M, Sahni A, Patel J, Khanipov K, Wood TG, Fofanov Y, Sahni SK (2015) Bacterial small RNAs in the Genus *Rickettsia*. *BMC Genom* 16(1075). <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2293-7>
- Secretaria da Saúde (SES) and Secretaria de Agricultura (SEAPI) do Rio Grande do Sul (2023) Febre Maculosa: situação do Rio Grande do Sul em 2023. Nota conjunta sobre Febre Maculosa. <https://saude.rs.gov.br/upload/arquivos/202306/15185007-nota-febre-maculosa-2023.pdf>
- Silva IG, Silva HHG (1993) Suscetibilidade de 11 espécies de Triatomíneos (Hemiptera, Reduviidae) à cepa ‘Y’ de *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae). *Rev Bras Entomol* 37:459–63
- Silva CL, Graciolli G, Rui AM (2009) Novos registros de ácaros ectoparasitos (Acari, Spinturnicidae) de morcegos (Chiroptera, Phyllostomidae) no Rio Grande do Sul, Brasil. *Chiroptera Neotropical* 15(2):469–471

- Silva CL, Valim MP, Gracioli G (2017) Ácaros ectoparasitos de morcegos no estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. *Iheringia, Série Zoologia*, 107(supl.): e2017111. <https://doi.org/10.1590/1678-4766e2017111>
- Silva AB, Sato TP, Carvalho PVS, Oliveira ML, Freitas EJP (2019) Panorama Epidemiológico de *Rickettsia* spp. no Brasil: Uma breve revisão. *Acta Tecnologica FAVALE*, 1. v.01, n.01
- Silva D, Ratzlaff FR, Osmari V, Fernandes FD, Lourenço EC, Famadas KM, Campos A, Witt AA, Pacheco SM, Vogel FSF, Botton SA, Sanigioni LA (2023) *Rhipicephalus microplus* larvae: first report in bats, *Molossus rufus*. *Vet Res Commun*. <https://doi.org/10.1007/s11259-022-10050-5>
- Socolovschi C, Kernif T, Raoult D, Parola P (2012) *Borrelia*, *Rickettsia*, and *Ehrlichia* Species in Bat Ticks, France, 2010. *Emerg Infect Dis* 18(12):1966–1975. <https://doi.org/10.3201/eid1812.111237>
- Spears RE, Durden LA, Hagan DV (1999) Ectoparasites of Brazilian free-tailed bats with emphasis on anatomical site preferences for *Chirotonyssus robustipes* (Acari: Macronyssidae). *J Med Entomol* 36(4):481–485. <https://doi.org/10.1093/jmedent/36.4.481>
- Szentiványi T, Haelewaters D, Pfliegler WP, Clément L, Christe P, Glaizot O (2018) Laboulbeniales (Fungi: Ascomycota) infection of bat flies (Diptera: Nycteribiidae) from *Miniopterus schreibersii* across Europe. *Parasit Vectors* 11(1):395. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2921-6>
- Ter Hofstede HM, Fenton MB, Whitaker JO Jr (2004) Host and host-site specificity of bat flies (Diptera: Streblidae and Nycteribiidae) on Neotropical bats (Chiroptera). *Can J Zool* 82:616–626. <https://doi.org/10.1139/Z04-030>
- Uieda W, Bred A (2016) Morcegos: agentes negligenciados da sustentabilidade. *Sustentabilidade em Debate – Brasília*. 7(1):186–209
- Vargas M (2006) Clave para los géneros más comunes de larvas de Ixodida. (Acari:Ixodidae) *Agron Costarricense*. 30(1):101–105
- Whitaker JO Jr, Ritzi CM, Dick CW (1988) Collecting and preserving bat ectoparasites for ecological study. In: Kunz TH (ed) *Ecological and Behavioral Methods for the Study of Bats*. Smithsonian Institution Press, Washington, D.C., pp 459–474
- Yoshida N (2009) Molecular mechanisms of *Trypanosoma cruzi* infection by oral route. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 104, Supl. I, p. 101–107. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000900015>
- Zhao S, Yang M, Liu G, Hornok S, Zhao S, Sang C, Tan W, Wang Y (2020) Rickettsiae in the common pipistrelle *Pipistrellus pipistrellus* (Chiroptera: Vespertilionidae) and the bat soft tick *Argas vespertilionis* (Ixodida: Argasidae). *Parasit Vectors* 9;13(1):10. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-3885-x>

Zhou P, Yang XL, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, Si HR, Zhu Y, Li B, Huang CL, Chen HD, Chen J, Luo Y, Guo H, Jiang RD, Liu MQ, Chen Y, Shen XR, Wang X, Zheng XS, Zhao K, Chen QJ, Deng F, Liu LL, Yan B, Zhan FX, Wang YY, Xiao GF, Shi ZL (2020) A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* 579(7798):270–273. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>. (Erratum.In:Nature.2020Dec;588(7836):E6)



Fig. 1. (A) Egg and larva of *Chirnyssoides* sp. (B) *Chiroptonyssus robustipes*. (C) *Ewingana inaequalis* (Zeiss Primo Star (2) optical microscope)

Table 1 Distribution of bats by family, eating habits, genus, species, municipality of capture, sex and frequency of detection of ectoparasites by species, city and family between 2016 and 2021 in the state of Rio Grande do Sul (RS), Brazil

Family/feeding habits	Genus/species	County	No. of bats county/family %	Sex M/F	No. of bats parasitized per county/%	Parasitized per family/%	
Molossidae/insetivorous	<i>Tadarida brasiliensis</i>	Pelotas	14/14.9	07/07	8/57.1		
		Canoas	11/11.7	05/06	10/90.9		
		Porto Alegre	07/7.4	04/03	0.0		
		Rio Grande	05/5.3	04/01	3/60.0		
		Caxias do Sul	05/5.3	05/00	2/40.0		
		Camaquã	01/1.1	00/01	1/100.0		
		Capão do Leão	01/1.1	01/00	1/100.0		
		Gramado	01/1.1	01/00	1/100.0		
		Gravataí	01/1.1	00/01	0.0		
		Ivoti	01/1.1	01/00	1/100.0		
		Passo Fundo	01/1.1	01/00	1/100.0		
		Santa Maria	01/1.1	01/00	1/100.0		
		São Gabriel	01/1.1	00/01	0.0		
		São Leopoldo	01/1.1	01/00	1/100.0		
		<i>Molossus</i> spp.	Santa Maria	03/3.2	02/01	1/33.3	
	<i>Molossus correntium</i>	Pelotas	05/5.3	03/02	1/20.0		
		Capivari do Sul	01/1.1	01/00	0.0		
		Eldorado do Sul	01/1.1	01/00	0.0		
		Guaíba	01/1.1	01/00	0.0		
		Nova Alvorada	01/1.1	00/01	0.0		
		Porto Alegre	01/1.1	01/00	0.0		
		Rio Grande	01/1.1	00/01	0.0		
		São José do Norte	01/1.1	01/00	0.0		
		<i>Molossus molossus</i>	Rio Grande	04/4.2	00/04	0.0	
		Bento Gonçalves	02/2.1	02/00	1/50.0		
		Caxias do Sul	02/2.1	00/02	0.0		
		Pelotas	02/2.1	01/01	0.0		
		Campo Bom	01/1.1	00/01	1/100.0		
	Canoas	01/1.1	01/00	0.0			
	São Leopoldo	01/1.1	01/00	0.0			
	Sapucaia do Sul	01/1.1	01/00	0.0			
	<i>Molossus rufus</i>	Porto Alegre	04/4.2	03/01	0.0		
		Ijuí	03/3.2	01/02	0.0		
		Cachoeirinha	01/1.1	01/00	1/100.0		
		Campo Bom	01/1.1	01/00	0.0		
		São Leopoldo	01/1.1	01/00	0.0		
		Taquari	01/1.1	01/00	1/100.0		
		Tiradentes do Sul	01/1.1	01/00	0.0		
<i>Nyctinomops laticaudatus</i>		Alegrete	01/1.1	01/00	0.0		
<i>Promops nasutus</i>		Toropi	01/1.1	01/00	0.0		
Subtotal Molossidae				94/86.2	58/36		36/38.3
Vespertilionidae /insetivorous	<i>Eptesicus furinalis</i>	Nova Boa Vista	02/28.6	02/00	0.0		
	<i>Eptesicus brasiliensis</i>	Igrejinha	01/14.3	00/01	0.0		
	<i>Histiotus velatus</i>	Sertão Santana	01/14.3	01/00	0.0		
	<i>Lasiurus blossevillii</i>	Humaitá	01/14.3	00/01	0.0		
	<i>Myotis levis</i>	Rio Grande	01/14.3	01/00	0.0		
	<i>Myotis nigricans</i>	Pelotas	01/14.3	01/00	0.0		

Family /feeding habits	Genus/species	County	No. of bats county/fam- ily %	Sex M/F	No. of bats parasitized per county/%	Parasitized per family/ %
Subtotal Vespertilionidae			07/6.4	05/02		0.0/0.0
Phyllostomidae /hematophagous	<i>Desmodus rotundus</i>	Santiago	02/66.7	02/00	0.0	
	<i>Sturnira lilium</i>	Canoas	01/33.3	01/00	0.0	
Subtotal Phyllostomidae			03/2.7	03/00		0.0/0.0
Not identified		Santa Maria	02/40.0	00/02	0.0	
		Unknown	02/40.0	01/01	2/100.0	
		Agudo	01/20.0	01/00	1/100.0	
Unidentified subtotal			05/4.6	02/03		3/60.0
Total	15	34	109/100	68/41	39	

MANUSCRITO 1**Comparison of total DNA extraction protocols for *Chiroptonyssus robustipes* mites**

(Manuscript submitted for publication in the Molecular & Biochemical Parasitology (eletronic ISSN 0166-6851).

Submission ID MOLBIO-D-23-00150

Daniele da Silva^a, Fabiana Raquel Ratzlaff^a, Vanessa Osmari^a, Fagner D'ambroso Fernandes^{a,b}, Elizabete Captivo Lourenço^c, Katia Maria Famadas^d, Gisele Vaz Aguirre Samoel^a, Aline Campos^e, Susi Missil Pacheco^f, Fernanda Silveira Flores Vogel^a, Sônia de Avila Botton^g, Luis Felipe Dias Lopes^h, Luís Antônio Sanigioni^{a,g}

^aLaboratório de Doenças Parasitárias (LADOPAR), Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Rurais (CCR), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Av. Roraima, n° 1000, Prédio 63D, Bairro Camobi, Santa Maria, RS, CEP 97105-900, Brasil

^bCentro Universitário Ritter Dos Reis (UniRitter), Av. Manoel Elias, n° 2001, Bairro Passo das Pedras, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, CEP 91240-261, Brasil

^cLaboratório de Ecologia de Mamíferos (LEMA), Departamento de Ecologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ). Rua Dolores Duran, Bairro Maracanã, Rio de Janeiro, RJ, CEP 20990-000, Brasil

^dLaboratório de Hemoparasitos e Vetores (LHV), Departamento de Parasitologia Animal (DPA), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). Rod. BR 465, km 7, Seropédica, RJ, CEP 23890-000, Brasil

^eCentro Estadual de Vigilância em Saúde (CEVS). Av. Ipiranga, 5400, Porto Alegre, RS, CEP 90610-000, Brasil

^fInstituto Sauber (ISAUVER)- Organização Não Governamental, Rua Dr. Paulo Franco Dos Réis, n° 40, Bairro Boa Vista, Porto Alegre, RS, CEP 90480-090, Brasil

^gLaboratório de Saúde Única (LASUS), Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Rurais (CCR), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Av. Roraima, n° 1000, Prédio 44, Bairro Camobi, Santa Maria, RS, CEP 97105-900, Brasil

^hDepartamento de Ciências Administrativas, Centro de Ciências Sociais e Humanas (CCSH), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Avenida Roraima, n° 1000, Prédio 74C, Bairro Camobi, Santa Maria, RS, CEP 97105-900, Brasil

ABSTRACT

In this study, total DNA was extracted from *Chirotonyssus robustipes* mites collected from bats from different regions of Rio Grande do Sul, Brazil. This ectoparasite is commonly found in bats and may impact public health. Given the scarcity of tissues in these mites, it is essential to choose an effective method for extracting total DNA. In this study, we evaluated different protocols for extracting total DNA from *C. robustipes* using three commercial kits. The protocol using the DNeasy Blood and Tissue Kit (GmbH, Qiagen®, Germany) in individual extractions with whole mites proved to be effective ($p < 0.05$) for obtaining total DNA in sufficient quantity and quality for gene amplification procedures.

Keywords: Macronyssidae, ectoparasite, polymerase chain reaction (PCR), molecular biology.

1. Introduction

Obtaining DNA from samples of small ectoparasites is challenging because of the small amount of nucleic acids produced during the extraction of genetic material, as well as the presence of contaminants in the reactions that interfere with the detection of the agent (Burggraf and Olgemöller, 2004). Therefore, the efficiency of the total DNA extraction protocol influences the sensitivity of molecular diagnostic methods (Nakatani et al., 2004). Currently, there are several methodologies for extracting genetic material; however, there is no consensus on the most suitable method for obtaining nucleic acids from mites, such as *Chirotonyssus robustipes*. Therefore, the objective of this study was to analyze different total DNA extraction protocols for *C. robustipes* collected from bats in different regions of Rio Grande do Sul (RS), Brazil.

The ectoparasites were collected from bats from 34 municipalities in RS from 2016 to 2021, which were sent to the Centro Estadual de Vigilância Sanitária (CEVS) and later to the Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF) to carry out diagnostic tests for rabies. Animals with negative results for the rabies test were kept frozen at -20°C and sent to the Laboratório de Doenças Parasitárias (LADOPAR) of Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) in isothermal boxes, with the aim of carrying out parasitological studies.

To check for the presence of ectoparasites, bats were thawed at room temperature, and their fur and membranes were inspected with magnifying glasses. Subsequently, the body of each animal was individually “swept” with a soft bristle

brush, and ectoparasite specimens were collected in a Petri dish. The storage packaging of the animals was also inspected for ectoparasites. The collected ectoparasite specimens were stored in 2 ml microtubes with 70° GL ethanol solution and sent to the Laboratório de Artrópodes Parasitas (LAPAR), of Departamento de Parasitologia Animal of Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) for taxonomic identification and characterization. The ectoparasites were observed using an Olympus UC30 stereoscopic microscope. Specimens of the Macronyssidae family were morphologically identified according to Radovsky's key (2010).

To obtain total DNA from *C. robustipes*, three groups of samples were used, with the first group (G1) comprising a single mite specimen in its entirety. In group 2 (G2), the mites were macerated after freezing in liquid nitrogen. For maceration, each mite was placed individually in a 2 mL microtube. Each microtube containing the mites was immersed in a container containing liquid nitrogen for approximately 10 s. Subsequently, the microtube was removed from the container, and the mite was macerated inside the microtube using the tapered end of a 100 µL tip. Three cycles of immersion of the microtubes in liquid nitrogen were then carried out to ensure complete dissolution of the ectoparasite. In group 3 (G3), a pooled sample of 28 whole mites was used.

After obtaining samples for each group, three protocols were used and compared using three commercial kits for the extraction of total DNA in triplicate. In the first protocol (P1), the Wizard Genomic DNA Purification Kit (A1125; Promega®, USA) was used. In the second protocol (P2), the PureLink Genomic DNA Mini Kit (CA92008; Invitrogen®, USA) was used. For the third protocol (P3), a DNeasy Blood and Tissue Kit (GmbH, Qiagen®, Germany) was used. All commercial kits were used in accordance with the manufacturers' guidelines.

The quality of the total DNA obtained from each protocol was evaluated by measuring the concentration and absorbance ratio at 260/280 nm using a NanoDrop 1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). Total DNA samples were stored at -20°C for molecular tests.

All samples obtained from the total DNA extractions were subjected to conventional polymerase chain reaction (PCR) to verify whether there was amplification of the mite 18S rDNA ribosomal gene, using the primers 18S-1F (5'-ATATTGGAGGGCAAGTCTGG-3') and 18S-1R (5'-TGGCATCGTTTATGGTTAG-3'), which amplify a 500 bp fragment (Otto and Wilson, 2001). The PCR reaction was prepared to a final volume of 25 µL containing: 1 X Buffer (Promega® Corporation, Madison, WI, USA), 2 mM of MgCl₂ (Ludwig Biotec®, Brazil), 0,2 mM of dNTPs (Ludwig Biotec®, Brazil), 0.2 µM of each primer (Exxtend Biotecnologia®, São Paulo, Brazil), 2 U of Taq DNA polymerase (Promega® Corporation, Madison, WI, USA) and ~20 ng of the total DNA sample extracted.

Amplification was performed in an automatic thermocycler (T100™ Thermal Cycler, Bio-Rad®) under the following conditions: initial cycle at 94°C for 1 min, 30 cycles of 95°C for 20 s, 50°C for 30 s, 72°C for 90 s, and a final cycle at 72°C for 10 min, followed by 4°C/∞. For each reaction, Milli-Q water was used as a negative control and *Rhipicephalus microplus* DNA, which was morphologically characterized and isolated from samples collected from cattle, was used as a positive control. Afterwards, 8 µL of the products amplified in the PCR were subjected to electrophoresis in a 1.5% agarose gel, with 2 µL of Diamond™ Nucleic Acid Dye (Promega® Corporation, Madison, WI, USA) and 2 µL of Buffer (Promega® Corporation) under 70 v for 50 min at 300 A, which were subsequently visualized on a transilluminator in the presence of ultraviolet light.

The detection threshold was achieved by diluting the positive control in Milli-Q water in serial dilutions from 1:10 to 1:10⁶ and testing by PCR. Inhibition of the PCR was performed by diluting the positive control in a 1:1 ratio and testing by PCR. PCR was performed as previously described. The obtained data were subjected to statistical analysis using analysis of variance, and the minimum significant differences were determined using the Tukey's test.

This study received institutional authorization from CEVS in accordance with Portaria SES/RS n°. 334/2019 and was submitted to the Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFSM) under protocol number 7576231019 and to the Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio/SISBIO).

Of the total number of chiropterans analyzed, 35.8% (39/109) presented ectoparasites. Of these, 95% (37/109) were parasitized with *C. robustipes*. 382 *C. robustipes* were obtained at different stages, predominantly there was the presence of protonymphs (353/382; 92.4%), followed by females (19/382; 5%) and males (10/382; 2.6%).

The results of total DNA extractions using with among the different protocols used for total DNA extraction revealed significant differences in extraction efficiency and in the average concentration of total DNA obtained in samples from *C. robustipes*. Under the conditions tested in this study, it was found that the extractions carried out in P1 did not yield total DNA from any *C. robustipes* sample. In contrast, extractions using P2 had an average total DNA concentration of 0.9 ng/µL for G1, 1.6 ng/µL for G2, and 3.3 ng/µL for G3. Extractions performed using P3 showed an average total DNA concentration of 5 ng/µL for G1, 5.5 ng/µL of DNA for G2, and 6.2 ng/µL for G3 (Table 1).

The samples derived from total DNA extraction following protocols P2 and P3 all had the 18S rDNA ribosomal gene of *C. robustipes* amplified, indicating that the genetic material obtained from these samples belonged to the mite.

Chiroptonyssus robustipes belongs to the family Macronyssidae and is considered the most abundant ectoparasite in bats (Pesenti et al., 2014). These mites are heteroxenous and feed on the blood and lymph of their hosts (Radovsky, 1967). Owing to their ability to adapt to the environment, they can become a public health problem and cause dermatitis in

humans (Keh, 1974). Considering that only a small amount of tissue is obtained from these mites, effective methods must be used to extract total DNA. There is a lack of effective protocols for total DNA extraction from *C. robustipes*. Commercial kits for extracting total DNA are used for a variety of samples of different biological origins. Therefore, it is important to validate a suitable protocol for total DNA extraction from this parasite.

Additionally, there were discrepancies in obtaining total DNA from mite tissues in the evaluated protocols. This can be attributed to variations in the extraction of total DNA from the samples, which may have influenced the removal of PCR inhibitory molecules (Huggins et al., 2020). Therefore, the choice of total DNA extraction method is a critical factor for obtaining reliable results in molecular studies involving these mites.

The results obtained using the three protocols in this study indicated that P3 was the most effective protocol ($p < 0.05$) for DNA extraction, with higher concentrations of DNA in all groups tested. There was no significant difference in the quality or quantity of DNA obtained in the different P3 groups (Table 1) and all groups in this protocol presented adequate quality and purity, falling within the absorbance index range of 1.7 to 1.9 (recommended values by the extraction kit used), estimated by the values of the 260/280 nm ratio.

Other relevant aspects were considered when choosing the extraction protocol, such as the possibility of recovering the mite in the kit's extraction column after the DNA extraction process, which is of considerable importance as it allows the preservation of the specimen for subsequent studies as well as the extraction of total DNA from the individual mite, a fundamental factor in ensuring the obtained material comes exclusively from that individual.

Thus, based on the findings obtained using the P1, P2, and P3 protocols in different groups (G1, G2, and G3), our results suggest that the P3 protocol in the G1 group is a viable option for conducting molecular tests on *C. robustipes*. The average concentration of DNA among the P3G1 samples was sufficient to perform molecular tests while ensuring that the genetic material originated from the mite and preserving the specimen for further studies.

Acknowledgments

We thank the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES)—Financial Code 001 and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) for their financial support.

References

Burggraf, S., Olgemöller, B., 2004. Simple technique for internal control of real-time amplification assays. *Clin. Chem.* 50, 819–825. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2003.027961>.

- Huggins, L.G., Koehler, A.V., Schunack, B., Inpankaew, T., Traub, R.J., 2020. A host-specific blocking primer combined with optimal DNA extraction improves the detection capability of a metabarcoding protocol for canine vector-borne bacteria. *Pathogens*. 9, 258. <https://doi.org/10.3390/pathogens9040258>.
- Keh, B., 1974. Dermatitis caused by the bat mite, *Chirotonyssus robustipes* (Ewing), in California. *J. Med. Entomol.* 11, 498. <https://doi.org/10.1093/jmedent/11.4.498>.
- Nakatani, S.M., Burger, M., Assef, M.C., Brockelt, S.R., Cogo, L.L., Messias-Reason, I.J.T., 2004. Efficient method for mycobacterial DNA extraction in blood cultures aids rapid PCR identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 23, 851–854. <https://doi.org/10.1007/s10096-004-1236-z>.
- Otto, J.C., Wilson, K.J., 2001. Assessment of the usefulness of ribosomal 18S and mitochondrial COI sequences in Prostigmata phylogeny, in: *Acarology. Proceedings of the 10th International Congress*. CSIRO Publishing, pp. 100–109.
- Pesenti, T.C., Gomes, S.N., Rui, A.M., Müller, G., 2014. Geographic variation in ectoparasitic mites diversity in *Tadarida brasiliensis* (Chiroptera, Molossidae). *Iheringia Sér. Zool.* 104, 451–456. <https://doi.org/10.1590/1678-476620141044451456>.
- Radovsky, F.J., 1967. The *Macronyssidae* and *Laelapidae* (Acarina: Mesostigmata) parasitic on bats. *Univ. Calif. Publ. Entomol.* 46, 1–288.
- Radovsky, F.J., 2010. Revision of genera of the parasitic mite family *Macronyssidae* (Mesostigmata: Dermanyssoidea) of the world. USA, Michigan. Indira Publishing House, West Bloomfield. 170 p.

Table 1 Quantification and average quality of total DNA extracted from *Chiroptonyssus robustipes* mites using three different protocols.

Protocol	Group	Amount of total DNA ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) (SD)		Total DNA quality (260/280 nm)	
P1	G1	0.50 (0.000)		0.00 (0.000)	
	G2	0.00 (0.000)	---	0.00 (0.000)	---
	G3	1.00 (0.500)		0.00 (0.000)	
P2	G1	0.93 ^b (0.586)		1.15 ^b (0.145)	
	G2	1.63 ^b (0.153)	p = 0.005	1.56 ^a (0.101)	p = 0.064
	G3	3.37 ^a (0.777)		1.29 ^{ab} (0.183)	
P3	G1	5.00 ^a (0.500)		1.93 ^a (0.026)	
	G2	5.50 ^a (0.620)	p = 0.162	1.92 ^a (0.099)	p = 0.162
	G3	6.23 ^a (0.367)		2.02 ^a (0.030)	

mean (standard deviation - SD). * Equal letters do not differ statistically ($p > 0.05$) – Tukey test

P1: Protocol based on Wizard Genomic DNA Purification Kit (A1125, Promega®, EUA).

P2: Protocol based on PureLink Genomic DNA Mini Kit (CA92008, Invitrogen®, EUA).

P3: Protocol based on DNeasy Blood and Tissue Kit (GmbH, Qiagen®, Germany).

G1: group of samples containing a single specimen of *C. robustipes*.

G2: group of samples containing a *C. robustipes* macerated in liquid nitrogen.

G3: group of samples containing a pool of 28 *C. robustipes*

MANUSCRITO 2

Pesquisa molecular de *Rickettsia* spp., *Trypanosoma* spp. e *Leishmania* spp. em *Chirotonyssus robustipes* (Ewing, 1925) (Acari: Macronyssidae) de quirópteros do Rio Grande do Sul, Brasil

(Manuscrito será submetido na revista Ciência Rural (electronic ISSN 1678-4596; print ISSN 0103-8478).

Daniele da Silva^a, Fabiana Raquel Ratzlaff^a; Vanessa Osmari^a; Fagner D'ambroso Fernandes^{a,b}; Elizabete Captivo Lourenço^c; Katia Maria Famadas^d; Gisele Vaz Aguirre Samoel^a; Aline Campos^e; Susi Missil Pacheco^f; Fernanda Silveira Flores Vogel^a; Sônia de Avila Botton^g; Luís Antônio Sangioni^{a,g}

^aLaboratório de Doenças Parasitárias (LADOPAR), Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP), Centro de Ciências Rurais (CCR), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Av. Roraima, nº 1000, Prédio 63D, Bairro Camobi, CEP 97105-900, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil

^bCentro Universitário Ritter Dos Reis (UniRitter), Av. Manoel Elias, nº 2001, Bairro Passo das Pedras, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, CEP 91240-261, Brasil

^cLaboratório de Ecologia de Mamíferos (LEMA), Departamento de Ecologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ). Rua Dolores Duran, Bairro Maracanã, Rio de Janeiro, RJ, CEP 20990-000, Brasil

^dLaboratório de Hemoparasitos e Vetores (LHV), Departamento de Parasitologia Animal (DPA), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). Rod. BR 465, km 7, Seropédica, RJ, CEP 23890-000, Brasil

^eCentro Estadual de Vigilância em Saúde (CEVS). Av. Ipiranga, 5400, Porto Alegre, RS, CEP 90610-000, Brasil.

^fInstituto Sauber (ISAUVER)- Organização Não Governamental, Rua Dr. Paulo Franco Dos Réis, nº 40, Bairro Boa Vista, Porto Alegre, RS, CEP 90480-090, Brasil

^gLaboratório de Saúde Única (LASUS), Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Rurais (CCR), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Av. Roraima, nº 1000, Prédio 44, Bairro Camobi, Santa Maria, RS, CEP 97105-900, Brasil

Pesquisa molecular de *Rickettsia* spp., *Trypanosoma* spp. e *Leishmania* spp. em *Chirotonyssus robustipes* de quirópteros do Rio Grande do Sul, Brasil

Resumo

O estudo teve por objetivo investigar a presença de *Rickettsia* spp., *Trypanosoma* spp. e *Leishmania* spp. em ácaros *Chirotonyssus robustipes* coletados de morcegos provenientes de 34 municípios do Rio Grande do Sul, Brasil. A extração de DNA total foi realizada empregando um único exemplar de ácaro de forma integral, utilizando *DNeasy Blood & Tissue Kit* (GmbH, Qiagen®, Germany). Para a pesquisa de *Rickettsia* spp., *Trypanosoma* spp. e *Leishmania* spp. foi realizada a amplificação do DNA total extraído de 18 ácaros, utilizando os primers CS-78 e CS-323; KIN1 e KIN2 e S4 e S12 e S17 S18, respectivamente. Não foram verificadas amostras positivas para os agentes testados.

Palavras chave: PCR, Macronyssidae, *Chirotonyssus robustipes*, *Leishmania* spp., *Rickettsia* spp., *Trypanosoma* spp.

Introdução

Pesquisas moleculares identificaram material genético de *Rickettsia* spp. em ácaros da família Macronyssidae (REEVES et al., 2007). No entanto, há carência de investigações sobre a presença de *Trypanosoma* spp. e *Leishmania* spp. em espécies pertencentes a esta família. Desta forma, buscamos preencher esta lacuna de informações realizando a pesquisa, por meio de análises moleculares, da presença de *Rickettsia* spp., *Trypanosoma* spp. e *Leishmania* spp. em *Chirotonyssus robustipes*, ácaro da família Macronyssidae.

Este ácaro foi assinalado parasitando morcegos no Brasil, Chile, Cuba, Estados Unidos, México, Panamá, Paraguai e Venezuela (SAUNDERS, 1975; WHITAKER; EASTERLA, 1975; GUZMÁN-CORNEJO et al., 2003; PRESLEY; WILLIG, 2008; MUÑOZ et al., 2011; FRANK et al., 2014). No Brasil, *C. robustipes* foi encontrado em *Histiotus velatus*, *Artibeus lituratus* e *Tadarida brasiliensis* em Minas Gerais (MORAES et al., 2013; MELLO, 2017), *Nyctinomops macrotis* em São Paulo (FONSECA, 1948) e em *T. brasiliensis* no Rio Grande do Sul (PESENTI et al., 2014). São obrigatoriamente hematófagos nos estágios de protoninfa e adultos (OVAZZA, 1950) e podem causar dermatites em humanos Reh (1974).

Os ectoparasitos foram coletados de morcegos provenientes de 34 municípios do Rio Grande do Sul, os quais foram encaminhados ao Centro Estadual de Vigilância Sanitária (CEVS) e, posteriormente, ao Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF) para a realização dos testes diagnósticos para raiva, durante os anos 2016 a 2021. Os animais com resultados negativos para o teste rábico foram mantidos congelados a -20°C e encaminhados ao Laboratório de Doenças Parasitárias (LADOPAR) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), em caixas isotérmicas, com o objetivo de realizarem-se estudos parasitológicos.

Para verificar a presença dos ectoparasitos, os morcegos foram descongelados em temperatura ambiente e foram inspecionadas a sua pelagem e membranas com lupas. Posteriormente, o corpo de cada animal foi “varrido”, individualmente, com uma escova de cerdas macias e os espécimes de ectoparasitos encontrados foram coletados em uma placa de Petri. A embalagem de armazenamento dos animais também foi inspecionada. Os espécimes coletados foram armazenados em microtubos de 2 mL com solução de etanol 70° GL e encaminhados ao Setor de Artrópodes Parasitas do Laboratório de Hemoparasitos e Vetores (LHV), do Departamento de Parasitologia Animal da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), para identificação e caracterização taxonômica. Os ectoparasitos foram observados em microscópio estereoscópico Olympus UC30. Os espécimes da família Macronyssidae foram identificados morfológicamente de acordo com a chave de Radovsky (2010).

A extração de DNA total dos ácaros *C. robustipes* foi realizada empregando um único exemplar de ácaro de forma integral, utilizando DNeasy Blood & Tissue Kit (GmbH, Qiagen®, Germany), de acordo com as instruções do fabricante. A qualidade do DNA obtido foi avaliada pela concentração e pela razão de absorbância 260/280 nm, utilizando um espectrofotômetro NanoDrop 1000 (Thermo Fisher® Scientific). Posteriormente, as amostras de DNA foram armazenadas a -20°C até a realização dos testes moleculares. Após, as amostras das extrações de DNA total foram submetidas à PCR convencional, para verificar se amplificaria o gene ribossômico 18S rDNA do ácaro, utilizando os primers 18S-1F (5' – ATATTGGAGGGCAAGTCTGG – 3') e 18S-1R (5' – TGGCATCGTTTATGGTTAG – 3'), que amplificam um fragmento de 500pb (OTTO; WILSON, 2001). A reação de PCR foi preparada para um volume final de 25 μL contendo: 1 X Buffer (Promega® Corporation, Madison, WI, USA), 2 mM de MgCl_2 (Ludwig Biotec®, Brazil), 0,2 mM de dNTPs (Ludwig Biotec®, Brazil), 0,2 μM de cada Primer (Exxtend Biotecnologia®, São Paulo, Brazil), 2 U de Taq DNA polimerase (Promega® Corporation, Madison, WI, USA) e ~ 20 ng de amostra de DNA total extraído.

A amplificação foi realizada no termociclador automático (T100™ Thermal Cycler, Bio-Rad®), nas seguintes condições: ciclo inicial a 94°C por 1 min, 30 ciclos de 95°C por 20 seg, 50°C por 30 seg, 72°C por 90 seg e um ciclo final a 72°C por 10 min, seguido por 4°C/∞. Para cada reação foram utilizados água Milli-Q como controle negativo e DNA de *Rhipicephalus microplus*, caracterizados morfolologicamente e isolados a partir de amostras coletadas de bovinos, como controle positivo. Após, 8 µL dos produtos amplificados na PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5%, sendo adicionado 2 µL de Diamond™ Nucleic Acid Dye (Promega® Corporation, Madison, WI, USA) e 2 µL de Buffer (Promega® Corporation, Madison, WI, USA), sob 70 volts, por 50 min a 300 A e, posteriormente, visualizados em transiluminador na presença de luz ultravioleta.

Para a pesquisa de *Rickettsia* spp. foi realizada a amplificação do DNA total extraído de *C. robustipes*, utilizando os primers CS-78 senso (5'-38 GCAAGTATCGGTGAGGATGTAAT-3') e CS-323 anti-senso (5'-GCTTCCTTAAAATTCAATAAATCAGGAT'-3') que amplificam um fragmento de 401 pb do gene *gltA*, localizado na matriz mitocondrial, que expressa uma enzima que participa da primeira etapa do ciclo do ácido cítrico e está presente em todas as espécies do gênero *Rickettsia* (LABRUNA et al., 2004).

A reação de PCR foi preparada para um volume final de 25 µL contendo: 1 X Buffer (Promega® Corporation, Madison, WI, USA), 2 mM de MgCl₂ (Ludwig Biotec®, Brazil), 0,2 mM de dNTPs (Ludwig Biotec®, Brazil), 0,2 µM de cada primer (Exxtend Biotecnologia®, São Paulo, Brazil), 2 U de Taq DNA polimerase (Promega® Corporation, Madison, WI, USA) e ~ 20 ng de amostra de DNA extraído.

A amplificação foi processada em termociclador automático (T100™ Thermal Cycler, Bio-Rad®), nas seguintes condições: 1 ciclo inicial a 95°C por 3 min, 40 ciclos de 30 s a 95°C, 30 s a 48°C, 30 s a 72°C e 1 ciclo final a 72°C por 7 min, seguido por 4°C/∞. Para cada reação foram utilizados água Milli-Q como controle negativo e *Rickettsia vini* obtida a partir de cultivo celular (NOVAKOVA et al., 2016) como controle positivo. Após, 8 µL dos produtos amplificados na PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2%, sendo adicionado 2 µL de Diamond™ Nucleic Acid Dye (Promega® Corporation, Madison, WI, USA) e 2 µL de Buffer (Promega® Corporation, Madison, WI, USA), sob 90 volts, por 60 minutos a 300 A e, posteriormente, visualizados em transiluminador na presença de luz ultravioleta.

Para a pesquisa de *Trypanosoma* spp. foi realizada a amplificação total do DNA extraído de *C. robustipes*, utilizando os primers KIN1R senso (5'-GCGTTCAAAGATTGGGCAAT-3') e KIN2F anti-senso (5'-CGCCCGAAAGTTCACC -3'), que amplificam um fragmento de 540 pb do gene alvo ITS1, na região conservada

18S e 5.8S do rDNA (DESQUESNES et al., 2001). A reação de PCR foi preparada para um volume final de 25 µL contendo: 1 X Buffer (Promega® Corporation, Madison, WI, USA), 2 mM de MgCl₂ (Ludwig Biotec®, Brazil), 0,2 mM de dNTPs (Ludwig Biotec®, Brazil), 0,2 µM de cada Primer (Exxtend Biotecnologia®, São Paulo, Brazil), 2 U de Taq DNA polimerase (Promega® Corporation, Madison, WI, USA) e ~ 20 ng de amostra de DNA extraído.

A reação foi realizada no termociclador automático (T100TM Thermal Cycler, Bio-Rad®), nas seguintes condições: ciclo inicial a 94°C por 3 min, 35 ciclos de 94°C por 1 min, 53° C por 1 min, 72° C por 1 min e um ciclo final a 72° C por 5 min, seguido por 4°C/∞. Para cada reação foram utilizados água Milli-Q como controle negativo e *Trypanosoma evansi*, isolado a partir de um cão naturalmente infectado, como controle positivo. Após, 8 µL dos produtos amplificados na PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5%, sendo adicionado 2 µL de Diamond™ Nucleic Acid Dye (Promega® Corporation, Madison, WI, USA) e 2 µL de Buffer (Promega® Corporation, Madison, WI, USA), sob 70 volts, por 50 min a 300 A e, posteriormente, visualizados em transiluminador na presença de luz ultravioleta.

Para a pesquisa de *Leishmania* spp. foi realizada a amplificação do DNA através de *nested polymerase reaction* (*n*-PCR), que amplifica o gene da subunidade ribossomal (SSU rDNA). Na primeira fase da reação foram utilizados os primers externos S4 (5'-GATCCAGCTGCAGGTTCCACC-3') e S12 (5'-GGTTGATTCCGTCAACGGAC-3'), que amplificam um fragmento de 520 pb (ULIANA et al., 1994). Para a segunda fase da reação, foram utilizados os primers internos S17 (5'-CCAAGCTGCCAGTAGAAT-3') e S18 (5'-TCGGGCGGATAAAAACCC-3'), que amplificam um fragmento de aproximadamente 490 pb (SAVANI et al., 2009). Controles positivos e negativos foram utilizados nas reações, consistindo de DNA extraído de cultura de *L. infantum* (MHOM/BR/1974/PP75) e água Milli-Q, respectivamente.

A reação de PCR foi preparada para um volume final de 25 µL contendo: 1 X Buffer (Promega® Corporation, Madison, WI, USA), 2 mM de MgCl₂ (Ludwig Biotec®, Brazil), 0,2 mM de dNTPs (Ludwig Biotec®, Brazil), 0,2 µM de cada Primer (Exxtend Biotecnologia®, São Paulo, Brazil), 2 U de Taq DNA polimerase (Promega® Corporation, Madison, WI, USA) e ~ 20 ng de amostra de DNA extraído.

A amplificação foi processada em termociclador automático (T100TM Thermal Cycler, Bio-Rad®), seguindo as recomendações de Savani et al. (2009), com as modificações realizadas por Ratzllaf et al. (2022). Após, 8 µL dos produtos amplificados na PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2%, sendo adicionado 2 µL de Diamond™ Nucleic Acid Dye (Promega® Corporation, Madison, WI, USA) e 2 µL de Buffer

(Promega® Corporation, Madison, WI, USA), sob 90 volts por 60 minutos a 300 A e, posteriormente, visualizados em transiluminador na presença de luz ultravioleta.

O limiar de detecção de todas as reações de PCR foi realizado através da diluição de cada controle positivo em água Milli-Q nas seguintes diluições seriadas de 1:10 a 1:10⁶ e testados por PCR. A inibição da reação de PCR foi realizada, individualmente, com diluição de cada controle positivo na proporção de 1:1 e testados por PCR. As reações de PCR de cada teste foram realizadas conforme descrito anteriormente.

Do total de morcegos analisados, 35,8% (39/109) apresentaram um total de 385 ectoparasitos. Destes, 94,87% (37/109) estavam parasitados por *C. robustipes* (382/385; 99,22%). Todos os morcegos parasitados possuíam hábito insetívoro e destes 28,4% (31/109) eram *T. brasiliensis*.

Chirotonyssus robustipes embora tenha registro de parasitismo em várias espécies de quirópteros (BASSINI-SILVA et al. 2021) a alta prevalência e abundância observadas em *T. brasiliensis* faz dessa espécie seu principal hospedeiro (DURDEN et al., 1992; GUSMAN-CORNEJO et al., 2003; MUÑOZ et al., 2003; COLÍN-MARTÍNEZ et al. 2017; PESENTI et al., 2014; SILVA et al., 2016).

Neste estudo foram submetidos a pesquisa de *Rickettsia* spp, *Trypanosoma* spp. e *Leishmania* spp. as amostras que apresentaram resultado positivo para o gene ribossômico 18S rDNA. Na extração de DNA total, 75,68% (28/37) do total das amostras testadas apresentaram material genético. Destas, 64,2% (18/28) amplificaram o gene ribossômico 18S rDNA de *C. robustipes*, evidenciando que o material genético obtido destas amostras pertence a subclasse Acari.

Nas reações da PCR para pesquisa de *Leishmania* spp., *Rickettsia* spp. e *Trypanosoma* spp. nenhuma das 18 amostras processadas amplificou o DNA destes microrganismos. *Chirotonyssus hematófagos* (Macronyssidae), coletados de morcegos do Rio de Janeiro, foram negativos para *Rickettsia* spp., enquanto uma mosca coletada destes mesmos morcegos foi positiva para a bactéria (AMARAL et al., 2018). Ratzlaff et al. (2022) testou os morcegos deste estudo para *Leishmania* spp., dos quais três foram positivos para o agente. Dos três morcegos positivos para *Leishmania* spp., recuperou-se ácaros de dois deles, que foram testados neste estudo e não apresentaram DNA deste microorganismo.

É importante salientar que a presença de agentes parasitários em morcegos não implica necessariamente em danos à saúde desses mamíferos, nem podemos inferir sua importância epidemiológica no ciclo das enfermidades apenas com base nessa presença. No entanto, destaca-se a importância da pesquisa de ocorrência

destes agentes na ecologia natural, proporcionando dados epidemiológicos que podem auxiliar nas questões relacionadas não somente a saúde pública, mas também para a preservação das espécies de morcegos.

Referências

- AMARAL, R. B. et al. (2018) Molecular detection of *Bartonella* spp. and *Rickettsia* spp. in bat ectoparasites in Brazil. **PLoSOne** 13: e0198629.
- BASSINI-SILVA, R. et al. (2021) A checklist of macronyssid species (Mesostigmata: Macronyssidae) from Brazil. *Journal of Medical Entomology*, 58(2), 625-633.
- COLÍN-MARTÍNEZ, H., et al. (2017) Epizotic Fauna Survey on Phyllostomid Bats (Chiroptera: Phyllostomidae) in a Shaded Coffee Plantation of Southeastern Chiapas, Mexico. **Journal of Medical Entomology**, 1–11.
- DURDEN L.A. et al. (1992) Ectoparasites mites (Acari) of sympatric brazilian free-tailed bats and big brown bats in Alabama. **Journal of Medical Entomology**. 29(2):507-511.
- FONSECA, F. (1948) Monograph of the general and species of Macronyssidae Oudemans, 1936 (synom.: Liponyssidae Vitzthum, 1931) (Acari). **Proc. Zool. Soc. Lond.** 118: 249–334.
- FRANK, R. et al. (2014) Macroparasites of Microchiroptera: bat ectoparasites of Central and South America. In: Klimpel S, Mehlhorn H. Bats (Chiroptera) as Vectors of Diseases and Parasites. **Parasitology Research Monographs**. Volume 5. Berlin: Springer Verlag; 87-130.
- GUZMAN-CORNEJO, C. et al. (2003) Parasites of *Tadarida brasiliensis mexicana* (Chiroptera: Molossidae) from Arid Regions of Mexico. **Comp. Parasitol.** 70 (1), pp. 11–25.
- MELLO, E. M. (2017) **Interações taxonômicas entre parasitos e morcegos de alguns municípios do estado de Minas Gerais** (TESE). Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 355p.
- MORAES, L. M. et al. (2013) Bat flies (Diptera: Streblidae, Nycteribiidae) and mites (Acari) associated with bats (Mammalia: Chiroptera) in a high-altitude region in southern Minas Gerais, Brazil. **Acta Parasitol.** 58: 556–563.
- MUÑOZ, L. et al. (2003) Prevalencia e intensidad de ectoparasitos asociados a *Tadarida brasiliensis* (geoffroy saint-hilaire, 1824) (chiroptera: molossidae) en concepcion. **Gayana** 67(1): 1-8.

- MUÑOZ, P. et al. (2011) New report of parasite-fauna of the free-tailed bat (*Tadarida brasiliensis*, Geoffroy, 1824) in Chile. **Vet. Res. Commun.** 35: 61–66.
- OVAZZA, M. (1950) Quelques observations sur la biologie et plus particulièrement le cycle de *Liponyssus bacoti* Hirst, 1913. **Annals of Parasitology**, XXV, 3.
- PESENTI, T.C. et al. (2014) Geographic variation in ectoparasitic mites diversity in *Tadarida brasiliensis* (Chiroptera, Molossidae). **Iheringia Sér. Zool.** 104, 451–456, 2014.
- PRESLEY, S.J.; WILLIG, M.R. (2008) Intraspecific patterns of ectoparasite abundances on Paraguayan bats: effects of host sex and body size. **Journal of Tropical Ecology**, 24(1): 75-83.
- RADOVSKY, F. J. (2010) **Revision of genera of the parasitic mite family macronyssidae (Mesostigmata: Dermanyssoidea) of the world.** USA, Michigan, West Bloomfield, Indira Publishing House. 170 p.
- RATZLAFF, F.R. et al. (2022) Prevalence and molecular detection of *Leishmania* spp. in bats from Rio Grande do Sul state, Brazil. **Parasitol Res**, 121(11):3193-3202.
- REEVES, W.K. et al. (2007) *Rickettsial* pathogens in the tropical rat mite *Ornithonyssus bacoti* (Acari: Macronyssidae) from Egyptian rats (*Rattus* spp.). **Exp Appl Acarol** 41(1–2):101–107.
- REH, B. (1974) Dermatitis caused by the bat mite, *chirotonyssus robustipes* (Ewing), in California. **Journal of medical entomology**, volume 11, issue 4, 498 p. 1974.
- SAVANI, E.S.M.M. et al. (2009) Detection of *Leishmania (Leishmania) amazonenses* and *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in Brazilian bats. **Veterinary Parasitology**, 168(1-2): 5-10.
- SAUNDERS, S. C. (1975) Venezuelan Macronyssidae (Acarina: Mesostigmata). **Brigh. Young. Univ. Sci. Bull.** 20: 75–90.
- SILVA, J. C. M. et al. (2016) Pesquisa de *Rickettsia*, *Ehrlichia* e *Anaplasma* em ectoparasitas coletados em cães no Distrito Federal, no ano de 2015. **Relatório final de pesquisa de Iniciação Científica apresentado à Assessoria de Pós-Graduação e Pesquisa pela Faculdade de Ciências da Educação e da Saúde – FACES.** Centro Universitário De Brasília, DF, 32p.
- WHITAKER, J. O. JR.; D. A. EASTERLA (1975) Ectoparasites of bats from Big Bend National Park, Texas. **Southwest. Nat.** 20: 241–254.

8 DISCUSSÃO

O presente estudo aborda a presença e as implicações do parasitismo em morcegos, visando compreender as complexas relações parasito-hospedeiro que regem essas interações. O padrão de dispersão dos parasitos é considerado importante ferramenta epidemiológica para o entendimento da dinâmica populacional de seus hospedeiros, permitindo avaliar a relação parasito-hospedeiro e investigar as consequências do parasitismo em um ecossistema (LUQUE; POULIN, 2007). Mello (2017) sugere que comportamentos atípicos de quirópteros negativos para raiva, analisados pelos centros de vigilância epidemiológica, podem ser decorrentes de alterações fisiológicas ocasionadas por parasitos, como relatado por Gardner e Molyneux (1987), onde a relutância em voar ou a incapacidade dos morcegos de manter-se em voo coincidiu com altos picos de parasitemia por *Babesia* spp. Campbell et al. (2004) observaram paralisia muscular flácida e distúrbios elétricos no coração de morcegos, causado pela toxina liberada pelo carrapato *Ixodes holocyclus* e Sangster et al. (2012) associaram alterações comportamentais de morcegos aos danos neurológicos causados pela toxoplasmose.

Alguns fatores podem afetar as pesquisas parasitológicas, podendo resultar na perda de parasitos, como o tempo decorrente entre a morte do animal e a coleta de ectoparasitos. As amostras utilizadas neste estudo, provenientes de 34 municípios do RS (Figura 01), foram coletadas pela população, sem informações sobre o tempo de permanência no ambiente, bem como sobre as condições de armazenamento das amostras. Apesar da minuciosa inspeção dos animais e das embalagens onde estavam armazenados, constatou-se que apenas 16 desses municípios apresentaram morcegos com ectoparasitos (Figura 02).

Atualmente, a Febre Maculosa Brasileira (FMB) é considerada uma zoonose reemergente no Brasil e de grande impacto para a saúde pública, em decorrência da dificuldade de diagnóstico e à alta mortalidade em casos humanos não tratados precocemente (SILVA et al., 2019). No período de 2010 a 2020 foram notificados 29.208 casos em todo o país. Destes, 1.928 foram confirmados para FMB e outras riquetsioses, sendo que 1.215 pacientes (63% dos casos confirmados) foram hospitalizados e 679 evoluíram para óbito, representando uma letalidade de 35% (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021).

No que se refere aos vetores, há descrição de diversas espécies de carrapatos dos gêneros *Amblyomma* spp., *Aponoma* spp., *Dermacentor* spp., *Haemaphysalis* spp., *Hyalomma* spp., *Ixodes* spp. e *Rhipicephalus* spp. naturalmente infectados por riquetsias em diferentes partes do

mundo, incluindo carrapatos encontrados parasitando morcegos (PAROLA et al., 2005; HORNOK et al., 2019; REEVES et al., 2020). No Brasil, o gênero *Amblyomma* é o mais identificado na transmissão de *Rickettsia* spp. No entanto, *Rhipicephalus sanguineus* também pode transmitir o patógeno (BRASIL, 2016). O artrópode pode permanecer infectado durante toda sua vida, mantendo a bactéria na população de carrapatos por meio da transmissão vertical (transovariana), estágio-estádio (transestadial) ou por meio da cópula. Pode ainda, durante o repasto sanguíneo, transmitir o agente para uma grande diversidade de mamíferos, o que torna o conhecimento da distribuição geográfica desses vetores extremamente relevantes nas ações de vigilância epidemiológica (SILVA et al., 2019; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021).

Para que ocorra a infecção humana, é necessário que o carrapato permaneça aderido ao hospedeiro por um período entre quatro a seis horas, período em que realiza a hematofagia e regurgitações subsequentes, gerando um estímulo térmico para a reativação e a multiplicação das bactérias (ativação riquetsial), favorecendo a infecção no hospedeiro. No entanto, estudos demonstraram que *A. aureolatum* pode transmitir *R. rickettsii* para os humanos em apenas alguns minutos de parasitismo (MONTEIRO, 2017).

Diversos animais são susceptíveis a infecção por *Rickettsia* sp., entre eles estão os gatos, marsupiais e os morcegos. Caninos e equinos são considerados animais sentinelas e amplificadores dos hospedeiros intermediários e as capivaras e os pequenos roedores silvestres são considerados animais reservatórios (HORTA et al., 2004; MONTEIRO, 2017). É importante salientar que múltiplos grupos de vetores e mamíferos podem coexistir na mesma área, compartilhando ou não de elementos epidemiológicos e, eventualmente, animais sinantrópicos ou domésticos que atuam como hospedeiros primários de carrapatos mantendo a circulação do agente nestas populações (RUDAKOV et al., 2003; SILVA et al., 2019).

Além das medidas de prevenção e controle, que consistem principalmente em evitar o contato da população com potenciais vetores, são realizadas ações de vigilância em saúde da enfermidade, como a capacitação de profissionais para coleta e identificação de carrapatos em áreas silenciosas do Brasil, o treinamento e apoio aos laboratórios para realização de diagnóstico e projetos de pesquisa para identificação da circulação de agentes etiológicos em áreas desconhecidas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021).

Em relação ao papel dos morcegos como portadores de *Rickettsia* sp., existem trabalhos publicados, no Brasil e no mundo, acerca desta associação. Reeves et al. (2006) encontraram

morcegos da espécie *Eptesicus fuscus*, provenientes do estado da Geórgia, EUA, reativos para *R. conorii* e *R. rickettsii* por meio da sorologia e, na cidade de São Paulo, Brasil, amostras de soro de morcegos das famílias Molossidae, Vespertilionidae e Phyllostomidae foram reativas para *R. rickettsii*, *R. parkeri*, *R. amblyommii*, *R. rhipicephali* e *R. bellii* (D'AURIA et al., 2010).

Estudos utilizando técnicas de biologia molecular identificaram *Rickettsia africae* em amostras de sangue de morcegos da espécie *Artibeus jamaicensis* e *Ardops nichollsi*, provenientes da ilha caribenha de São Cristóvão (REEVES et al., 2016); *R. conorii* em amostras de sangue de morcegos frugívoros e insetívoros das espécies *M. natalensis*, *N. thebaica*, *E. wahlbergi*, *Scotophilus dinganii* e *Glauconycteris variegata*, coletados na África do Sul e Suazilândia (atualmente Reino de Essuatíni) (DIETRICH et al., 2016); *Rickettsia bellii* em tecidos de morcegos da espécie *Tadarida brasiliensis* capturados na cidade de Buenos Aires, Argentina (CICUTTIN et al., 2017); *Rickettsia parkeri*, *R. lusitaniae*, *R. slovacca* e *R. raoultii* em tecidos de morcegos da espécie *Pipistrellus pipistrellus*, provenientes da China (ZHAO et al., 2020) e *R. monacensis* em tecidos de morcegos da espécie *Nyctalus noctula* e *Pipistrellus pipistrellus* coletados na Romênia (MATEI et al., 2021).

A Doença de Chagas é considerada endêmica no RS, sendo um dos estados brasileiros que apresentaram maior índice de soroprevalência humana para *T. cruzi* (CAMARGO et al., 1984). Embora o estado seja considerado livre de transmissão vetorial da doença e *Triatoma infestans* tenha sido eliminado no RS, existem outras espécies de triatomíneos que persistem em domicílios rurais (BEDIN et al., 2009), os quais podem ser agentes competentes na transmissão de *T. cruzi* (SILVA; SILVA, 2023). No Brasil, após a transmissão intradomiciliar de *T. cruzi*, a principal rota de infecção ocorre por transmissão oral e a Doença de Chagas está ressurgindo como uma doença transmitida por alimentos (VALENTE et al., 2009; XAVIER et al., 2014).

A significância epidemiológica potencial dos morcegos como possíveis hospedeiros reservatórios para *T. cruzi*, devido à frequência de infecção, foi mencionada por Marinkelle (1982). Espécies comuns de morcegos neotropicais, incluindo aquelas dos gêneros *Artibeus*, *Noctilio*, *Mormoops*, *Natalus*, *Pteronotus*, *Myotis*, *Carollia*, *Desmodus*, *Glossophaga*, *Phyllostomus* e *Molossus* foram relatadas como suscetíveis à infecção por *T. cruzi*, tanto em condições naturais, quanto experimentais (MARINKELLE, 1982; THOMAS et al., 2007). Foi identificada em morcegos a presença de uma linhagem de *T. cruzi* considerada predominante

na população humana, causando a doença de Chagas na Venezuela, Colômbia e na Amazônia brasileira, onde diferentes formas clínicas da doença foram relatadas, variando de assintomáticas a fatais, tanto na fase aguda quanto na crônica (AÑEZ et al., 2004; MONTILLA et al., 2002; COURA et al., 2002; TEIXEIRA et al., 2006).

Os morcegos podem se infectar com *T. cruzi*, seja por contaminação com formas metacíclicas defecadas por insetos triatomíneos infectados durante o repasto sanguíneo, ou pela ingestão de insetos infectados (THOMAS et al., 2007). No entanto, a transmissão congênita é um fenômeno comum na natureza (AÑEZ et al., 2009). Desta forma, os morcegos são um fator de risco adicional na manutenção do ciclo silvestre do *T. cruzi* em áreas endêmicas. Isso parece ser um fato de potencial importância epidemiológica, levando em consideração que os morcegos são talvez os mamíferos mais abundantes nos trópicos do novo mundo. Algumas espécies, como *M. molossus*, são excelentes hospedeiros de *T. cruzi*, com os quais possivelmente têm uma associação antiga (MARINKELLE, 1976).

Inicialmente considerada uma zoonose de animais silvestres, acometendo ocasionalmente pessoas em contato com as florestas, a leishmaniose passou a ocorrer em áreas rurais e em regiões periurbanas e urbanas, em ambientes transformados, com destruição dos habitats silvestres, expondo pessoas ao ciclo de transmissão do protozoário, constituindo um grande problema de saúde pública (BRASIL, 2021). No Brasil, há registros de morcegos infectados com *Leishmania* spp. nos seguintes estados: Mato Grosso do Sul (CASTRO et al., 2020; FERREIRA et al., 2017; REZENDE et al., 2017; SHAPIRO et al., 2013), São Paulo (OLIVEIRA et al., 2015; PAIZ et al., 2015; SAVANI et al., 2010), Maranhão (COSTA et al., 2015), Minas Gerais (GÓMEZ-HERNÁNDEZ et al., 2017) e Rio Grande do Sul (RATZLAFF et al., 2022). No entanto, não há registro de ectoparasitos associados a transmissão de *Leishmania* spp. nos morcegos infectados.

Em nosso estudo, a ausência de resultados positivos para *Rickettsia* spp., *Trypanosoma* spp. e *Leishmania* spp. pode ser atribuída não apenas a ausência destes agentes nos morcegos, mas também à possível degradação do DNA desses microorganismos, considerando que a forma de armazenamento pode ter interferido na preservação do material genético dos agentes parasitários pesquisados, pois algumas amostras estavam em avançado estado de deterioração. Outra possibilidade é que a quantidade de DNA correspondente seja insuficiente para detecção.

Destaca-se a importância do aproveitamento de morcegos coletados pelos serviços de vigilância epidemiológica para diagnóstico da raiva, oferecendo uma alternativa viável para pesquisas envolvendo morcegos. É importante ressaltar que a presença de agentes parasitários em morcegos não implica necessariamente em danos à saúde desses mamíferos, nem permite inferir sua importância epidemiológica no ciclo das enfermidades apenas com base nessa presença. No entanto, a investigação de agentes parasitários nestes mamíferos é essencial para compreender quais parasitos esses animais podem albergar e as possíveis implicações desse parasitismo.

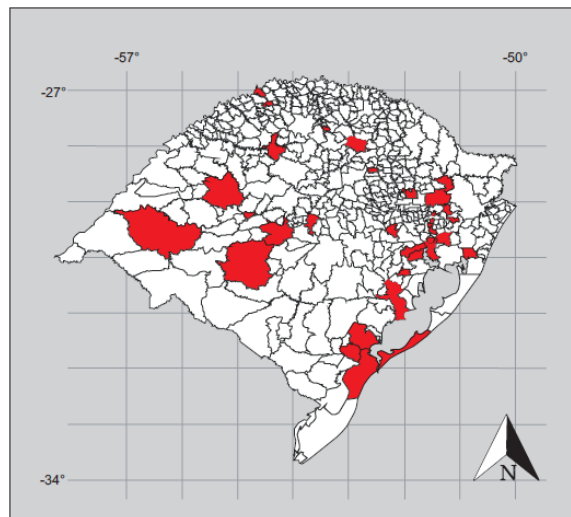


Figura 1. Mapa do Rio Grande do Sul destacando os municípios onde foram encontrados morcegos.

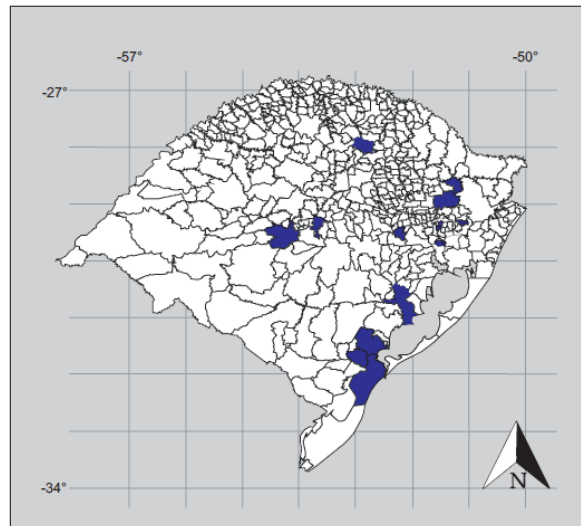


Figura 2. Mapa do Rio Grande do Sul destacando os municípios onde foram encontrados morcegos com ectoparasitos.

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O parasitismo de *Rhipicephalus microplus* em morcegos emerge como um fenômeno incomum, abrindo novas perspectivas para a compreensão das dinâmicas parasitárias em ambientes de vida silvestre. Uma estratégia adotada pelos ácaros para manter a espécie inclui tornar-se generalista e parasitar múltiplos hospedeiros, possibilitando sua sobrevivência e disseminação (FURMAN, 1966). Tradicionalmente o parasitismo por *R. microplus* está relacionado aos bovinos, contudo, a ocorrência deste ectoparasito em morcegos desafia as expectativas convencionais e suscita questionamentos sobre a especificidade do hospedeiro desse carrapato.

Diversos fatores podem influenciar na diversidade de ectoparasitos nos animais, como o clima, habitat, distribuição geográfica, comportamento, porte físico, tipo de abrigo ou resposta imune da espécie hospedeira (SZENTIVÁNYI et al., 2018; RUI; GRACIOLLI, 2005). A presença simultânea de *Chirnyssoides* sp., *E. inaequalis* e *C. robustipes* em morcegos da família Molossidae pode representar a competência destes ectoparasitos de se adaptarem a novos hospedeiros, assim como a sua capacidade em coexistirem no mesmo hospedeiro, fatos que desempenham um papel crucial na ecologia parasitária, pois, de acordo com Whitaker et al.

(1988), parasitos com especificidade de hospedeiro podem se adaptar a outras espécies devido às circunstâncias do ambiente e do hospedeiro.

A identificação de ectoparasitos como *R. microplus*, *Chirnyssoides* sp., *E. inaequalis* e *C. robustipes* em morcegos da família Molossidae provenientes de diferentes regiões do RS expressa uma diversidade de hospedeiros potenciais para esses artrópodes, ampliando a compreensão do cenário epidemiológico. A coexistência de ácaros de diferentes espécies em um mesmo hospedeiro sugere estratégias adaptativas dos parasitos, para evitar a competição interespecífica, possivelmente relacionada às preferências por diferentes partes do hospedeiro.

No que diz respeito à FMB, observam-se diferentes cenários epidemiológicos relacionados a esta enfermidade. Os morcegos examinados nesta pesquisa, provenientes de áreas urbanas e periurbanas, onde a enfermidade não tem perfil de ocorrência no RS, foram negativos para *Rickettsia* spp.

Em relação à infecção por *T. cruzi*, os morcegos investigados neste estudo, identificados como insetívoros, apresentam um maior potencial de exposição e infecção por tripanossomos. No entanto, o RS é considerado livre de transmissão vetorial da Doença de Chagas e a ausência de insetos positivos para *T. cruzi* em estudos anteriores destaca a necessidade de uma abordagem mais ampla para compreender outras fontes de transmissão.

Não houve detecção de *Rickettsia* spp., *Trypanosoma* spp. e *Leishmania* spp. em *C. robustipes*. Nesse sentido, é crucial considerar que outros artrópodes possam desempenhar um papel mais proeminente na epidemiologia desses patógenos.

Um aspecto observado deste estudo é a falta de consenso nos métodos de extração de DNA total para *C. robustipes*. A padronização desses métodos é essencial para garantir a eficiência na obtenção de material genético de qualidade para análises moleculares. O protocolo utilizando DNeasy Blood & Tissue Kit (GmbH, Qiagen[®], Germany) se mostrou mais eficaz na extração de DNA total ($p < 0,05$) ao extrair o DNA de apenas um ácaro inteiro, demonstrando concentrações mais elevadas de DNA em todos os grupos testados. Aspectos adicionais relevantes foram considerados na escolha do protocolo de extração, incluindo a possibilidade de recuperar o ácaro na coluna de extração do kit após o processo de extração do DNA, o que é de considerável importância, pois possibilita a preservação do espécime para estudos posteriores, bem como a extração individual de DNA total, assegurando que o material obtido seja exclusivamente proveniente daquele indivíduo.

Esta pesquisa contribui para o entendimento da diversidade de ectoparasitos em morcegos no RS, fornecendo *insights* sobre a interação entre esses artrópodes, hospedeiros e a potencial transmissão de patógenos na região. Os dados aqui apresentados têm implicações importantes não apenas para a pesquisa científica, mas também para a saúde pública e estratégias de controle de doenças transmitidas por ectoparasitos.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR Gustavo Marins de; VILELA Maurício Luiz; LIMA Rosimar Baptista. Ecology of the sandflies of Itaguaí, an area of cutaneous leishmaniasis in the State of Rio de Janeiro. Food preferences (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.82, p. 583-584, 1987.
- AKHOUNDI et al. *Leishmania* infections: Molecular targets and diagnosis. **Molecular Aspects of Medicine**, New York, v.57, p. 1-29, 2017.
- ALMEIDA, J. C.; GETTINGER, D. D. Spinturnicidae in Catálogo Taxonômico da Fauna do Brasil. **PNUD**. Disponível em: <http://fauna.jbrj.gov.br/fauna/faunadobrasil/2529>, 2018. Acesso em 20 nov. 2020.
- AMARAL, R. B., E. C. LOURENÇO, K. M. FAMADAS, A. B. GARCIA, R. Z. MACHADO, AND M. R. ANDRE. Molecular detection of *Bartonella* spp. and *Rickettsia* spp. in bat ectoparasites in Brazil. **PLoSOne** 13: e0198629, 2018.
- AÑEZ, N., et al. Predominance of lineage I among *Trypanosoma cruzi* isolates from Venezuela patients with different clinical profiles of acute Chagas disease. **Trop. Med. Int. Health** 9 (12), 1319–1326, 2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15598264/>. Acesso em 15 out. 2023.
- AÑEZ, N. et al. *Trypanosoma cruzi* congenital transmission in wild bats. **Acta Tropica**, v 109, 1, 2009. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001706X08002180>. Acesso em 15 out. 2023.
- BARROS-BATTESTI, D. M.; ARZUA, M.; BECHARA, G.H. **Carrapatos de importância médico veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies**. São Paulo: Vox : ICTTD-3 : Butantan, 223 p., 2006.
- BARROS, M.N.D.; RIET-CORREA, F.; AZEVEDO, S.S.; LABRUNA, M.B. Off-host development and survival of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in the Brazilian semiarid. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports** 9:17–24, 2017.
- BIANCHI, T. F. et al. Validation of a documentar on Chagas disease by a population living in an endemic area. **Braz J Biol.** 81 (3), 2021. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/bjb/a/DwgsxnrDHqMBXfKtTfp8fZK/abstract/?lang=en#>. Acesso em 20 out. 2023.
- BECK, A. J. **Factors affecting the density and occurrence of ectoparasites of bats**. (Ph.D. THESIS) University of California, Davis, 1966.

- BEDIN, C. et al. Vigilância ambiental: doença de Chagas no Rio Grande do Sul. **Bol. Epidemiol.** 11; 1-8, 2009. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/312630269_Vigilancia_ambiental_Doenca_de_Chagas_no_Rio_Grande_do_Sul. Acesso em 18 de out. 2023.
- BEDIN, C., et al. Residual foci of *Triatoma infestans* infestation: surveillance and control in Rio Grande do Sul, Brazil, 2001-2018. **Rev Soc Bras Med Trop.** 2021;54:e0530-2020, 2021. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rsbmt/a/tFTrhsdkkwY8VxwTPLVrdrx/>. Acesso em 20 nov. 2023.
- BOCK, R., JACKSON, L., DE VOS, A., JORGENSEN, W. Babesiosis of cattle. **Parasitology**, 129, S247–S269, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S0031182004005190>. Acesso em 18 jul 2022.
- BOSCO-LAUTH, A. M., et al. Experimental infection of domestic dogs and cats with SARS-CoV-2: Pathogenesis, transmission, and response to reexposure in cats. **PNAS**, v. 117, no. 42, 2020. Disponível em: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.2013102117. Acesso em 05 jan. 2021.
- BRASIL. Morcegos em áreas urbanas e rurais: Manual de Manejo e Controle. 2 ed., Brasília: **Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde**, 1998, 117 p. Disponível em: <http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILACS&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=291552&indexSearch=ID>. Acesso em 19 nov. 2020.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Imunização e Doenças Transmissíveis – DEIDT. Boletim Epidemiológico, 2021 - **Doenças tropicais negligenciadas**. Número Especial. Mar. 2021.76p.
- BRASIL. Guia de Vigilância em saúde: Febre maculosa Brasileira e outras riquetsioses. **Ministério da Saúde**, 2016. Disponível em: <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2016/dezembro/31/GVS-Febr-Maculosa.pdf>. Acesso em 10 nov. 2021.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Inovação, Desenvolvimento Rural e Irrigação. Avaliação seletiva de bovinos para o controle do carrapato *Rhipicephalus microplus*. Brasília: **MAPA**, 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/producao-animal/arquivos-publicacoes-bem-estar-animal/CARRAPATOS2.pdf>. Acesso em 15 jul 2023.
- CABRAL, A. D, et al. First isolation and genotyping of *Toxoplasma gondii* from bats (Mammalia: Chiroptera). **Veterinary Parasitology**. 2013; 193: 100-104. Disponível em <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401712005997>. Acesso em 20 nov. 2020.

CALISHER, C. H., et al. Bats: Important Reservoir Hosts of Emerging Viruses. **Clinical Microbiology Reviews** 19(3):531-545. 2006. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1539106/>. Acesso em 20 nov. 2020.

CAMARGO, M. E. et al. Inquérito sorológico de prevalência da infecção chagásica no Brasil, 1975/1980. **Rev Inst Med Trop São Paulo**. 26 (4):192-204, 1984. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rimts/a/DktJNWLR8QwfbsfmvjlXlTh/>. Acesso em 15 out. 2023.

CAMPBELL, F., et al. Cardiovascular effects of the toxin(s) of the Australian paralysis tick, *Ixodes holocyclus*, in the rat. **Toxicon**. 2004; 43: 743-750. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15284008/>. Acesso em 21 nov. 2020.

CASTRO, Ludiele Souza; DORVAL, Maria Elizabeth Cavalheiros; MATHEUS, Larissa Maria Dávalo; BEDNASKI, Aline Viana; FACCO, Gilberto Gonçalves; SILVEIRA, Maurício, SANTOS, Carolina Ferreira; GONTIJO, Célia Maria Ferreira; OLIVEIRA, Ana Paula Garcia, FERREIRA, Eduardo de Castro. *Leishmania* presence in bats in areas endemic for leishmaniasis in central-west Brazil. **International Journal for Parasitology Parasites Wildlife**, v.11, p.261–267, 2020.

CICUTTIN, G. L. et al. *Neorickettsia risticii*, *Rickettsia* sp. and *Bartonella* sp.in *Tadarida brasiliensis* bats from Buenos Aires, Argentina. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28673455/>. Acesso em 21 abr. 2021.

COLÍN-MARTÍNEZ, H., et al. Epizootic Fauna Survey on Phyllostomid Bats (Chiroptera: Phyllostomidae) in a Shaded Coffee Plantation of Southeastern Chiapas, Mexico. **Journal of Medical Entomology**, 2017, 1–11. Disponível em <https://academic.oup.com/jme/advance-article-abstract/doi/10.1093/jme/tjx186/4653542>. Acesso em 10 nov. 2021.

COSTA, Andréa Pereira da; COSTA, Francisco Borges; SOARES, Herbert Sousa; RAMIREZ, Diego Garcia; MESQUITA, Eric Takashi Kamakura de Carvalho; GENNARI, Solange Maria; MARCILI, Arlei. *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania infantum chagasi* infection in wild mammals from Maranhão state, Brazil. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v.15, n.11, p. 656-666, 2015.

COSTA, Jackson M.L. Epidemiologia das leishmanioses no Brasil. **Gazeta Médica da Bahia**, v.75, n.1, p3-17, 2005.

COSTA LIMA, A. Insetos do Brasil. **Escola Nacional de Agronomia**. Série didática, 2º Tomo, n. 3, 1940. Disponível em: <http://www.ufrj.br/institutos/ib/ento/tomo02.pdf>. Acesso em 15 nov. 2020.

COURA, J. R., et al. Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. **Trends Parasitol.** 18, 171–176, 2002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11998705/>. Acesso em 15 out 2023.

CUROTTO, S. M. et al. Malária em mamíferos silvestres. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zootecnia da UNIPAR** 15(1):67-77. 2012. Disponível em: <https://revistas.unipar.br/index.php/veterinaria/article/view/4169>. Acesso em 19 nov. 2020.

DARIO, M. A. et al. High *Trypanosoma* spp. diversity is maintained by bats and triatomines in Espírito Santo state, Brazil. **PLOS ONE** 12(11): e0188412, 2017. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article/citation?id=10.1371/journal.pone.0188412>. Acesso em 14 jul. 2023.

D'AURIA, S.R. et al. Serologic survey for rickettsiosis in bats from São Paulo city, Brazil. **Vector Borne Zoonotic Dis.** 2010;10(5):459–63. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19877815/>. Acesso em 20 jan. 2022.

DESQUESNES, M. et al. Detection and identification of *Trypanosoma* of African livestock through a single PCR based on internal transcribed spacer 1 of rDNA. **Int J Parasitol.** 1;31(5-6):610-4, 2001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11334950/>. Acesso em 18 set. 2023.

DICK, C. W; PATTERSON, B. D. Bat flies: Obligate ectoparasites of bats. *In* **Micromammals and macroparasites: From evolutionary ecology to management.** Chapter: Bat flies: obligate ectoparasites of bats. Ed. Springer-Verlag, 179-194, 2006. Disponível em https://www.researchgate.net/publication/235979440_Bat_fliesobligate_ectoparasites_of_bats/link/00b7d51520e1c47834000000/download. Acesso em 10 out. 2020.

DIETRICH, M. et al. Diversity of *Bartonella* and *Rickettsia* spp. in bats and their blood-feeding ectoparasites from South Africa and Swaziland. **PLoS ONE** 11(3): e0152077. doi:10.1371/journal.pone.0152077. 2016. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0152077>. Acesso em 10 nov. 2021.

DOVE, W; SHELMIRE, B. Tropical rat mites *Liponyssus bacoti* Hirst, vectors of endemic typhus. **J. Amer. Med. Assn.** XCVII, 21:1506, 1931.

DURDEN L.A. et al. Ectoparasites mites (Acari) of sympatric Brazilian free-tailed bats and big brown bats in Alabama. **Journal of Medical Entomology.** 29(2):507-511, 1992. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1625301/>. Acesso em 8 set. 2023.

FAIN, A. Adaptation, specificity and host-parasite coevolution in mites (ACARI). **International Journal for Parasitology.** 24(8): 1273-1283, 1994. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0020751994901945?via%3Dihub>. Acesso em 20 ago. 2023.

FAIN, A, LUKOSCHUS, F.S. Parasitic mites of Surinam. XVIII. Mites of the genera *Notoedres* and *Chirnyssoides* from bats (Sarcoptiformes: Sarcoptidae). **Bull Ann Soc Roy Entomol Belgique.** 107: 298-313, 1971. Disponível em:

<https://research.itg.be/en/publications/parasitic-mites-of-surinam-xviii-mites-of-the-genera-notoedres-an>. Acesso em 18 out. 2023.

FENTON, M. B. **Bats**. New York: Facts on File, Inc., 1992. 207 p.

FERREIRA, Eduardo Castro; PEREIRA, Inês Antônio Sampaio; SILVEIRA, Maurício; MARGONARI, Carina; MARCON, Glaucia Elisete Barbosa; FRANÇA, Adriana de Oliveira; CASTRO, Ludiele Souza; BORDIGNON, Marcelo Oscar; FISCHER, Erich; TOMÁS, Walfrido Moraes; DORVAL, Maria Elizabeth Cavalheiros; GONTIJO, Célia Maria Ferreira. *Leishmania (V.) braziliensis* infecting bats from Pantanal wetland, Brazil: First records for *Platyrrhinus lineatus* and *Artibeus planirostris*. **Acta Tropical**, v.172, p. 217-222, 2017.

FINDLEY, J. S. **Bats: A Community Perspective**. 1st ed. New York: Cambridge University Press; 1993.

FONSECA, F. Monograph of the general and species of Macronyssidae Oudemans, 1936 (synom.: Liponyssidae Vitzthum, 1931) (Acari). **Proc. Zool. Soc. Lond.** 118: 249–334, 1948.

FOSTER, G.W.; MERTINS, J.W. Parasitic Helminths and Arthropods from Brazilian Free-Tailed Bats (*Tadarida brasiliensis cynocephala*) in Florida. **J. Helminthol. Soc. Wash.** 63(2), 1996.

FRANK, R., MÜNSTER, J., SCHULZE, J., LISTON, A., KLIMPEL, S. Macroparasites of Microchiroptera: bat ectoparasites of Central and South America. In: Klimpel S, Mehlhorn H. Bats (Chiroptera) as Vectors of Diseases and Parasites. **Parasitology Research Monographs**. Volume 5. Berlin: Springer Verlag; 87-130, 2014.

FURMAN, D. P. The spinturnicid mites of Panama (Acarina: Spinturnicidae). In: Wenzel RL, Tipton VJ. **Ectoparasites of Panama** Editado; Chicago: Field Museum of Natural History; 1966. 125-166. Disponível em: <https://www.biodiversitylibrary.org/page/2651605#page/140/mode/1up>. Acesso em 20 nov. 2020.

GAY, N. et al. Parasite and viral species richness of Southeast Asian bats: Fragmentation of area distribution matters. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**. v. 3: 161-170, 2014. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213224414000212>. Acesso em 21 nov. 2020.

GARBINO, G. S. T., GREGORIN, R., LIMA, I.P., LOUREIRO, L., MORAS, L., MORATELLI, R., NOGUEIRA, M.R., PAVAN, A.C., TAVARES, V.C., NASCIMENTO, M.C., NOVAES, R.L.M., PERACCHI, A.L. **Updated checklist of Brazilian bats: versão 2020**. Comitê da Lista de Morcegos do Brasil—CLMB. Sociedade Brasileira para o Estudo de Quirópteros (Sbeq). Disponível em: <http://www.sbeq.net/updatelist>. Acesso em 25 nov. 2020.

GARDNER, R. A; MOLYNEUX, D. H. *Babesia vesperuginis*: natural and experimental infections in British bats (Microchiroptera). **Parasitology**. v. 95: 461-469, 1987. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/journals/parasitology/article/abs/babesia-vesperuginis->

natural-and-experimental-infections-in-british-bats-microchiroptera/E0E638EF2A039C8013737A80AD1A4F81#. Acesso em 20 nov. 2020.

GAUSS, C. L. B.; FURLONG, J. Comportamento de larvas de *Boophilus microplus* em pastagens de *Brachiaria decumbens*. **Ciência Rural**, 32(3):467-72, 2002. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cr/a/p9XjB6WbSGYrZ8WR9PnKCC/abstract/?lang=pt#>. Acesso em 18 jul 2022.

GEORGE, J.E., DAVEY, R.B., POUND, J.M. Introduced ticks and tick-borne diseases: the threat and approaches to eradication. **Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.** 18, 401–16, vi, 2002.

GÓMEZ-HERNÁNDEZ, César; BENTO, Elaine C.; REZENDE-OLIVEIRA, Karine; NASCENTES, Gabriel An; BARBOSA, Cecília G.; BATISTA, Lara R.; TIBURCIO, Monique G. S.; PEDROSA, André L.; LAGES-SILVA, Eliane; RAMÍREZ, Juan D.; RAMIREZ Luis E. *Leishmania infection* in bats from a non-endemic region of Leishmaniasis in Brazil. **Parasitology**, v.144, p.1980–1985, 2017.

GONZALES, J. C. **O controle dos carrapatos dos bovinos**. Porto Alegre: Sulina, 1975. 104 p.

GONZALES, J. C. **O controle do carrapato do boi**. 2. ed. Porto Alegre: Edição do Autor, 1995. 235 p.

GONZALES, J. C.; SILVA, N. R.; WAGNER, E. M. O ciclo parasitário do *Boophilus microplus* em bovinos estabulados. **Arq. Fac Vet UFRGS** 2:25-34, 1974.

GRACIOLLI, G. et al. Artrópodos Ectoparasitos de Morcegos no Brasil. In: Pacheco S, Marques RVE, Esbérard CEL. **Morcegos no Brasil: Biologia, Sistemática, Ecologia e Conservação**. Porto Alegre: Armazém Digital, 115-138, 2008.

GRACIOLLI, G. Nycteribiidae (Diptera, Hippoboscoidea) no Sul do Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**. 21(4): 971-985, 2004. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbzool/a/ZTqVZPKqNhQ7QrdRM4mLxsd/?lang=pt>. Acesso em 15 dez. 2020.

GRACIOLLI, G. Streblidae in Catálogo Taxonômico da Fauna do Brasil. **PNUD**. 2018a. Disponível em: <http://fauna.jbrj.gov.br/fauna/faunadobrasil/2624>. Acesso em 17 nov. 2020.

GRACIOLLI, G. Nycteribiidae in Catálogo Taxonômico da Fauna do Brasil. **PNUD**. 2018b. Disponível em: <http://fauna.jbrj.gov.br/fauna/faunadobrasil/1145>. Acesso em 17 nov. 2020.

GRACIOLLI, G.; RUI, A. M. Streblidae (Diptera, Hippoboscoidea) em morcegos (Chiroptera, Phyllostomidae) no nordeste do Rio Grande do Sul, Brasil. **Iheringia, Sér. Zool.**

Porto Alegre, (90): 85-92, 2001. Disponível em:

<https://www.scielo.br/pdf/isz/n90/a09n90.pdf>. Acesso em 18 nov. 2020.

GREENHALL, A. M. et al. *Desmodus rotundus*. **Mamm Species**, 202: 1-6p, 1983.

Disponível em: <https://academic.oup.com/mspecies/article/doi/10.2307/3503895/2600261>.

Acesso em nov. 2023.

GUZMAN-CORNEJO, C. et al. Parasites of *Tadarida brasiliensis mexicana* (Chiroptera: Molossidae) from Arid Regions of Mexico. **Comp. Parasitol.** 70 (1), 2003, pp. 11–25.

Disponível em: [https://www.bioone.org/doi/full/10.1654/1525-](https://www.bioone.org/doi/full/10.1654/1525-2647%282003%29070%5B0011%3APOTBMC%5D2.0.CO%3B2)

[2647%282003%29070%5B0011%3APOTBMC%5D2.0.CO%3B2](https://www.bioone.org/doi/full/10.1654/1525-2647%282003%29070%5B0011%3APOTBMC%5D2.0.CO%3B2). Acesso em 10 nov. 2021.

HAMILTON, P. B., et al. The evolution of *Trypanosoma cruzi*: the 'bat seeding' hypothesis. **Trends Parasitol.** 28: 136e141, 2012. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22365905/>. Acesso em 18 set. 2023.

HODO, C.L. et al. Trypanosome species, including *Trypanosoma cruzi*, in sylvatic and peridomestic bats of Texas, USA. **Acta Trop.**, 164:259–266, 2016. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27647574/>. Acesso em out. 2023.

HORNOK, S. Molecular detection of vector-borne bacteria in bat ticks (Acari: Ixodidae, Argasidae) from eight countries of the Old and New World set al. **Parasites & Vectors** (2019) 12:50. Disponível em:

<https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-019-3303-4>. Acesso em 10 nov. 2021.

HORTA M. C., et al. Prevalence of antibodies to spotted fever group rickettsiae in humans and domestic animals in a Brazilian spotted fever-endemic area in the state of São Paulo, Brazil: serologic evidence for infection by *Rickettsia rickettsii* and another spotted fever group Rickettsia. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 71(1):93-97. 2004. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15238696/>. Acesso em 18 out. 2023.

JONGEJAN, F., UILENBERG, G. The global importance of ticks. **Parasitology**, 129, S3, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S0031182004005967>. Acesso em 17 jul 2022.

KALKO, E. K. V. Neotropical leaf-nosed bats (Phyllostomidae): Whispering bats or candidates for acoustic survey? In: Brigham M, Jones G, Kalko EK V, editors. **Bat Echolocation Research**, 2002. 63-69p.

KRASNOV, B.R. et al. Patterns of macroparasite diversity in small mammals, p. 197-231. In: Morand S., Krasnov B.R., Poulin R. **Micromammals and Macroparasites. From Evolutionary Ecology to Management**. Japan: Springer Verlag, 197-231p., 2006.

LABRUNA, M. B. Ecology of *Rickettsia* in South America. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1166, p. 156-166, 2009. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19538276/>. Acesso em 17 mar. 2021.

LABRUNA, M. B., et al. *Rickettsia* species infecting *Amblyomma cooperi* ticks from an area in the state of São Paulo, Brazil, where Brazilian spotted fever is endemic. **J Clin Microbiol.** 42(1):90-8, 2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14715737/>. Acesso em 17 mar. 2021.

LANGONI, Hélio. Leishmanioses. In: MEGID, Jane; RIBEIRO, Márcio Garcia; PAES, Antonio Carlos. **Doenças infecciosas em animais de produção e de companhia**. 1. ed. Rio de Janeiro: Roca, p. 1013 – 1024, 2016.

LAVOPIERRE, M. M. J.; BECK, A. J. Feeding mechanism of *Chiroptonyssus robustipes* on the transilluminated bat wing. **Experimental parasitology** 20, 312-320, 1967. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6073595/>. Acesso em 27 jun. 2023.

LAVOPIERRE, M. M. J.; BECK, A. J. Host-parasite relationships of acarine parasites and their vertebrate hosts. II. Lesions produced by myobiid mites in the skin of their hosts. **Acta Trop.** 27(2):146-64, 1970. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4395823/>. Acesso em 27 jun. 2023.

LIMA L. et al. New insights into the evolution of the **Trypanosoma cruzi** clade provided by a new trypanosome species tightly linked to Neotropical *Pteronotus* bats and related to an Australian lineage of trypanosomes. **Parasit Vectors**, 8: 657, 2015. Disponível em: <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-015-1255-x>. Acesso em 20 ago. 2023.

LINARDI, P. M; GUIMARÃES, L. R. Sifonápteros do Brasil. São Paulo: **Museu de Zoologia USP/FAPESP**, 291p., 2000. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/mioc/v98n3/a26v98n3.pdf>. Acesso em 27 set. 2017.

LIU, W.T. Isolation of typhus rickettsiae from rat mites, *Liponyssus bacoti*, in Peiping. **Am J Hyg.**, 45(1):58-66, 1947.

LOURENÇO, E.C. et al. New record, host and localities of bat mite of genus *Chirnyssoides* (Acari, Sarcoptiformes, Sarcoptidae). **Rev Bras Parasitol Vet.** Apr-Jun 22(2):260-4, 2013. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbpv/a/5Q4BkC7pKGWxWCmRhVkkLM/?lang=en>. Acesso em 20 out. 2023.

LUQUE, J. L.; POULIN, R. Metazoan parasite species richness in Neotropical fishes: hotspots and the geography of biodiversity. **Parasitology**, v. 134, n. 6, p. 865-878, 2007. Disponível em <https://www.cambridge.org/core/journals/parasitology/article/abs/metazoan-parasite-species-richness-in-neotropical-fishes-hotspots-and-the-geography-of-biodiversity/F0A31791871F4D53C2CB771B60F811CD#>. Acesso em 22 nov. 2020.

McCRACKEN, G. F. Estimates of population sizes in summer colonies of Brazilian free-tailed bats (*Tadarida brasiliensis*). In: O'Shea TJ, Bogan MA, editors. **Monitoring Trends in Bat Populations of the U.S. and Territories: Problems and Prospects**. United States Geological Survey, Biological Resources Discipline, Information and Technology Report;

2003. pp. 21±30. Disponível em: <https://pubs.usgs.gov/itr/2003/0003/report.pdf>. Acesso em 22 nov. 2023.

MARINKELLE, C. J. The biology of trypanosomes of bats. In: Lumsden, W.H.R., Evans, D.A. (Eds.), **Biology of the Kinetoplastida**, vol. 1. Academic Press, London, New York, San Francisco, pp. 175–216, 1976.

MARINKELLE, C. J. Developmental stages of *Trypanosoma cruzi*-like flagellates in *Carvenicola pilosa*. **Rev Biol Trop**. 30: 107–111, 1982. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6820697/>. Acesso em 15 out. 2023.

MARSHALL, A. G. Ecology of insects ectoparasitic on bats. In: Kunz TH. **Ecology of bats**. New York: Plenum; 1982. 369-401. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4613-3421-7_10. Acesso em 22 nov. 2020.

MATEI, I. A. et al. *Rickettsia* spp. in bats of Romania: high prevalence of *Rickettsia onacensis* in two insectivorous bat species. **Parasites Vectors** (2021) 14:107. Disponível em: <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-021-04592-x>. Acesso em 29 out 2023.

MAXFIELD, Luke; CRANE, Jonathan S. **Leishmaniasis**. [Updated 2022 Oct 12]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK531456/> Acesso em 21dez 2022.

MELO, L. C. V. et al. **Prevalência de zoonoses parasitárias em morcegos do município de São Paulo, Brasil**. (MESTRADO). Instituto Adolfo Lutz. São Paulo, SP, Brasil. Área de Concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública – Programa de Pós-graduação em Ciências. 2008.

MELLO, E. M. **Interações taxonômicas entre parasitos e morcegos de alguns municípios do estado de Minas Gerais** (TESE). Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2017, 355p. Disponível em <http://www.parasitologia.icb.ufmg.br/defesas/454D.PDF>. Acesso em 20 mai. 2020.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Doenças tropicais negligenciadas. **Boletim Epidemiológico** - Secretaria de Vigilância em Saúde. Número Especial. Mar. 2021.

MONTEIRO, S. G., et al. Primeiro registro de *Rhynchopsylluspulex* (Siphonaptera: Tungidae) em *Nyctinomops laticaudatus* (Chiroptera: Molossidae) no Brasil. **Ciência Rural**, 35: 956-957, 2005. Disponível em https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782005000400037. Acesso em 22 nov. 2020.

MONTEIRO, S.G. **Parasitologia na Medicina Veterinária**, 2, ed- Rio de Janeiro, Roca, 2017. 370p.

MONTILLA, M.M. et al. Isoenzyme clustering of Trypanosomatidae Colombian populations. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 66, 394–400, 2002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12164294/>. Acesso em 15 out. 2023.

MORAES, L. M., L. F. BERNARDI, G. GRACIOLLI, AND R. GREGORIN. Bat flies (Diptera: Streblidae, Nycteribiidae) and mites (Acari) associated with bats (Mammalia: Chiroptera) in a high-altitude region in southern Minas Gerais, Brazil. **Acta Parasitol.** 58: 556–563, 2013.

MORATELLI, R; CALISHER, C. H. Bats and zoonotic viruses: can we confidently link bats with emerging deadly viruses? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 110, 2015, v. 1, 1-22p. Disponível em https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762015000100001. Acesso em 22 nov. 2020.

MORRISON, Amy C; FERRO, Cristina; TESH, Robert B. Host preferences of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* at an endemic focus of American visceral leishmaniasis in Colombia. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** v.49, n.1, p. 68-75, 1993.

MUÑOZ, L., AGUILERO, M., CASANUEVA, M. E. Prevalencia e intensidad de ectoparasitos asociados a *Tadarida brasiliensis* (geoffroy saint-hilaire, 1824) (chiroptera: molossidae) en concepcion. **Gayana** 67(1): 1-8, 2003. Disponível em: https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-65382003000100001. Acesso em 27 abr. 2021.

MUÑOZ, P., F. FREDES, E. RAFFO, D. GONZÁLEZ-ACUÑA, L. MUÑOZ, AND C. CID. New report of parasite-fauna of the free-tailed bat (*Tadarida brasiliensis*, Geoffroy, 1824) in Chile. **Vet. Res. Commun.** 35: 61–66, 2011.

NEUWEILER, G. **The biology of bats**. New York: Oxford University Press, 2000, 310p.

NIERI-BASTOS, F. A., M. B. LABRUNA, A. MARCILI, L. A. DURDEN, L. MENDOZA-URIBE, AND D. M. BARROS-BATTESTI. Morphological and molecular analysis of *Ornithonyssus* spp. (Acari: Macronyssidae) from small terrestrial mammals in Brazil. **Exp. Appl. Acarol.** 55: 305–327, 2011.

NOVAKOVA, M. et al. *Rickettsia vini* n. sp. (Rickettsiaceae) infecting the tick *Ixodes arboricola* (Acari: Ixodidae). **Parasites & Vectors**, 9:469, 2016. Disponível em: <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-016-1742-8>. Acesso em 10 mar. 2021.

OLIVEIRA, Fernanda Müller de; COSTA, Luis Henrique Camargo; BARROS, Thainá Landim de; ITO, Pier Rauschkolb Katsuda; COLOMBO, Fábio Antonio; CARVALHO, Cristiano de; PEDRO, Wagner André; QUEIROZ, Luzia Helena; NUNES, Cáris Maroni. First detection of *Leishmania* spp. DNA in Brazilian bats captured strictly in urban areas. **Acta tropica**, v. 150, p. 176-181, 2015.

OMS – Organização Mundial da Saúde. **Publicações**, 2017. Disponível em: <http://www.who.int/eportuguese/countries/bra/pt/>. Acesso em 12 nov. 2020.

OTTO J. C.; WILSON, K. J. Assessment of the usefulness of ribosomal 18S and mitochondrial COI sequences in Prostigmata phylogeny. In: Proctor H. C., Norton R. A., Colloff M. J. *Acarology: Proceedings of the 10th International Congress*. Melbourne: **CSIRO Publishing**, p. 100-109, 2001.

OVAZZA, M. Quelques observations sur la biologie et plus particulièrement le cycle de *Liponyssus bacoti* Hirst, 1913. **Annals of Parasitology**, XXV, 3, 1950.

PACHECO, S. M. Chiroptera, p. 175-176, 244, 254. In: Weber MM, Roman C, Cáceres NC (Org.). **Mamíferos do Rio Grande do Sul**. Santa Maria, Editora da UFSM, 2013, 554p.

PADDOCK, C. D., et al. *Rickettsia parkeri*: a newly recognized cause of spotted fever rickettsiosis in the United States. **Clin. Infect. Dis.** 38(6):805-811. 2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14999622/>. Acesso em 18 nov. 2023.

PAGE, K. et al. Reducing Baylisascaris procyonis Roundworm Larvae in Raccoon Latrines. **Emerging Infectious Diseases**. v.17, n.1, p.90-93, 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3204634/>. Acesso em 21 nov. 2020.

PAIZ, Laís Moraes; FORNAZARI, Felipe; MENOZZI, Benedito Donizete; OLIVEIRA, Gabriela Capriogli; COIRO, Carla Janeiro; TEIXEIRA, Carlos Roberto; SILVA Valdinei Moraes Campanucci da; DONALISIO, Maria Rita; LANGONI, Helio. Serological Evidence of Infection by *Leishmania (Leishmania) infantum* (Synonym: *Leishmania (Leishmania) chagasi*) in Free-Ranging Wild Mammals in a Nonendemic Region of the State of São Paulo, Brazil. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases** v.15, p.667–673, 2015.

PAROLA, P. et al. Tick-borne Rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. **Clinical microbiology reviews**. v. 4 (18):719-56. 2005. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/CMR.18.4.719-756.2005>. Acesso em 10 nov. 2021.

PATRÍCIO, P. M. P. et al. Host morphophysiological conditions and environment abiotic factors correlate with bat flies (Streblidae) prevalence and intensity in *Artibeus* Leach, 1821 (Phyllostomidae). **Ciência Rural** 46(4):648-653, 2016. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cr/a/rrCbznBBXNBg47qPkrGNLk/?lang=en>. Acesso em 18 out. 2023.

PERACCHI, A. L. et al. Ordem Chiroptera. In: **Mamíferos do Brasil**. Londrina: Universidade Estadual de Londrina, p. 153-230, 2006. Disponível em <http://www.uel.br/pos/biologicas/pages/arquivos/pdf/Livro-completo-Mamiferos-do-Brasil.pdf>. Acesso em 20 mai. 2020.

PESENTI, T.C. et al. Geographic variation in ectoparasitic mites diversity in *Tadarida brasiliensis* (Chiroptera, Molossidae). **Iheringia Sér. Zool.** 104, 451–456, 2014. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/isz/a/48tLp6sjKZRWdFFtxd4Q99y/abstract/?lang=pt>. Acesso em 20 ago. 2023.

PHILIP, C. B.; HUGHES, L. E. The tropical rat mite, *Liponyssus bacoti*, as na experimental vector of rickettsialpox. **The American Journal of Trop Med.**, 28,5,01948.

PINHEIRO, M. C. et al. Levantamento de enteroparasitos em morcegos através de técnica de centrífugo flutuação (Mammalia: Chiroptera) em área de floresta tropical. **Neotropical Helminthology**. v. 7, n. 1, p. 143-147, 2013. Disponível em <https://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/neohel/v7n1/pdf/a14v7n1.pdf>. Acesso em 15 jun. 2020.

PRESLEY, S.J.; WILLIG, M.R. Intraspecific patterns of ectoparasite abundances on Paraguayan bats: effects of host sex and body size. **Journal of Tropical Ecology**, 24(1): 75-83, 2008.

RADOVSKY, F. J. The *Macronyssidae* and *Laelapidae* (Acarina: Mesostigmata) parasitic on bats. **Univ. Calif. Publ. Entomol.** 46: 1–288. 1967. Disponível em: <https://academic.oup.com/ae/article/14/4/293/187974>. Acesso em 10 abr. 2022.

RADOVSKY, F. J. **Revision of genera of the parasitic mite family macronyssidae (Mesostigmata: Dermanyssoidea) of the world.** USA, Michigan, West Bloomfield, Indira Publishing House. 170 p., 2010.

RATZLAFF, F.R., FERNANDES, F.D., OSMARI, V., SILVA, D., VASCONCELOS, J.S.P., BRAUNIG, P., VOGEL, F.S.F., BOTTON, S.A., SANTOS, H.F., CARGNELUTTI, J.F., CALDART, E.T., CAMPOS, A., DE MELLO FILHO, J.A., SOARES, J.F., FAGUNDES-MOREIRA, R., WITT, A.A., PACHECO, S.M., SANGIONI, L.A. Prevalence and molecular detection of *Leishmania* spp. in bats from Rio Grande do Sul state, Brazil. **Parasitol Res**, 121(11):3193-3202, 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36048268/>. Acesso em 10 jan 2023.

REEVES, W. K. et al. Serologic survey of *Eptesicus fuscus* from Georgia, USA for *Rickettsia* and *Borrelia* and laboratory transmission of a *Rickettsia* by bat ticks. **J Vector Ecol.** 2006;31:386–9. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17249357/>. Acesso em 18 jun. 2021.

REEVES, W. K. et al. Ecology of bats, their ectoparasites, and associated pathogens on Saint Kitts Island. **J Med Entomol.** 2016;53:1218–25. Disponível em: <https://academic.oup.com/jme/article/53/5/1218/1751910>. Acesso em 18 jun. 2021.

REEVES, W. K. et al. *Rickettsia hoogstraalii* and a *Rickettsiella* from the bat tick *Argas transgaripepinus*, in Namibia. **J Parasitol.** v. 1;106(5):663-669. 2020. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33079998/>. Acesso em 10 nov. 2021.

REH, B. Dermatitis caused by the bat mite, *chiroptonyssus robustipes* (Ewing), in California. **Journal of medical entomology**, volume 11, issue 4, 498 p. 1974. Disponível em: <https://academic.oup.com/jme/article-abstract/11/4/498/2219092>. Acesso em 10 nov. 2021.

REIS, N. R. et al. **Morcegos do Brasil**. Londrina: Universidade Estadual de Londrina, 2007, 253p. Disponível em http://www.uel.br/pos/biologicas/pages/arquivos/pdf/Morcegos_do_Brasil.pdf. Acesso em 15 abr. 2020.

REZENDE, M.B. de; HERRERA, H.M.; CARVALHO, C.M.E.; ANJOS, E.A.; RAMOS, C.A.N; ARAÚJO, F.R.; TORRES, J.M.; OLIVEIRA, Carina Elisei. Detection of *Leishmania* spp. in bats from an area of Brazil endemic for visceral leishmaniasis. **Transboundary and Emerging Diseases** v.64, n.6, p.e36-e42, 2017.

RIO GRANDE DO SUL. **Guia de Manejo e Controle de Morcegos: Técnicas de Identificação, Captura e Coleta**. 2 ed. Porto Alegre: CEVS/RS, 2018, 140 p. Disponível em: <https://cevs-admin.rs.gov.br/upload/arquivos/201909/24093745-2018-guia-morcegos.pdf>. Acesso em 10 nov. 2020.

RUDAKOV, N. V., SHPYNOV, S.N., SAMOILENKO, I.E., TANKIBAE, M.A. Ecology and epidemiology of spotted fever group rickettsia and new data from their study in Russia and Kazakhstan. **Ann NY Acad Sci**, v. 990, p.12–24, 2003.

RUI, A. M.; GRACIOLLI, G. Moscas ectoparasitas (Diptera, Streblidae) de morcegos (Chiroptera, Phyllostomidae) no sul do Brasil: associações hospedeiros-parasitas e taxas de infestação. **Revista Brasileira de Zoologia**. 22(2): 438-445, 2005. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbzool/a/TBDR4zYbp7LNBpMTbm4XdHH/>. Acesso em 10 mar. 2021.

SANGIONI, L. A., et al. Rickettsial infection in Cerro Largo, State of Rio Grande do Sul, Brazil. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** 63(2):511-514. 2011. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abmvz/a/GdxLv5g4VBV8Z6GqpdQSzgf/>. Acesso em 27 mai. 2021.

SANGSTER, C. R. Systemic toxoplasmosis in captive flying-foxes. **Australian Veterinary Journal**. 2012; 90: 140-142. Disponível em: <http://era.daf.qld.gov.au/id/eprint/4050/>. Acesso em 17 mai. 2020.

SANT'ANNA, M.R.V. et al. Triatomines (Hemiptera, Reduviidae) blood intake: Physical constraints and biological adaptations. **J Insect Physiol**, 97:20-26, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27521585/>. Acesso em 18 set. 2023.

SAUNDERS, S. C. Venezuelan Macronyssidae (Acarina: Mesostigmata). **Brigh. Young. Univ. Sci. Bull.** 20: 75–90, 1975.

SAVANI, E. S. M. M. et al. Detection of *Leishmania (Leishmania) amazonenses* and *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in Brazilian bats. **Veterinary Parasitology**. 2009; 168(1-2): 5-10. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19939568/>. Acesso em 05 nov. 2020.

SAVANI, Elisa San Martin Mouriz; ALMEIDA, Marilene Fernandes de; CAMARGO, Maria Cecília Gibraíl de Oliveira; D'AURIA, Sandra Regina Nicoletti; SILVA, Miriam Martos Sodré; OLIVEIRA, Maria Lúcia de; SACRAMENTO, Débora. Detection of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in Brazilian bats. **Veterinary Parasitology**, v.168, p.5–10, 2010.

SCHMIDT, U.; MANSKE, U. Die Jugendentwicklung der Vampirfledermaus (*Desmodus rotundus*). **Z Saugetierkunde**, 38: 14-33, 1973. Disponível em: https://www.zobodat.at/pdf/Zeitschrift-Saeugetierkunde_38_0014-0033.pdf. Acesso em 18 nov. 2023.

SERRA-COBO, J. et al. European Bat Lyssavirus Infection in Spanish Bat Populations. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 4, p. 413-420, 2002. Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2730232/>. Acesso em 05 nov. 2020.

SHAPIRO, Julie Teresa; LIMA JUNIOR, Manoel Sebastião da Costa; DORVAL, Maria Elizabeth Cavalheiros; FRANÇA, Adriana de Oliveira; MATOS, Maria de Fátima Cepa; BORDIGNON, Marcelo Oscar. First record of *Leishmania braziliensis* presence detected in bats, Mato Grosso do Sul, southwest Brazil. **Acta tropica**, v. 128, n. 1, p. 171-174, 2013.

SILVA, A. B. et al. Panorama Epidemiológico de *Rickettsia* spp. no Brasil: Uma breve revisão. **Acta Tecnológica FAVALE**, 1. v.01, n.01, 2019.

SILVA, C. L. Novos registros de ácaros ectoparasitos (Acari, Spinturnicidae) de morcegos (Chiroptera, Phyllostomidae) no Rio Grande do Sul, Brasil. **Chiroptera Neotropical**. 2009; 15(2): 469-471. Disponível em: [https://www.bvs-vet.org.br/vetindex/periodicos/chiroptera-neotropical/15-\(2009\)-2/novos-registros-de-acaros-ectoparasitos-acari-spinturnicidae-de-morceg/](https://www.bvs-vet.org.br/vetindex/periodicos/chiroptera-neotropical/15-(2009)-2/novos-registros-de-acaros-ectoparasitos-acari-spinturnicidae-de-morceg/). Acesso em 05 jun. 2020.

SILVA, I. G.; SILVA, H. H. G. Suscetibilidade de 11 espécies de Triatomíneos (Hemiptera, Reduviidae) à cepa 'Y' de *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae). **Rev Bras Entomol**. 1993;37:459-63, 1993. Disponível em: <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/19950506982>. Acesso em 20 out. 2023.

SILVA, J. C. M. et al. Pesquisa de *Rickettsia*, *Ehrlichia* e *Anaplasma* em ectoparasitas coletados em cães no Distrito Federal, no ano de 2015. **Relatório final de pesquisa de Iniciação Científica apresentado à Assessoria de Pós-Graduação e Pesquisa pela**

Faculdade de Ciências da Educação e da Saúde – FACES. Centro Universitário De Brasília, DF, 2016. 32p.

SCHROEDER, C. L. C. et al. Bacterial small RNAs in the Genus *Rickettsia*. **BMC genomics**, v. 16, n. 1075, Dec. 2015. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1186/s12864-015-2293-7>. Acesso em 14 ago. 2022.

STEVENS, J. R. et al. The ancient and divergent origins of the human pathogenic trypanosomes, *Trypanosoma brucei* and *T. cruzi*. **Parasitology**, 118: 107e116, 1999. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10070668/>. Acesso em 14 set. 2023.

SZENTIVÁNYI, T. et al. Laboulbeniales (Fungi: Ascomycota) infection of bat flies (Diptera: Nycteribiidae) from *Miniopterus schreibersii* across Europe. **Parasit Vectors**, 11(1):395, 2018. Disponível em: <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-018-2921-6>. Acesso em 14 set. 2022.

TAYLOR, M. A.; COOP, R. L.; WALL R. L. **Parasitologia Veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017. 1052p.

TEIXEIRA, M. M. G. et al. *Trypanosoma cruzi* lineage I in endomyocardial biopsy from a north-eastern Brazilian patient at end-stage chronic chagasic cardiomyopathy. **Trop. Med. Intern. Health** 11 (3), 294–298, 2006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16553909/>. Acesso em 16 out. 2023.

THOMAS, M. E. et al. Experimental transmission of the parasitic flagellates *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* between triatomine bugs or mice and captive neotropical bats. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 102, 559–565, 2007. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/mioc/a/vZLCF8Zvjfhz5xZNS75JBgq/?lang=en>. Acesso em 15 out. 2023.

UIEDA, W. et al. **Guia das Principais Espécies de Morcegos Brasileiros**. 1 ed, Botucatu: Wilson Uieda, 2006.71p.

UIEDA, W.; BRED, A. Morcegos: agentes negligenciados da sustentabilidade. **Sustentabilidade em Debate** - Brasília, v. 7, n. 1, p. 186-209, jan/abr, 2016. Disponível em: <https://periodicos.unb.br/index.php/sust/article/view/15851/14149>. Acesso em 15 mai. 2020.

ULIANA, S. R. et al. Discrimination amongst *Leishmania* by polymerase chain reaction and hybridization with small subunit ribosomal DNA derived oligonucleotides. **J Eukaryot Microbiol** 41:324-330. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8087103/>. Acesso em 18 set. 2023.

WHITAKER, J. O. JR.; D. A. EASTERLA. Ectoparasites of bats from Big Bend National Park, Texas. **Southwest. Nat.** 20: 241–254, 1975.

WHITAKER, J. O. JR. et al. Collecting and preserving bat ectoparasites for ecological study. In Kunz, T. H., Parsons, S. (Eds) **Ecological and Behavioral Methods for the Study of Bats**. Johns Hopkins University Press, Baltimore, 2nd ed. 1988, 459–474p.

WILKINSON, G. S. et al. Non-kin cooperation in bats. **Phil Trans R Soc B**. 371: 20150095, 2016. Disponível em: <https://royalsocietypublishing.org/doi/epdf/10.1098/rstb.2015.0095>. Acesso em 4 nov. 2023.

VALENTE, S. A. et al. Analysis of an acute Chagas disease outbreak in the Brazilian Amazon: human cases, triatomines, reservoir mammals and parasites. **Trans R Soc Trop Med Hyg.**, 103(3):291-7, 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19118852/>. Acesso em 20 set. 2023.

XAVIER, S. et al. Distantiae transmission of *Trypanosoma cruzi*: a new epidemiological feature of acute Chagas disease in Brazil. **PLoS Negl Trop Dis**. 8(5): e2878, 2014. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0002878>. Acesso em 5 out. 2023.

YU, X. J.; WALKER, D. H. The Order Rickettsiales. In: M Dworkin, **The Prokaryotes: an Evolving Electronic Resource for the Microbiology Community**. Springer-Verlag, 3 ed., 2003.

ZHAO, S. et al. Rickettsiae in the common pipistrelle *Pipistrellus pipistrellus* (Chiroptera: Vespertilionidae) and the bat soft tick *Argas vespertilionis* (Ixodida: Argasidae). **Parasit Vectors**. 2020;13:1–6. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6953312/>. Acesso em 15 mai. 2020.